

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre INRS-Institut Armand-Frappier
Mai 2018

**Caractérisation du microbiome (bactéries et champignons)
associé au dendroctone du mélèze, *Dendroctonus simplex*
LeConte**

Par
Audrey-Anne Durand

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de *Philosophiæ Doctor* (Ph.D.) en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

Pr Philippe Constant
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Dr Richard Hogue
Institut de Recherche et de
Développement en Agroenvironnement

Examineur externe

Dr Richard Trudel
Institut National de Santé Publique du
Québec

Directeur de recherche

Pr Claude Guertin
INRS-Institut Armand-Frappier

Co-directeur de recherche

Pr Éric Déziel
INRS-Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Claude Guertin, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci pour tout le soutien et les encouragements au cours des années, pour toutes les discussions enrichissantes et pour m'avoir poussé à me surpasser. Merci d'avoir cru en mes capacités et d'avoir travaillé avec moi jour après jour pour la réussite de ce projet. Merci pour ta grande disponibilité et ton écoute. Ce fut un plaisir de travailler à tes côtés et j'en garderai de merveilleux souvenirs.

Merci également à mon codirecteur de recherche, Éric Déziel, de m'avoir épaulé tout au long de ce projet. Merci pour tous les conseils judicieux, pour ton écoute et ta patience. Tu as su développer mon esprit de microbiologiste. Merci pour toutes les ressources que tu as mises à ma disposition. Ce fut également un plaisir de travailler avec toi.

Un immense merci à Philippe Constant pour ta grande contribution à la réussite de ce projet. Merci pour tout le temps et les efforts que tu as mis dans mon encadrement, je t'en suis infiniment reconnaissante. Merci pour ta bonne humeur et pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons eues.

Un merci tout spécial à Fabrice et Marie-Christine. Merci pour tous ces moments passés avec vous, pour m'avoir transmis votre passion de la microbiologie, mais surtout, merci pour votre amitié. Vous avez rendu mon passage à l'INRS des plus agréables et je ne l'oublierai jamais. Merci pour toutes les réponses aux questions, les traductions et les conseils judicieux. Merci pour votre soutien et votre dévouement. Merci à mes collègues de laboratoire, présents et passés. Spécialement à Valentin Popa et Narin Srei pour toutes les discussions enrichissantes et animées.

J'aimerais également remercier Patrick, pour ta patience infinie et ton amour. Merci de m'avoir encouragé et soutenu à travers l'ensemble de mon parcours. Merci d'avoir cru en moi. Merci pour ta compréhension et ton dévouement à mon égard, je n'aurais pas pu passer au travers sans toi. Merci pour ton calme légendaire et pour avoir su être ma douce moitié complémentaire.

Finalement, merci à mes parents, Jean Guy et Christiane, pour m'avoir transmis vos valeurs et votre amour des études. Vous m'avez toujours encouragé dans mes études et dans ma volonté à me surpasser. Merci pour le soutien, autant financier qu'émotionnel. Vous avez façonné la personne que je suis aujourd'hui et je vous en remercie. Rien de tout ceci n'aurait pu être accompli sans vous et je vous en serai éternellement reconnaissante. Merci d'avoir cru en mes capacités.

Merci d'avoir contribué à ma réussite

AVANT-PROPOS

Les trois premiers chapitres de cette thèse sont composés d'articles rédigés lors de mon doctorat. Ceux-ci révèlent la caractérisation du microbiome (bactéries et champignons) associé au dendroctone du mélèze. L'approche expérimentale permettant de récolter l'ensemble des microorganismes composant ce microbiome a d'abord été mise au point lors d'une première année d'étude à la maîtrise. Les protocoles expérimentaux ainsi que les résultats présentés dans cette thèse reposent donc sur les données récoltées avant le passage accéléré au doctorat. Dans un premier temps, la composition des communautés bactériennes associées au stade adulte a été observée. Par la suite, la composition des communautés fongiques et bactériennes, respectivement, a été caractérisée au cours du développement de l'insecte. Une synthèse du microbiome retrouvé chez cet insecte ainsi que plusieurs hypothèses sur les fonctions de ces microorganismes associés sont également proposées dans le dernier article.

Cette thèse comprend également un chapitre supplémentaire portant sur des résultats non publiés. En effet, pour pouvoir tester les différentes fonctions proposées, une étape de mise en culture de ces microorganismes a été réalisée. Les résultats s'y rattachant constituent le quatrième chapitre de cette thèse. Ces isolats pourront être utilisés lors de travaux futurs au sein du laboratoire.

Finalement, une conclusion générale de l'ensemble du projet ainsi que les perspectives sont proposées.

Une terminologie spécifique sera utilisée dans ce document. En effet, le terme holobionte sera employé afin de définir l'insecte ainsi que l'ensemble de ses microorganismes associés. Le terme microbiome sera utilisé afin de décrire l'ensemble des OTU (groupement de séquences nucléotidiques possédant une identité de 97% et plus) bactériens et fongiques associés à l'insecte. Finalement, le terme microbiote réfèrera à l'ensemble des microorganismes associés à l'insecte et leurs fonctions.

RESUME

Au Canada et dans le nord des États-Unis, le dendroctone du mélèze (*Dendroctonus simplex* LeConte) est un insecte causant d'importants dommages aux peuplements de mélèzes. Lorsque les populations sont endémiques, celui-ci s'attaque uniquement aux arbres affaiblis ou encore récemment morts. Cependant, lorsque les populations atteignent des seuils épidémiques, les adultes pionniers peuvent également s'attaquer aux arbres sains, entraînant la mort de plusieurs milliers de mélèzes. Plusieurs espèces d'insectes sont reconnues comme vecteurs d'une flore bactérienne et fongique, que l'on nomme microbiote. Ces microorganismes peuvent former un complexe symbiotique qui facilite l'établissement des insectes dans l'environnement subcortical de leur hôte, notamment par la dégradation des terpènes et l'affaiblissement du système de défense des arbres. Ce complexe serait également impliqué dans divers processus physiologiques chez les insectes, notamment au niveau de la nutrition ou encore de la protection contre certains microorganismes antagonistes. Afin de mieux comprendre l'établissement de l'insecte sous l'écorce et de trouver de nouvelles avenues de recherche en lutte biologique contre les populations de *D. simplex*, la caractérisation complète du microbiome associé à cet insecte a été entreprise.

Puisqu'il est connu que ces microorganismes peuvent se retrouver à la surface ou encore à l'intérieur de l'insecte, une approche expérimentale a été développée au laboratoire afin de différencier ces deux microbiotes (ecto- et endomicrobiote). Une grande diversité bactérienne et fongique a été identifiée lors de ce projet durant le cycle de développement de l'insecte. Dans un premier temps, il a été possible de constater que les microbiomes bactériens représentaient deux populations distinctes (ecto- vs endo-) chez les adultes pionniers, laissant croire à une certaine spécificité des fonctions. De plus, ces communautés se distinguent de celles des galeries, représentant le milieu immédiat de l'insecte. Par la suite, nous avons démontré que chez les adultes et les larves, les communautés fongiques sont fortement associées aux levures, alors que les pupes renferment une communauté fongique enrichie en champignons filamenteux. Les résultats suggèrent que les levures joueraient un rôle nutritionnel chez les stades actifs de l'insecte. Finalement, une succession au niveau des bactéries retrouvées en abondance au cours du développement de l'insecte a été observée.

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de dresser un portrait global du microbiome associé au dendroctone du mélèze en fonction de son développement. Sur cette base, plusieurs fonctions ont été proposées pour ces microorganismes associés. Grâce aux isolats obtenus, il sera possible de tester ces différentes hypothèses au laboratoire lors de travaux futurs. L'identification des microorganismes associés à *D. simplex* ainsi que l'élucidation de leurs fonctions au sein d'un éventuel complexe symbiotique permettra, à plus long terme, de trouver de nouvelles cibles pour lutter contre ce ravageur forestier.

Mots clés : microbiome, microbiote, *Dendroctonus simplex*, symbiose, communautés microbiennes, diversité, séquençage à haut débit, stades de développement.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	iii
Avant-propos	v
Résumé	vii
Liste des figures.....	xv
Liste des tableaux.....	xvii
Liste des abréviations	xix
1 <i>Dendroctonus simplex</i> LeConte.....	1
1.1 Insectes du genre <i>Dendroctonus</i>	1
1.2 Le dendroctone du mélèze.....	2
1.3 Stratégies d'attaque chez les insectes du genre <i>Dendroctonus</i>	4
1.4 Signes d'attaque et dommages causés par <i>D. simplex</i>	5
1.5 Stratégies de lutte existantes contre les insectes du genre <i>Dendroctonus</i>	7
2 Microorganismes associés aux insectes du genre <i>Dendroctonus</i>	9
2.1 Généralités.....	9
2.2 Emplacement des microorganismes associés aux insectes	10
2.3 Fonctions démontrées ou proposées pour les microorganismes associés aux insectes.....	10
2.3.1 Fonctions des bactéries.....	11
2.3.2 Fonctions des champignons filamenteux.....	13
2.3.3 Fonctions des levures.....	15
2.4 Identification des microorganismes par une approche de biologie moléculaire	17
2.4.1 Identification moléculaire des bactéries.....	18
2.4.2 Identification moléculaire des champignons	19
2.4.3 Traitement des données provenant du séquençage à haut débit	21
3 Problématique.....	23
4 Hypothèse et objectifs.....	25
4.1 Hypothèse	25

4.2	Objectifs	25
4.2.1	Objectifs généraux et spécifiques.....	25
5	Chapitre 1 : Surveying the endomicrobiome and ectomicrobiome of bark beetles : The case of <i>Dendroctonus simplex</i>	27
5.1	Résumé	28
5.2	Abstract	28
5.3	Introduction.....	29
5.4	Materials and Methods	30
5.4.1	Site location and sample preparation	30
5.4.2	DNA extraction and PCR amplification	31
5.4.3	16S rRNA pyrosequencing	32
5.4.4	Sequence processing pipeline.....	33
5.4.5	Diversity analysis	33
5.5	Results	34
5.5.1	Bacterial diversity associated with the eastern larch beetle microbiome.....	34
5.5.2	Taxonomical composition and variability of bacterial communities associated with the eastern larch beetle.....	36
5.5.3	Bacterial community comparison between sampled environments.....	40
5.6	Discussion.....	41
5.7	Acknowledgement.....	44
6	Chapitre 2: Fungal communities associated with the eastern larch beetle: diversity and variation within developmental stages	45
6.1	Résumé	46
6.2	Abstract	46
6.3	Introduction.....	47
6.4	Materials and Methods	49
6.4.1	Site location, beetle processing, and samples preparation	49
6.4.2	DNA extraction and PCR amplification	50
6.4.3	Fungal 18S rRNA pyrosequencing	51

6.4.4	Sequences processing pipeline	51
6.4.5	Diversity analysis	52
6.4.6	Isolation and culture of <i>D. simplex</i> associated fungi	52
6.5	Results	53
6.5.1	<i>Dendroctonus simplex</i> fungal diversity across developmental stages and microenvironments	53
6.5.2	Taxonomic identification of mycobiome associated with developmental stages	55
6.5.3	Fungal Biomarkers.....	57
6.5.4	Taxonomic identification of mycobiome associated with the environment of <i>D. simplex</i>	59
6.6	Discussion	59
6.7	Funding	63
6.8	Acknowledgments	63
6.9	Supplemental data	64
7	Chapitre 3 : The symbiotic complex of <i>Dendroctonus simplex</i> : implications in the beetle attack and its life cycle	73
7.1	Résumé	74
7.2	Abstract	74
7.3	Introduction.....	75
7.4	Materials and Methods	76
7.4.1	Site location, beetle processing, and samples preparation	76
7.4.2	DNA extraction and PCR amplification	77
7.4.3	Pyrosequencing of microbial DNA	78
7.4.4	Sequences processing pipeline	78
7.4.5	Data analysis	79
7.5	Results	79
7.5.1	Diversity of the associated microbial community across <i>D. simplex</i> developmental stages.....	79

7.5.2	Variation and taxonomical composition of the microbial communities across the eastern larch beetle developmental stages	80
7.6	Discussion	84
7.7	Funding	90
7.8	Acknowledgments	90
8	Chapitre 4: Mise en culture des microorganismes associés aux adultes de <i>D. simplex</i> .	91
8.1	Mise en contexte	91
8.2	Méthodologie.....	91
8.2.1	Milieus et conditions de culture.....	91
8.2.2	Récupération et mise en culture des microorganismes.....	95
8.2.3	Extraction d'ADN génomique, amplification PCR et RFLP.....	96
8.2.4	Séquençage des isolats obtenus.....	97
8.2.5	Création d'une banque d'isolats	98
8.3	Résultats	98
8.3.1	Mise en culture des bactéries associées aux adultes de <i>D. simplex</i>	98
8.3.2	Mise en culture des champignons filamenteux et levures associés aux adultes de <i>D. simplex</i>	105
8.4	Discussion.....	108
9	Conclusions et perspectives	113
10	Références.....	121
11	Annexe 1 : Informations supplémentaires sur les données brutes et analyses de séquençage à haut débit	131
11.1	Identification des bactéries associées aux adultes de <i>D. simplex</i> ainsi qu'aux galeries (section 5).....	131
11.2	Identification des champignons associés aux stades de développement de <i>D. simplex</i> (section 6)	132
11.3	Identification des bactéries associées aux stades de développement de <i>D. simplex</i> (section 7)	133
11.4	Comparaison mélèzes hybrides et laricins (section 9).....	134

12	Annexe 2 : Document de passage direct au doctorat.....	135
13	Annexe 3 : Surveying the endomicrobiome and ectomicrobiome of bark beetles : The case of <i>Dendroctonus simplex</i>	159

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Schéma représentant les différents stades de développement de <i>Dendroctonus simplex</i> , ainsi que leur durée pour les provinces de l'Atlantique.	3
Figure 1.2. Attaque et développement des insectes du genre <i>Dendroctonus</i>	5
Figure 1.3. Signes d'attaque par le dendroctone du mélèze.	6
Figure 2.1. Schéma résumé des fonctions attribuées aux microorganismes associés aux insectes.	16
Figure 2.2. Régions conservées et variables du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S chez les bactéries ainsi que la précision de la classification selon les régions.	19
Figure 2.3. Organisation générale des gènes codants pour les ARNr chez les champignons.	20
Figure 5.1. Rarefaction curves of OTUs diversity for each sample.	35
Figure 5.2. Bacterial community composition of the eastern larch beetle and the galleries.	37
Figure 5.3. Phylogenetic affiliation of the abundant bacterial OTUs associated with the eastern larch beetle based on partial 16S rRNA gene sequences.	39
Figure 5.4. Venn diagram representing the distribution of the OTUs across the different environments.	40
Figure 5.5. Principal coordinates analysis (PCoA) of bacterial communities associated with <i>Dendroctonus simplex</i> using Fast UniFrac.	41
Figure 6.1. Principal component analysis of the different developmental stages and microenvironments of <i>D. simplex</i>	54
Figure 6.2. Taxonomical identification of the fungal community associated to the developmental stages and microenvironments of the eastern larch beetle.	56
Figure 6.3. Indicator OTUs for each developmental stage and microenvironments of the eastern larch beetle.	58
Sup. Figure 6.4. Rarefaction curves of OTUs diversity for each sample.	70
Sup. Figure 6.5. Phylogenetic affiliation of the abundant fungal OTUs associated with the eastern larch beetle developmental stages based on partial 18S rRNA gene sequences.	71
Figure 7.1. Bacterial communities composition of <i>D. simplex</i> developmental stages.	81

Figure 7.2. Fungal communities composition of <i>D. simplex</i> developmental stages.	83
Figure 7.3. Eastern larch beetle microbiota throughout developmental stages.	86
Figure 8.1. Arbre phylogénétique «Maximum likelihood» représentant les isolats bactériens de l'ecto- et endomicrobiote des adultes de <i>D. simplex</i> , les souches de références ainsi que les OTU retrouvées en abondance lors du séquençage à haut débit.	104
Figure 8.2. Arbre phylogénétique «Maximum likelihood» représentant les isolats fongiques associés aux adultes de <i>D. simplex</i> ainsi que les souches de références.	107
Figure 9.1. Tract intestinal complet d'un adulte de <i>D. simplex</i> : présence de microvillosités et de corps gras au niveau de l'intestin moyen.	115

LISTE DES TABLEAUX

Table 5.1. Diversity associated with the external surface and the interior of the eastern larch beetle body as well as the galleries.....	36
Table 6.1. Taxonomical identification of the fungal community associated with the environment of the eastern larch beetle.	59
Sup. Table 6.2. Shannon diversity index for all the developmental stages of <i>D. simplex</i>	64
Sup. Table 6.3. Relative abundance (OTUs \geq 1% for each replicate) and mean values (\pm standard deviation).	65
Sup. Table 6.4. Cultured fungi associated to the eastern larch beetles adults.....	67
Table 7.1. Shannon diversity index for bacterial and fungal microbiota throughout <i>D. simplex</i> development.	80
Tableau 8.1. Milieux et conditions de culture utilisés afin de cultiver les microorganismes (bactéries, champignons filamenteux et levures) associés à l'ecto- et l'endomicrobiome des adultes pionniers de <i>D. simplex</i>	92
Tableau 8.2. Isolats bactériens de l'ectomicrobiote des adultes de <i>D. simplex</i>	99
Tableau 8.3. Isolats bactériens de l'endomicrobiote des adultes de <i>D. simplex</i>	100
Tableau 8.4. Levures et champignons filamenteux isolés de l'ectomicrobiote des adultes de <i>D. simplex</i>	105
Tableau 11.1. Nombre de séquences obtenues et répartition des OTU générées suite aux analyses de bioinformatiques portant sur les bactéries associées aux adultes de <i>D. simplex</i> ainsi qu'à leurs galeries.....	131
Tableau 11.2. Nombre de séquences obtenues et répartition des OTU générées suite aux analyses de bioinformatiques portant sur les champignons associés aux stades de développement de <i>D. simplex</i>	132
Tableau 11.3. Nombre de séquences obtenues et répartition des OTU générées suite aux analyses de bioinformatiques portant sur les bactéries associées aux stades de développement de <i>D. simplex</i>	133
Tableau 11.4. Comparaison entre le nombre d'OTU bactériennes obtenues chez les adultes provenant de mélèzes hybrides et laricins.	134

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomal
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
OTU	Unité taxonomique opérationnelle (<i>Operational Taxonomic Unit</i>)
pb	Paires de bases
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCA	Analyse en composantes principales
PCoA	Analyse en coordonnées principales
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RDP	<i>Ribosomal database project</i>
RFLP	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with arithmetic mean</i>

1 *DENDROCTONUS SIMPLEX* LECONTE

1.1 Insectes du genre *Dendroctonus*

Les insectes du genre *Dendroctonus* appartiennent à la famille des Curculionidae et de la sous-famille des Scolytinae, d'où leur appellation commune scolytes (Bentz, 2004). Ce genre a été décrit pour la première fois par Erichson en 1836 et compte 19 espèces, réparties principalement en Amérique, mais également en Europe et en Asie (Six & Bracewell, 2015). Ces insectes s'établissent sous l'écorce de divers conifères appartenant aux genres *Larix*, *Picea*, *Pinus* et *Pseudotsuga* (Bentz, 2004; Armendáriz-Toledano & Zúñiga, 2017). Les espèces du genre *Dendroctonus* ont une importance écologique et économique variable, dépendant de leur stratégie de colonisation (Six & Bracewell, 2015). De plus, ils sont généralement nommés selon l'essence d'arbre qu'ils colonisent (Bentz, 2004).

Parmi les insectes du genre *Dendroctonus* les plus étudiés, on note le dendroctone du pin ponderosa (*Dendroctonus ponderosae* Hopkins). Celui-ci se retrouve majoritairement en Colombie-Britannique, ainsi que sur la côte ouest américaine, et a pour hôte principal le pin ponderosa (S.L. Wood, 1982). Due à de récentes épidémies, il est considéré comme un des dendroctones les plus agressifs, pouvant coloniser toutes les essences de pins indigènes se trouvant dans son aire de distribution (Six & Bracewell, 2015). Le dendroctone méridional du pin (*Dendroctonus frontalis* Zimmermann) est lui aussi considéré comme agressif, colonisant plusieurs espèces de pin le long de son aire de distribution (Six & Bracewell, 2015). Celui-ci est retrouvé au sud de l'Amérique du nord, majoritairement au Mexique (S.L. Wood, 1982). Le dendroctone occidental du pin, *Dendroctonus brevicomis* LeConte, est lui aussi retrouvé en Colombie-Britannique, sur la côte ouest américaine, ainsi qu'au Mexique, où il colonise exclusivement deux espèces de pin, *Pinus ponderosa* et *P. coulteri* (S.L. Wood, 1982; Six & Bracewell, 2015).

Le dendroctone de l'épinette (*Dendroctonus rufipennis* Kirby) est également retrouvé en Amérique du Nord, suivant la distribution de son hôte, l'épinette (majoritairement *Picea glauca* et *P. engelmannii*) (S.L. Wood, 1982). Cette espèce est décrite comme persistante, étant présente même lorsque les populations sont endémiques (Six & Bracewell, 2015). Le dendroctone rouge de l'épinette (*Dendroctonus valens* LeConte) est le dendroctone possédant la plus vaste diversification d'hôte, en partie due à sa grande répartition (Amérique du Nord et Centrale). Il est considéré comme une espèce parasite, puisqu'il colonise et se développe dans les arbres sans les tuer (Six & Bracewell, 2015).

Certaines espèces de dendroctones sont moins étudiées, notamment le dendroctone du mélèze, *Dendroctonus simplex* LeConte. Cet insecte présente un intérêt particulier, puisqu'il est retrouvé en abondance au Canada, notamment dans la province de Québec.

1.2 Le dendroctone du mélèze

Le dendroctone du mélèze est un insecte indigène de l'Amérique du Nord qui se nourrit principalement du mélèze laricin, *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch (Langor & Raske, 1987b; Seybold *et al.*, 2002). Cependant, celui-ci peut également se nourrir d'espèces de mélèzes exotiques ou encore certaines espèces hybrides (Langor & Raske, 1989a; Seybold *et al.*, 2002). Dans les faits, son aire de distribution suit celle de son hôte principal, et l'insecte se retrouve de Terre-Neuve jusqu'à la Colombie-Britannique et de l'Alaska jusqu'aux États-Unis (Langor & Raske, 1987b).

Le dendroctone du mélèze est un insecte dit subcortical puisqu'il vit presque exclusivement sous l'écorce de l'arbre, où il creuse des galeries afin d'accomplir son cycle de développement. Suivant sa croissance, il se nourrit du phloème (tissu conducteur de la sève), ce qui engendre une grande détérioration de l'arbre, suivi de sa mort au bout d'environ deux ans. Les femelles initient l'attaque de l'arbre. Lorsqu'elles pénètrent le tronc, elles creusent une galerie de ponte verticalement, afin d'éviter de sectionner les canaux résinifères de l'arbre, et ainsi réduire l'écoulement de résine (mécanisme de défense de l'hôte) (Langor & Raske, 1987a). Ce n'est que lorsque la galerie sera prête que le mâle y pénétrera pour féconder la femelle. Plusieurs femelles peuvent utiliser les mêmes trous d'entrée, mais chacune construira sa propre galerie de ponte (Langor & Raske, 1987b). Selon les mêmes auteurs, une fois la fécondation terminée, la femelle déposera les œufs à intervalle irrégulier le long de la galerie, par groupe d'un à quatre œufs. Pour sa part, Wood (1982) a noté un maximum de six œufs par combinat de ponte. La femelle entoure les œufs d'un mélange de sciures et de déjections (Langor & Raske, 1987b). Le développement embryonnaire complet est d'une durée d'environ 11 jours (Figure 1.1) (S.L. Wood, 1982). Au moment de l'éclosion, le chorion (enveloppe de l'œuf) est coupé par la larve. De plus, Langor et Raske (1987) mentionnent que cette dernière mangerait une portion du chorion suite à l'éclosion.

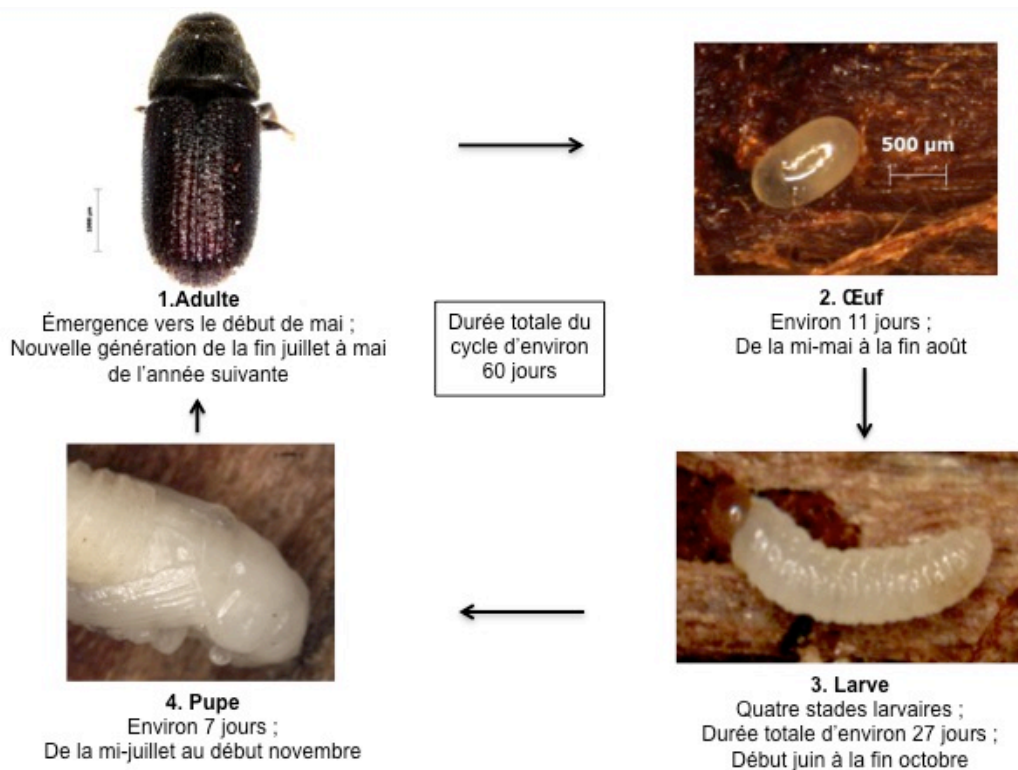


Figure 1.1. Schéma représentant les différents stades de développement de *Dendroctonus simplex*, ainsi que leur durée pour les provinces de l'Atlantique.
D'après Langor et Raske (1987b). (Crédit photo : Valentin Popa, laboratoire Guertin).

Au rythme de leur développement, les larves de *D. simplex* creusent des galeries perpendiculaires à la galerie de ponte (Langor & Raske, 1987a). Quatre stades larvaires sont observés chez cet insecte, la durée totale du développement étant d'environ 27 jours (Figure 1.1) (Langor & Raske, 1987b; S.L. Wood, 2007b). Durant cette période, les larves se nourrissent du phloème et des champignons qui poussent dans les galeries (Langor & Raske, 1987a; Six & Wingfield, 2011). Les larves du dernier stade creusent une chambre pupale ovale au bout de la galerie larvaire et bloquent l'entrée de celle-ci avec des déjections. En préparation pour se transformer en pupa, la larve arrête de s'alimenter et vide son intestin (Langor & Raske, 1987b). Le stade pupal dure environ sept jours (Figure 1.1) (S.L. Wood, 1982). À l'émergence, la pupa se transformera en un individu ténéral (adulte au corps mou) qui deviendra adulte suite à la sclérification de la chitine formant l'exosquelette des insectes (Langor & Raske, 1987a). La durée totale du développement d'un individu est d'environ 60 jours et varie en fonction de la température et de la région (Figure 1.1) (Langor & Raske, 1987b; McKee & Aukema, 2015). De façon générale, la nouvelle génération d'insectes passe l'hiver sous forme adulte, la maturation finale des individus se déroulant au printemps de l'année suivante (Anonyme, 2010). Le développement de *D. simplex* s'effectue de façon asynchrone, puisque les attaques ne se déroulent pas toutes au même moment.

Également, plusieurs couvées peuvent être observées durant une même saison, puisque le dendroctone peut émerger de l'arbre et effectuer une seconde attaque (Langor & Raske, 1987a).

1.3 Stratégies d'attaque chez les insectes du genre *Dendroctonus*

La période de vol du dendroctone du mélèze pour les provinces de l'Atlantique se produit normalement vers le début du mois de mai, lorsque les températures moyennes sont supérieures à 10°C (S.L. Wood, 1982; Langor & Raske, 1987b). Cependant, les données pour le Québec varient, puisque la période de vol des insectes a été observée lorsque les degrés-jours cumulés atteignent en moyenne 45°C, se concentrant normalement vers le milieu du mois de mai (Srei, 2017). Le degré-jour est un modèle mathématique servant à calculer l'accumulation de chaleur. Cette formule prend en compte la température moyenne observée quotidiennement, ainsi que la température seuil du développement de l'insecte (Srei, 2017).

De façon générale, chez les espèces du genre *Dendroctonus*, les premiers individus à attaquer un arbre sont désignés « pionniers » (Figure 1.2). Lors de la période de vol, ces pionniers sont attirés par des substances volatiles libérées par les tissus de l'arbre. La reconnaissance de ces substances stimulantes par les insectes pourrait être un élément important dans la sélection de l'hôte préférentiel. Le rôle principal des pionniers est de permettre l'établissement de leurs champignons symbiotiques, afin que ceux-ci colonisent les canaux résinifères de l'arbre (Paine *et al.*, 1997). L'inoculation de champignons phytopathogènes affecterait le mécanisme de défense de l'hôte, principalement la production de résine, réduisant ainsi sa capacité de contrer les prochaines attaques par de nouveaux insectes. Ces insectes pionniers sont également confrontés à la présence de terpènes (composés volatils produits par l'arbre dans le but de se défendre), qui sont toxiques pour l'insecte à fortes concentrations (Adams *et al.*, 2013). Les pionniers libèrent par la suite des phéromones d'agrégation, servant à attirer d'autres membres de l'espèce, ce qui peut mener à une attaque massive de l'arbre (Six & Wingfield, 2011). Les insectes pourront réaliser leur développement complet, jusqu'à l'émergence et la dispersion de la nouvelle génération d'insectes l'année suivante.

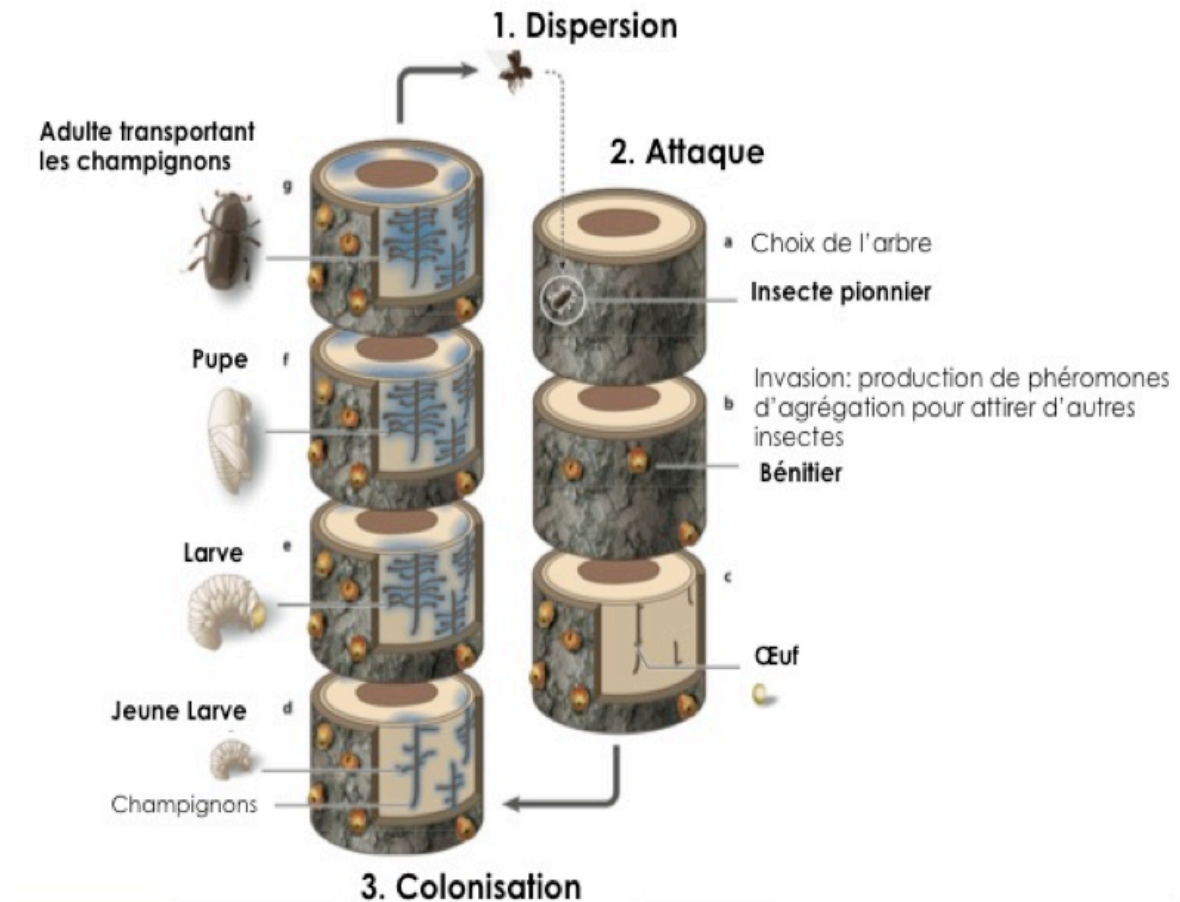


Figure 1.2. Attaque et développement des insectes du genre *Dendroctonus*.
(Adapté de Six and Wingfield (2011).

En condition endémique, le dendroctone du mélèze possède une stratégie d'attaque dite secondaire, puisqu'il ne s'attaque qu'aux arbres affaiblis ou récemment morts (S.L. Wood, 1982; Langor & Raske, 1987b). Lorsque les niveaux de populations atteignent des seuils épidémiques, les adultes peuvent également s'attaquer aux arbres sains, causant ainsi d'importants dommages aux peuplements de mélèzes (S.L. Wood, 2007b).

1.4 Signes d'attaque et dommages causés par *D. simplex*

Les signes d'attaque par le dendroctone du mélèze sont visibles à la surface de l'écorce de l'arbre. L'observation de petites protubérances nommées bénitiers, composées d'un mélange de résine et de sciures de bois sur le tronc, ainsi que de trous d'entrée est une indication de la présence d'insectes sous l'écorce (Figure 1.3A et B). L'écoulement de résine sur le tronc de l'arbre, ainsi qu'au pied de celui-ci, est également un autre bon indicateur (Figure 1.3C) (Seybold *et al.*, 2002). Lorsque le nombre de galeries dans le phloème est

abondant, la sève ne peut plus circuler correctement, ce qui entraîne un dessèchement de l'arbre (Anonyme, 2010). De plus, le réseau formé par les galeries de ponte et les galeries larvaires facilite le décollement de l'écorce. Une chlorose, jaunissement prématuré des aiguilles, survient rapidement à la suite d'une attaque par une population de dendroctones. En effet, plus de 50% des arbres attaqués suite à la période de vol printanière changent de coloration vers la fin juillet ou le début du mois d'août (Langor & Raske, 1989b). La mort complète de l'arbre est normalement observée dans les deux années suivant l'attaque initiale.

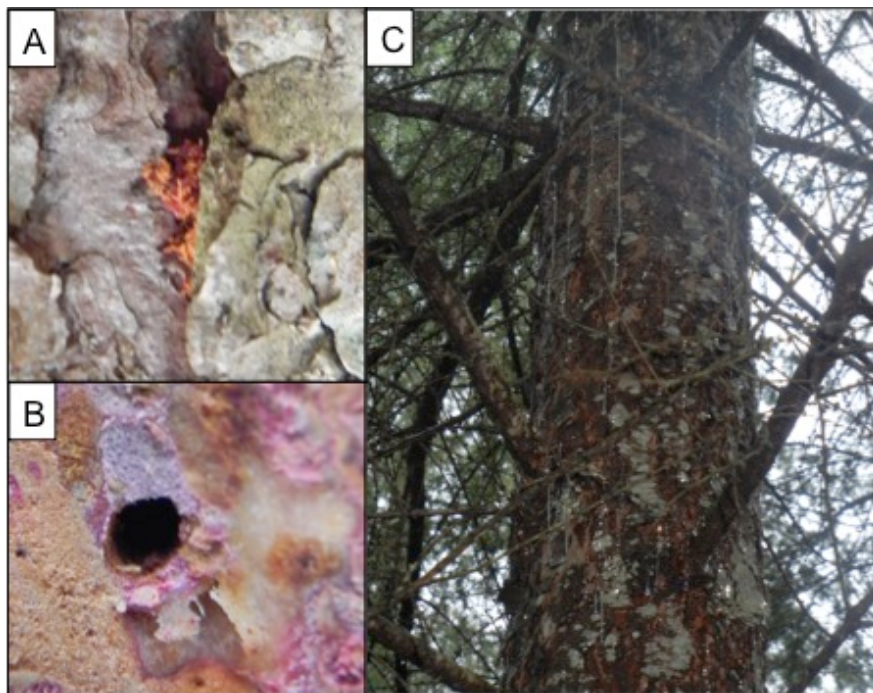


Figure 1.3. Signes d'attaque par le dendroctone du mélèze.

A : Présence d'un bénitier sur l'écorce ; B : Trou d'attaque par les adultes ; C : Écoulement de résine sur le tronc de l'arbre. (Crédit photo Narin Srei, laboratoire Guertin)

Les insectes du genre *Dendroctonus* sont parmi les ravageurs les plus importants en Amérique du Nord (S.L. Wood, 2007b). Des attaques par le dendroctone du mélèze sont signalées depuis plus de 100 ans (Langor & Raske, 1987a). L'augmentation du stress causé par plusieurs facteurs environnementaux, tels que le feu et les inondations, joue un rôle majeur dans l'établissement de populations de dendroctones, puisqu'il prédispose les peuplements d'arbres aux attaques par l'insecte. L'âge, les maladies, les blessures ainsi que la défoliation peuvent également être des facteurs majeurs augmentant la susceptibilité des mélèzes aux attaques de cet insecte (Seybold *et al.*, 2002). Depuis le milieu des années

70, une recrudescence des populations du dendroctone du mélèze est observée et celle-ci se traduit par de multiples attaques, causant énormément de dommages aux peuplements de mélèze à travers le Canada (Langor & Raske, 1989b; Langor & Raske, 1989a). La situation globale pour le Québec n'est pas encore bien établie à ce jour. Cependant, la dernière étude portant sur les dommages causés par le dendroctone du mélèze dans le sud du Québec démontrait que plus de 50% des peuplements de mélèzes exhibaient des signes d'attaques par *D. simplex*, avec des taux de mortalité allant de 11% à 95% (Benoît & Blais, 1984).

Due à ces attaques massives, certains auteurs suggèrent que la stratégie d'attaque de ce ravageur ne soit plus considérée comme secondaire (Langor & Raske, 1989a). Les changements climatiques des dernières années provoquent des stress significatifs chez les mélèzes, notamment l'augmentation des précipitations et l'augmentation des températures saisonnières, augmentant leur susceptibilité aux attaques par *D. simplex*. Ce phénomène pourrait expliquer la recrudescence des attaques de l'insecte, notamment aux États-Unis et dans plusieurs régions du Canada, tels que le Manitoba, l'Alberta et l'Ontario (McKee & Aukema, 2015). Cet insecte demeure une menace importante pour les peuplements naturels ainsi que pour les plantations de mélèzes en Amérique du Nord, ce qui exige un contrôle efficace de ce ravageur forestier.

1.5 Stratégies de lutte existantes contre les insectes du genre *Dendroctonus*

La lutte contre les dendroctones est complexifiée par leur cycle de vie subcortical (Srei, 2017). Différentes stratégies de lutte existent pour contrer les insectes appartenant au genre *Dendroctonus*. Pour qu'elles soient efficaces, ces approches doivent être en mesure d'affecter l'insecte lorsqu'il se retrouve sous l'écorce. Parmi les moyens de lutte directe connus, des méthodes de lutte physique sont employées, comme la destruction de l'insecte par coupe de l'arbre ou encore par brûlis (Safranyk *et al.*, 2002). De façon préventive, il est également possible de retirer le bois coupé ou encore mort avant la période d'activité de vol des dendroctones. De plus, certaines mesures d'aménagement des peuplements d'arbres pourraient être réalisées, comme retirer les arbres trop vieux et varier l'âge des arbres plantés afin de réduire les risques d'infestations majeures (Seybold *et al.*, 2002). La lutte chimique a également été employée avec l'utilisation de différents pesticides (Safranyk *et al.*, 2002). Bien que cette dernière approche puisse être efficace pour de petits peuplements, ce moyen de lutte ne peut être envisagé sur de grandes étendues en

considérant les coûts prohibitifs et les effets néfastes pour l'environnement. Un autre moyen connu de lutte contre les insectes du genre *Dendroctonus* est l'utilisation de phéromones d'agrégation combinées avec des pièges servant à la capture des insectes. De cette façon, les populations peuvent être contrôlées en altérant le comportement de l'insecte (Seybold *et al.*, 2002).

La lutte biologique se définit comme l'utilisation d'organismes vivants pour contrôler les populations d'espèces ravageuses (Lazarovits *et al.*, 2007). Cette approche peut représenter une solution intéressante pour contrôler les populations de dendroctones, tout en ayant des risques réduits pour l'environnement. Parmi les agents de lutte biologique utilisés, on retrouve les champignons entomopathogènes. L'utilisation d'insectes prédateurs ou de compétiteurs a déjà été envisagée comme moyen de contrôle des populations chez certaines espèces de dendroctones avec, cependant, des succès mitigés (Safranyk *et al.*, 2002).

Parmi ces méthodes de lutte, certaines ont déjà été testées contre le dendroctone du mélèze, telles que les aménagements sanitaires chez les peuplements de mélèze. De plus, l'utilisation de phéromones couplées à la capture des insectes a également été employée (Seybold *et al.*, 2002). Plus récemment, l'utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* a démontré une bonne efficacité pour le contrôle de *D. simplex* (Srei *et al.*, 2016).

La lutte biologique contre les insectes du genre *Dendroctonus* est complexifiée par la présence de microorganismes associés à ceux-ci, puisqu'ils joueraient un rôle de premier plan dans l'immunité de l'insecte (Hurst & Darby, 2009). En effet, plusieurs études font état de la présence de bactéries et de levures protégeant l'insecte contre les agents couramment utilisés en lutte biologique, notamment les champignons entomopathogènes (Dillon & Charnley, 1988; Scarborough *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2008; Davis, 2014). Récemment, une résistance à certains pesticides conférée par ces bactéries a été observée (Kikuchi *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que les microorganismes associés aux insectes jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense. Dans le cas du dendroctone du mélèze, il s'agit d'un facteur à considérer dans l'élaboration de stratégies de lutte, qu'elles soient chimiques ou biologiques.

2 MICROORGANISMES ASSOCIES AUX INSECTES DU GENRE *DENDROCTONUS*

2.1 Généralités

Les insectes du genre *Dendroctonus* vivent en association avec des microorganismes qui leur servent de support pour divers processus physiologiques de l'insecte, mais également pour la colonisation et la protection dans l'environnement subcortical de l'hôte (Popa *et al.*, 2012; Six, 2013; Hofstetter *et al.*, 2015). Chaque dendroctone et l'ensemble de ses microorganismes associés forment un holobionte, tel que défini par Margulis and Fester (1991). Pour sa part, le terme microbiote est employé afin de décrire l'ensemble des microorganismes associés à un même hôte, l'insecte dans le cas présent (Lederberg & McCray, 2001).

Parmi les microorganismes associés aux insectes, certains peuvent être symbiotiques. La symbiose est décrite comme une association étroite entre deux organismes d'espèces différentes, sur une portion significative de leur vie (Seipke *et al.*, 2012). Le type d'association symbiotique peut varier d'un microorganisme à l'autre, allant du mutualisme à une relation parasitaire (Brownlie & Johnson, 2009). De plus, le degré d'association entre les différents microorganismes et leur hôte peut varier, même lorsqu'on retrouve plusieurs microorganismes chez un seul insecte (Gibson & Hunter, 2010). Certains symbiotes sont dits obligatoires et jouent un rôle important pour l'insecte. Ils se trouvent à l'intérieur de celui-ci ou encore dans certaines structures de transport, et parfois même à l'intérieur de certains tissus. La présence de bactériomes, repliement au niveau de l'intestin moyen contenant des bactéries, peut également être observée (Bressan *et al.*, 2009). Ces symbiotes sont généralement transmis verticalement, mais peuvent également être transmis horizontalement. La réduction génomique ou la perte de certaines structures est parfois observées chez ces microorganismes. Ce type de symbiote est donc en relation étroite avec son hôte, et résulte d'une coévolution (Gibson & Hunter, 2010). Ainsi, ces microorganismes sont souvent plus difficiles à isoler sur des milieux de culture avec des techniques traditionnelles de microbiologie. En effet, la majorité est considérée comme non cultivable. D'autres symbiotes sont considérés comme facultatifs, jouant un rôle important, mais non indispensable pour l'hôte. Ils sont généralement transmis horizontalement ou acquis de façon récurrente de l'environnement (Brownlie & Johnson, 2009; Gibson & Hunter, 2010). Actuellement, dans la littérature, la majorité des symbiotes transmis verticalement sont rapportés comme étant des bactéries, contrairement aux champignons transmis essentiellement de façon horizontale à la génération suivante (Gibson & Hunter, 2010).

Tel que mentionné précédemment, seulement une partie des microorganismes associés aux insectes est symbiotique. Afin de décrire la relation entre les microorganismes et l'insecte de symbiotique, les fonctions remplies par ceux-ci au sein du microbiote chez l'insecte doivent être démontrées. En absence de cette démonstration, le terme «microorganismes associés» sera employé tout au long du texte afin de décrire les microorganismes compris dans le microbiote chez les insectes.

2.2 Emplacement des microorganismes associés aux insectes

Les microorganismes associés aux insectes sont retrouvés à la surface de celui-ci (ectomicrobiote), notamment au niveau de la cuticule et des pièces buccales. Ils sont également retrouvés à l'intérieur de l'insecte (endomicrobiote), majoritairement au niveau du tract intestinal, mais également au niveau des corps gras ou de certaines structures spécialisées, tel que mentionné précédemment (Gibson & Hunter, 2010; Popa *et al.*, 2012). Ces deux environnements présentent des conditions différentes pour les microorganismes s'y retrouvant. En effet, on observe chez plusieurs insectes un gradient d'oxygène au niveau du tract intestinal, ainsi qu'un pH très basique (11-12) (Engel & Moran, 2013). Ainsi, on pourrait s'attendre à observer deux communautés microbiennes distinctes chez ces deux environnements. À ce jour, aucune étude n'a différencié l'ecto- et l'endomicrobiote chez les insectes du genre *Dendroctonus*, la majorité de celles-ci ayant ciblé spécifiquement le tract intestinal (Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2015; Briones-Roblero *et al.*, 2017a) ou encore l'insecte en entier (Adams *et al.*, 2010; Dohet *et al.*, 2016).

2.3 Fonctions démontrées ou proposées pour les microorganismes associés aux insectes

Les insectes du genre *Dendroctonus* vivent en association avec plusieurs types de microorganismes, notamment des bactéries, des champignons filamenteux et des levures (Hofstetter *et al.*, 2015). Ceux-ci jouent un rôle dans l'établissement des insectes sur leur hôte. Comme les insectes se nourrissent et se développent sous l'écorce, ces microorganismes servent de soutien pour celui-ci, agissant notamment au niveau de la protection de l'insecte et de son alimentation, le phloème étant pauvre en nutriments. En retour, l'insecte fournit une protection physique pour ces microorganismes et leur permet de coloniser une niche à laquelle ils n'auraient pas accès (Aanen *et al.*, 2009; Persson *et al.*,

2011). Dans la littérature, plusieurs fonctions ont été rapportées pour les microorganismes associés aux insectes. De plus, une redondance fonctionnelle est observée chez les différents microorganismes au sein du microbiote. Malheureusement, plusieurs de ces fonctions sont simplement des hypothèses plutôt que démontrées chez l'insecte.

2.3.1 Fonctions des bactéries

Plusieurs espèces bactériennes ont déjà été identifiées chez les insectes. Celles-ci ont été retrouvées au niveau de la cuticule, à l'intérieur de celui-ci, notamment dans le tract intestinal et dans les corps gras, dans certaines parties buccales ainsi que dans les sécrétions orales (Popa *et al.*, 2012). Certains auteurs avancent même que ces bactéries seraient les médiateurs des interactions entre les différents types de microorganismes au sein du microbiote de l'insecte (Aanen *et al.*, 2009).

Un des rôles attribués aux bactéries présentes au niveau du microbiote des insectes est de compléter la diète pauvre qu'est le phloème, celui-ci contenant peu des éléments nutritifs essentiels dont l'insecte a besoin pour se développer et se reproduire (Morales-Jimenez *et al.*, 2012a). Parmi ces éléments, un apport en acides aminés essentiels et en vitamines est noté (Miao *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006). En effet, les pucerons possèdent une relation symbiotique obligatoire avec des bactéries du genre *Buchnera* possédant les gènes de synthèse pour les acides aminés essentiels, ceux-ci étant absents du phloème, ainsi que pour la synthèse de vitamines (Wu *et al.*, 2006). Lorsqu'on élimine les bactéries à l'aide d'un traitement antibiotique, une diminution de l'apport en acides aminés essentiels survient, se traduisant par une croissance réduite des larves, des insectes plus petits, ainsi que la stérilité chez certains adultes (Miao *et al.*, 2003). De plus, un apport en azote est également fourni par les bactéries associées aux insectes, cet élément étant en faible concentration dans le phloème (Bridges, 1981; Morales-Jimenez *et al.*, 2009). En effet, la présence de bactéries fixatrices d'azote, telle que *Rahnella aquatilis*, a été observée chez plusieurs espèces du genre *Dendroctonus* (Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Morales-Jimenez *et al.*, 2012a). Ces études ont démontré la capacité de cette espèce à croître sur des milieux sans source d'azote, mais également la présence de gènes impliqués dans la fixation de l'azote atmosphérique. Plus encore, une activité uricolytique est également observée chez certaines bactéries associées aux dendroctones, tels que *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia proteomaculans*, le recyclage de l'acide urique contribuant à une meilleure utilisation des sources d'azote chez l'insecte (Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Morales-Jimenez *et al.*, 2013).

En plus de compléter leur diète, certaines bactéries associées aux insectes du genre *Dendroctonus* sont capables de dégrader la cellulose, un composé qui serait autrement non assimilable par l'insecte (Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Morales-Jimenez *et al.*, 2012a). Parmi les genres bactériens cellulolytiques isolés chez les dendroctones, on retrouve *Serratia*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas* et *Stenotrophomonas* (Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Morales-Jimenez *et al.*, 2012a; Hu *et al.*, 2014). En effet, ces dernières ont démontré une activité cellulolytique par la présence d'un halo clair autour des colonies sur géloses rouge Congo contenant de la carboxyméthylcellulose, ou encore ont été capables de croître au laboratoire sur des géloses contenant de la cellulose comme seule source de carbone. Les bactéries associées aux insectes joueraient donc un rôle important au niveau de la nutrition de l'insecte, lui permettant d'obtenir les nutriments essentiels à son développement.

Les bactéries associées aux insectes du genre *Dendroctonus* jouent également un rôle au niveau de la protection de l'insecte sous l'écorce. Lors de l'attaque et de la colonisation du milieu subcortical de l'hôte, les insectes sont confrontés à la présence de terpènes. Ces molécules volatiles sont produites par l'arbre dans le but de se défendre et sont toxiques pour l'insecte en forte concentration (Adams *et al.*, 2013). En effet, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas* spp. et *R. aquatilis*, isolées de *D. ponderosae*, ont démontré une réduction des concentrations de monoterpènes en conditions contrôlées au laboratoire, suggérant un rôle de détoxification de l'environnement pour ces bactéries (Boone *et al.*, 2013a). De plus, la tolérance aux terpènes et leur capacité de dégradation diffèrent selon les bactéries et semblent reliées à la stratégie d'attaque de l'insecte (Adams *et al.*, 2011; Boone *et al.*, 2013a). Plus encore, une étude métagénomique réalisée chez le même insecte a démontré la présence de gènes de dégradation des terpènes, majoritairement associés aux genres *Pseudomonas* et *Rahnella* (Adams *et al.*, 2013). Il a donc été suggéré que certaines bactéries associées aux insectes dégraderaient les terpènes, détoxifiant ainsi l'environnement de l'insecte et lui permettant de s'établir sous l'écorce.

Les insectes sont également confrontés à la présence de champignons antagonistes dans le milieu subcortical. Certaines bactéries associées aux scolytes produisent des composés antifongiques servant à inhiber la croissance des champignons antagonistes présents dans le milieu. Par exemple, la présence de bactéries dans les sécrétions orales de *D. rufipennis*, inhibant la croissance de quatre champignons antagonistes de l'insecte qui prolifèrent dans leurs galeries, a été démontrée (Cardoza *et al.*, 2006). En effet, cette inhibition était absente lorsque les sécrétions orales de l'insecte étaient stérilisées, confirmant l'action des bactéries. De plus, certaines interactions insecte-champignon sont bénéfiques pour une portion du développement de l'insecte et néfastes par la suite. C'est le

cas de *D. frontalis* et son symbiote *Ophiostoma minus*, bénéfique pour l'adulte lors de l'attaque, mais néfaste pour le développement de la larve sous l'écorce (Aanen *et al.*, 2009). Cet insecte transporte avec lui une bactérie symbiotique appartenant au genre *Streptomyces* dans une structure de transport, le mycangium. Cette bactérie produit un antifongique, la mycangimycine, afin de contrôler sélectivement la croissance de *O. minus* (Scott *et al.*, 2008). En protégeant l'insecte, la bactérie symbiotique profiterait du succès de colonisation de celui-ci (Aanen *et al.*, 2009).

Comme mentionné précédemment, certaines bactéries associées aux insectes leur confèrent une résistance face aux agents de lutte chimique ou biologique couramment utilisés. En effet, une résistance à un insecticide, le fénitrothion, conférée par une bactérie appartenant au genre *Burkholderia*, a été observée chez la punaise *Riptortus pedestris* (Kikuchi *et al.*, 2012). En dégradant l'insecticide, l'endosymbiote confère donc une protection à l'insecte face à ce composé, en plus d'augmenter son taux de survie ainsi que la grosseur de l'insecte. De plus, la production d'un antifongique par des bactéries présentes dans les déjections du criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria*, inhibant la germination de quatre souches de *Metarhizium anisopliae*, un champignon entomopathogène utilisé en lutte biologique, a également déjà été observée (Dillon & Charnley, 1988). Les bactéries associées aux insectes confèreraient donc une résistance face aux agents de lutte utilisés pour contrôler leur population.

Finalement, les bactéries associées aux insectes sont également impliquées dans la production de phéromones d'agrégation, notamment par la bactérie *Pantoea agglomerans* qui est fréquemment isolée de l'intestin des sauterelles (Dillon *et al.*, 2002). Ce phénomène a également été observé chez *D. valens* et son association avec *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. et *R. aquatilis*. En effet, ces trois bactéries ont démontré la capacité à convertir le *cis*-verbénol libéré par l'arbre en verbénone, une phéromone d'agrégation chez cet insecte (Xu *et al.*, 2015). Les bactéries associées aux insectes possèdent donc plusieurs rôles au niveau de la nutrition, de la colonisation et de la survie de l'insecte sous l'écorce, faisant d'elles des membres importants de leurs microbiotes.

2.3.2 Fonctions des champignons filamenteux

Plusieurs espèces de champignons filamenteux ont également été identifiées chez les insectes. Parmi les plus souvent associés aux scolytes, on retrouve les champignons Ophiostomatoïdes, regroupant notamment les genres *Ophiostoma*, *Ceratocystiopsis*, *Grosmannia* et *Ceratocystis* (Six, 2013). Ces champignons sont également nommés *blue-stain fungi* en anglais dû à la coloration bleuâtre qu'ils confèrent au bois des arbres qu'ils

colonisent (Six & Wingfield, 2011; Villari *et al.*, 2012). Les champignons filamenteux sont retrouvés à la surface de l'insecte, au niveau du mycangium chez certaines espèces, ou, moins fréquemment, à l'intérieur de celui-ci (Popa *et al.*, 2012; Hofstetter *et al.*, 2015). Diverses fonctions ont été attribuées à ces champignons, principalement au niveau de la défense et de la nutrition de l'insecte.

Un des rôles majeurs attribués aux champignons Ophiostomatoïdes est d'affaiblir le système de défense de l'arbre. Plusieurs hypothèses ont été émises sur la façon dont ces champignons agissent au niveau de l'arbre. La première est que ces champignons phytopathogènes tuent directement l'arbre lors de leur colonisation, alors que la deuxième stipule que ceux-ci épuisent le système de défense de l'arbre, menant à sa mort au bout de quelque temps, permettant ainsi à l'insecte de coloniser l'arbre (Paine *et al.*, 1997; Klepzig & Six, 2004; Six & Wingfield, 2011; Villari *et al.*, 2012). Ces mêmes auteurs ajoutent également que cette relation serait symbiotique et qu'elle serait même obligatoire. L'écoulement de résine représente un des principaux moyens de défense des conifères face aux scolytes. En colonisant l'arbre, ces champignons vont bloquer les canaux résinifères et donc empêcher la résine de couler (Paine *et al.*, 1997; Lieutier *et al.*, 2009). Ces interactions entre les champignons Ophiostomatoïdes et les scolytes ont été abordées à plusieurs reprises, mais peu d'exemples spécifiques ont été rapportés.

Les champignons filamenteux associés aux scolytes possèdent également une fonction au niveau de la nutrition des insectes. En effet, ceux-ci sont une excellente source de stérols, nécessaires pour la croissance, la métamorphose et la reproduction de l'insecte (Bentz & Six, 2006). *D. ponderosae*, lorsqu'il se développe en présence de *Ophiostoma montium*, consommerait significativement moins de phloème que lorsqu'il se développe sans son champignon associé (Bentz & Six, 2006; Adams & Six, 2007). Plus encore, le phloème colonisé par les larves de cet insecte contenait significativement plus d'ergostérol que le phloème non colonisé, menant à l'interprétation que les champignons filamenteux seraient la source principale de stérols pour l'insecte (Bentz & Six, 2006).

Finalement, les champignons filamenteux seraient également impliqués dans la médiation des interactions entre les différentes espèces de champignons au sein du microbiote de l'insecte (Paine *et al.*, 1997). En effet, les champignons filamenteux produisent une variété de composés volatils qui affectent la croissance des autres espèces fongiques associées à l'insecte. C'est le cas chez *D. ponderosae*, associé à trois champignons filamenteux produisant divers composés volatils stimulant ou inhibant la croissance des autres (Cale *et al.*, 2016). Les champignons filamenteux possèdent donc plusieurs fonctions importantes au niveau de l'attaque et de la survie de l'insecte sous l'écorce de l'arbre hôte.

2.3.3 Fonctions des levures

Les levures, considérées plus récemment comme membres du microbiote chez les scolytes, possèdent également un large éventail de fonctions nécessaires pour l'établissement des insectes sous l'écorce (Davis, 2014; Hofstetter *et al.*, 2015). Plusieurs genres de levures sont associés aux insectes du genre *Dendroctonus*, certains genres étant majoritaires. Celles-ci sont retrouvées sur la surface de la cuticule ainsi qu'à l'intérieur de l'insecte, au niveau de son tract intestinal (Davis, 2014).

Comme les bactéries et les champignons filamenteux, les levures seraient impliquées dans la nutrition de l'insecte. En effet, celles-ci sont reconnues pour être capables de métaboliser plusieurs composés importants pour les scolytes (Davis, 2014). Par exemple, plusieurs espèces appartenant au genre *Candida* isolées du tract intestinal de larves sont en mesure de dégrader les sucres ou encore la cellulose au laboratoire, menant les auteurs à suggérer que celles-ci pourraient jouer un rôle dans la nutrition de l'insecte (Chararas *et al.*, 1983). Certains auteurs ont également discuté l'importance des levures dans l'alimentation des scolytes en lien avec leur forte abondance au niveau de l'intestin, laissant croire qu'elles seraient une source nutritionnelle importante pour eux (Davis, 2014; Hofstetter *et al.*, 2015). Plus encore, Kabir et Giese (1966) ont démontré qu'une levure appartenant au genre *Pichia*, isolée de *Cortilus Comlumbianus*, apportait à elle seule l'alimentation nécessaire pour le développement larvaire complet de l'insecte. Les levures pourraient donc être une source alimentaire importante pour les scolytes.

Selon certains auteurs, les levures seraient également impliquées au niveau de la dégradation des terpènes produits par l'arbre. En effet, *Ogataea pini*, isolée de *D. brevicomis*, est capable de tolérer certains composés terpénoïdes, sa croissance en étant améliorée au cours du temps (Davis & Hofstetter, 2011). Les auteurs avancent que cette capacité permet à *O. pini* de persister dans ce type d'environnement. De plus, certaines levures utiliseraient les terpènes comme source de carbone, un processus important dans la tolérance des scolytes à ces molécules toxiques, mais aucun exemple concret n'a été démontré (Davis, 2014). Les levures associées aux insectes joueraient donc un rôle dans la détoxification de l'environnement, permettant à l'insecte de coloniser l'arbre.

Les levures associées aux scolytes seraient également impliquées dans la communication entre les insectes. En effet, Hunt et Borden (1990) ont démontré que *Kuraishia capsulata* et *O. pini* associées à *D. ponderosae* effectuent la conversion du verbénole en verbénone. Cette phéromone d'agrégation, lorsque présente en très grande quantité, peut également agir comme phéromone d'anti-agrégation. Les auteurs suggèrent

donc que, lorsqu'il y a une forte densité de levures, une grande quantité de verbénone est produite, envoyant ainsi le message aux autres insectes que l'environnement n'est plus propice à la colonisation. Plus encore, les levures produisent également des composés volatils affectant la croissance des champignons présents dans l'environnement. En effet, des composés volatils produits par *O. pini* et qui ont été isolés des galeries larvaires de *D. brevisomis* stimulent la croissance du champignon associé *Entomocorticum* sp. B, alors que ceux-ci inhibent la croissance du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Davis *et al.*, 2011). Les auteurs concluent donc que les composés volatils produits par les levures favoriseraient les champignons mutualistes alors qu'ils inhiberaient la croissance des champignons antagonistes. Ce phénomène a également été observé chez *D. ponderosae*, associé à *P. scolyti* et *Candida* sp. (Adams *et al.*, 2008). En effet, ces levures produisent des composés volatils stimulant la croissance de *O. minus*, présent dans le mycangium de l'insecte, alors qu'ils inhibent la croissance de *Grosmannia clavigera* retrouvé dans les galeries de celui-ci.

Les microorganismes associés aux insectes semblent donc remplir diverses fonctions importantes pour la colonisation de l'insecte sur son hôte, mais également au niveau de son développement et sa survie dans l'environnement subcortical de l'arbre (Figure 2.1). Afin de comprendre la dynamique de l'établissement de l'insecte dans son environnement, il est donc primordial d'identifier les microorganismes présents au sein du microbiote chez les insectes.

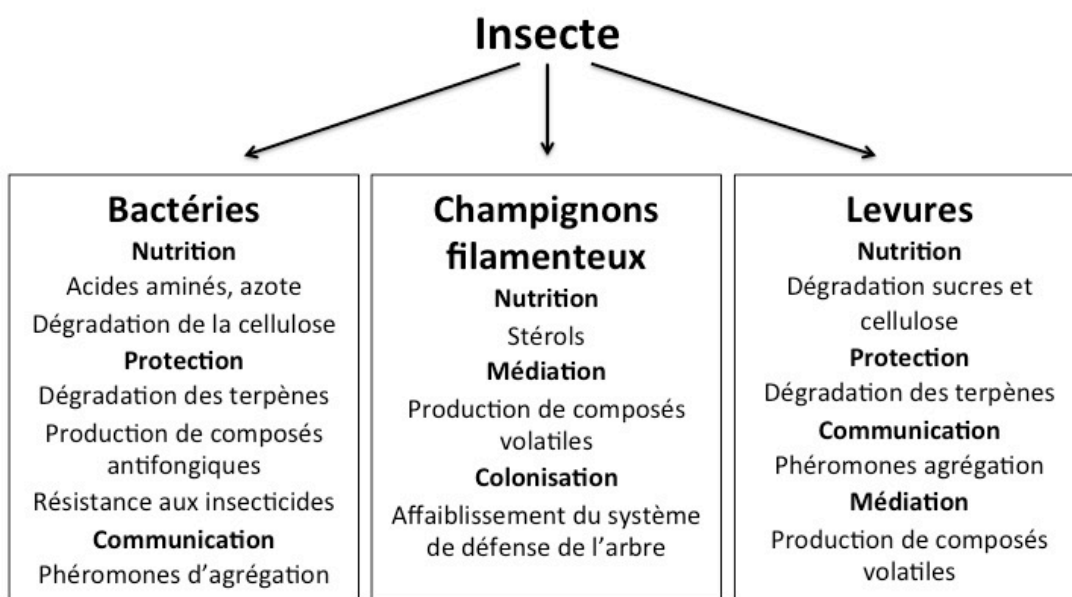


Figure 2.1. Schéma résumé des fonctions attribuées aux microorganismes associés aux insectes.

2.4 Identification des microorganismes par une approche de biologie moléculaire

L'identification de microorganismes présents dans un échantillon peut être réalisée de plusieurs façons. Certaines de ces techniques requièrent leur mise en culture afin de procéder à l'identification des isolats. Toutefois, ces méthodes complexifient la tâche, puisque: [1] plusieurs microorganismes ne croissent pas sur des milieux géloses avec les techniques actuelles de microbiologie comme c'est le cas des bactéries, dont seulement 10% seraient cultivables à l'aide des techniques standards de laboratoire (Stewart, 2012); [2] dans le cas des microorganismes cultivables, une variété de milieux de culture et de conditions de croissance seraient nécessaires pour satisfaire les demandes nutritionnelles de chaque microorganisme, multipliant ainsi les manipulations à réaliser ; et, finalement [3] le temps de croissance est variable d'un organisme à l'autre. Ces techniques d'identification traditionnelles demandent donc beaucoup plus de temps que les techniques courantes de biologie moléculaire. Plus encore, la mise en culture des microorganismes requiert une sélection de ceux-ci avant l'identification, entraînant de ce fait un biais, puisque les microorganismes présents en faible abondance seront sous- ou surreprésentés, certains pouvant être tout simplement non sélectionnés lors du processus. Pour toutes ces raisons, les techniques d'identification conventionnelles par mise en culture entraînent une sous-estimation de la diversité microbienne. Comme mentionné précédemment, les microorganismes symbiotiques sont d'autant plus difficiles à cultiver au laboratoire (Stewart, 2012). Les techniques d'identification par mise en culture sont donc moins appropriées dans le cas d'une caractérisation du microbiote des insectes.

De plus en plus, les approches d'identification des microorganismes sont réalisées par des techniques de biologie moléculaire. Différentes approches sont possibles, la plus couramment utilisée de nos jours étant le séquençage à haut débit. Cette approche nous permet d'identifier une plus grande quantité de microorganismes, permettant de caractériser des communautés microbiennes complexes (Huse *et al.*, 2007). De plus, cette approche ne nécessite pas la séparation des microorganismes au préalable, réduisant ainsi énormément le temps requis (Siqueira *et al.*, 2012). Il est également possible d'identifier les bactéries présentes en très faible abondance, permettant d'avoir un portrait plus complet de ces communautés. Par contre, les fragments obtenus sont de plus faible taille (environ 500 paires de bases (pb) pour le pyroséquençage par exemple), ne permettant pas une identification précise dans plusieurs cas (Siqueira *et al.*, 2012). L'utilisation du séquençage à haut débit est donc une approche appropriée afin d'identifier les microorganismes associés

aux insectes. Par contre, une approche de mise en culture reste nécessaire afin de pouvoir identifier avec assurance les espèces présentes au sein de l'échantillon.

Différentes technologies de séquençage sont disponibles, les plus couramment utilisées étant le pyroséquençage et la technologie Illumina. Les deux technologies utilisent le principe de «séquençage par synthèse», signifiant que la séquence nucléotidique est identifiée au même moment que le brin est synthétisé (Siqueira *et al.*, 2012). La technologie de pyroséquençage permet d'obtenir des fragments d'environ 500 pb, représentant un avantage lors de l'identification des microorganismes. Par contre, celle-ci n'arrive pas à bien distinguer les longues chaînes d'homopolymères (nucléotides répétés), créant des séquences non-valables. La technologie Illumina, pour sa part, permet d'obtenir un plus grand nombre de séquences, augmentant ainsi la profondeur de séquençage obtenue (Siqueira *et al.*, 2012). Au moment des analyses, la technologie de pyroséquençage représentait donc la meilleure alternative afin d'identifier les communautés microbiennes.

Plus récemment, Illumina a mis au point la technologie MiSeq *paired-end*, permettant le séquençage à partir des deux extrémités (amorces sens et anti-sens). De cette façon, il est maintenant possible d'obtenir des fragments de près de 450 pb, tout en gardant la profondeur de séquençage offerte par cette technologie (Schirmer *et al.*, 2015). Il s'agit, à ce jour, de la technologie de séquençage à haut débit la plus utilisée pour la caractérisation des communautés microbiennes.

2.4.1 Identification moléculaire des bactéries

L'ARN ribosomal (ARNr) 16S est l'une des constituantes de la petite sous-unité des ribosomes bactériens permettant la synthèse des protéines (Willey *et al.*, 2008). Le gène codant pour cet ARNr est le marqueur génétique le plus souvent utilisé à ce jour pour l'identification des bactéries, puisque celui-ci est présent dans tous les cas, parfois même en multiples copies (Janda & Abbott, 2007). Il a été employé pour la première fois par Carl Woese en 1977. Celui-ci cherchait un marqueur moléculaire présent dans tous les organismes vivants. De ce fait, l'ARN ribosomal représentait un marqueur idéal, puisqu'il est nécessaire pour la réplication cellulaire, donc présent dans chaque organisme, et que celui-ci change peu au cours du temps. Puisque la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S est largement connue chez les bactéries, ce gène est donc devenu une référence au niveau de la phylogénie (Woese & Fox, 1977). Ce gène est formé d'environ 1 500 pb à partir desquelles une identification des bactéries est possible. Ce gène comprend des portions très conservées au sein des bactéries, ainsi que des régions variables selon l'espèce (Figure 2.2). De cette façon, il est possible d'utiliser des amorces universelles bactériennes

(s'hybridant au niveau des régions conservées) afin de séquencer une portion de ce gène, l'identification des bactéries étant possible au niveau des régions variables (Salyers & Whitt, 2002). Cette technique est idéale, surtout lorsqu'aucune information sur l'identité des bactéries n'est connue.

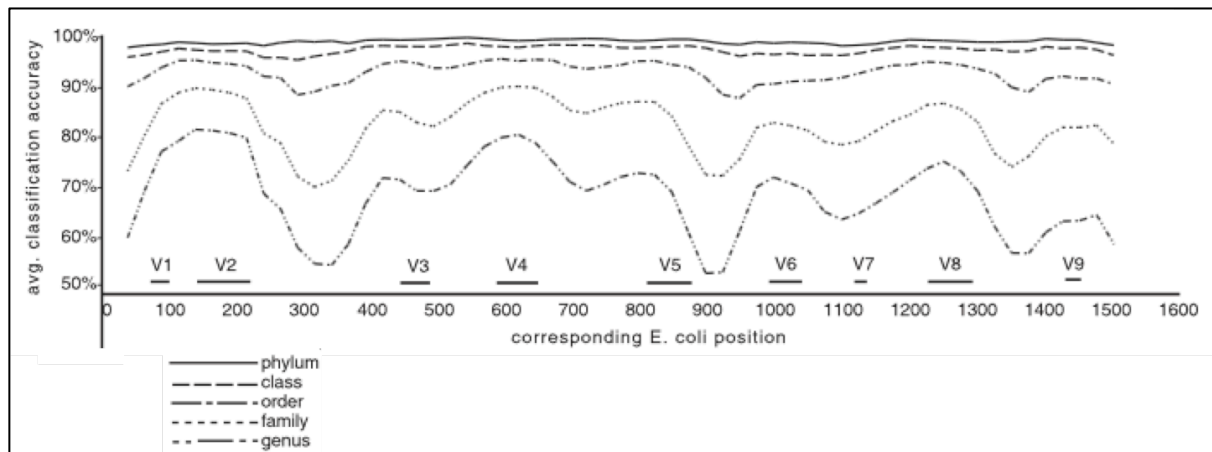


Figure 2.2. Régions conservées et variables du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S chez les bactéries ainsi que la précision de la classification selon les régions.
Adapté de (Wang *et al.*, 2007b)

La précision d'identification des bactéries varie selon les régions variables utilisées. En effet, lors de l'utilisation de courts fragments (500 pb) comme dans le cas du séquençage à haut débit, il est recommandé d'utiliser les régions variables V2 ou V4, ayant démontré un pourcentage de précision plus grand pour l'identification taxonomique des bactéries que les autres (Figure 2.2) (Wang *et al.*, 2007b).

Cependant, cette méthode possède ses limites, puisqu'il est parfois impossible de différencier certaines espèces de bactéries par ce gène (Janda & Abbott, 2007). Dans ces cas, d'autres gènes peuvent être ciblés afin de permettre l'identification. De plus, la taille du fragment obtenu lors du séquençage à haut débit peut également rendre l'identification au genre ou à l'espèce ambiguë, laissant place à l'identification à des niveaux taxonomiques supérieurs dans ces cas (Wang *et al.*, 2007b).

2.4.2 Identification moléculaire des champignons

L'identification moléculaire des champignons par séquençage des gènes codants pour les ARNr est une méthode fiable et couramment utilisée (Martin & Rygiewicz, 2005). Chez ces microorganismes, la petite sous-unité du ribosome est composée de l'ARNr 18S

et la grande sous-unité composée de l'ARNr 28S et de l'ARNr 5,8S (Willey *et al.*, 2008). Les gènes codant pour ces ARNr sont retrouvés les uns à la suite des autres, intercalés par les espaceurs internes transcrits 1 (ITS1) et 2 (ITS2) (Figure 2.3). Ces derniers sont responsables de la formation de structures secondaires essentielles aux ribosomes (Korabecna, 2007). Comme dans le cas des bactéries, ces gènes sont composés de régions conservées ainsi que de régions variables, permettant l'hybridation des amorces universelles au niveau des régions conservées, ainsi que l'identification des champignons au niveau des régions variables (Martin & Rygielwicz, 2005).

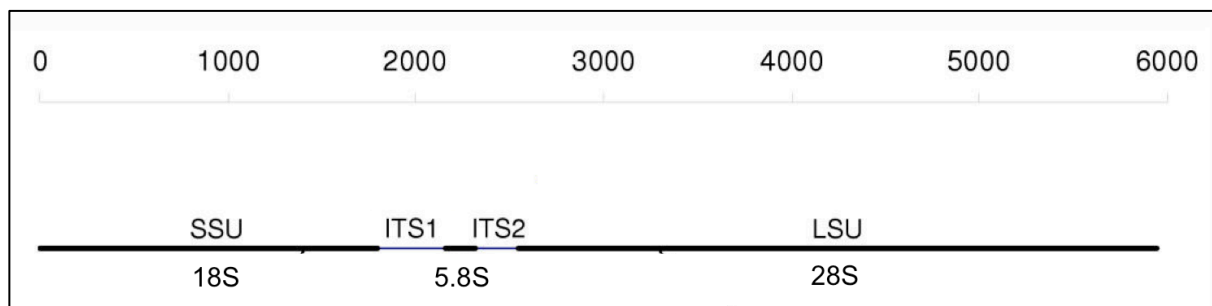


Figure 2.3. Organisation générale des gènes codants pour les ARNr chez les champignons.

Les champignons étant des organismes eucaryotes, ils ne sont pas les seuls à posséder les gènes codant pour ces ARNr (Martin & Rygielwicz, 2005; Persson *et al.*, 2011). Ceci implique qu'une attention particulière doit être portée sur les amorces utilisées pour amplifier les gènes, notamment dans le cas d'une identification des champignons à partir d'échantillons provenant d'insectes. Dans ce cas-ci, l'utilisation des ITS était impossible, puisque les amorces universelles disponibles pour ces régions ont déjà démontré une amplification de l'ADN provenant de l'insecte, et non pas spécifiquement des champignons (Persson *et al.*, 2011). L'utilisation du gène codant pour l'ARNr 18S s'est donc avérée le meilleur choix pour nos échantillons, puisqu'il existe des amorces permettant d'amplifier spécifiquement les champignons. De plus, cette région est présente dans les banques de références utilisées afin de faire l'identification taxonomique des séquences. Malheureusement, certains protistes (eucaryotes unicellulaires) retrouvés chez les insectes peuvent également être amplifiés avec ces amorces, mais en faible proportion. Dans ces cas, un traitement adéquat des données doit être utilisé afin de pouvoir éliminer ces séquences dites «contaminantes».

2.4.3 Traitement des données provenant du séquençage à haut débit

Le séquençage à haut débit génère des milliers de séquences pour chacun des échantillons, nécessitant l'utilisation de logiciels de bioinformatique afin d'analyser les données obtenues. Plusieurs logiciels sont disponibles en libre accès, tels que mothur et QIIME. Ces logiciels permettent l'analyse complète des séquences, des fichiers bruts jusqu'aux analyses de diversité (Schloss *et al.*, 2009; Caporaso *et al.*, 2010).

Puisque le séquençage à haut débit repose sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR), des erreurs peuvent être introduites lors de l'amplification, telles que des insertions, délétions, substitutions, ou encore la présence de bases ambiguës (Huse *et al.*, 2007). Il est donc important de faire un contrôle de la qualité des séquences avant de traiter les données, afin d'éliminer les erreurs et ainsi ne pas surestimer la diversité présente au sein de l'échantillon (Schloss *et al.*, 2011). Les séquences obtenues pourront par la suite être regroupées sous forme d'unités taxonomiques opérationnelles (OTU), représentant des groupements de séquences identiques entre elles selon un pourcentage donné (Schloss & Handelsman, 2005). Sur la base de ces OTU, une identification taxonomique peut être réalisée afin de connaître la composition microbienne des échantillons. Différents logiciels ou fichiers de références sont disponibles pour cette identification, tels que SILVA, Greengenes, le «Ribosomal Database Project» (RDP) ou encore NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Pruesse *et al.*, 2007; Cole *et al.*, 2013; Quast *et al.*, 2013). Différentes analyses de diversité peuvent également être réalisées sur la base de ces OTU, permettant de comparer les échantillons entre eux (Schloss *et al.*, 2009).

3 PROBLEMATIQUE

Au Canada et dans le nord des États-Unis, le dendroctone du mélèze, *Dendroctonus simplex* LeConte, est un insecte causant d'importants dommages aux peuplements de mélèzes (Langor & Raske, 1989a). Lorsque les populations d'insectes sont endémiques, ceux-ci s'attaquent uniquement aux arbres affaiblis ou encore récemment morts. Cependant, lorsque les populations atteignent des seuils épidémiques, les adultes peuvent également s'attaquer aux arbres sains, entraînant la mort de plusieurs milliers de mélèzes (Langor & Raske, 1987a; Langor & Raske, 1989a). Au cours des dernières années, un accroissement des attaques par cet insecte a été remarqué dans plusieurs régions du Québec (Claude Guertin, données non publiées). Afin d'accomplir son cycle de développement, le dendroctone du mélèze creuse des galeries sous l'écorce et s'alimente du phloème de son hôte, entraînant une réduction de l'apport d'éléments nutritifs essentiels à la survie de celui-ci (Langor & Raske, 1987b). Le développement de cette espèce subcorticale est caractérisé par quatre stades : l'œuf, la larve, la puppe et finalement l'adulte. C'est sous cette dernière forme que, à l'automne, le dendroctone du mélèze entre en diapause pour l'hiver. Au printemps, les adultes reprennent leurs activités et sortent de l'écorce à la recherche de nouveaux arbres à attaquer, afin de recommencer le cycle de vie (S.L. Wood, 2007b).

Il est généralement admis que les insectes du genre *Dendroctonus* vivent en association avec des microorganismes (bactéries, champignons filamenteux et levures), formant un microbiote (Six, 2013; Hofstetter *et al.*, 2015). Ces microorganismes facilitent l'établissement des insectes sur leurs arbres-hôtes, notamment en favorisant la dégradation de la cellulose, et en apportant des éléments nutritifs essentiels à leur développement (Morales-Jimenez *et al.*, 2013). Certains d'entre eux affaibliraient également le système de défense de l'arbre (Paine *et al.*, 1997). De plus, ces microorganismes seraient impliqués dans la détoxification de l'environnement subcortical de l'hôte, en dégradant les terpènes (Adams *et al.*, 2013). Plus encore, ceux-ci joueraient un rôle défensif, en protégeant les dendroctones contre certains microorganismes antagonistes présents dans le milieu, notamment les champignons entomopathogènes utilisés en lutte biologique, en produisant des substances antifongiques (Dillon & Charnley, 1988; Davis *et al.*, 2011). Dans le cas du dendroctone du mélèze, aucun microbiote n'a été étudié jusqu'à présent.

Afin de vérifier si les populations du dendroctone du mélèze possèdent un microbiote et, éventuellement, de déterminer son rôle dans l'attaque et l'établissement sur l'essence-hôte, une caractérisation des bactéries, champignons filamenteux et levures associés à ces

insectes est proposée. Par l'utilisation des techniques de biologie moléculaire, ce projet visait, dans un premier temps, à identifier l'ensemble des microorganismes associés aux populations de *D. simplex*. Par la suite, la composition du microbiome pour trois des quatre stades de développement (larve, pupa et adulte) a été déterminée, permettant d'observer la succession des microorganismes au sein du microbiote en fonction du développement de l'insecte et ainsi de proposer des fonctions pour ceux-ci. Finalement, la composition du milieu immédiat des adultes a également été caractérisée. Des travaux de mise en culture ont également été entamés afin d'isoler les microorganismes présents, dans le but de confirmer l'identification réalisée par séquençage à haut débit et de pouvoir éventuellement vérifier les fonctions proposées associées à ceux-ci.

Les travaux réalisés au cours de ce projet ont permis de confirmer la présence d'un microbiote chez *D. simplex*. Ces travaux ouvrent également la voie à une meilleure compréhension de la relation existant entre l'insecte et son essence-hôte. À plus long terme, ces travaux permettront de trouver de nouveaux outils de lutte biologique contre ce ravageur forestier.

4 HYPOTHESE ET OBJECTIFS

4.1 Hypothèse

La présence d'un microbiote joue un rôle facilitateur pour l'établissement des insectes du genre *Dendroctonus* sur leur essence-hôte à travers différents mécanismes. De plus, les microorganismes présents représentent une source alimentaire essentielle au développement de l'insecte. Ce microbiote procure également une protection à l'insecte contre les agents pathogènes présents dans le milieu environnant, ayant pour conséquence de réduire les options disponibles pour lutter contre ce ravageur. En observant les niveaux d'attaques enregistrés au Québec ces dernières années, il devient important d'étudier les interactions qui pourraient exister entre *D. simplex* et les microorganismes qui lui sont associés. L'hypothèse suivante a donc été émise :

Il y a présence d'un microbiome résident et transitoire associé à *Dendroctonus simplex*, dont l'abondance relative des microorganismes qui lui sont associés varie en fonction du développement de l'insecte.

4.2 Objectifs

4.2.1 Objectifs généraux et spécifiques

Les objectifs généraux de ce projet visaient, dans un premier temps, la caractérisation détaillée du microbiome associé à *D. simplex*. Dans un second temps, ce projet visait également la mise en place d'une banque d'isolats bactériens et fongiques appartenant au stade adulte de *D. simplex*, afin d'appuyer et confirmer l'étude du microbiome.

Afin de répondre à l'hypothèse de travail, les objectifs spécifiques suivants ont été formulés :

1. Caractérisation de la diversité bactérienne associée à l'ecto- et l'endomicrobiome des adultes de *D. simplex*, ainsi qu'au milieu immédiat de l'insecte ;

2. Caractérisation de la diversité fongique associée à l'ecto- et l'endomicrobiome durant le cycle de développement de *D. simplex* (larve, pupe et adulte), ainsi qu'au milieu immédiat de l'insecte ;
3. Caractérisation de la diversité bactérienne associée à l'ecto- et l'endomicrobiome durant le cycle de développement de *D. simplex* (larve, pupe et adulte) ;
4. Perspectives du microbiome (bactéries, champignons filamenteux et levures) au cours du cycle de développement de *D. simplex* ;
5. Mise en culture des microorganismes (bactéries, champignons filamenteux et levures) formant l'ecto- et l'endomicrobiote des adultes de *D. simplex*.

5 CHAPITRE 1 : SURVEYING THE ENDOMICROBIOME AND ECTOMICROBIOME OF BARK BEETLES : THE CASE OF *DENDROCTONUS SIMPLEX*

Audrey-Anne Durand, Amélie Bergeron, Philippe Constant, Jean-Philippe Buffet, Éric Déziel, et Claude Guertin

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, H7V1B7, Canada

Journal: Scientific Reports, publié

Soumission: 6 mai 2015

Acceptation : 26 octobre 2015

Publication : 26 novembre 2015

Contribution des auteurs :

Audrey-Anne Durand : Planification du *design* expérimental, réalisation des expériences, analyse des résultats, préparation des figures, rédaction du manuscrit

Amélie Bergeron : réalisation des expériences

Philippe Constant : analyse des résultats, révision du manuscrit

Jean-Philippe Buffet : analyse des résultats, préparation des figures, révision du manuscrit

Éric Déziel : Planification du *design* expérimental, analyse des résultats, révision du manuscrit

Claude Guertin : Planification du *design* expérimental, réalisation des expériences, analyse des résultats, révision du manuscrit

5.1 Résumé

Plusieurs espèces du genre *Dendroctonus* possèdent un microbiote (bactéries et champignons), formant un complexe symbiotique aidant les insectes à coloniser l'environnement subcortical de leur hôte. Par contre, la diversité des bactéries présentes à la surface de la cuticule ainsi qu'à l'intérieur de ce genre d'insecte demeure peu étudiée. Le but de cette étude était de caractériser le microbiome bactérien associé au dendroctone du mélèze, *Dendroctonus simplex*, par pyroséquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. L'ecto- et l'endomicrobiome, ainsi que les galeries, ont été étudiés. Plusieurs genres bactériens ont été identifiés pour l'ectomicrobiome, tels que *Pseudomonas*, *Serratia* et *Yersinia*. Au niveau de l'endomicrobiome, des entérobactéries et des gammaprotéobactéries ont été identifiées en majorité. Les résultats obtenus ont démontré la présence de communautés bactériennes exclusives à chacun des groupes, suggérant la présence de microbiome distinct chez l'insecte. Plus encore, les résultats démontrent que les galeries renferment une communauté bactérienne distincte de l'ectomicrobiome, suggérant une sélection des microorganismes par l'insecte. Cette étude rapporte pour la première fois l'identification du microbiome bactérien associé au dendroctone du mélèze.

5.2 Abstract

Many bark beetles belonging to the *Dendroctonus* genus carry bacterial and fungal microbiota, forming a symbiotic complex that helps the insect to colonize the subcortical environment of the host tree. However, the biodiversity of those bacteria at the surface of the cuticle or inside the body parts of bark beetles is not well established. The aim of this study was to characterize the bacterial microbiome associated with the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex*, using bacterial 16S rRNA gene pyrosequencing. The ecto- and endomicrobiome and the subcortical galleries were investigated. Several bacterial genera were identified, among which *Pseudomonas*, *Serratia* and *Yersinia* are associated with the surface of the beetle cuticle, and genera belonging to Enterobacteriaceae and Gammaproteobacteria with the interior of the insect body. The index of dissimilarity indicates that the bacterial microbiome associated with each environment constitutes exclusive groups. These results suggest the presence of distinct bacterial microbiota on the surface of the cuticle and the interior of *D. simplex* body. Additionally, the bacterial diversity identified in the galleries is substantially different from the ectomicrobiome, which could indicate a selection by the insect. This study reports for the first time the identification of the eastern larch beetle microbiome.

5.3 Introduction

Symbiotic microorganisms are crucial for plant feeding insects: they are involved in the food digestion processes and provide supplemental nutrition and detoxification of plant defense compounds (Brownlie & Johnson, 2009; Gibson & Hunter, 2010; Popa *et al.*, 2012). Several bark beetles belonging to the *Dendroctonus* genus carry a symbiotic complex that helps the insects to colonize their host trees (Popa *et al.*, 2012; Six, 2013). Symbiotic bacteria supplement the phloem diet with amino acids (Miao *et al.*, 2003; Douglas, 2009), vitamins (Gibson & Hunter, 2010) and nitrogen (Bridges, 1981; Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Morales-Jimenez *et al.*, 2013). For example, *Enterobacter agglomerans* and *Enterobacter* spp., which are associated with larvae and adults of *Dendroctonus terebrans*, are nitrogen-fixing bacteria (Bridges, 1981). Gammaproteobacteria and Actinobacteria isolated from *Dendroctonus rhizophagus* are capable of cellulose breakdown (Morales-Jimenez *et al.*, 2012a). Furthermore, in response to the attacks of the beetles, coniferous trees secrete and release deterrent terpenes, which are toxic for phloeophagous insects (Phillips & Croteau, 1999). Some *Pseudomonas* species isolated from *Dendroctonus ponderosae* and *Dendroctonus valens* are capable to metabolize the terpenoid molecules, which seems to facilitate the colonization of the host trees by the beetles (Adams *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2013). The microorganisms may also be involved in immunity processes in some beetle species (Hurst & Darby, 2009). Accordingly, some bacteria of the symbiotic complex produce secondary metabolites, some with antifungal activities (Cardoza *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2008; Aanen *et al.*, 2009). These symbiotic bacteria may protect the insects against entomopathogenic fungi used as biological control agents (Scarborough *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2008). For example, *Streptomyces* isolated from *Dendroctonus frontalis* produces mycangimycin, an antifungal molecule that inhibits the growth of the antagonistic fungus *Ophiostomas minus* (Scott *et al.*, 2008).

The eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* LeConte (Coleoptera: Scolytinae), is a phloeophagous beetle for which the microbiome has not yet been characterized. This beetle is a secondary pest that usually attacks freshly dead or weakened trees. However, the eastern larch beetle may undergo epidemic outbreaks; in such cases they may attack healthy trees (Langor & Raske, 1989c; Langor & Raske, 1989a). During the dispersal phase, the pioneer beetles bore holes in the tree trunk and subsequently buildup galleries into the phloem layer. Gallery construction causes severe desiccation, bark decay and eventually tree death (Langor & Raske, 1987a; Langor & Raske, 1989a). The widespread outbreaks observed in the past suggest that the identification of these beetles as a secondary pest should be reconsidered (Langor & Raske, 1989a).

The identification of microbial communities associated with *Dendroctonus* species has been mainly performed by using culture-dependent methods or through targeted sequencing following gene cloning (Hulcr *et al.*, 2011; Morales-Jimenez *et al.*, 2012a). Even though fungi are crucial partner in insect's microbiome, this paper attempts to focus on bacteria. Symbiotic bacteria have been isolated from the inside or the outside of the insect body. Mainly, ectosymbiotic bacteria are related to the mouthparts and cuticles of the insects while endosymbiotic bacteria are mostly found in the body cavity, in the gut and within cells (Steinhaus, 1946; Kikuchi *et al.*, 2007; Kikuchi, 2009). More recently, high throughput sequencing and community metagenomic analyzes have been used to identify the microorganisms associated with bark beetles (Hulcr *et al.*, 2012; Adams *et al.*, 2013). These approaches allow for a better resolution of the existing diversity in the samples. However, none of the previous studies investigated the difference that may exist between the ectomicrobiome and the endomicrobiome of an insect. Therefore, bacterial 16S rRNA gene pyrosequencing was used to identify bacteria associated with the eastern larch beetle. The aim of this research was to characterize the bacterial diversity associated with the surface of the cuticle, the interior of the insect body, as well as that found in subcortical galleries. Analyzes were performed to compare the bacterial diversity from the different microenvironments. We report the first comprehensive characterization of the bacterial diversity associated with the surface of the cuticle and the interior of *D. simplex*. Our results revealed non-random mutually exclusive bacterial communities, which demonstrate a specific organization between the three different environments.

5.4 Materials and Methods

5.4.1 Site location and sample preparation

Eastern larch beetles, along with a sample from their galleries, were collected from a Quebec provincial larch plantation located in St-Claude (Québec, Canada; Lat. 45.6809, Long. -71.9969) with the permission of the ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs authority. To obtain pioneer beetles, newly attacked hybrid larch trees were selected and harvested, and logs were transported to the laboratory, just after the insect flight activity. The tree sections were kept overnight at 4°C until the insects were harvested. Each *D. simplex* adult was picked using sterilized tweezers and placed into separated sterile 2 ml microcentrifuge tubes. The insects were recovered by gently peeling off the bark from the entrance holes until the insects were reached. A 1 cm section of the galleries was also collected near the insect entrance hole and placed in a sterile microcentrifuge tube.

The bacterial microbiome associated with the surface of the cuticle and the interior of the insect body, and the galleries were investigated. For each environment, three replicates were prepared. For each replicate, fifty insects were randomly selected and pooled in 15 ml polypropylene tubes to recover sufficient bacterial genomic DNA from the surface of the cuticle. Five consecutive washes in 5 ml phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) containing 0.1% Triton X-100 with 1 min agitation (Fisher Vortex Genie 2, Ottawa, ON, Canada) were applied to each sample. The pooled microbial suspensions were then filtered through a 0.22 µm nitrocellulose filter (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) to concentrate the biomass. Each filter was placed in a Lysing matrix A tube (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) until DNA extraction.

For the endomicrobiome of *D. simplex*, ten adults among the 50 washed insects were randomly selected per replicate. The surface of the insects was sterilized with three serial washes in 1 ml 70% ethanol (EtOH) with 1 min vortexing. Finally, 1 ml sterile water was used to wash the remaining ethanol, and the insects were then carefully crushed in 200 µl PBS containing 0.1% Triton using sterilized mortar pestles fitting 1.5 ml microcentrifuge tubes (VWR, Mont-Royal, QC, Canada). For each sample, the homogenate was transferred into a 2 ml screw cap tube containing 200 mg of 0.1 mm glass beads (BioSpecs, Bartlesville, OK, USA). This material was used for DNA extraction.

The bacterial microbiome associated with the subcortical galleries was recovered from the galleries where the insects were collected. A total of 25 galleries were selected per replicate. First, insect frass was removed, and the inside galleries were carefully scraped using a sterile scalpel. For each selected galleries, the material was then placed in an individual sterile microtube. As previously described with ectomicrobiome of larch beetle, five washes and agitations with PBS-Triton X-100 solution were performed, followed by filtration to recover bacteria. Each filter was then transferred into a Lysing matrix A tube until DNA extraction.

5.4.2 DNA extraction and PCR amplification

Total DNA was extracted using mechanical lysis method. Briefly, 1 ml extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA-2Na, 3% SDS, pH 8.0) containing 20 µg/ml RNase A was added into tubes containing the ectobacteria, the endobacteria, and those from the corresponding galleries. Cell lysis was achieved using the FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Two cycles of lysis at 4 m/s for 50 s followed by 5 min on the ice were performed. The tubes were then centrifuged at 16,800 x g for 5 min, and the supernatant recovered before the second lysis cycle. For each sample, ammonium acetate

was added to the combined supernatants at a final concentration of 2 M. Tubes were briefly agitated by inversion and kept on ice for 5 min before centrifugation at 20,800 x g for 15 min at 4°C. The supernatant was collected and maintained on ice for 5 min before a second centrifugation with the same parameters was done. Supernatants were collected and DNA precipitated overnight at 4°C by adding an equal volume of isopropyl alcohol (2-Propanol). Centrifugation at 20,800 x g at 4°C for 30 min was performed, and the supernatant discarded. Two DNA pellet washes with cold EtOH 70% and centrifugation at 20,800 x g for 15 min at 4°C were finally done. The pellets were air-dried and suspended in sterile water. DNA concentration was estimated using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Life Technologies, Burlington, ON, Canada) following the manufacturer instruction.

In order to document the presence of bacterial DNA in each sample, the 16S rRNA gene was amplified by PCR using the universal primers pA-27-YM (5' AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG 3') (Frank *et al.*, 2008) and pH (5' AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA 3') (Fernandez *et al.*, 1999). All PCR reactions were carried out in a 50 µl volume containing 25 mM MgCl₂, 10 µg BSA, 10 mM dNTPs, 10 mM of each primer, 5 U Taq DNA polymerase and 10x ThermoPol® buffer (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada). Following the initial denaturation step of 5 min at 94°C, 30 amplification cycles were performed (94°C for 45 s, 55°C for 45 s, 72°C for 45 s) followed by a final extension step at 72°C for 10 min. Amplification was confirmed by electrophoresis of the PCR products on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light. A negative control containing all the extraction reactive but no insect was realized and no amplification was observed.

5.4.3 16S rRNA pyrosequencing

DNA samples were sequenced by Research and Testing Laboratory, LLC (Lubbock, TX, USA). PCR amplification of bacterial 16S rRNA gene was done using the universal primers 28F (5' GAG TTT GAT CNT GGC TCA G 3') and 519R (5' GTN TTA CNG CGG CKG CTG 3') covering the V1-V3 variable regions. The amplicons were pyrosequenced using Roche 454 Titanium chemistry. Elongation was performed from the forward primer. Raw data are available on NCBI under BioProject number PRJNA275539.

5.4.4 Sequence processing pipeline

The post-sequencing processing were completed using the open-source program mothur v.1.33.0 software (<http://www.mothur.org>) (Schloss *et al.*, 2009) following the pipeline described by Comeau *et al.* (Comeau *et al.*, 2012). Raw 454 reads were first processed to remove low-quality reads, such as (i) the presence of one or more uncertain bases (N), (ii) sequences shorter than 150 nt (nucleotides), (iii) unusually long reads that extended more than 100 nt over the amplicon size, (iv) reads that had long homopolymers sequences (more than 8), and (v) reads that had incorrect forward primer sequences. Sequences corresponding to forward primers were kept to facilitate the alignment of the sequences during subsequent analyzes. Contaminants, such as chloroplasts and mitochondria, were eliminated before removing the chimeras with UCHIME (Edgar *et al.*, 2011), as implemented in mothur. The remaining filtered sequences were aligned by domain against the provided SILVA reference alignment (Quast *et al.*, 2013) using the ksize=9 parameter in mothur. Manual alignment was performed to correct the misaligned sequences with BioEdit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Reads were also trimmed of all bases beyond the reverse primer. Singletons were finally removed after clustering into draft Operational Taxonomic Units (OTUs) to obtain the final quality reads. An equalization step was performed to obtain equal sampling depth for each sample. The final aligned reads were clustered into OTUs at $\geq 95\%$ similarity level using the furthest neighboring cluster in mothur, thus allowing for the identification of the bacterial genus (Schmitt *et al.*, 2012). The measure of diversity and community similarity analysis were also obtained based on mothur analysis. Sequences were taxonomically identified using the Ribosomal Database Project (RDP) classifier version 2.6 (Wang *et al.*, 2007b) trained on 16S rRNA training set 9.

5.4.5 Diversity analysis

Rarefaction curves were generated within the software mothur to evaluate the sufficiency of the sampling effort using equalized data (*i.e.* random selection of a determined number of sequences from each library according to the size of the smallest library to avoid bias due to variable sampling efforts). The abundance-based coverage estimator (Ace) and the Shannon index, also generated with mothur, were used to estimate the diversity among the bacterial populations using the same data.

To proceed with the diversity analyzes among the bacterial communities, a maximum likelihood phylogenetic tree was constructed with MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) using a representative sequence of each previously generated OTU and an Archaea sequence as

the outgroup. A sample ID mapping file was also built to indicate to which sample each OTU belongs as well as the number of times each sequence was observed (sequence abundance). Finally, a category-mapping file was constructed to relate the sample names in the sample ID mapping file to their related data. A cluster of similarity was generated with Fast UniFrac (<http://bmf2.colorado.edu/fastunifrac/>) (Lozupone & Knight, 2005; Lozupone *et al.*, 2006) to compare all communities simultaneously and to observe which communities are phylogenetically similar. Average agglomerative clustering (UPGMA) based on computed UniFrac distances and the abundance of each OTU was calculated using a jackknife procedure with 1,000 permutations and 75% of the sequences to verify whether partitioning of ribotyping profiles corresponded to the three ecological niches surveyed. To visualize the bacterial community across all samples, a heat map was generated on the log-transformed abundance using the MultiExperiment Viewer (MeV) v4.9 (Saeed *et al.*, 2003). The representative sequence of each of the 90 OTUs found in abundance ($\geq 1\%$ of sample abundance), as well as their closely related sequences identified by BLASTN against NCBI database were aligned together with the MUSCLE (Edgar, 2004) algorithm implemented in MEGA. A maximum likelihood phylogenetic tree was built with FastTree 2.1.7 (Price *et al.*, 2010) using the GTR model with 1000 resampling to estimate node support values. Additionally, a Venn diagram was also generated with *mothur* to observe the partition of the OTUs across the three environments sampled. Finally, a principal coordinate analysis (PCoA) was also achieved with Fast UniFrac to assess whether different bacterial communities were distributed along the axes of variation using the same previous reference files.

5.5 Results

5.5.1 Bacterial diversity associated with the eastern larch beetle microbiome

To investigate the complete bacterial microbiome associated with the eastern larch beetle, ecto- and endobacteria, as well as the bacteria located in the galleries were recovered. For each environment, three replicates were analyzed, except for the ectobacteria, where the quantity of bacterial genomic DNA extracted from one of the pooled samples was not sufficient to perform pyrosequencing. A total of 108,447 raw sequences were obtained, and 48,380 high-quality-filtered sequences were recovered. The average read length was 422 bp. Comparison of the diversities between the endo-, the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries was performed on equalized-sequence number. Because one sample contained less sequences of quality than the other samples,

537 sequences were kept for each sample, representing a total of 4296 sequences. After clustering at a 95% pairwise-identity threshold, 278 OTUs were recovered, from which only 26% enclosed a unique sequence. Figure 5.1 shows the rarefaction curves associated with the eight samples. Asymptotes are reached for the samples coming from the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries, suggesting that the OTUs observed are representative of the whole bacterial diversities. As for the endomicrobiome, rarefaction curves tend to reach a plateau, indicating that most of the diversity was recovered, but not all of it. The endomicrobiome displays a higher bacterial richness than the other two environments. Hence, among the OTUs containing only one representative sequence, 74% were associated with the endomicrobiome. Consequently, the ectomicrobiome displays the lower richness, with only 6 OTUs representing 95% of the diversity.

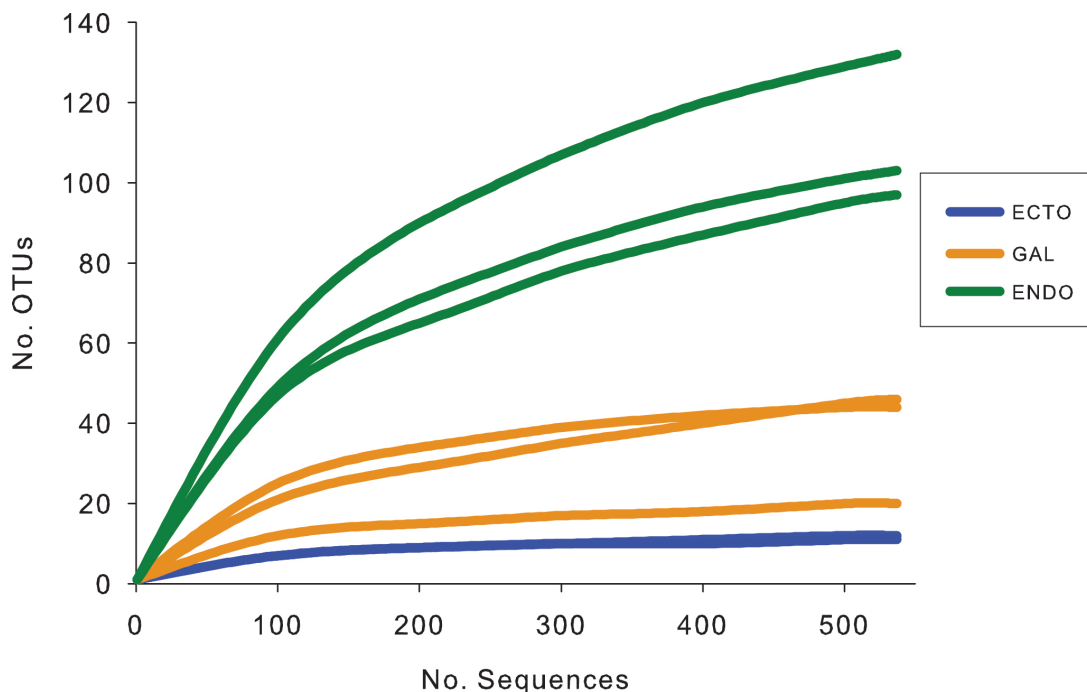


Figure 5.1. Rarefaction curves of OTUs diversity for each sample.

Each of the samples contains 537 sequences to obtain equal sampling depth. “Ecto”, ectomicrobiome; “Gal”, microbiome of the galleries; “Endo”, endomicrobiome.

The abundance-based coverage estimator (Ace) and Shannon diversity index for each of the samples were computed (Table 5.1). The Shannon indices show a significant difference between the endo-, the ectomicrobiome and microbiome of galleries with values, respectively, of 4.15, 1.27 and 2.24 (ANOVA test; $F = 60.14$; $p < 0.0003$). On the other hand, for Ace estimator results, the environment seems to have a significant effect on the microbial richness (ANOVA test; $F = 20.88$; $p < 0.0037$). However, no difference was observed

between the ectomicrobiome (16.68) and the microbiome of the galleries (60.93). Endomicrobiome (148.90) shows a significant difference in the bacterial richness found in the two other environments.

Table 5.1. Diversity associated with the external surface and the interior of the eastern larch beetle body as well as the galleries.

Environment	Shannon (sd)	Ace (sd)
ECTO	1.267 (0.008) ^a	16.684 (4.464) ^a
GAL	2.240 (0.377) ^b	60.931 (32.298) ^a
ENDO	4.150 (0.296) ^c	148.895 (18.453) ^b

The abundance-base coverage estimator (Ace) and the Shannon diversity index were used to compare richness within the samples. Each of the samples contains 537 sequences to obtain equal sampling depths. All generated OTUs were used to calculate the diversity indexes. “Ecto”, ectomicrobiome; “Gal”, microbiome of the galleries; “Endo”, endomicrobiome; “sd”, standard deviation.

5.5.2 Taxonomical composition and variability of bacterial communities associated with the eastern larch beetle

Each of the 278 OTUs was taxonomically identified using the RDP classifier. Most of the identified OTUs belong to the phyla Acidobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria (Figure 5.2). Within the Proteobacteria, Gammaproteobacteria were largely predominant, although a few Alphaproteobacteria OTUs were also identified. Only one predominant bacterial genus, *Pseudomonas*, was associated with the surface of the cuticle with 95% of the sequences total abundance. Two other genera, *Serratia* and *Yersinia*, were also considered abundant, representing respectively 2% and 1% of the sequences. Unclassified bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family were also associated with the insect cuticle with about 2% of the total sequences found.

Unclassified Gammaproteobacteria are the most prevalent OTUs associated with the endomicrobiome, followed by bacteria from the Enterobacteriaceae family, which together represent approximately 70% of the total abundance. *Lactobacilli* were also found in two of the three samples. A great number of non-abundant bacteria were found in those samples, representing 20% to 35% of the diversity.

A higher number of abundant bacterial OTUs ($\geq 1\%$ of total abundance) were identified in the galleries samples than in the ecto- and endomicrobiome of *D. simplex*. For all replicates, bacterial OTUs belonging to the *Pseudoxanthomonas* genus and the Enterobacteriaceae family represent almost 80% of the total sequences abundance. Other genera were also identified, such as *Pseudomonas*, *Serratia*, *Acidobacteria* Gp1 and *Lactobacillus*, each of them representing more than 1% of the galleries relative abundance. In addition, unclassified bacteria belonging to several phyla were found in these samples. Between 2% to 10% of the OTUs were placed in the category “others”, depending on the replicate. Experiments were conducted for a second year, and results were consistent with previous identification.

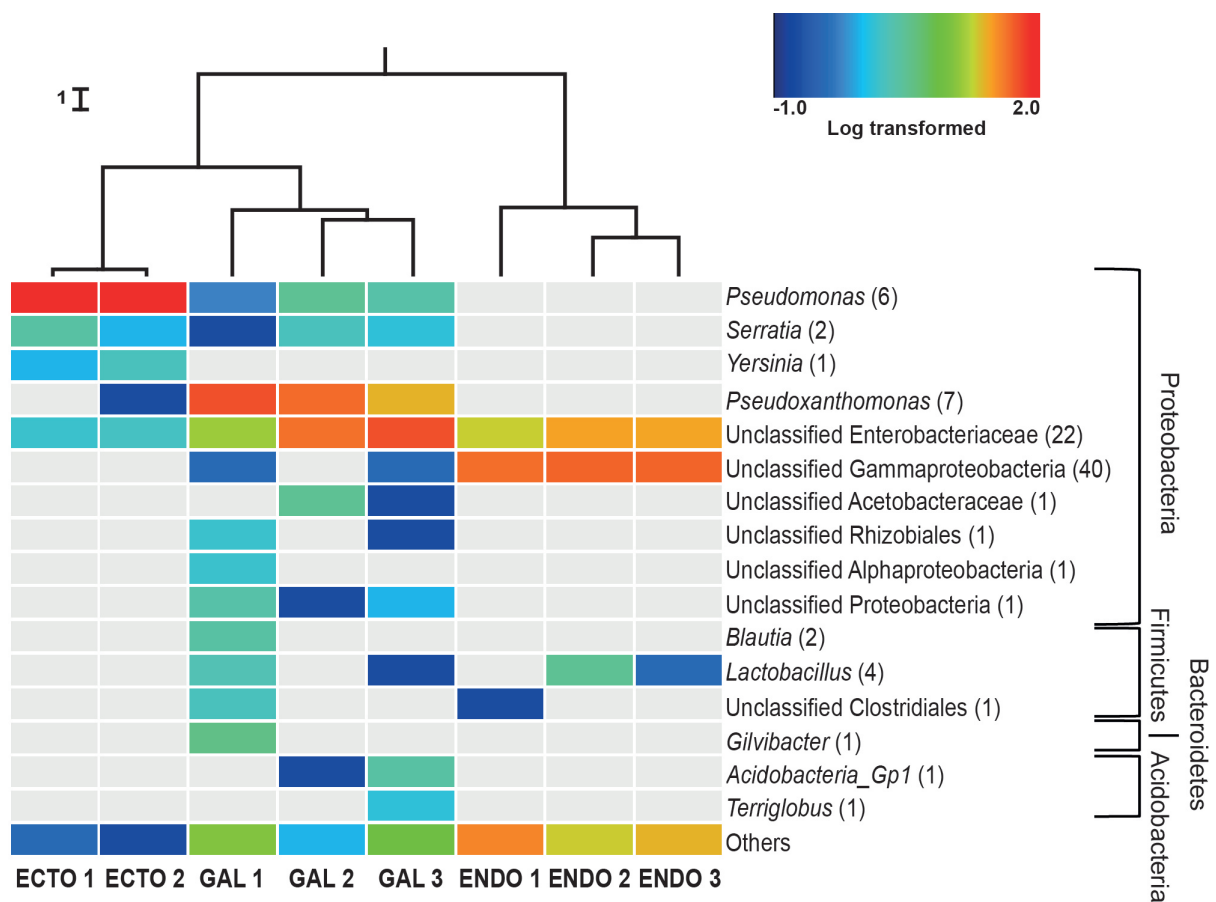


Figure 5.2. Bacterial community composition of the eastern larch beetle and the galleries. Only high quality filtered sequences were used to generate the heat map. Abundant OTUs ($\geq 1\%$ of the total abundance) are represented in the chart. The non-abundant OTUs ($< 1\%$) are grouped in the category named “others”. The heat map represents the log-transformed relative abundance and grey representing the absence of the OTU. Number in parenthesis represents the number of OTUs associated with each genus. Cluster of similarities regrouping the different samples is represented above the heat map, with each node supported by a Jackknife analysis with greater than 99.9% accuracy. “Ecto”, ectomicrobiome; “Gal”, microbiome of the galleries; “Endo”, endomicrobiome.

A weighted UniFrac UPGMA dendrogram (Figure 5.2) was computed to assess differences between microbial communities based on phylogenetic information. For each environment (ectomicrobiome, endomicrobiome and microbiome of the galleries), the different replicates clustered together, showing the consistency of the sequences obtained and the specificity of each environment. Additionally, the samples coming from the insect's cuticle and the galleries are more closely related, while OTUs associated with the endomicrobiome of *D. simplex* form a more distinct phylogenetic group. A Jackknife analysis was performed to establish the robustness of each node of the environmental cluster. Each node of the dendrogram was recovered with more than 99.9% accuracy, showing the validity of the similarity clustering.

To further investigate the taxonomic identification of the most abundant OTUs across the three ecological niches, a maximum likelihood phylogenetic tree was constructed using FastTree based on the representative 16S sequences of each OTU and their closely related sequences identified by BLASTN (Figure 5.3). Phylogenetic analysis revealed taxa related to genera *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Rahnella*, *Serratia* and *Ewingella* on the surface of the insect's cuticle. Whereas, in the interior of the insect body, most OTUs (56) formed a well-delineated and monophyletic cluster representing potentially novel bacterial genera belonging to the family Enterobacteriaceae. Among the closest relatives of this cluster (85% identity) were *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. Likewise, for the endobacteria, two OTUs were affiliated to *Lactobacillus* (Firmicutes). Finally, the most frequently found OTUs in galleries exhibit phylogenetic relationships with *Pseudoxanthomonas*, *Gilvibacter*, *Terriglobus*, *Lactobacillus* and *Raoultella*. Furthermore, some OTUs highly abundant in the endomicrobiome have also been recovered from the galleries.

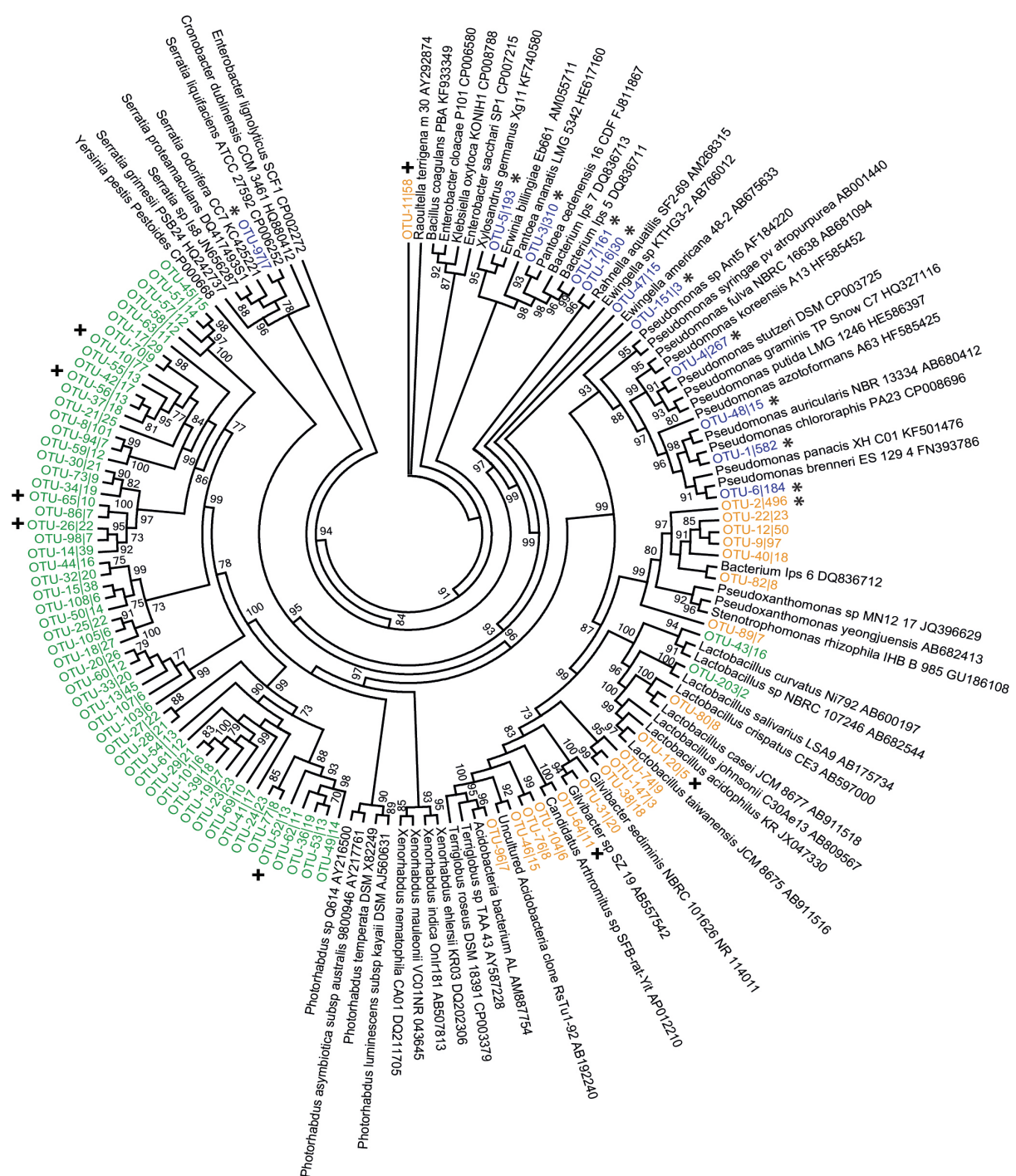


Figure 5.3. Phylogenetic affiliation of the abundant bacterial OTUs associated with the eastern larch beetle based on partial 16S rRNA gene sequences.

Closely related sequences were identified using BLASTN against NCBI database. Sequences were aligned using the MUSCLE algorithm implemented in Geneious. Maximum phylogenetic tree was constructed with FastTree using the GTR model with 1,000 resampling. The colors used for the OTUs represent the environment they belong to (blue = ectomicrobiome, red = microbiome of the galleries, green = endomicrobiome, * = presence in ectomicrobiome and galleries and + = presence in endomicrobiome and galleries).

5.5.3 Bacterial community comparison between sampled environments

A Venn diagram was also constructed to visualize the partition of the OTUs across the different environment types (Figure 5.4). As mentioned before, more OTUs were found associated with the endomicrobiome. Some OTUs are shared between the different niches, as observed in the heat map (Figure 5.2). One important observation is that there is no OTU shared only between the ectomicrobiome and endomicrobiome, further highlighting the difference in bacterial communities between the surface of the cuticle and the interior of the insect body. Moreover, few OTUs are shared between the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries, as well as between the endomicrobiome and the microbiome of the galleries.

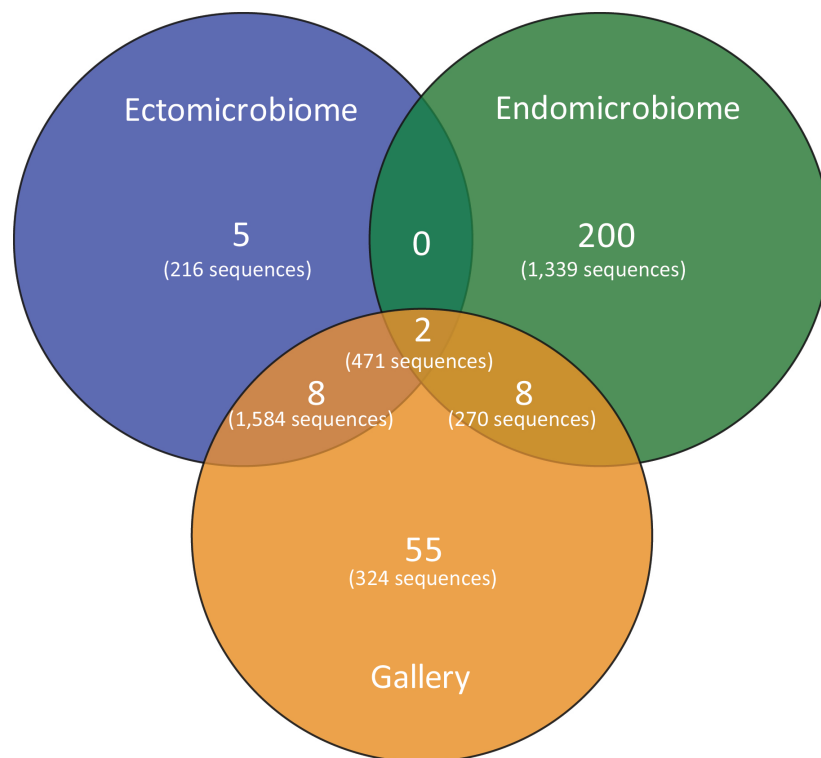


Figure 5.4. Venn diagram representing the distribution of the OTUs across the different environments.

Only the high quality filtered sequences clustered at a 95% pairwise-identity threshold were used to generate the diagram. The number of OTUs and sequences is shown for each environment type. “Ecto”, ectomicrobiome; “Gal”, microbiome of the galleries; “Endo”, endomicrobiome.

To ascertain whether different bacterial communities were distributed along the axes of variation, a principal coordinate analysis (PCoA) was performed. Figure 5.5 shows how the different bacterial populations are distributed. The first axis (P1) explains 79.1% of the variation and clearly distinguishes the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries from the endomicrobiome. However, this axis doesn't differentiate the ectomicrobiome and

the galleries. The second axis (P2) explains 13.7% of the variation and mostly influences the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries. Together, these axes explain 92.7% of the variability observed between sampled environments. The PCoA analysis clearly distinguishes among the three environments, highlighting once again their specific divergence.

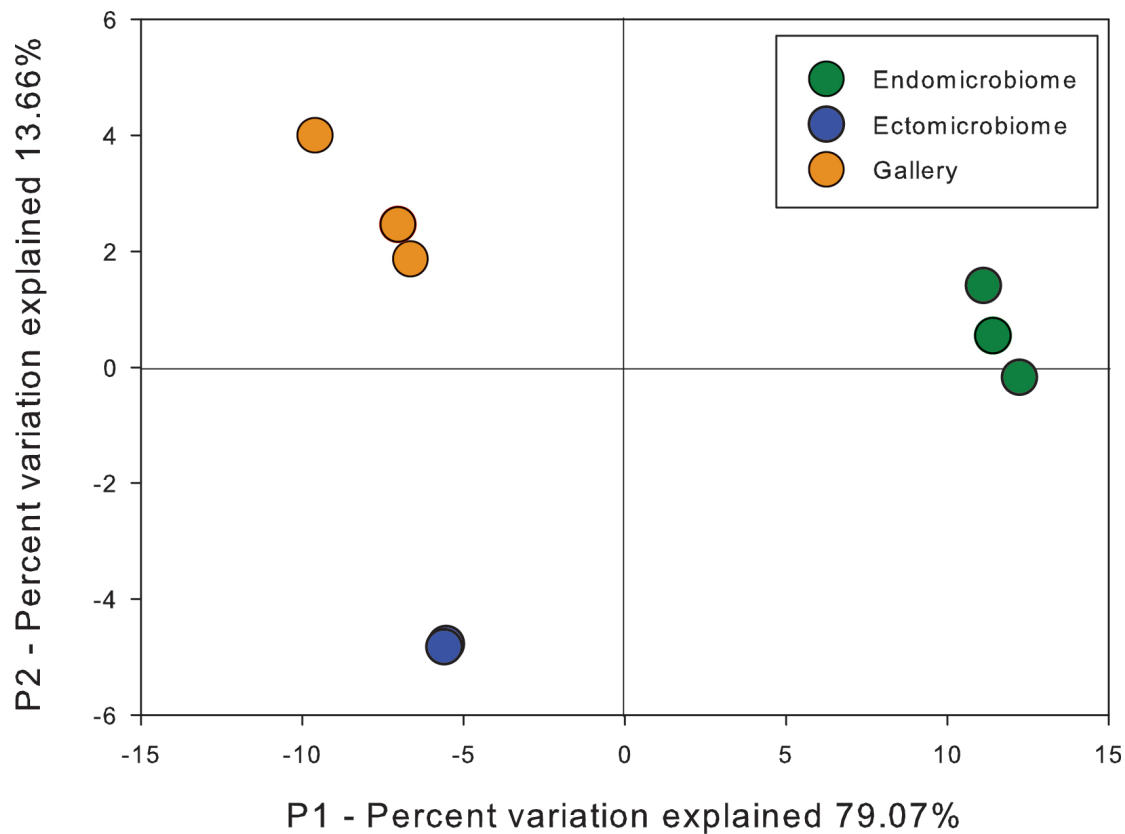


Figure 5.5. Principal coordinates analysis (PCoA) of bacterial communities associated with *Dendroctonus simplex* using Fast UniFrac.

The percentages of variation explained by each axis are shown in parentheses. Equal sampling depths were used for each sample. “Ecto”, ectomicrobiome; “Gal”, microbiome of the galleries; “Endo”, endomicrobiome.

5.6 Discussion

The aim of this work was to characterize the bacterial microbiome associated with the eastern larch beetle. We examined the diversity of the ecto- and endomicrobiome of *D. simplex* adults. And since the immediate surroundings in which the beetles live may also influence their microbiome, the microbial diversity of the galleries from which the insects were sampled was also investigated. Such microorganisms could have an impact on the eastern larch beetle’s microbiome (Hulcr *et al.*, 2011). To identify the widest bacterial diversity possible, the 16S rRNA was sequenced by pyrosequencing, using the universal

primer pair 28F-519R to cover the variable V1-V3 regions, widely used for the identification of bacteria. The V2 region is one of the two regions that provides the most accurate taxonomic classification with the lowest error rate (Wang *et al.*, 2007b). The rarefaction curves for these samples tend toward an asymptote, showing that the identified diversity was fully suitable for the aims of this study. However, a higher number of sequences would be necessary to detect all diversity associated with the endomicrobiome. It is noteworthy that the experiment was repeated the following year with insects sampled at the same location, and obtained results fully validated those presented here (unpublished).

In order to compare bacterial diversity between samples, diversity indexes were calculated (Table 5.1). The Shannon index lends importance to the rare OTU and is sensitive to their abundance. In contrast, the Ace index does not give a greater importance to OTUs with fewer sequences and thus constitutes an appropriate diversity measure when the number of OTUs to analyze is small (Hill *et al.*, 2003). To better understand the diversity of the samples, both indexes were used. Shannon's diversity index showed a significant difference between the three environments, highlighting the specific bacterial communities identified. However, Ace showed a significant difference between the endomicrobiome and the two other conditions, but not between the ectomicrobiome and the microbiome associated to galleries. These results may indicate that diversity observed between the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries is influenced by the non-abundant OTUs. In the literature, a large number of bacteria have been isolated from gut of several insect species, revealing its diversity (Dillon *et al.*, 2002; Gibson & Hunter, 2010; Morales-Jimenez *et al.*, 2012b; Morales-Jimenez *et al.*, 2013). Because many bacteria are significant factors for cellulose metabolism and for the acquisition of various nutrients, bacterial diversity of endomicrobiome of insects should be more complex. Despite the fact that some bacteria associated to bark beetles were previously recovered in the oral secretions or mouthparts (Cardoza *et al.*, 2006; Cardoza *et al.*, 2009), our results shown for the first time the presence of microbiome associated to the cuticle of the *D. simplex* adults. Some bark and ambrosia beetles possess mycangia, which are transport structures for symbiotic bacteria and fungi (S.L. Wood, 2007b). However, the eastern larch beetle is one of the bark beetle species without mycangia (S.L. Wood, 2007b). Thus, the associated bacteria may be carried on the cuticle of an insect, probably under the elytra (unpublished observations). The absence of bacterial transportation structure could explain the lower diversity related to the ectomicrobiome compare to that of the endomicrobiome of the eastern larch beetles.

Pseudomonas sp., *Rahnella* sp., *Serratia* sp., *Pantoea* sp. and *Erwinia* sp. have been previously detected and isolated from several *Dendroctonus* species (Adams *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2013; Boone *et al.*, 2013b; Aylward *et al.*, 2014). Experiments have shown that

some of these bacteria can reduce terpene concentrations (Adams *et al.*, 2011; Boone *et al.*, 2013b). A community metagenomic analysis of the mountain pine beetle (*D. ponderosae*) revealed that the majority of genes responsible for terpene degradation were associated with bacteria from the genera *Pseudomonas* and *Rahnella* (Adams *et al.*, 2013). Furthermore, *Pseudomonas* species produce a large variety of antifungal metabolites (Naik & Sakthivel, 2006; Park *et al.*, 2012; Seema *et al.*, 2012). Because the antifungal production is one of the significant roles played by symbiotic bacteria across the *Dendroctonus* genus, it is possible that *Pseudomonas* sp. associated with *D. simplex* are also involved in that function (Scott *et al.*, 2008; Aanen *et al.*, 2009). Consequently, terpene degradation and the production of antifungal metabolites might explain the presence of those bacteria to the *D. simplex* adult ectomicrobiome. Abundant bacteria found associated to the endomicrobiome were almost all Gammaproteobacteria, with also Firmicutes. In the phylogenetic tree (Figure 5.3), the majority of endomicrobial OTUs are divergent from known bacterial species present in Genbank. These well-delineated OTUs might belong to novel bacterial genera or/and species. Enterobacteriaceae bacteria have been already found in beetle's gut, where they were implicated in nitrogen-fixing processes and cellulolytic activities (Bridges, 1981; Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Morales-Jimenez *et al.*, 2012b; Morales-Jimenez *et al.*, 2013). *Pseudoxanthomonas*, *Gilvibacter*, *Terriglobus* and *Raoultella* are also associated with the gut of several *Dendroctonus* species (Morales-Jimenez *et al.*, 2012a; Morales-Jimenez *et al.*, 2013). It is thus possible that some of these apparently new identified bacteria are involved in important nutritional roles. No shared bacterial genus was observed between the ectomicrobiome and endomicrobiome of *D. simplex*, which suggests that these distinct populations play exclusive roles, supporting a symbiotic implication.

Data observed are supported by the diversity analysis performed with mothur and Fast UniFrac. The environmental cluster regrouped the ectomicrobiome and the galleries sample closer together, thus clearly distinguishing the endomicrobiome. The Fast UniFrac analysis is based on the phylogeny and the relative abundance of the identified OTUs in each environment. Clearly, bacteria found on the surface of the insect cuticle and the interior of the insect body, are phylogenetically dissimilar, most probably because of environmental selection. The galleries and the ectomicrobiome cluster closer together, reflecting some overlap of the bacterial genera previously observed. Still, the PCoA analysis clearly distinguishes the three ecological niches (Figure 5.5). The difference in the bacterial OTUs identified in the ectomicrobiome and the endomicrobiome was to be expected because of the difference in the environment they were recovered from. Surprisingly, the bacterial OTUs identified in the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries harbor substantial differences, which, once again, reflect the high specificity of the bacterial communities

identified in this study. This finding could indicate some selection of bacteria by the insect or a pressure from the environment. Altogether, our results indicate a specific organization between the bacterial communities. *D. simplex* also play a role as a vector of colonization of new ecological niches for microbes. Therefore, co-evolution may occur between the insect and its microbiome.

Finally, while significant bacterial diversity was found in the three niches investigated, a limited number of OTUs were predominant in each, with specific bacteria related to each of these ecological niches. Such a structured organization strongly suggests evolved specific interactions between *D. simplex* and its microbiome. Probably associated bacteria play different roles in each *D. simplex* environment, all of which may be complementary to the success of a beetle colonization attempt. The beetles used for this study were pioneers, as they were first to colonize the host tree. From a fitness perspective, these beetles should have carried the microorganisms conferring benefits related to initial host colonization.

This study is the first to report an association between the eastern larch beetle and a bacterial community. Moreover, it is the first to distinguish the ectomicrobiome and endomicrobiome of an insect and revealed significant differences. To get a complete picture of the microorganisms associated with *D. simplex*, investigation of the eukaryotic microbiome should be addressed. These findings will lead to the complete characterization of the eastern larch beetle symbiotic complex. Future directions will aim to isolate identified bacteria in order to investigate the functions in which they are involved.

5.7 Acknowledgement

We would like to thank Marie-Christine Groleau, Fabrice Jean-Pierre, Valentin Popa, Julie Wilkin and Vincent Peck for the technical assistance. This work was supported by the iFor Consortium (NSERC) and ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs Quebec (DGPSP) to CG. AAD was supported by a Wladimir A. Smirnov Fellowship.

6 CHAPITRE 2: FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH THE EASTERN LARCH BEETLE: DIVERSITY AND VARIATION WITHIN DEVELOPMENTAL STAGES

Audrey-Anne Durand, Jean-Philippe Buffet, Philippe Constant, Eric Déziel & Claude Guertin

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval (Québec), Canada

Soumis et accepté à BIORXIV le 9 janvier 2018

doi: <https://doi.org/10.1101/220780>

Contribution des auteurs :

Audrey-Anne Durand : Planification du *design* expérimental, réalisation des expériences, analyse des résultats, préparation des figures, rédaction du manuscrit

Jean-Philippe Buffet : analyse des résultats, préparation des figures, rédaction du manuscrit

Philippe Constant : analyse des résultats, révision du manuscrit

Éric Déziel : Planification du *design* expérimental, analyse des résultats, révision du manuscrit

Claude Guertin : Planification du *design* expérimental, réalisation des expériences, analyse des résultats, révision du manuscrit

6.1 Résumé

Les communautés bactériennes et fongiques associées aux scolytes, spécialement chez les espèces du genre *Dendroctonus*, servent de support à l'insecte pour coloniser l'environnement subcortical de son hôte. Pour leur part, les champignons filamenteux et les levures sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques chez l'insecte, tels que la nutrition, la protection contre les microorganismes antagonistes ou encore la détoxification des composés secondaires produits par la plante hôte. Le dendroctone du mélèze, *Dendroctonus simplex*, est un insecte ravageur causant d'importants dommages au Canada et au nord des États-Unis. Malgré que *D. simplex* soit largement étudié, ses communautés fongiques ainsi que leurs rôles écologiques demeurent peu étudiés. Dans cette étude, nous avons caractérisé la diversité fongique associée à cet insecte, puis nous avons comparé la composition de ces communautés en fonction du développement de l'insecte et de la microflore par pyroséquençage du gène codant pour l'ARNr 18S. La communauté fongique associée aux galeries a également été observée. Notre étude a révélé une diversité fongique inattendue pour l'ensemble des stades de développement de l'insecte. De plus, une différence significative au niveau de la richesse spécifique a été identifiée entre ces stades. En effet, les levures ont été retrouvées en abondance chez l'adulte et la larve, alors que les champignons filamenteux ont été retrouvés en abondance chez la puppe. Nos résultats indiquent possiblement une implication des levures dans la nutrition chez le dendroctone du mélèze.

6.2 Abstract

Bacterial and fungal communities associated with bark beetles, especially some *Dendroctonus* species, mediate challenging aspects of the subcortical habitat for their hosts. Filamentous fungi and yeasts are important in various metabolic processes of certain bark beetles, with involvement in nutrition, protection and detoxification of plant defense compounds. The eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex*, is recognized as a serious forest pest in the upper part of North America. Although *D. simplex* is well studied, its associated fungal communities and their ecological role remain to be investigated. Here, using 18S rRNA gene pyrosequencing, we investigated the yeasts and filamentous fungi associated with the eastern larch beetle. We also compare fungal communities between different life stages and microenvironments. The Fungal mycobiome associated with the galleries, the beetle's environment under the bark, was also investigated. Our study has

unveiled an unexpected fungal diversity associated with the life stages. Significant differences in species abundance between the life stages were also determined. Yeasts were found in higher abundance in the adult and larval stages, whereas filamentous fungi were more abundant in the pupae. Our results suggest a possible implication of yeasts in the eastern larch beetle nutrition.

6.3 Introduction

The bark beetle-microbe community is a complex assemblage that has fascinated ecologists and microbiologists for nearly a century. Indeed, bark beetles, especially *Dendroctonus* species (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), are among the most ecologically important organisms in conifer forest ecosystems worldwide. They colonize the subcortical tissues of conifers with the aid of their microbiota, including filamentous fungi, yeasts and bacteria (Popa *et al.*, 2012; Six, 2013). These associated microorganisms play a key role in bark beetles' biology, including nutrition, protection against pathogens, detoxification of plant defense compounds for host plant use, and swarm behavior modifications by the synthesis of pheromones (Popa *et al.*, 2012; Adams *et al.*, 2013; Davis, 2014; Shi *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015).

Dendroctonus species are commonly associated with filamentous fungi and yeasts (Rivera *et al.*, 2009; Popa *et al.*, 2012; Six, 2012; Davis, 2014; Hofstetter *et al.*, 2015). The most prevalent bark beetle fungal partners are Ophiostomatales belonging to the *Grosmannia* and *Ophiostoma* genera, and yeasts of the *Saccharomycetaceae* family (Six *et al.*, 2011; Popa *et al.*, 2012; Davis, 2014). Bark beetles carry their fungal communities in the gut, on the surface of their exoskeleton or within highly specialized structures (Six, 2003b; Six, 2012; Davis, 2014). As bark beetle tunnel under the bark, they inoculate the wall of their galleries with the fungus (Paine *et al.*, 1997; Six & Klepzig, 2004).

While most bark beetles are phloeophagous, some are considered mycophloeophagous; gaining nutrients from feeding on fungi as well as phloem (Popa *et al.*, 2012; Six, 2013). Some of these nutritional symbioses are obligate where the beetle gains nitrogen and others nutrients from the fungi (Ayres *et al.*, 2000; Bleiker & Six, 2007). Feeding on Ophiostomatales fungi increases the beetles' fitness throughout their life stages by stimulating the growth of larvae as well as increasing the fecundity, reproduction and survival rate of adults (Moore & Six, 2015).

Yeasts, known to be prolific metabolizers, also have significant functional roles in bark beetle ecology. Some beetle-associated yeasts use plant terpene defenses as carbon sources (Davis, 2014). Furthermore, yeasts isolated from several *Dendroctonus* species produce a variety of volatile compounds acting as semiochemicals, that are responsible of influencing the behavior of beetles as well as their predators (Davis, 2014). They can also modulate the growth of filamentous fungi, including mutualists of the beetle, entomopathogens, and opportunistic saprophytes (Hulcr & Dunn, 2011; Davis, 2014). Moreover, it has been suggested that yeasts provide nutritional supplements for the beetles. However, no direct evidence has yet supported this hypothesis (Six, 2013; Davis, 2014; Hofstetter *et al.*, 2015).

The eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* LeConte, is a subcortical phlophagous insect that kills tamaracks, *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch, and some exotic larch species. The distribution of this beetle extends throughout the range of the natural tree host, including northeastern and north-central regions of North America, western Canada, and Alaska (Langor & Raske, 1987a; Langor & Raske, 1987b; Seybold *et al.*, 2002). This beetle is mainly considered as a secondary pest attacking freshly dead or weakened trees but, under epidemic conditions, it can also kill healthy *Larix* species (Langor & Raske, 1987a; Langor & Raske, 1989a). In the mid-1970s and early-1980s, a widespread outbreak of the eastern larch beetle caused the death of 1.4 million m³ of tamarack in the Atlantic provinces of Canada alone. Since then, the eastern larch beetle has been recognized as a serious forest pest (Langor & Raske, 1989a). During the dispersal period, pioneer beetles attack trees and build galleries in the phloem layer. Following the reproduction period and egg hatching, larvae also excavate galleries and eat phloem throughout their development. The last larval instar digs a pupal chamber, stops feeding and empties its digestive tract in preparation for transformation into pupae, which represents an inactive stage. The pupae will then transform into adults, overwintering until the next dispersal period (Langor & Raske, 1987a; Langor & Raske, 1987b). Although *D. simplex* is well studied, the associated fungi and their ecological roles in the development of this beetle remain to be investigated.

Since the relative importance of the filamentous fungi and yeasts associated with bark beetles likely varies over their different growth stages, the present study was undertaken to identify the fungal communities associated with *D. simplex* throughout its life stages, using 18S rRNA amplicon pyrosequencing. We compared fungal communities between different life stages of the larch beetle (*i.e.*, adult, larva, and pupae). In a previous study, we have investigated the bacterial communities associated with the eastern larch beetle and found that the composition of bacterial communities is clearly dissimilar between the surface (ectomicrobiome) and the interior (endomicrobiome) of *D. simplex* body (Durand

et al., 2015). Thus, these two microenvironments were also investigated in the present study. Additionally, the mycobiome associated with the galleries was explored. We hypothesized that the abundance of the associated fungi should vary according to the life stage of the beetle. These results are the first step to provide insights into the potential ecological roles of filamentous fungi and yeasts in the insect life cycle.

6.4 Materials and Methods

6.4.1 Site location, beetle processing, and samples preparation

Beetles were collected from a provincial larch plantation located near Saint-Claude (Quebec, Canada; Lat. 45.6809, Long. -71.9969) with the permission of the Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs authority. Log sections of randomly selected larch trees showing apparent signs of attacks by *D. simplex* were transported to the laboratory where they were stored at room temperature in plexiglass cages (30 cm x 30 cm x 88 cm). Beetle development was monitored weekly by gently peeling off the bark from the entry holes until the insects were reached. Based on their developmental morphology, pioneer beetles (adults), larvae, and pupae were randomly harvested with sterilized tweezers from different log sections, and insects were individually placed in sterile 2 ml microcentrifuge tubes.

For each life stage of *D. simplex*, the fungal microbiota associated with the ecto- and endomycobiome was recovered. For both of these fungal communities, three replicates were prepared following the method previously described (Durand *et al.*, 2015). For each replicate, 50 insects were randomly selected, for a total of 150 insects per life stage. Briefly, for the ectomycobiome of each life stage, insects were pooled in 15 ml polypropylene tubes to recover sufficient fungal genomic DNA from the surface of the cuticle. Then, each sample underwent five serial washes with 5 ml phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1 % Triton X-100, with 1 min agitation (Genie 2 Vortex, Fisher, Ottawa, ON, Canada). The solution was filtered through a 0.22 μm nitrocellulose filter (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) to recover the biomass. Each filter was placed in a Lysing matrix A tube (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) for DNA extraction. To recover the endomycobiome from each life stage, ten previously washed beetles were randomly selected for each replicate. Their external surface was sterilized with three serial washes in 70% EtOH, followed by one wash with sterile water. The insects were then crushed into PBS and placed in a 2 ml screw cap tube containing 200 mg 0.1 mm glass beads (BioSpecs, Bartlesville, OK, USA) for DNA extraction.

The mycobiome associated with the subcortical galleries was recovered from the galleries where the pioneer beetles (adults) were collected. A total of 25 galleries were pooled per replicate. First, insect frass was removed, and the inside galleries were carefully scraped using a sterile scalpel. For each selected gallery, the material was then placed in an individual sterile microtube. Samples were processed as for the ectomycobiome.

6.4.2 DNA extraction and PCR amplification

Total DNA was extracted following the method previously described (Durand *et al.*, 2015). Briefly, 1 ml of extraction buffer containing 20 µg/ml RNase A was added to tubes containing the ecto- and endomycobiome. Cell lysis was achieved using the FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Two cycles of lysis at 4 m/s for 50 s followed by 5 min on ice were performed consecutively. After centrifugation at 16,800 x *g* for 5 min, the supernatant was recovered, and extraction buffer containing RNase A was added to the previous tubes for the second cycle of lysis. Ammonium acetate was added to the supernatant at a final concentration of 2 M. The content was briefly mixed by inversion and the tubes kept on ice for 5 min before centrifugation at 20,800 x *g* for 15 min at 4°C. After collecting the supernatant, a second centrifugation was done with the same parameters. An equal volume of isopropyl alcohol (2-Propanol) was added to the supernatant, and DNA precipitation was performed overnight at 4°C. Centrifugation at 20,800 x *g* at 4°C for 30 min was done the next morning; then supernatant was discarded. Pellets were washed twice with 70% EtOH and were centrifuged at 20,800 x *g* for 15 min at 4°C. The EtOH supernatant was discarded, and pellets were air-dried before suspension in sterile ultrapure water. DNA concentration was estimated using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Life Technologies, Burlington, ON, Canada) following the manufacturer instruction. The integrity of the genomic DNA was confirmed on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

PCR amplification was achieved to confirm the presence of fungal DNA in the samples. Universal fungal primer NSA3 (5' AAA CTC TGT CGT GCT GGG GAT A 3') and NLC2 (5' GAG CTG CAT TCC CAA ACA ACT C 3') were used to amplified the SSU, ITS and LSU regions of the rRNA gene (Martin & Rygiewicz, 2005). Each 50 µl PCR reaction contained 25 mM MgCl₂, 10 µg BSA, 10 mM dNTPs, 10 mM of each primer, 5 U Taq DNA polymerase and 10x ThermoPol® buffer (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada). Following the initial denaturation step of 5 min at 94°C, 30 amplification cycles were performed (94°C for 30 s, 67°C for 30 s, 72°C for 1 min) followed by a final extension step at

72°C for 10 min. Amplification was confirmed by electrophoresis of the PCR products on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light. A negative control using all the extraction solutions but no insect was performed, and no amplification was observed.

6.4.3 Fungal 18S rRNA pyrosequencing

DNA samples were sent to Research and Testing Laboratory (Lubbock, TX, USA) for sequencing. The fungal 18S rRNA gene was amplified using the universal primers SSUForward (5' TGG AGG GCA AGT CTG GTG 3') and funTitSsuRev (5' TCG GCA TAG TTT ATG GTT AAG 3'). Roche 454 FLX-Titanium chemistry was used to sequence the amplicons. Elongation was performed from the forward primer. Raw data are available on NCBI under BioProject number PRJNA354793 for the life stages of *D. simplex* and PRJNA377102 for the galleries.

6.4.4 Sequences processing pipeline

The post-sequencing processing were completed using the open-source program mothur v.1.33.0 software¹ (Schloss *et al.*, 2009). Raw 454 reads were first processed to remove low quality reads, such as those containing (i) one or more uncertain bases (N), (ii) sequences shorter than 150 nt (nucleotides), (iii) unusually long reads that extended more than 100 nt over the amplicon size, (iv) reads that have long homopolymer sequences (more than 8), and (v) reads with incorrect forward primer sequences. Regions corresponding to the forward primer were kept to facilitate the alignment of the sequences during subsequent analyzes. Chimeras were removed with UCHIME against the SILVA reference alignment release 119 (Edgar *et al.*, 2011; Quast *et al.*, 2013), as implemented in mothur. The remaining filtered sequences were aligned by domain against the SILVA reference alignment using the ksize=9 parameter in mothur. Reads were also trimmed of all bases beyond the reverse primer with BioEdit 7.2.5². Singletons were finally removed after clustering into draft Operational Taxonomic Units (OTUs) to obtain the final high quality reads. Libraries were normalized to the sequencing effort of the smallest 18S rRNA gene library (2641 sequences) to avoid biases in comparative analyzes introduced by the sampling depth. The final aligned reads were clustered into OTUs at $\geq 97\%$ identity as done before (O'Brien *et al.*, 2005; Buée *et al.*, 2009; Rousk *et al.*, 2010) using the furthest

¹ <http://www.mothur.org>

² <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

neighboring cluster in mothur. Representative sequences of each OTU were taxonomically identified by BLASTN against the NCBI database³. The taxonomic identification is based on the current name in MycoBank Database⁴. Some contaminant OTUs related to protists were identified in a few samples; they were removed from the data set. The relative abundance of each OTU is presented.

6.4.5 Diversity analysis

Rarefaction curves were generated using the mothur software. Diversity analysis were performed with the R software 3.1.3⁵. Shannon index was calculated with the package “vegan”. ANOVA was performed with JMP Pro 12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) on obtained values. A Hellinger transformation was first applied to standardize the dataset. The “vegan” and “gclus” packages were used to generate the PCA. Equilibrium circle (not shown) of descriptor with the radius $\sqrt{d/p}$ (where d is the number of dimensions of the reduced space: 2 and p is the total space: 1634) was plotted to identify OTUs significantly contributing to the axes defining the position of sampling sites. Additionally, a PERMANOVA was calculated with the package “vegan”. A Kruskal-Wallis rank sum test and a Dunn test were performed in R to find significant differences between relative abundance for each abundant OTU. Indicator OTUs characterizing the different life stages were generated using the package “indicspecies”. Heatmap representing the distribution of these indicators across the life stages was generated using the “gplots” and “RColorBrewer” packages.

The representative sequences of each of the 69 OTUs found in high relative abundance throughout beetle life stages ($\geq 1\%$ of sample abundance), as well as their closely related sequences identified by BLASTN against the NCBI database, were aligned together with the MUSCLE (Edgar, 2004) algorithm implemented in MEGA. A maximum likelihood phylogenetic tree was built with FastTree 2.1.7 (Price *et al.*, 2010) using the GTR model with 1000 resampling to estimate node support values.

6.4.6 Isolation and culture of *D. simplex* associated fungi

Yeasts and filamentous fungi associated with the adults of *D. simplex* were isolated using the same method previously described. The wash solutions and the crushed insects were plated on several culture media: Potato Dextrose Agar (pH 7.4; BD Difco, Franklin

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

⁴ <http://www.mycobank.org>

⁵ <http://www.r-project.org>

lakes, NJ, USA), Malt Extract Agar (pH 4.7; BD Difco), Czapek Solution Agar (pH 7.3; BD Difco) and Yeast Malt Extract Agar (pH 3.5; 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 1% glucose, 0.5% tryptone, 2% agar). To only obtain fungi isolates, 1 mg/ml streptomycin, 0.05 mg/ml penicillin and 0.05 mg/ml chloramphenicol were added to the media. Petri dishes were incubated for two weeks at 25°C. Obtained fungi were purified separately on the same medium following the same conditions.

DNA extraction of the purified fungi was achieved using the same protocol as described above. A PCR amplification was done with the universal primers ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') and ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White *et al.*, 1990). After visualisation, PCR products were purified using the EZ-10 spin column PCR purification kit (Bio Basic, Markham, ON, Canada). A digestion with the restriction enzymes HaeIII, DdeI and HinfI (NEB) was done to select unique isolates. Selected purified PCR products were sequenced using the same primers and taxonomically identified by BLASTN.

6.5 Results

6.5.1 *Dendroctonus simplex* fungal diversity across developmental stages and microenvironments

To compare the fungal microbiota associated with the life stages and microenvironment of *D. simplex*, the ecto- and endomycobiome of the adults, larvae and pupae were recovered, using 50 insects for each of the three replicates per life stages. Following DNA extraction, a total of 18 samples were analysed, and 117,949 raw sequences were obtained. After quality control, 85,216 high-quality-filtered sequences were left. The average read length was 447 bp. After the equalization step and removing the protist reads, 44,377 sequences were kept for the remaining analyses. Clustering at 97% pairwise-identity generated 1623 OTUs. Rarefaction curves tend toward an asymptote, indicating that a suitable number of sequences were obtained for this analysis, although not all diversity was recovered (Sup Fig 6.4). This indicates that a larger number of sequences will be needed in future studies. Additionally, no significant differences were observed in the diversity (Shannon index) between the analysed samples (Sup Table 6.2).

A principal component analysis (PCA) was generated to see the dispersion of the samples along the axes of variation (Fig 6.1). Together, the first two axes explained 52.8%

of the variation. The three replicates from all sample types clustered together, except one replicate associated with the endomycobiome of the adults, showing the reproducibility of the results. However, the dissimilarity of this particular sample did not influence the position of the other samples in the PCA (data not shown). All replicates from the ectomycobiome of the adults and larvae are grouped together, showing similarity in the composition of their fungal communities. Samples belonging to the endomycobiome of larvae showed divergence from other samples, as they are separated by the second axis (19.3%). Finally, the pupae samples (ecto- and endo-) are separated from the two other life stages by the first axis (33.5%), showing a divergent OTUs assembly associated with this life stage.

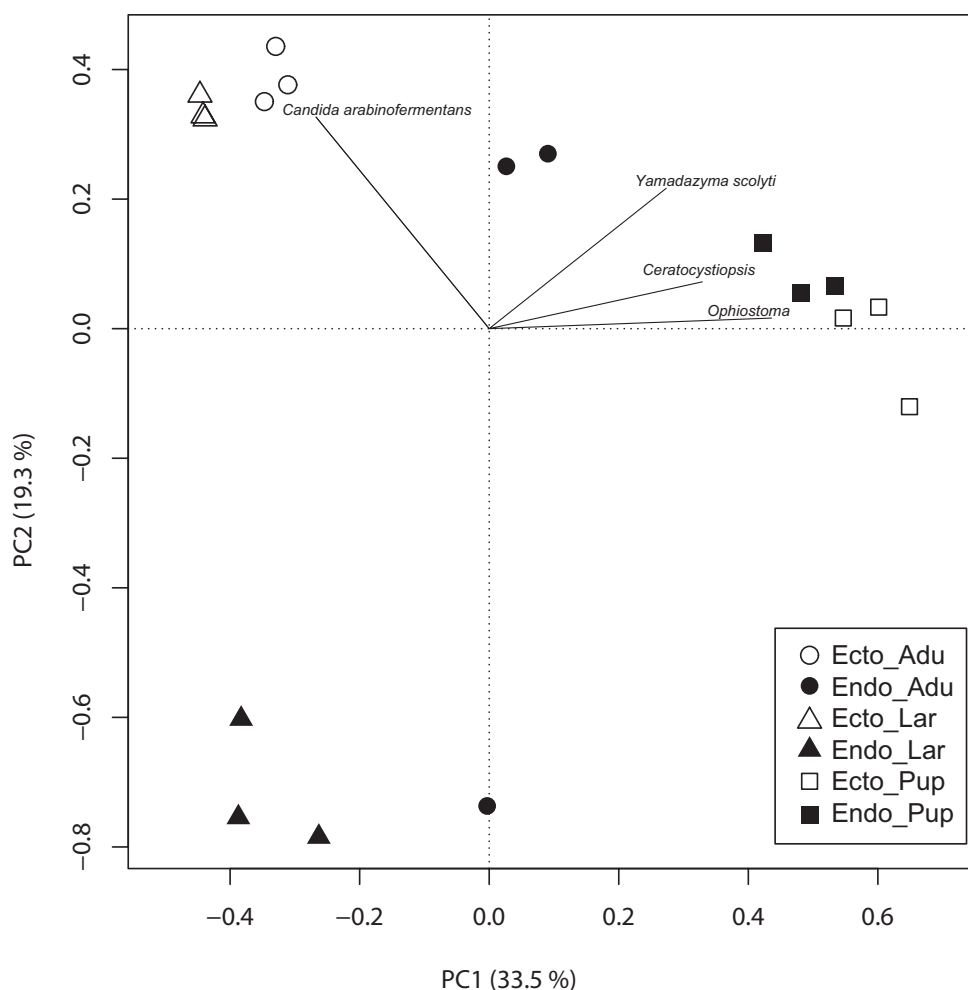


Figure 6.1. Principal component analysis of the different developmental stages and microenvironments of *D. simplex*.

50 insects were used per replicates, representing 150 insects for each developmental stage. All generated OTUs and equalized dataset were used to construct the PCA. Relative abundance of each OTU was used. “ECTO”, ectomycobiome; “ENDO”, endomycobiome; “ADU”, adults; “LAR”, larvae; “PUP”, pupae.

Four OTUs had a significant effect on the position of the samples in the PCA, represented by two yeasts and two filamentous fungi. *Candida arabinofementans* influenced the position of the adults and larvae ectomycobiome, whereas one OTU belonging to *Yamadazyma scolyti* influenced the position of the adult's endomycobiome. Two filamentous fungi genera, *Ceratocystiopsis* and *Ophiostoma*, influenced the position of pupae samples. These results seem to indicate that yeasts have an impact on the position of adults and larvae samples, whereas filamentous fungi influence the pupae samples position. Moreover, the PCA analysis seems to indicate that the life stages apply a selective pressure on the mycobiome, as shown by the position of the samples along the axes of variation. Accordingly, the life stage explained 59.1% of the variation observed in our analyses (PERMANOVA, p-value = 0.001).

6.5.2 Taxonomic identification of mycobiome associated with developmental stages

Each of the 1623 OTUs linked to the life stages of the beetle were taxonomically identified by BLASTN against the NCBI database. A phylogenetic tree was generated with the abundant ($\geq 1\%$) OTUs to confirm their taxonomic affiliations (Sup Fig 6.5). Figure 6.2 shows the taxonomic identification of abundant ($\geq 1\%$ of sample relative abundance) yeast and filamentous fungi for each of the six microenvironments investigated. All the identified yeasts and filamentous fungi belonged to the phylum Ascomycota. More specifically, all yeasts belonged to the Saccharomycetes class, whereas filamentous fungi belonged to diverse classes. Yeasts were found in high abundance in the adult ecto- and endomycobiomes, with more than 70% of the total abundance in each sample. Additionally, yeasts were also found in high abundance in the larval ecto- and endomycobiome with, respectively, about 75% and 65% of the total abundance. On the other hand, filamentous fungi were abundant in the pupae, with 54% and 35% in the ecto- and endomycobiomes respectively. Depending on the samples, between 20 to 29% of the sequences observed were associated with non-abundant OTUs ($<1\%$ of the sample abundance).

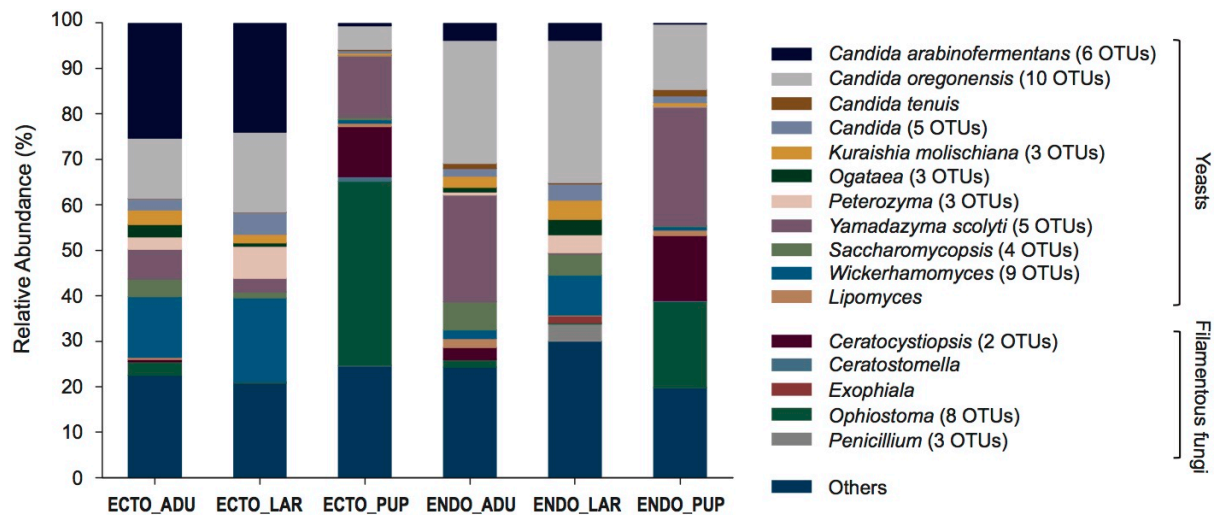


Figure 6.2. Taxonomical identification of the fungal community associated to the developmental stages and microenvironments of the eastern larch beetle.

50 insects were used per replicates, representing 150 insects for each developmental stage. All abundant OTUs ($\geq 1\%$ of the relative abundance per sample) are represented. Non-abundant OTUs ($< 1\%$) are grouped in the category others. Mean relative abundance of the three replicates is represented for each developmental stage. Yeasts identified to the gender represent cultured strains. “ECTO”, ectomycobiome; “ENDO”, endomycobiome; “ADU”, adults; “LAR”, larvae; “PUP”, pupae.

Among the identified yeasts, *Candida* species, such as *C. arabinofementans*, *C. tenuis* and *Candida* sp., were found in abundance ranging from 5% to 30% of all OTUs. On the other hand, OTUs corresponding to genera such as *Kuraishia*, *Ogataea* and *Peterozyma*, ranging from 1% to 7%, were also found in abundance in both the ecto- and endomycobiome of adults and larvae, but were not abundant in the pupal samples. Additionally, *Saccharomycopsis* and *Wickerhamomyces* represented 1% to 13% of total abundance in adult and larval samples but were underrepresented in pupae samples. Finally, *C. oregonensis* and *Yamadazyma scolyti* were found in abundance in all samples and were the two yeasts found in abundance in pupal samples. Among yeasts, *C. arabinofementans* and OTUs belonging to the *Ogataea* genus were closely related to the ecto- and endomycobiome of adults and larvae, and underrepresented in pupae samples (Sup Table 6.3).

Among the identified filamentous fungi, OTUs related to the *Ophiostoma* genus were found in abundance in most samples, with up to 40% in the pupae ectomycobiome. Moreover, these OTUs were mainly found in the pupal samples but were also identified in the adult’s ecto- and endomycobiome, with an abundance around 2%. *Ceratocystiopsis* genus was prevalent in pupal samples, with up to 14% of sample abundance. Additionally, this genus was also identified in the endomycobiome of the adults (3%). *Penicillium* was also found (3%) in the larvae endomycobiome, but was mostly absent in the other samples. Two

others filamentous fungi genera were identified, such as *Ceratostomella* and *Exophiala*, with abundance close to 1%.

The culture-base approach on adult beetles support the data obtained by high-throughput sequencing, as the majority of isolates were yeasts (44 yeasts out of 58 isolates total). Although different culture medias were used to obtain the highest diversity possible, obtained isolates on different media were redundant. Isolates corresponding to abundant OTUs identified by high-throughput sequencing are presented in supplemental Table 6.4. Mainly isolates from the *Candida* genus were cultured, as well as from the *Kuraishia* and *Yamadazyma* genera. Other isolates were also obtained, but did not correspond to the abundant OTUs presented in this study (data not shown). Not all fungal diversity was obtained by the culture-base approach, supporting the high-throughput sequencing technique. More efforts will be needed in the future to cultivate all fungi associated to the eastern larch beetle.

6.5.3 Fungal Biomarkers

Indicator OTUs were calculated to define fungal OTUs that were closely associated with each life stage and microenvironments of *D. simplex* (Fig 6.3). Indicator OTUs associated with adult and larvae were all yeasts, whereas almost all OTUs associated with the pupae were filamentous fungi, reflecting the taxonomic identification (Fig 6.2). Several indicator OTUs were shared between the adults and larvae ectomycobiome, related to *C. arabinofermentans* and the genera *Peterozyma* and *Wickerhahomyces*, with a higher number of sequences in larvae samples. Only one OTU, belonging to the *Ogataea* genus, was specific to the adult's ectomycobiome. These results highlight, once again, the similarities between the ectomycobiome of adults and larvae. In contrast, indicator OTUs were specific for each life stage in the case of the endomycobiome of adults and larvae, with only one OTU abundantly present for the adults, identified as *C. oregonensis*. A greater number of indicator OTUs were identified for the larvae, mostly belonging to the *Candida* genus, and one OTU belonging to the *Ogataea* genus.

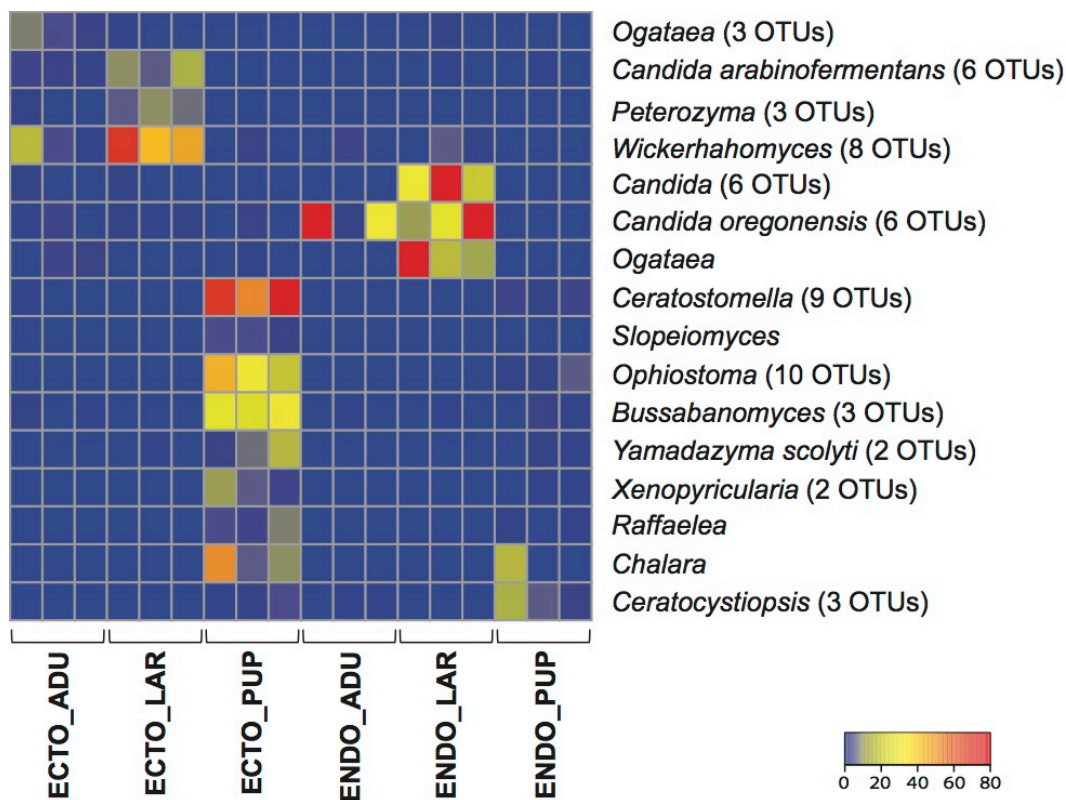


Figure 6.3. Indicator OTUs for each developmental stage and microenvironments of the eastern larch beetle.

All generated OTUs and equalized dataset were used. All three replicates are shown on the heat map. Color key represent de number of sequences for the observed OTUs. Yeasts identified to the gender represent cultured strains. “ECTO”, ectomycobiome; “ENDO”, endomycobiome; “ADU”, adults; “LAR”, larvae; “PUP”, pupae.

Mostly filamentous fungi and one yeast were identified as indicator OTUs for both the ecto- and endomycobiome of the pupae. The ectomycobiome of the pupae is the niche where the larger number of specific indicator OTUs was found. Among them, *Ceratostomella*, *Ophiostoma* and *Yamadazyma* genera were identified. Other indicators, belonging to the genera *Slopeiomyces*, *Bussabanomyces*, *Xenopyricularia* and *Raffaelea* were also identified in lower number of sequences. Only two indicator OTUs were identified for the endomycobiome of pupae, belonging to the *Chalara* and *Ceratocystiopsis* genera. These results highlight, once again, the strong association of filamentous fungi with the pupal stage.

6.5.4 Taxonomic identification of mycobiome associated with the environment of *D. simplex*

In order to identify the fungal diversity associated with the immediate environment of the beetle, the 438 OTUs associated with the galleries were taxonomically identified by BLASTN against the NCBI database. Table 6.1 shows the identification of the abundant fungi for each replicate. All abundant OTUs were identified as yeasts, such as *Candida* species that represent together 43% of the relative abundance. The *Wickerhamomyces* genus was also highly represented in the galleries (17%). Other genera of yeasts were identified with abundance ranging from 2% to 6%, such as *Yamadazyma*, *Ogatea*, *Kuraishia*, *Peterozyma* and *Saccharomycopsis*. All identified abundant OTUs associated with the galleries were also associated with the eastern larch beetle life stages (Fig 6.2). Additionally, some non-abundant OTUs were found, representing 19% of samples relative abundance.

Table 6.1. Taxonomical identification of the fungal community associated with the environment of the eastern larch beetle.

Taxonomical identification	Gal 1	Gal 2	Gal 3	Mean Relative abundance (\pm SD)
<i>Candida</i> (9 OTUs)	51.12	35.44	44.76	43.77 (\pm 7.88)
<i>Yamadazyma</i> (2 OTUs)	3.26	2.92	5.72	3.96 (\pm 1.53)
<i>Ogatea</i> (4 OTUs)	3.45	10.68	4.28	6.13 (\pm 3.96)
<i>Kuraishia</i> (2 OTUs)	2.69	4.66	4.20	3.85 (\pm 1.03)
<i>Peterozyma</i> (2 OTUs)	5.04	4.43	1.77	3.75 (\pm 1.73)
<i>Saccharomycopsis</i> (2 OTUs)	1.83	0.90	2.19	1.67 (\pm 0.67)
<i>Wickerhamomyces</i> (6 OTUs)	12.61	18.86	20.22	17.23 (4.06)
Others	19.96	22.11	16.85	19.06 (\pm 2.65)

All abundant OTUs ($\geq 1\%$ of the relative abundance per sample) are represented in the table, non-abundant OTUs ($< 1\%$) are grouped in the category others. "GAL", galleries; "SD", standard deviation.

6.6 Discussion

The aim of this work was to characterize the mycobiome (filamentous fungi and yeasts) associated with the different life stages of the eastern larch beetle. Associations

between several *Dendroctonus* species and their fungal partners have been widely reviewed (Popa *et al.*, 2012; Six, 2013). However, the mycobiome of the eastern larch beetle has never been thoroughly studied. Here, we investigated the fungal diversity associated with the ecto- and endomycobiomes of adult, larvae, and pupae life stages of *D. simplex* and their immediate surrounding environment using 18S rRNA pyrosequencing. Our results showed that yeasts were abundant in the adults and larvae samples, whereas filamentous fungi were more abundant in the pupal stage.

An important fungal diversity was identified for each life stage and microenvironments. The fact that fungi are present throughout the ontogeny of the beetle suggests that they are probably important for the insect's development. No statistically significant differences were observed between the ecto- and endomycobiome of all life stages in term of diversity (Shannon index), which indicates that fungal communities are equally distributed at the surface of the cuticle and in the interior of the insect. A variety of filamentous fungi and yeasts can accomplish a single essential function within the beetle microbiome (Hofstetter *et al.*, 2015). The eastern larch beetle could then benefit from transporting a wide variety of associated fungi, promoting the adaptation to a broader range of environments. Although Davis (2014) mentioned that bark beetles harbour a lower yeast diversity compared to other families of beetles, we found a significant yeast diversity throughout the life stages of *D. simplex*. In fact, yeasts were more abundant than filamentous fungi (50 OTUs and 19 OTUs found in abundance respectively). Filamentous fungi associated with bark beetles have been reported to interfere with tree's defense systems, as well as other possible function, impeding tree defenses (Paine *et al.*, 1997; Six & Wingfield, 2011). As the eastern larch beetle attacks mostly weakened or freshly dead trees, the presence of filamentous fungi may be less critical, allowing a greater proportion for insect-associated yeasts. The higher diversity observed in this study compared to previous ones may also be due to a bias associated with the technique used. Most previous studies on bark beetles employed culture-dependant or molecular methods (Sanger sequencing, qPCR and DGGE) (Adams & Six, 2007; Khadempour *et al.*, 2012; Lou *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015), whereas here we used high throughput sequencing, which allowed the identification of the majority of the specific richness, explaining the higher number of observed species.

Fungal diversity associated with the ectomycobiome of adults and larvae is similar to each other, but distinct from that of the pupal stage, as shown by the PCA and the higher relative abundance of yeasts in the adults and larvae stages. This shift in fungal communities can be explained by the fact that pupae are an inactive stage found in a closed environment, and that they do not feed. In opposition, adults and larvae share the same environment under the bark. During the construction of galleries, mainly yeasts, and

filamentous fungi, carried by the adults could be inoculated into the galleries. Accordingly, 10 species of yeasts identified in the ectomycobiome of adults and larvae were also identified in the beetle's galleries, which represent 80% of galleries abundance. During the beetle development, adults and larvae feed on bark as they construct their galleries (Langor & Raske, 1987b; S.L. Wood, 2007b). Simultaneously, they feed on yeasts and filamentous fungi found in their galleries, which significantly reduced their development period (Paine *et al.*, 1997; Six & Paine, 1998; Klepzig & Six, 2004; Davis, 2014). However, even if the nutritional benefits of yeasts have often been proposed for bark beetles, no study clearly demonstrates this phenomenon (Davis, 2014). Yeasts are frequently isolated from adults and larvae of bark beetles (Davis, 2014; Hofstetter *et al.*, 2015). Almost all the identified yeasts in this study were also previously recovered from various beetles (Davis, 2014). The endomycobiome of the adults and larvae, even if they represent two distinct populations as shown on the PCA, are also composed of a great majority of yeast OTUs. Only a few filamentous fungi were found in these microenvironments. The high prevalence of yeasts associated with the adults and larvae and the presence of small proportions of filamentous fungi associated with their endomycobiomes is in agreement with the hypothesis that yeasts are important nutritional elements for the development of the eastern larch beetle and that the insect is performing some microbial gardening. Some insects, such as ants, termites and ambrosia beetles, transport and cultivate their fungal associates in order to feed on them (Mueller & Gerardo, 2002; Mueller *et al.*, 2005). Furthermore, fungus gardens of scolytine ambrosia beetles are composed of an assemblage of filamentous fungi, yeasts and bacteria (Mueller *et al.*, 2005). This fungus-farming behaviour has never been observed in bark beetles to date. This type of behaviour, *i.e.* inoculating their fungal associates in galleries in order to feed on them, could explain the similarities observed between the adults and larvae mycobiome. Yeasts and filamentous fungi associated with *Dendroctonus* species provide the insect with essential nutriment, such as sterols, reducing the developmental time of larvae and increasing beetle fitness (Six & Paine, 1998; Bentz & Six, 2006). Moreover, yeasts such as *Candida* species can assimilate nutrient such as nitrate, xylose and cellobiose (Lou *et al.*, 2014). Nutritional need should be different over the life stages of the beetle, as the beetle needs nutritional benefits to accomplish different steps in its life cycle, such as ovogenesis and development. These differences in requirements could reflect the greater distance observed associated with the endomycobiome, whereas different yeasts could provide the insect with different nutrients, supporting once again the nutritional hypothesis for yeasts.

In the literature, many functions have been associated with yeasts other than nutrition, such as mediation of beetle-microorganism interactions, production of volatiles compounds or degradation of tree chemicals (Davis, 2014). These function can be accomplished by many genera of yeasts, while a single yeast may accomplish many functions (Six, 2013; Davis, 2014). Pioneer beetles were collected for this study. During the beetle attack, the trees release volatile compounds, such as terpenes, that are toxic to the insects (Adams *et al.*, 2011; Davis & Hofstetter, 2012). Some yeast associated with the eastern larch beetle may detoxify the environment, facilitating the adaptation of the insect. It has been shown that *O. pini*, associated to female *D. brevicomis*, can alter concentration of monoterpenes present in phloem tissue of *Pinus ponderosa* over time (Davis & Hofstetter, 2011). Accordingly, *Ogataea* was found in abundance in the adults and larvae ectomycobiome.

A few filamentous fungi were identified in samples coming from the ecto- and endomycobiome of the adults and larvae, such as *Ophiostoma* and *Ceratocystiopsis*. These genera are grouped as ophiostomatoids fungi, which are commonly associated with bark beetles (Paine *et al.*, 1997; Six & Wingfield, 2011; Six, 2013; Hofstetter *et al.*, 2015). These fungi help beetles to overcome tree defenses by colonizing resin ducts, in order to proceed to a successful attack (Paine *et al.*, 1997). This function may explain the presence of a few ophiostomatoids fungi associated mainly with the adult's samples, responsible for the initial attack and detoxification of the immediate environment. Among other roles, nutrition and mediation of microbial associations have been proposed (Paine *et al.*, 1997).

The mycobiomes associated with the surface and the interior of the pupae are separated from the other life stages of the beetle, as shown on the PCA. Under the bark, pupae are found in a pupal chamber closed by frass, forming a restricted environment (Langor & Raske, 1987a). This microenvironment likely explains why pupae have such a different mycobiome from the other two life stages, especially represented by a majority of filamentous fungi. Indeed, indicator OTUs for this life stage are almost all filamentous fungi, showing a strong association between them. For instance, *Ophiostoma* was more abundant in these samples (41% in the ectomycobiome and 19% in the endomycobiome) than in the adult's samples (3% and 2% respectively). Other ophiostomatoids fungi were also identified in those samples. During the pupal stages, beetles stop feeding and undergo a reorganization of their body (Langor & Raske, 1987a). This finding could explain why yeast abundance was less important in these samples, once again supporting the hypothesis of a nutritional function for these associates. Pupae are also more fragile than the other life stages of the beetle. Filamentous fungi associated with the bark beetles can protect the

insect against antagonistic fungi by inhibiting their growth (Paine *et al.*, 1997). Pupae may need these filamentous fungi for protection during this crucial period of development.

Fungal diversity was identified associated with life stages of the eastern larch beetle. Yeasts were more abundant than filamentous fungi in the samples coming from the adults and larvae, which could indicate a nutritional benefit from this type of microorganism. In contrast, filamentous fungi were mainly abundant at the pupae stages, which could indicate a role in protection. Further studies are required to confirm these functions. Our results reveal that the eastern larch beetle is closely associated with various yeasts and filamentous fungi throughout its development cycle, with varying relative abundances according to the life stages. We propose that microbial gardening behaviour is probably involved as yeasts and filamentous fungi seem to play a role in the development of the eastern larch beetle. Now that the bacterial and fungal microbiomes of this beetle have been characterized, it will be interesting to study the ecological interactions between these two types of microorganisms, in order to better understand the mechanism of *D. simplex* attack and development under the bark.

6.7 Funding

This work was supported by the Direction Générale de la Production des Semences et de Plants Forestiers (DGPSP) [grant number DGPSP-2013-1122435] to CG. AAD was supported by a Wladimir A. Smirnoff Fellowship.

6.8 Acknowledgments

We would like to thank Amélie Bergeron for her help with samples preparation and DNA extraction. We would also like to thank Fabrice Jean-Pierre and Marie-Christine Groleau for technical assistance.

6.9 Supplemental data

Sup. Table 6.2. Shannon diversity index for all the developmental stages of *D. simplex*.

Variance analysis						
Source	Liberty degree	Sum square	of	Mean square	F report	Prob. > F
Sample	5	1.169		0.234	1.2650	0.3401
Residue	12	2.218		0.185		
Corrected total	17	3.387				
Letter connection report						
Level		Mean				
ECTO_ADU	A	3.889				
ENDO_ADU	A	3.140				
ECTO_LAR	A	3.753				
ENDO_LAR	A	3.777				
ECTO_PUP	A	3.587				
ENDO_PUP	A	3.399				

Shannon index was calculated on relative abundance of all generated OTUs. "ECTO", ectomicrobiome; "ENDO", endomicrobiome; "ADU", adults; "LAR", larvae; "PUP", pupae.

Sup. Table 6.3. Relative abundance (OTUs \geq 1% for each replicate) and mean values (\pm standard deviation).

MEAN VALUES	Ectomycobiome			Endomycobiome		
	Adults	Larvae	Pupae	Adults	Larvae	Pupae
<i>Candida arabinofermentans</i> (6 OTUs)	25.35 \pm 2.62a	23.98 \pm 3.49a	0.61 \pm 0.48b	3.82 \pm 3.49b	3.77 \pm 3.61ab	0.27 \pm 0.14b
<i>Candida oregonensis</i> (10 OTUs)	13.25 \pm 4.37a	17.64 \pm 3.54a	5.14 \pm 5.69a	27.05 \pm 29.46a	31.34 \pm 30.60a	14.33 \pm 10.01a
<i>Candida tenuis</i>	0.11 \pm 0.10a	0.06 \pm 0.06a	0.28 \pm 0.11a	1.14 \pm 1.11a	0.25 \pm 0.44a	1.38 \pm 1.59a
<i>Candida</i> sp. (5 OTUs)	2.38 \pm 0.94a	4.81 \pm 5.01a	0.63 \pm 0.25a	1.67 \pm 1.47a	3.58 \pm 3.53a	1.51 \pm 1.04a
<i>Kuraishia molischiana</i> (3 OTUs)	3.22 \pm 0.96a	1.89 \pm 0.14a	0.40 \pm 0.10a	2.43 \pm 2.25a	4.22 \pm 3.09a	0.77 \pm 0.57a
<i>Ogataea</i> (3 OTUs)	2.74 \pm 1.30a	0.73 \pm 0.18ab	0.05 \pm 0.04b	1.07 \pm 1.06ab	3.42 \pm 4.35a	0.02 \pm 0.03b
<i>Peterozyma</i> (3 OTUs)	2.76 \pm 0.54a	7.08 \pm 3.40a	0.08 \pm 0bc	0.61 \pm 0.91bc	4.94 \pm 2.75ad	0.24 \pm 0.12bcd
<i>Yamadazyma scolyti</i> (5 OTUs)	6.54 \pm 0.50abc	2.98 \pm 0.17ab	13.50 \pm 4.91ac	23.57 \pm 20.05ac	0.29 \pm 0.29b	26.05 \pm 4.12c
<i>Saccharomycopsis</i> (4 OTUs)	3.78 \pm 3.06a	1.22 \pm 0.84a	0.64 \pm 0.77a	6.12 \pm 5.51a	4.72 \pm 4.45a	0.18 \pm 0.27a
<i>Wickerhamomyces</i> (9 OTUs)	13.37 \pm 2.75ac	18.52 \pm 5.31a	0.69 \pm 0.58bce	1.94 \pm 1.67cde	8.70 \pm 8.54ad	0.82 \pm 0.47e
<i>Lipomyces</i>	0.47 \pm 0.16abc	0.03 \pm 0.02ac	0.76 \pm 0.46bc	1.97 \pm 1.83ab	0.17 \pm 0.22c	1.22 \pm 0.21b

<i>Ceratocystiopsis</i> (2 OTUs)	0.55 ± 0.10ab	0.01 ± 0.02a	10.97 ± 1.13b	2.61 ± 2.25ab	0 ± 0a	14.28 ± 6.04b
<i>Ceratostomella</i>	0 ± 0a	0 ± 0a	1.04 ± 0.28b	0 ± 0a	0 ± 0a	0.11 ± 0.05b
<i>Exophiala</i>	0 ± 0a	0 ± 0a	0 ± 0a	0 ± 0a	1.54 ± 2.67a	0 ± 0a
<i>Ophiostoma</i> (8 OTUs)	2.91 ± 1.93ac	0.32 ± 0.12a	40.55 ± 9.71bc	1.68 ± 1.62a	0.23 ± 0.28a	18.99 ± 5.53a
<i>Penicillium</i> (3 OTUs)	0 ± 0a	0 ± 0a	0.04 ± 0.07a	0 ± 0a	3.81 ± 6.59a	0.04 ± 0.07a
Others	22.58 ± 2.51	20.71 ± 0.66	24.62 ± 1.14	21.31 ± 11.89	30.02 ± 10.46	19.80 ± 6.14

For each row, mean values with the same letter are not significantly different (p-value ≤ 0.05).

Sup. Table 6.4. Cultured fungi associated to the eastern larch beetles adults.

Species affiliation	Closest type strain (NCBI assention no.)	Coverage (%)	Identity (%)	Isolates name	Media isolated on
<i>Candida arabinofementans</i>	<i>Candida arabinofementans</i> culture-collection CBS:8469 (KY101941.1)	100	99	AADf-38	YMEA

>AADf-38

GAGGTCAACTTTATGATAAAGTTTGTAGGCAGAGCCAAAACTTTGCTACGTCCCAGCAG
AAGTCGAGTTCAACGATGGATAAAACCTAATACATTGAAATATAACAACTGTAGTCTGT
AAAACAAAACTCATGCCGATGCATTTCAAGTGAACCTTTGTCAGAGACAAAGTATCACC
CATCACCATACCCAAAAGAGGGGTGTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAAGCATGCCCTC
CGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCAATGATTCACGAAAATCTGCAA
TTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTT
GTTGAAAGTTTTAAATTTAGTTTAAAGCTTCTTTTACAAAGACTTCTTAAATTCAATGAC
TGTTTTGTTTAAAATTAACACGTTTTTACAACCCCGAAGGGATCAGAAAAGAGTTTTGT
TATTATAACCTTTGGCCGTGCCAGCTGGTTTTACGCAGCAGCCAGCCAAAGCAAATTTGT
CTCTAATAAGAAAACAAAGTGTGTAGAAGAGGTTTTTCAAGCTTTTGGTATAGAAAGATT
CCCAGGCTTCGGCACTTTCAACCTGCCCAACCGCGCACGCAATATTTACGAGCAGCGCAGTC
GAAAACAGAAAGACAGCAATCCAAAGTCAGAAACCAATCCAGCTCGAAAAGAATACTG
TAATGATCCTTC

<i>Candida oregonensis</i>	<i>Candida oregonensis</i> culture-collection CBS:5623 (KY102260.1)	100	100	AADf-34 AADf-05	YMEA PDA
----------------------------	--	-----	-----	--------------------	-------------

>AADf-34

GAATGGGGGCCTTTGGTGCTTAGACAAAGGGCGTTGAGATTTCTTGCAAAGACCAAGCC
GGGGGGCTTGAGAAGGGCCGACGCCAAACAGGCATGCCTTGAGGAATGCCTCAAGGC
GCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGTCTGCAAGTCATACTACGTATCGCAATT
CGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAGTTATTG
TGTGTGTTTGACATAAGGGTGTGTGTTGGTAATCGAAACGTGTGTAGTAATAATATTA
TGATCCTCCGCAGGTTACCTACGGAA

>AADf-05

TGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGGGGAAGAAATGGGGGCCTTTGGTGCT
TAGACAAAGGGCGTTGAGATTTCTTGCAAAGACCAAGCCGGGGGGCTTGAGAAGGGCCG
ACGCCAAACAGGCATGCCTTGAGGAATGCCTCAAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTC
GATGATTCACGTCTGCAAGTCATACTACGTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGC
GAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAGTTATTGTGTGTGTTTGACATAAGGGTG
TGTGTTTGGTAATCGAAACG

<i>Candida tenuis</i>	<i>Candida tenuis</i> culture-collection CBS:2308 (KY102436.1)	100	100	AADf-12 AADf-30	YMEA PDA
-----------------------	---	-----	-----	--------------------	-------------

>AADf-12

TTGTTTGTTCGTTGTAAGGCCGAGCCAAATACCAGAAATTTACCTCCGATCGTTCAACGAG
 TTGGATAAACCTAATACATTGAATAATCAGGACGCACTATCTAGCACACCCATGCCAATA
 CATTTC AAGCAAACGCCTAGTCTGACTAAGAGTACCCTCAATACCAAACCCAAAGGTTT
 GAGAGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTG
 CGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCATATTACTTATCGCATTTCGCTG
 CGTTCTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAAGATTATTTG
 AAATTAATCAAACAAATTGACAAATAATTAATAAATTAACAATTCAATAAAATTGAAGTTT
 ATGTGTCTTCTGGCCCAACCTTGC GGCCAAGCCAAAGCAATGGTTCTTGT AATAACAAAA
 AACACAGTGTGTAAGGATTAGTTTTCGCCGCGCAGTTAAGCGCTGGCAAAAATTAATAA
 CTGTAATGATCCTTCCGCAG

>AADf-30

TCCGCTTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAATCCTACCTGATTTGAGGTCAAACCTTG
 TTTGTCGTTGTAAGGCCGAGCCAATACCAGAAATTTACCTCCGATCGTTCAACGAGTTGG
 ATAAACCTAATACATTGAATAATCAGGACGCACTATCTAGCACACCCATGCCAATACATT
 TCAAGCAAACGCCTAGTCTGACTAAGAGTACCCTCAATACCAAACCCAAAGGTTT GAG
 AGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTT
 CAAAGATTTCGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCATATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTT
 CTTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAAGATTATTTGAAAT
 TAATCAAACAAATTGTGACAAATAATTAATAAATTAACAATTCAATAAAATTGAAGTTTGTG
 TGTCTCTGGCCCAACCTTGC GGCCAAGCCAAAGCAATGGTTCTTGT AATAACAAAAAAC
 ACAGTGTGTAAGGATTAGTTTTCGCCGCGCAGTTAAGCGCTGGCAAAAATTAATAACTGT
 AATGATCCTTCCGCAGGT

<i>Yamadazyma scolyti</i>	<i>Yamadazyma scolyti</i> culture-collection CBS:5731 (KY105949.1)	100	99	AADf- 39 AADf- 43	YMEA PDA
---------------------------	---	-----	----	--------------------------------	-----------------

>AADf-39

TGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTTACCTGATTTGAGGTCAAACCTTGTTTGTGTTG
 TAAGGCCGAGCCAGCAACCAGAAATTTACGTCCCGACCGTTCAACGAGTTGGATAAACC
 TAATACATTGAATAATCGGAGGCACTATCTAGCGCACCCATGCCAATACTTTTCAAGCAA
 ACGCTCAGTCTGACTAAGAGTATCACTCAATACCAAACCCGGGGTTTGAAGGAGAAAT
 GACGCTCAAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATT
 CGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCATATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCG
 ATGCGGAGAACCTAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAAGATTATTTGAATTTAATCAA
 CAAATTGACTTGTGGTTAAAAACAATTCAATAAAATTGAAGTTCACAGCACTCTGGCCC
 AACCCGAAGGCCAAGCCAAAGCAATAGTTCTTGT AATAACAAAAAACACAGTGTGTAAG
 ATTAGTCCC CGCGCAGTGAAGCGCTGGCTGGAATTAATAACTGTAATGATCCTTCCG
 CAGGTTCAACCTACGG

>AADf-43

GCGGAAGGATCATTACAGTTATTAATTCCAGCCAGCGCTTCACTGCGCGGGCGGGA ACTA
 ATCTTACACACTGTGTTTTTTGTTATTACAAGA ACTATTGCTTTGGCTTGGCCTTCGGGTT
 GGGCCAGAGTGCTGTGA ACTTCAATTTTATTGAATTGTTTTTTAACCACAAGTCAATTTGT
 TTGATTA AATTCAAATAATCTTCAA AACTTTCAACAACGGATCTCTAGGTTCTCGCATC
 GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATC
 GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCTGTTT GAGCGTC
 ATTTCTCCTTCAAACCCCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCAGACTGAGCGTTT
 GCTTGAAAAGTATTGGCATGGGTGCGCTAGATAGTGCCTCCGATTATTCAATGTATTAGG
 TTTATCCA ACTCGTTGAACG GTCGGGACGTA AATTTCTGTTGCTGGCTCGGCCTTACAA
 CAACAAACAAGTTGACCTC

<i>Kuraishia</i>	<i>Kuraishia molischiana</i>	100	98	AADf-	PDA
------------------	------------------------------	-----	----	-------	-----

molischiana

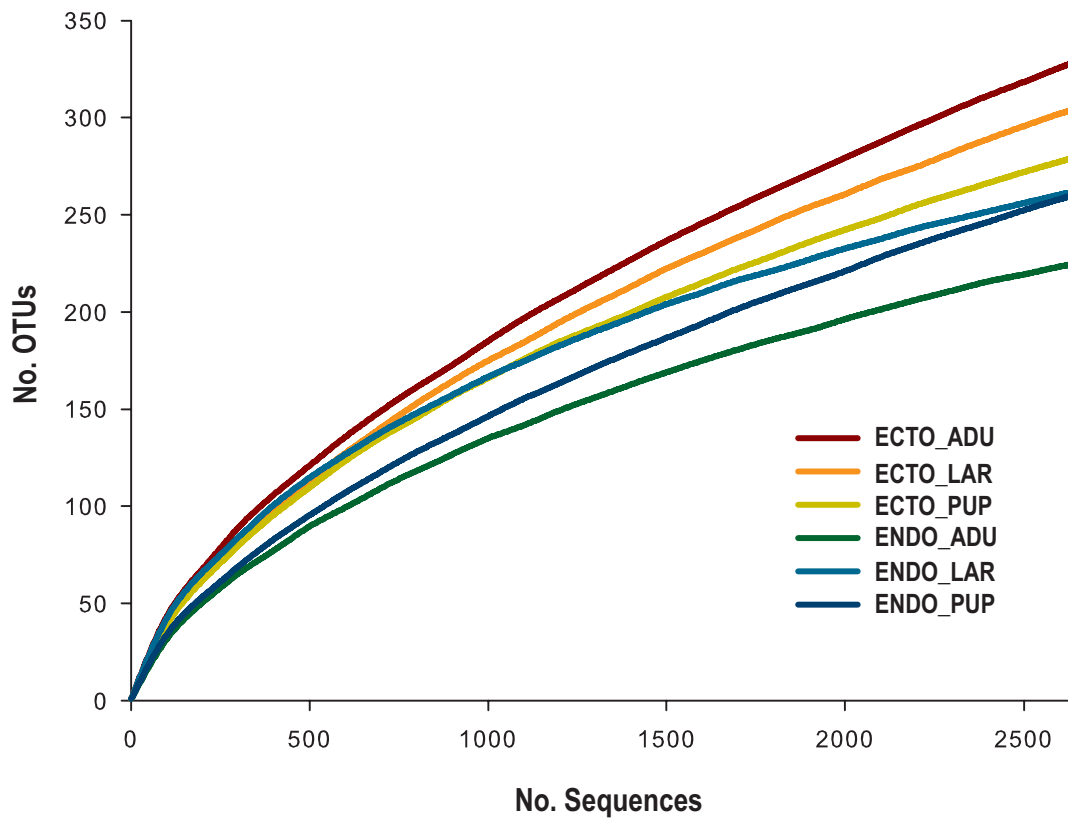
Culture-collection
CBS:7030
(KY103915.1)

51

>AADf-51

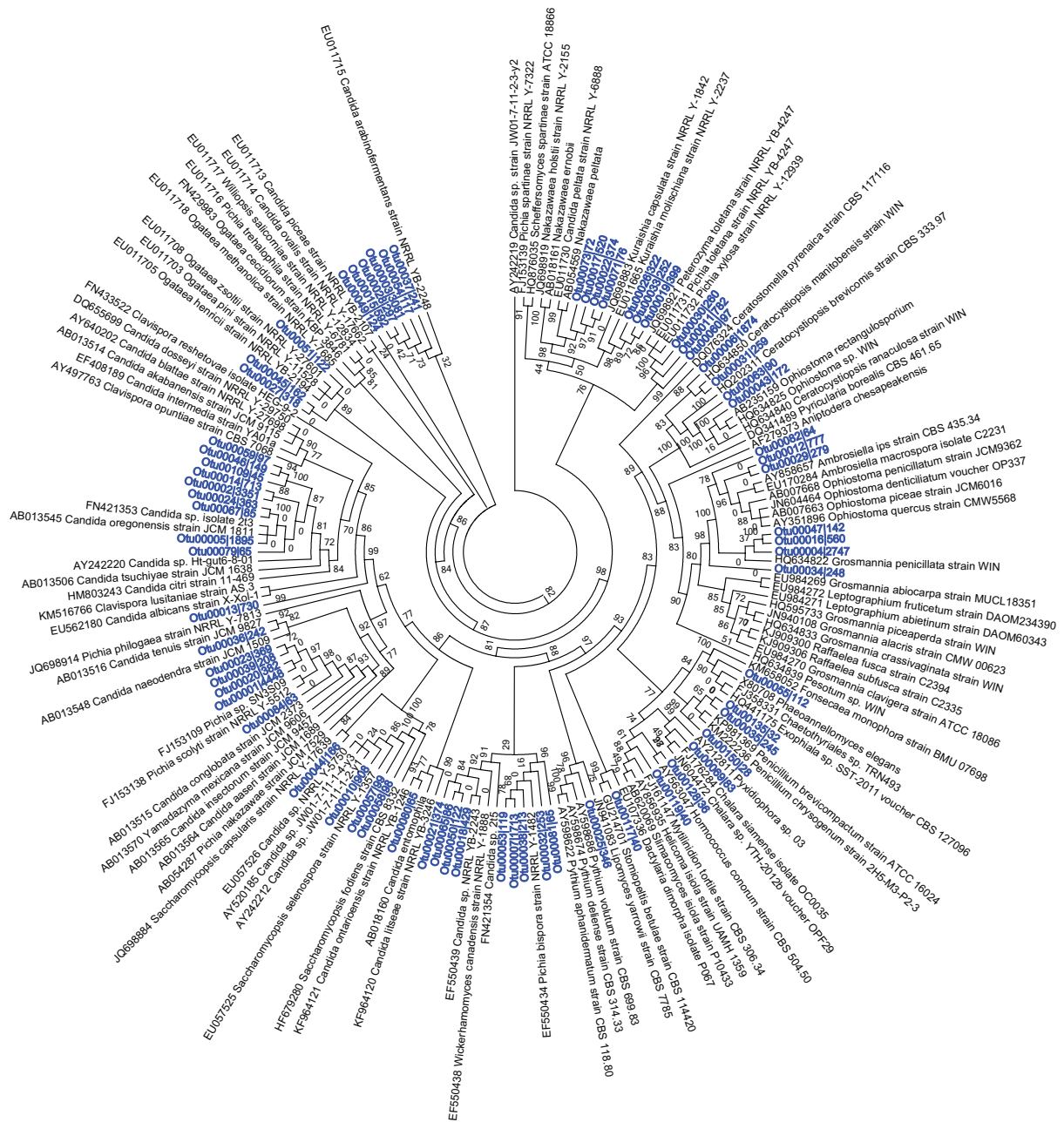
GAAGGATCATTCTGTTCTTATAGCTTTGCGTGCGCTGTCTCTTCTGAGACCTGCGCTGCA
AGCGAAAACCTTACCACACTTGTGTTTTTATTGAAGACAACCTTTGCTTTGGTCGGCTTGGC
GTAAAAACCGAATCGGCCAGAGGATTTAAACTCAAACCTAACTTTTTATACATATTTGTC
AGAATTTTAATCTGTTAATTCAGATAACTAATATTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTT
GGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTATTGTGAATTGCAGATTTT
CGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTGTAGTATTCTACAGGGCATGCCT
GTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTCGGTTTTGGTTGTGGGCGGTAAGTCTTCTGAC
TTTCGCTTGAAATGAATTGACCGGCTGGCTTTCAATGGCTTGTTATGTTTATTCAATGTAT
TAGGTTCTTCCAACCTCGTTGATTGACACGACAAAATCCAGGAAAGATTCGGCTTGTCGAA
CTTTTATCATAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTA

The yeasts represent isolates corresponding to OTUs identified by high throughput sequencing.



Sup. Figure 6.4. Rarefaction curves of OTUs diversity for each sample.

All generated OTUs are represented. Mean of the three replicates is shown. "ECTO", ectomicrobiome; "ENDO", endomicrobiome; "ADU", adults; "LAR", larvae; "PUP", pupae.



Sup. Figure 6.5. Phylogenetic affiliation of the abundant fungal OTUs associated with the eastern larch beetle developmental stages based on partial 18S rRNA gene sequences. Representative sequence of each OTU and closely related sequences were identified using BLASTN against NCBI database. Sequences were aligned using the MUSCLE algorithm implemented in Geneious. Maximum phylogenetic tree was constructed with FastTree using the GTR model with 1,000 resampling.

7 CHAPITRE 3 : THE SYMBIOTIC COMPLEX OF *DENDROCTONUS SIMPLEX*: IMPLICATIONS IN THE BEETLE ATTACK AND ITS LIFE CYCLE

Audrey-Anne Durand, Philippe Constant, Eric Déziel & Claude Guertin

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval (Québec), Canada

Soumis et accepté à BIORXIV le 5 mars 2018

doi: <https://doi.org/10.1101/276857>

Contribution des auteurs :

Audrey-Anne Durand : Planification du *design* expérimental, réalisation des expériences, analyse des résultats, préparation des figures, rédaction du manuscrit

Philippe Constant : analyse des résultats, révision du manuscrit

Éric Déziel : Planification du *design* expérimental, analyse des résultats, révision du manuscrit

Claude Guertin : Planification du *design* expérimental, réalisation des expériences, analyse des résultats, révision du manuscrit

7.1 Résumé

Le dendroctone du mélèze, *Dendroctonus simplex*, est un insecte ravageur causant d'importants dommages au Canada et dans le nord des Etats-Unis. Lorsque les populations sont endémiques, celui-ci s'attaque uniquement aux arbres affaiblis ou encore récemment morts. Cependant, lorsque les populations deviennent épidémiques, celui-ci peut également s'attaquer aux arbres sains, causant la mort de milliers de mélèzes. Les scolytes sont considérés comme des holobiontes, puisqu'ils sont associés avec plusieurs types de microorganismes, tels que des bactéries, champignons filamenteux et levures. Ces derniers participent à divers processus physiologiques chez l'insecte, comme au niveau de la nutrition. Ils jouent également un rôle primordial dans l'attaque de l'arbre hôte par l'insecte, la détoxification du milieu subcortical ainsi que l'affaiblissement du système de défense de l'arbre. L'implication des microorganismes dans le succès de colonisation de celui-ci est encore peu étudiée. Dans cette étude, nous avons caractérisé le microbiome (bactéries et champignons) de ce ravageur au cours de son développement (adultes pionniers, larves et pupes) par séquençage à haut débit. Une succession des microorganismes abondants en fonction du développement de l'insecte a été observée, reflétant les besoins de celui-ci. Nos résultats indiquent une association symbiotique entre le dendroctone du mélèze et certains de ses microorganismes associés, et que ce complexe symbiotique aide l'insecte à coloniser et à survivre dans l'environnement subcortical de son hôte.

7.2 Abstract

The eastern larch beetle (*Dendroctonus simplex* Le Conte) is recognized as a serious destructive forest pest in the upper part of North America. Under epidemic conditions, this beetle can attack healthy trees, causing severe damages to larch stands. *Dendroctonus* species are considered as holobionts, as they engage in multipartite interactions with microorganisms, such as bacteria, filamentous fungi, and yeasts, which are implicated in physiological processes of the insect, such as nutrition. They also play a key role in the beetle's attack, as they are responsible for the detoxification of the subcortical environment and weaken the tree's defense mechanisms. The eastern larch beetle is associated with bacteria and fungi, but their implication in the success of the beetle remains unknown. Here, we investigated the bacterial and fungal microbiota of this beetle pest throughout its ontogeny (pioneer adults, larvae and pupae) by high-throughput sequencing. A successional microbial assemblage was identified throughout the beetle developmental stages, reflecting the beetle's requirements. These results indicate that a symbiotic

association between the eastern larch beetle and some of these microorganisms takes place and that this *D. simplex* symbiotic complex is helping the insect to colonize its host tree and survive the conditions encountered.

7.3 Introduction

The eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* LeConte (Coleoptera: Scolytinae), is a phloem-feeding insect that attacks tamarack trees, *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch (S.L. Wood, 2007b). During the dispersal period, pioneer beetles attack trees and build galleries in the phloem layer. Following the reproduction and eggs hatching, larvae also excavate galleries and eat phloem throughout their development. The last larval instar digs a pupal chamber, stops feeding and empties his digestive tract in preparation for transformation in pupae, representing an inactive stage. Pupae will then transform into adults, overwintering until the next dispersal period (Langor & Raske, 1987a; Langor & Raske, 1987b). This beetle is considered a secondary pest because it usually attacks weakened or freshly dead trees. However, under epidemic conditions, it can attack healthy trees, causing severe damage to larch stands (Langor & Raske, 1987a; Langor & Raske, 1989b). The widespread attacks of the eastern larch beetle observed in the past suggest that this pest should no longer be considered secondary (Langor & Raske, 1989a). More recently, extensive attacks have been observed in Quebec (Canada), causing the death of thousands of larch trees across the province.

Bark beetles engage in a multitude of interactions with various microorganisms to form a holobiont (Margulis & Fester, 1991; Six, 2013). *Dendroctonus* species are commonly associated with bacteria, filamentous fungi, and yeasts. This assemblage of microorganisms, also called microbiota, is implicated in various physiological processes of the insect, colonization of the host tree, and protection from antagonistic organisms (Popa *et al.*, 2012; Hofstetter *et al.*, 2015). Accordingly, microorganisms included in the *Dendroctonus* microbiota may act as key factors in their success.

Dendroctonus species are associated with a variety of bacterial genera. Some of these bacteria are implicated in the beetle nutrition, supplementing the nutrient-poor phloem diet with amino acids, nitrogen and vitamins (Bridges, 1981; Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Morales-Jimenez *et al.*, 2013). Some are also able to break down cellulose, helping the assimilation by the insect (Morales-Jimenez *et al.*, 2012a). Additionally, some bacteria are implicated in detoxification processes, such as terpenoid degradation (Adams *et al.*, 2013). Some bacteria also produce antifungal compounds that protect the insect against antagonistic fungi (Scott *et al.*, 2008). On the other hand, associated filamentous fungi are

also implicated in beetle nutrition, supplementing their diet with sterols (Bentz & Six, 2006). Some fungi can weaken the tree defense system, leading the insect to a successful attack (Paine *et al.*, 1997). Yeasts also play a significant role in beetle success, as they are reported to be implicated in nutrition, detoxification of plant defense compounds and protection from antagonistic microorganisms (Davis, 2014). Additionally, associated yeasts are referred as mediators of the beetle-microorganisms interactions (Davis *et al.*, 2011; Davis, 2014; Hofstetter *et al.*, 2015). It appears that several functions are redundant among microorganisms forming the microbiota.

In the present study, the bacterial and fungal microbiota of the eastern larch beetle was identified at various beetle developmental stages (pioneers adult, larvae, and pupae) by high-throughput sequencing of the 16S and 18S rRNA genes. Since they are distinct, as we have previously demonstrated, both the ecto- and the endomicrobiota of the insect were investigated (Durand *et al.*, 2015). The aim of this study was to understand the crucial role played by the microbiota of *D. simplex* in the colonization success and to follow the changes that may occur in the microbial populations throughout its life cycle. We hypothesized that a core microbiota should be associated with *D. simplex* and that the proportion of these microorganisms should vary in function of beetle development. Moreover, pioneer beetles should carry microorganisms playing a key role in the beetle attack. These results will help us understand the eastern larch beetle attack and colonization process.

7.4 Materials and Methods

7.4.1 Site location, beetle processing, and samples preparation

Insects were collected from a Quebec Province larch plantation located near Saint-Claude (Quebec, Canada; Lat. 45.6809, Long. -71.9969) with the permission of the *Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs* authority. Log sections of larch trees showing apparent signs of *D. simplex* attack were randomly selected and transported to the laboratory, where they were placed in Plexiglas cages (30 cm x 30 cm x 88 cm) at room temperature. Beetle development monitoring and retrieval were achieved as described previously (Durand *et al.*, 2017). For each developmental stage, microorganisms associated with the ecto- and endomicrobiota were recovered, as previously described (Durand *et al.*, 2015). For the ectomicrobiota of each development stage, 50 insects per replicate were randomly selected, and pooled in a 15 ml polypropylene tube to recover sufficient bacterial genomic DNA from the surface of the cuticle. Then, each sample underwent five successive washes with 5 ml phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1

% Triton X-100, with 1 min agitation (Genie 2 Vortex, Fisher, Ottawa, ON, Canada). The solution was filtered through a 0.22 µm nitrocellulose filter (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) to recover the biomass. Each filter was placed in a Lysing matrix A tube (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) for DNA extraction. To retrieve the endomicrobiota, ten previously washed beetles were randomly selected for each replicate. Their external surface was sterilized with three serial washes in 70% EtOH, followed by one wash with sterile ultrapure water. The insects were then crushed into PBS and placed in a 2 ml screw cap tube containing 200 mg of 0.1 mm glass beads (BioSpecs, Bartlesville, OK, USA) for DNA extraction. Three biological replicates were achieved for each developmental stage.

7.4.2 DNA extraction and PCR amplification

Total DNA was extracted following the method previously described (Durand *et al.*, 2015). A negative control using all the extraction solutions but no insect was achieved. DNA concentration was estimated using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Life Technologies, Burlington, ON, Canada) following the manufacturer instruction. The integrity of the genomic DNA was confirmed on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

PCR amplification was achieved to confirm the presence of microbial DNA in each sample. For the bacteria, universal primers 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTA G 3') and 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') were used to amplify the 16S rRNA gene (Kwong & Moran, 2013). For the fungi, universal primer NSA3 (5' AAA CTC TGT CGT GCT GGG GAT A 3') and NLC2 (5' GAG CTG CAT TCC CAA ACA ACT C 3') were used to amplified the SSU, ITS, and LSU regions of the rRNA genes (Martin & Rygiewicz, 2005). Each 50 µl PCR reaction contained 25 mM MgCl₂, 10 µg BSA, 10 mM dNTPs, 10 mM of each primer, 5 U Taq DNA polymerase and ThermoPol® buffer (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada). For the bacteria, following the initial denaturation step of 5 min at 94°C, 30 amplification cycles were performed (94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 1 min and 30 s) followed by a final extension step at 72°C for 10 min. For the fungi, following the initial denaturation step of 5 min at 94°C, 30 amplification cycles were performed (94°C for 30 s, 67°C for 30 s, 72°C for 1 min) followed by a final extension step at 72°C for 10 min. Amplification was confirmed by electrophoresis of the PCR products on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light. Bacterial and fungal DNA was present in each sample, except for the negative control.

7.4.3 Pyrosequencing of microbial DNA

Genomic DNA from each sample was sent to Research and Testing Laboratory (Lubbock, TX, USA) for sequencing. The bacterial 16S rRNA gene was amplified using the universal primers 28F (5' GAG TTT GAT CNT GGC TAC G 3') and 519R (5' GTN TTA CNG CGG CKG CTG 3') targeting the V1-V3 hypervariable regions. Roche 454 FLX-Titanium chemistry was used to sequence the amplicons. Elongation was performed from the forward primer. Raw data are available on NCBI under BioProject number PRJNA401528.

Sequences related to fungal microbiota associated with the eastern larch beetle (BioProject PRJNA354793) presented in our previous study (Durand *et al.*, 2017) were also used in this study. The fungal 18S rRNA gene was amplified using the universal primers SSUForward (5' TGG AGG GCA AGT CTG GTG 3') and funTitSsuRev (5' TCG GCA TAG TTT ATG GTT AAG 3'). Roche 454 FLX-Titanium chemistry was also used to sequence the amplicons. Elongation was performed from the forward primer as well.

7.4.4 Sequences processing pipeline

The post-sequencing processing was completed using the open-source program mothur v.1.33.0 software (<http://www.mothur.org>) (Schloss *et al.*, 2009). For the sequences associated with the bacterial microbiota, the pipeline described by (Comeau *et al.*, 2012) was followed. Raw 454 reads were first processed to remove low-quality reads, such as (i) the presence of one or more uncertain bases (N), (ii) sequences shorter than 150 nt (nucleotides), (iii) unusually long reads that extended more than 100 nt over the amplicon size, (iv) reads that have long homopolymer sequences (more than 8), and (v) reads with incorrect forward primer sequences. Regions corresponding to the forward primer were kept to facilitate the alignment of the sequences during subsequent analyses. Contaminant sequences, such as chloroplast and mitochondria, were removed from the dataset. Additionally, chimeras were removed with UCHIME (Edgar *et al.*, 2011), as implemented in mothur. The remaining filtered sequences were aligned by domain against the SILVA reference alignment release 119 (Quast *et al.*, 2013) using the ksize=9 parameter in mothur. Reads were also trimmed of all bases beyond the reverse primer with BioEdit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Singletons were finally removed after clustering into draft Operational Taxonomic Units (OTUs) to obtain the final quality reads. Libraries were normalized to the sequencing effort of the smallest 16S rRNA gene library (1744 sequences/samples) to avoid biases in comparative analyses introduced by the sampling depth. The last aligned reads were clustered into OTUs at $\geq 97\%$ identity threshold

using the furthest neighboring cluster in mothur (Schmitt *et al.*, 2012). Representative sequences of each OTU were taxonomically identified using the Ribosomal Database Project (RDP) classifier (Wang *et al.*, 2007a).

For the sequences associated with the fungal microbiota, raw sequences processing, clusterization, taxonomical identification and equalization of the library was done as described before (Durand *et al.*, 2017).

7.4.5 Data analysis

Rarefaction curves were generated within the mothur software to evaluate the sufficiency of the sequencing effort (data not shown). Shannon diversity index was also calculated with mothur, and ANOVA was performed with JMP Pro 12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) on obtained values. A PERMANOVA analysis on the generated bacterial and fungal OTUs was performed with the R software 3.1.3 (<http://www.r-project.org>) using the package “vegan”. UPGMA clusterization analysis was achieved with R using the package “hclust” and the heatmap generated with the package “gplots” and “RColorBrewer”.

7.5 Results

7.5.1 Diversity of the associated microbial community across *D. simplex* developmental stages

The microbial diversity associated with the eastern larch beetle developmental stages were compared using 18 samples that were sequenced to characterize the bacterial and fungal microbiota. For the bacteria, a total of 31,392 high-quality-filtered sequences were recovered after quality control and equalization. The average read length was 442 bp. Clusterization at a 97% pairwise-identity threshold generated 4009 OTUs. The Shannon diversity index was calculated for all samples, and significant differences (ANOVA test; $F = 9.52$; $p < 0,0007$) are observed throughout the beetle developmental stages (Table 7.1). The endomicrobiota of the larvae exhibited the lowest diversity, followed by the ectomicrobiota of all developmental stages. The highest diversity was associated with the pupae endomicrobiota. Overall, the Shannon diversity index is higher for the endomicrobiota than the ectomicrobiota, except for the larvae samples.

Table 7.1. Shannon diversity index for bacterial and fungal microbiota throughout *D. simplex* development.

	Bacteria		Fungi	
	Shannon (se)	p value	Shannon (se)	p value
ECTO_ADU	4.69 (0.34) ^{ab}	0.0007	3.89 (0.25) ^a	0.34
ECO_LAR	4.23 (0.34) ^a		3.75 (0.25) ^a	
ECTO_PUP	4.16 (0.34) ^a		3.59 (0.25) ^a	
ENDO_ADU	5.87 (0.34) ^{bc}		3.14 (0.25) ^a	
ENDO_LAR	3.90 (0.34) ^a		3.78 (0.25) ^a	
ENDO_PUP	6.45 (0.34) ^c		3.40 (0.25) ^a	

The Shannon index was calculated on OTUs obtained from equalized dataset. The mean of three replicates is presented in the table, with the standard error in parenthesis. ANOVA test was performed to identify significant differences between samples. ECTO = ectomicrobiota, ENDO = endomicrobiota, ADU = adults, LAR = Larvae, PUP = Pupae.

For the fungi, a total of 44,377 high-quality-filtered sequences were obtained after quality control and equalization, with an average read length of 447 bp. Clusterization at a 97% pairwise-identity threshold generated 1623 OTUs. No significant difference in Shannon’s diversity index is observed between fungal community structures of each sample (Table 7.1). After analysis, a suitable number of sequences were obtained to characterize the eastern larch beetle bacterial and fungal microbiota.

7.5.2 Variation and taxonomical composition of the microbial communities across the eastern larch beetle developmental stages

Bacterial community differences within the beetle ontogeny are observed on the similarity dendrogram (Figure 7.1). Samples associated with the endomicrobiota of the adults and pupae form a cluster significantly different from other samples. Additionally, the ectomicrobiota of the adults is creating a distinct cluster from the other ectomicrobiota samples. Accordingly, the ectomicrobiota of the pupae and larvae are grouped along with the endomicrobiota of the larvae, showing significant differences in the bacterial community for the interior of insect at this stage.

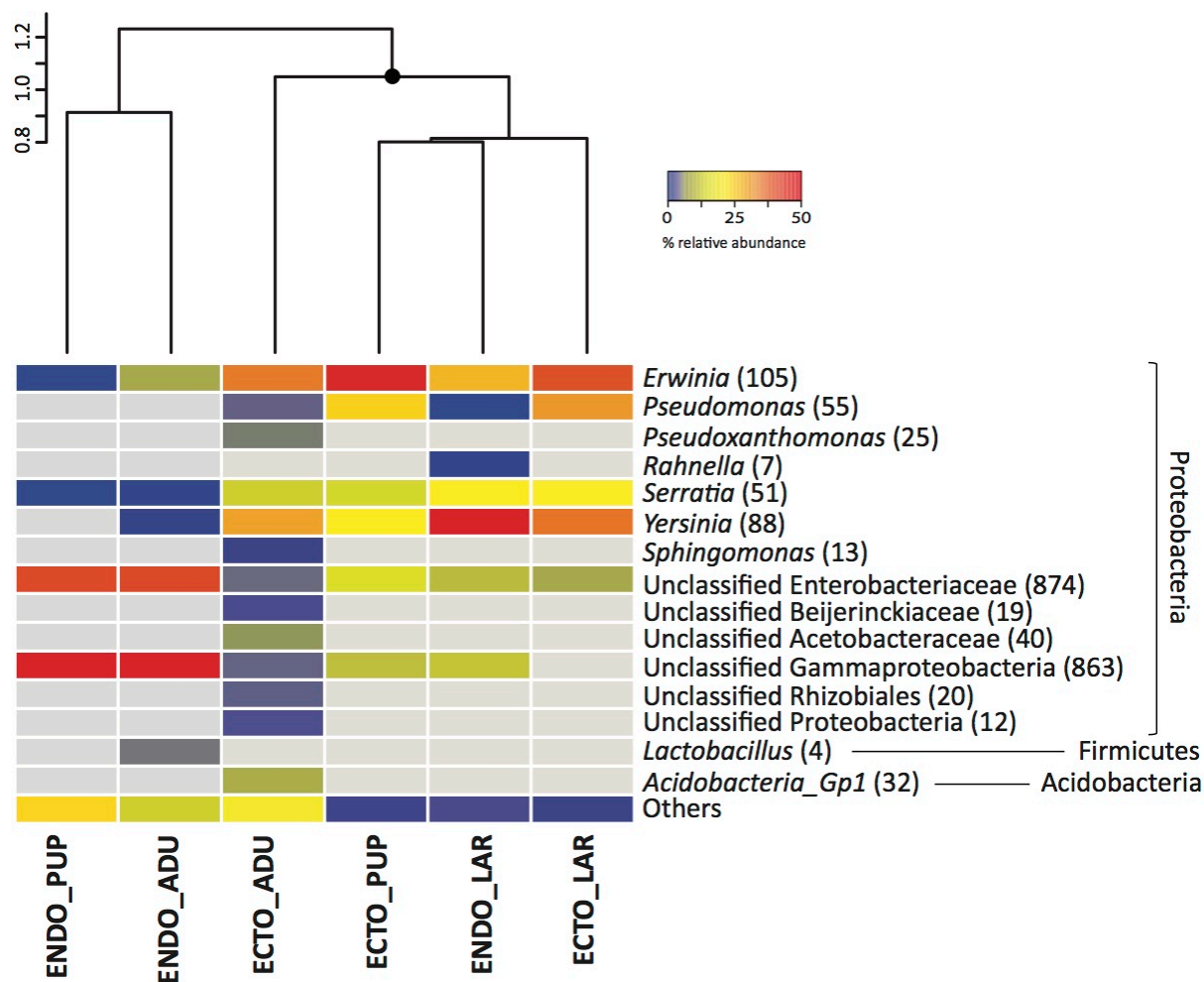


Figure 7.1. Bacterial communities composition of *D. simplex* developmental stages.

Based on equalised dataset. The mean relative abundance of the three replicates is presented. Abundant OTUs ($\geq 1\%$ of relative abundance in one sample) are presented in the table, non-abundant OTUs ($< 1\%$) are grouped in the category others. The grey color represents the absence of OTUs in the samples. The number in parenthesis represents the abundance of OTUs. Similarity cluster (UPGMA) grouping the different samples is presented above the heatmap, with significant ($\geq 95\%$) node mark as black circles. ECTO = ectomicrobiota, ENDO = endomicrobiota, ADU = adults, LAR = Larvae, PUP = Pupae.

To identify the microbial composition of these communities, all identified bacterial OTUs were taxonomically assigned using RDP classifier. Almost all bacterial OTUs were Proteobacteria, but some Firmicutes and Acidobacteria were also found. Among the Proteobacteria, Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria were represented. Figure 7.1 shows the taxonomical identification for the abundant bacterial OTUs ($\geq 1\%$ of the relative abundance per sample). For the ectomicrobiota, a few bacterial genera are abundant at all developmental stages, such as *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Yersinia* and unclassified OTUs belonging to the Enterobacteriaceae family. Altogether, these OTUs represent 60% of the total abundance in adults, and 98% and 90% for the larvae and pupae respectively. Additionally, unclassified OTUs belonging to the Gammaproteobacteria class

were also identified in samples associated with the adults and pupae, with relative abundance up to 8%. The ectomicrobiota of the adults, which exhibited the highest specific richness of all developmental stages, included other lower abundance distinct OTUs: *Pseudoxanthomonas* and *Acidobacteria* Gp1, Alphaproteobacteria such as *Sphingomonas*, unclassified Beijerinckiaceae, Acetobacteraceae, and Rhizobiales. These OTUs are explaining the separate cluster set by adult ectomicrobiota over other samples.

Some of the bacteria found in the ectomicrobiota of the larvae were also associated with their endomicrobiota, such as *Erwinia*, *Serratia*, and *Yersinia*, representing 82% of the relative abundance. The *Erwinia* genus was also identified in the endomicrobiota of the adults, but in lower abundance (6% of the samples abundance). Additionally, OTUs related to the *Lactobacillus* genus were also identified in these samples with 4% of the total abundance. Several unclassified OTUs linked to Enterobacteriaceae and Gammaproteobacteria were documented in samples associated to the endomicrobiota of the adults and pupae, representing, respectively, 81% and 84% of relative abundance. Some of these OTUs were also represented in the endomicrobiota of the larvae, but in lower abundance (15%). Finally, other non-abundant OTUs were also identified throughout the beetle developmental stages.

The similarity dendrogram for fungal communities (Figure 7.2) shows different grouping patterns than for the bacterial communities. Indeed, the pupae samples (ecto- and endomicrobiota) are arranged in a cluster significantly different than the other samples. Additionally, samples associated with the ectomicrobiota of the adults and larvae form a cluster significantly distinct from those of their endomicrobiota.

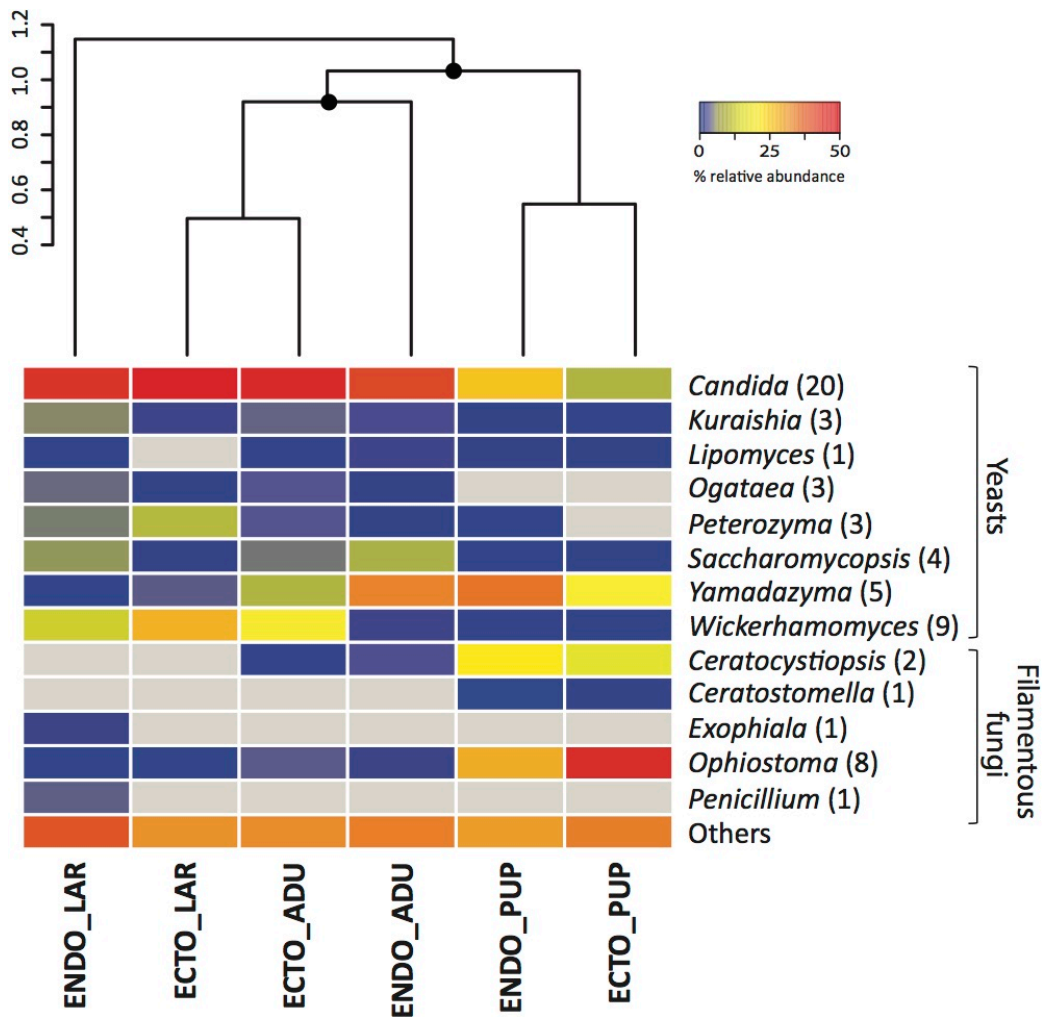


Figure 7.2. Fungal communities composition of *D. simplex* developmental stages.

Based on equalised dataset. The mean relative abundance of the three replicates is presented. Abundant OTUs are presented in the table, non-abundant OTUs are grouped in the category others. The grey color represents the absence of OTUs in the samples. The number in parenthesis represents the abundance of OTUs. Similarity cluster (UPGMA) grouping the different samples is presented above the heatmap, with significant ($\geq 95\%$) node mark as black circles. ECTO = ectomicrobiota, ENDO = endomicrobiota, ADU = adults, LAR = Larvae, PUP = Pupae.

All fungal OTUs were taxonomically identified by BLASTN against the NCBI database. All OTUs belong to the Ascomycota phylum. Among them, yeasts from the Saccharomycetes class and filamentous fungi were identified. Figure 7.2 shows the taxonomical identification for the abundant fungal OTUs. Yeasts were predominant in samples associated with the adults and larvae, whereas filamentous fungi were mainly related to pupal samples, both for the ectomicrobiota and the endomicrobiota. *Candida* was the most abundant genus found associated with the adults and larvae ectomicrobiota (41% and 45% respectively), followed by *Wickerhamomyces* (13% and 19%). Others genera were also found, such as *Kuraishia*, *Ogataea*, *Peterozyma*, *Saccharomycopsis*, and *Yamadazyma*, with abundances ranging from 2% to 7%. The ectomicrobiota of pupae

included only two abundant yeasts, *Candida* (7%) and *Yamadazyma* (14%), and two abundant filamentous fungi belonging to the Ophiostomatoidei group, *Ceratocystiopsis* (11%) and *Ophiostoma* (41%). Only *Ophiostoma* was associated in abundance with the adult ectomicrobiota samples.

Yeasts belonging to the *Candida* genus were also prevalent in the endomicrobiota at all developmental stages, with relative abundances ranging from 17% to 39%. Additionally, the *Yamadazyma* genus was also identified in samples from the adults and pupae (24% and 26%, respectively). The other yeasts genera identified in the ectomicrobiota of the adults and larvae were also present in their endomicrobiota (1% to 9%). Two main filamentous fungi identified in the ectomicrobiota of the pupae, *Ceratocystiopsis* and *Ophiostoma*, were also identified in abundance in their endomicrobiota samples, with, respectively, 14% and 19%. These filamentous fungi were also discovered in the endomicrobiota of the adults, but with lower abundances. As the adult's samples, few filamentous fungi were associated with the larvae, identified as *Exophiala* (2%) and *Penicillium* (3%).

A PERMANOVA analysis was performed to explain if the variability was triggered by both the developmental stages and the microbiota location. For bacteria and fungi, the developmental stage explained a higher percentage of the variation between samples (43% for bacteria and 59% for the fungi) than the microflora (14% for bacteria and 9% for the fungi).

7.6 Discussion

Bark beetles form associations with bacteria, filamentous fungi, and yeasts. These microorganisms play a major role in beetle development and help the insect colonize the subcortical environment of the host tree (Six, 2013; Hofstetter *et al.*, 2015). They can be acquired either from the environment or directly from their parents by vertical transmission (Gibson & Hunter, 2010). To better understand the symbiotic relationship between a beetle and its associated microorganisms, it is important to acquire a comprehensive portrait of the microbiota associated with the insect. Accordingly, the beetle microbiota, or at least the relative abundance of its various members, should change over the ontogeny of the insect in function of beetle requirements, resulting in a successional microbial assemblage. In this context, we characterized the microbiota associated with the developmental stages of the eastern larch beetle by highthroughput sequencing to observe the progression of the microbiota over time. Because the surface and interior of the insect represent two distinct microbial communities, we investigated both populations separately.

As expected, both similarity dendrograms and taxonomical identifications revealed a succession of the abundant microorganisms associated with the eastern larch beetle throughout its ontogeny. Accordingly, the developmental stages explain a high proportion of the observed variations, as the PERMANOVA analyses show. These differences are probably related to the beetle requirements over the developmental process. Figure 7.3 shows the proposed succession of abundant microorganisms and their possible functions according to the developmental stages and the microbiota of *D. simplex*. Non-abundant OTUs were still present in the samples, but not represented in the schema. This diagram is based on the sequencing results obtained and existing literature on beetle-associated microorganisms. Attack of tree and development of the eastern larch beetle start with a dispersion period. After the selection of a suitable host, pioneer beetles bore holes in the tree trunk and build-up galleries in the phloem layer (Langor & Raske, 1987a). To successfully attack and colonize the subcortical environment of the host tree, the insects need to overcome the tree defense system, for instance by clogging resin ducts and degrading terpenoid compounds (Paine *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 2011). The microbiota is essential in these defensive actions (Six & Wingfield, 2011; Six, 2013). Accordingly, pioneer beetles need to carry, mainly under their elytra, their associated microorganisms playing a key role in the protection from tree defense mechanisms (Durand *et al.*, 2015). Ophiostomatoid fungi have been frequently reported for their ability to colonize the resin ducts of conifer trees, enabling the insect to settle in the phloem without being trapped in the resin (Paine *et al.*, 1997; Lieutier *et al.*, 2009; Six & Wingfield, 2011). Indeed, the *Ophiostoma* genus was the only filamentous fungi identified in abundance (3%) in the ectomicrobiota of the adults. The beetle at this stage would transport and promote this filamentous fungus on its exoskeleton to weaken the tree defense system and thus benefit from it by successfully colonizing the host tree. Additionally, *Pseudomonas* and *Serratia*, which were reported to play a role in the degradation of terpenoid compounds in other *Dendroctonus* species, were identified in high proportion in the ectomicrobiota of *D. simplex* adults (Morales-Jimenez *et al.*, 2012a; Adams *et al.*, 2013; Boone *et al.*, 2013a). Yeasts, such as *Ogataea pini*, also abundant in the ectomicrobiota of adults, are able to tolerate and grow in the presence of some terpenoid compounds, but no direct evidence of degradation has been demonstrated (Davis & Hofstetter, 2011). Indeed, the beetle could be associated with these bacteria and yeast to benefit from the detoxification of the environment. With this assemblage of microorganisms carried on its surface, the insect could face the tree defense system and successfully colonize the phloem. In return, microorganisms get access to a new niche.

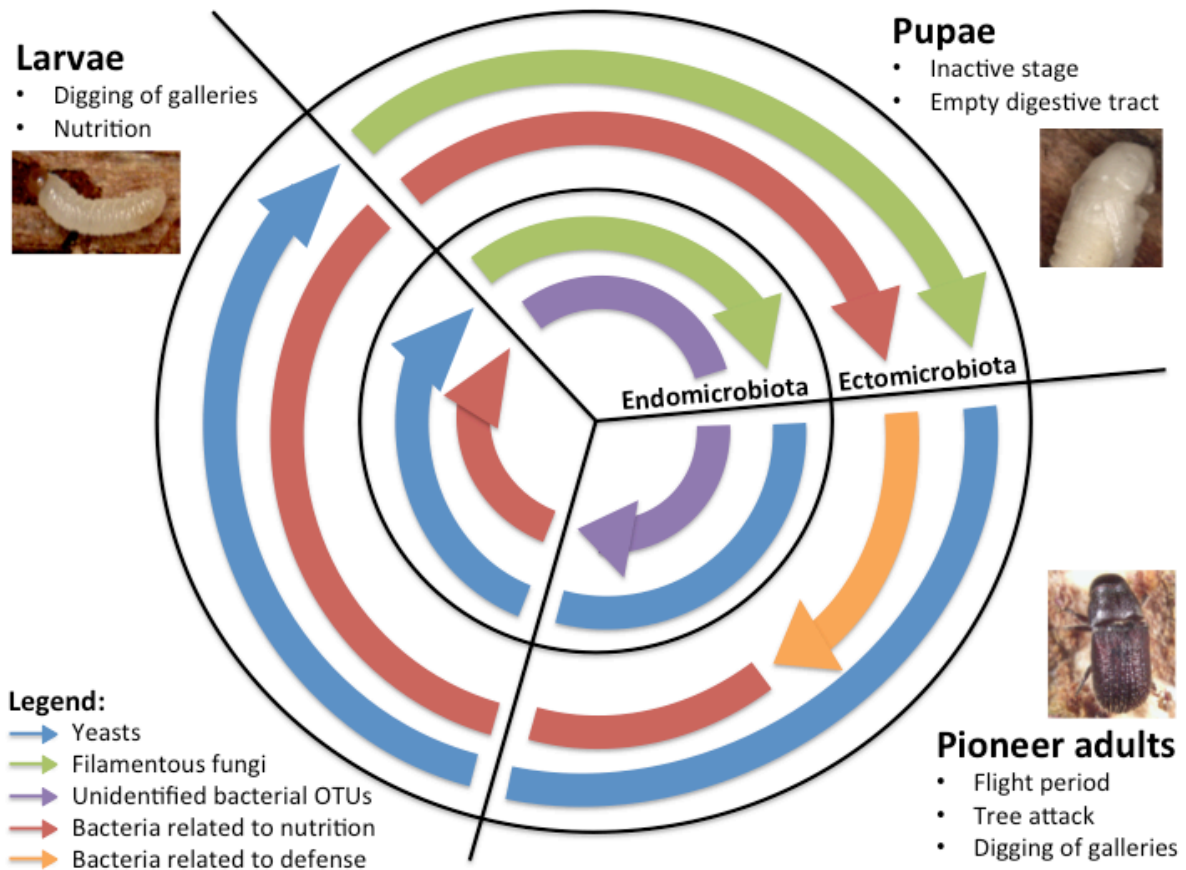


Figure 7.3. Eastern larch beetle microbiota throughout developmental stages.

Overview of the proposed successional microbiota associated with *D. simplex* developmental stages and microflora, based on obtained results and literature. The predominant microorganisms for each developmental stage and microbiota are presented in the figure.

Apart from the plant protection mechanisms, insects are also confronted to antagonistic microorganisms under the bark, such as fungi. *Pseudomonas* and *Serratia* genera have been reported to express antifungal activities against antagonistic fungi and are believed to play a major role in the beetle defense against pathogenic microorganisms under the bark (Cardoza *et al.*, 2006; Winder *et al.*, 2010). Moreover, yeasts and filamentous fungi associated with *Dendroctonus* species are also able to produce volatile compounds that modulate the growth of other fungi under the bark (Adams *et al.*, 2008; Cale *et al.*, 2016). *Ogataea pini*, associated with a few *Dendroctonus* species, produce volatile compounds that inhibit the growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Davis & Hofstetter, 2011). Accordingly, the *Ogataea* genus was identified in abundance in the ectomicrobiota of the adults. Based on the published functions and the presence of many microorganisms associated with the ectomicrobiota of the adults, we hypothesize that *D. simplex* is carrying on his exoskeleton a microbial assemblage implicated in the defense mechanisms of the insects, protecting them during the colonization.

Numerous studies report the implication of microorganisms in beetle nutrition, completing the nutrient-poor phloem diet (Paine *et al.*, 1997; Adams & Six, 2007; Six & Wingfield, 2011; Popa *et al.*, 2012; Davis, 2014). As beetle pioneers colonize a new environment, they should bring along these microorganisms on their exoskeleton to colonize the galleries they are digging. They can then proliferate under the bark, enabling the next generation of insects to feed on them. Such microbial gardening has been observed in ants, termites, and ambrosia beetle (Mueller & Gerardo, 2002; Mueller *et al.*, 2005). Many authors hypothesize that filamentous fungi could be a nutritional source for beetles, mainly by providing nitrogen and sterols, essential for oogenesis and larval development (Klepzig & Six, 2004; Bentz & Six, 2006; Adams & Six, 2007). Moreover, *Candida* species isolated from Coleoptera degrade many compounds, such as sugar and cellulose, and produce vitamins (Chararas *et al.*, 1983). More recently, the implication of associated yeasts in beetle nutrition has been hypothesized (Davis, 2014; Durand *et al.*, 2017). Accordingly, yeasts such as *Candida* were found in abundance in feeding developmental stages (adults and larvae) while being underrepresented in the inactive stage (pupae). This finding supports the implication of yeasts in beetle nutrition. Bacteria are also essential for the beetle diet, acting mainly as nitrogen fixators and cellulose degraders (Popa *et al.*, 2012). *Rahnella aquatilis*, associated with many *Dendroctonus* species, can fix nitrogen, leading authors to hypothesize that this bacterium could concentrate nitrogen to fulfil insect needs (Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Morales-Jimenez *et al.*, 2012a). Additionally, many *Pseudomonas* species, such as *Pseudomonas fluorescens*, also isolated from *Dendroctonus* species, have cellulolytic activity (Morales-Jimenez *et al.*, 2012a; Hu *et al.*, 2014; Briones-Roblero *et al.*, 2017b). Bacteria belonging to this genus could be implicated in cellulose breakdown, helping the insect to assimilate recalcitrant carbon sources. Vitamins and amino acids are also thought to be supplemented by bacteria, but no direct evidence is yet available (Gibson & Hunter, 2010). We hypothesize that filamentous fungi, yeasts, and bacteria providing nutritional benefits are transported by pioneer adults of *D. simplex*, and are inoculated in the galleries during their construction, so the next generation can feed on them to complete their development, explaining their predominant presence in the ectomicrobiota of adults. As demonstrated before, the beetle's ectomicrobiota enclosed specific OTUs, distinct from the galleries samples (Durand *et al.*, 2015). As pioneer beetles attack and colonize new trees, a selection of beneficial microorganisms by the insect could occur, leading them to a successful attack.

Other bacteria were identified in adults' ectomicrobiota, such as *Erwinia*, *Pseudoxanthomonas*, *Yersinia*, and some unclassified bacteria, but no specific function is yet attributed to them. Some authors suggest that they could be involved in beetle defense

or nutrition, or even play some role in the pheromone synthesis or the mediation of interactions among the microbiota (Gibson & Hunter, 2010; Popa *et al.*, 2012; Hofstetter *et al.*, 2015). Additionally, these bacteria could also be associated with the beetle's galleries rather than transported by the insect, and colonize the ectomicrobiota after galleries construction, as some of them were previously identified in *D. simplex* galleries (Durand *et al.*, 2015).

After reproduction and hatching of eggs, larvae construct their horizontal galleries and feed on phloem throughout their development (Langor & Raske, 1987b). Accordingly, microorganisms identified in high proportion in the larval stage should shift and be related to nutritional benefits, both for the ectomicrobiota, as they colonize the galleries, and the endomicrobiota, as they feed on them. Indeed, yeasts were predominant in both microbiota. Furthermore, the same yeast genera were also found in the adults and larvae, with different abundance for the endomicrobiota, likely reflecting different nutritional requirements for these two developmental stages. Moreover, bacteria related to nutrition identified in adults were also present in the ecto- and endomicrobiota of larvae, supporting the hypothesis of their nutritional benefits. Indeed, results for larvae microbiota support the hypothesis that pioneers transport microorganisms on their exoskeleton to enable them to grow in the galleries and the next generation to feed on them. The Shannon diversity index is also lower in the larvae endomicrobiota compared to other developmental stages. This finding suggests that a fewer number of bacterial species is required for the larval nutrition when the insect evolves under the bark environment, as they live a simpler life once the attack and colonisation of the tree is achieved.

In preparation for the transition to the pupal stage, a larvae excavates a pupal chamber, stops feeding, empty his gut and blocks the entrance hole with frass (Langor & Raske, 1987b). Accordingly, filamentous fungi were predominantly associated with this stage, for both the ecto- and endomicrobiota, whereas yeasts were underrepresented. This further supports a model where yeasts play a fundamental role in nutrition. The pupa is inactive under the bark, and so this developmental stage is more vulnerable. Pupal chambers harbor spores of filamentous fungi, and it was hypothesized that beetles could acquire them at this stage (Six, 2003a). Associated filamentous fungi produce antifungal compounds that inhibit the growth of antagonistic fungi, protecting the beetle under the bark (Paine *et al.*, 1997; Cale *et al.*, 2016). Pupae may form an association with these filamentous fungi for their protection during this crucial period of development, explaining the presence of more genera of filamentous fungi associated with this developmental stage. The change from active to passive behaviour could then explain the significant modification in fungal community structure of *D. simplex* pupae. Additionally, the bacterial population

exhibits a similar shift in its abundant microorganisms, as bacteria involved in nutritional functions were underrepresented. Unclassified Enterobacteriaceae and Gammaproteobacteria were mainly associated with pupae. Unfortunately, no particular function has been attributed to these bacteria yet. Our results suggest that there are probably endosymbiotic bacteria as they are found in pupae after the beetle empties its gut, and also in pioneer beetles. Additionally, these unclassified groups were recovered from the endomicrobiota of *D. simplex* in our previous study on hybrid larches (Durand *et al.*, 2015). These OTUs appear to represent novel species, as they do not correspond to known bacteria in the NCBI genomic database.

After the pupal stage, the insect transforms into adult and hibernates in the pupal chamber for winter. Before the flight period in the spring, the new generation of insects needs to feed to reach its sexual maturity (Langor & Raske, 1987b). Apart from the phloem, insects may feed on filamentous fungi found in their pupal chamber, as they were reported to contain a high concentration of sterols, but mainly on yeasts as they are found in abundance in the adult's endomicrobiota and in the galleries (Bentz & Six, 2006; Adams & Six, 2007; Durand *et al.*, 2017). Accordingly, mainly the unclassified Enterobacteriaceae and Gammaproteobacteria were identified in these samples, and the bacteria related to nutrition were underrepresented, also supporting the hypothesis of a feeding function for the yeasts. The next generation will then emerge from the bark and attack a new tree.

When considering the whole developmental process and the microorganisms altogether, we can hypothesize that bark beetle pioneers carry the microbial assemblage needed for a successful attack and the complete development cycle occurring under the bark. Indeed, all microorganisms with possible functions were identified in the adult samples. According to the beetle's requirements, the abundance of microorganisms shifts between the developmental stages, as their functions differ. Some of these microorganisms could be acquired by the new generation by vertical transfer or could be acquired by horizontal transfer as they colonize the galleries.

Investigating the structure of the microbial (bacteria, filamentous fungi, and yeasts) community associated with the eastern larch beetle revealed significant changes in their relative abundance over the various stages. Changes in bacterial and fungal community structures seem to be triggered by the physiological origin (ecto and endo) and by the developmental stages of the insect. These variations can be explained by the succession of functions required by each developmental stage, and beetle requirements. These results suggest that a symbiotic association between the eastern larch beetle and some of these microorganisms takes place and that this *D. simplex* symbiotic complex is helping the insect to colonize its host tree and survive under subcortical conditions.

7.7 Funding

This work was supported by the Direction Générale de la Production des Semences et de Plants Forestiers (DGPSP) [grant number DGPSP-2013-1122435] to CG. AAD was supported by a Wladimir A. Smirnoff Fellowship.

7.8 Acknowledgments

We would like to thank Amélie Bergeron for her help with samples preparation and DNA extraction. We would also like to thank Fabrice Jean-Pierre, Jean-Philippe Buffet and Marie-Christine Groleau for technical assistance.

8 CHAPITRE 4: MISE EN CULTURE DES MICROORGANISMES ASSOCIES AUX ADULTES DE *D. SIMPLEX*

8.1 Mise en contexte

La première étape du projet menant à une étude des fonctions pouvant être associées aux différents microorganismes présents au sein du microbiote chez *D. simplex*, une mise en culture permettant de créer une banque de référence a été réalisée. Dans ce contexte, différents milieux et conditions de culture ont été testés afin de cultiver les bactéries, champignons filamenteux et levures associés aux insectes pionniers responsables de l'attaque initiale et de la colonisation de l'arbre-hôte. Les isolats obtenus ont par la suite été identifiés à l'aide du séquençage de type Sanger et conservés au laboratoire. À plus long terme, à partir de cette banque, les fonctions proposées pour les différents microorganismes et leur impact chez les insectes pourront être testés *in vitro* et *in vivo*, afin de vérifier les hypothèses soulevées.

8.2 Méthodologie

8.2.1 Milieux et conditions de culture

Afin de récupérer la grande majorité des microorganismes présents au niveau des deux microflore de l'insecte (ecto- et endomicrobiome), différents milieux de culture ont été employés. Parmi ceux-ci, certains sont issus de la littérature, alors que d'autres ont été créés au laboratoire en se référant aux possibles fonctions des microorganismes au sein du microbiote de l'insecte. À cet effet, il est à noter que le tract intestinal chez plusieurs insectes représente un milieu alcalin et peu oxygéné (Engel & Moran, 2013). Afin de recréer ces conditions, le pH des géloses (7 et 9,5) ainsi que la quantité d'oxygène disponible lors de l'incubation (conditions aérobie et micro-aérophile) ont été variés pour la mise en culture des bactéries associées à l'endomicrobiome. Préalablement à l'étalement sur gélose, des enrichissements en milieu liquide ont également été réalisés pour certains milieux spécifiques, afin de favoriser la croissance des microorganismes. Le tableau 8.1 décrit les différentes combinaisons de milieux et conditions de cultures utilisées pour cultiver l'ensemble des microorganismes.

Tableau 8.1. Milieux et conditions de culture utilisés afin de cultiver les microorganismes (bactéries, champignons filamenteux et levures) associés à l'ecto- et l'endomicrobiome des adultes pionniers de *D. simplex*.

Milieux de culture et composition	Microflore	Conditions de culture	Références
1. Difco™ R2A agar (BD) Selon les directives du fabricant	Ecto- et endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie	-
2. Difco™ R2A agar + sucres du phloème R2A agar (18,2 g/l), Glucose (0,1M), Fructose (0,1M), Sucrose (0,1M) Les solutions de sucres ont été filtrées et ajoutées au R2A agar après stérilisation	Endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie pH 7 ; 9,5	Sucres (Woodruff, 2014)
3. R2A liquide + Agar bactériologique (Alpha Bioscience) R2A :Extrait de levures (0,5 g/l), Peptone (0,5 g/l), Acides casaminés (0,5 g/l), Dextrose (0,5 g/l), Amidon soluble (0,5 g/l), Pyruvate de sodium (0,3 g/l)K ₂ HPO ₄ (0,3 g/l), MgSO ₄ (0,024 g/l). Agar bactériologique (15 g/l) Les solutions de R2A et d'agar ont été stérilisées séparément	Endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie Enrichissement liquide	-
4. Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA – Oxoid) Selon les directives du fabricant	Ecto- et endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie	-
5. 10% Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB – BD) + Agar bactériologique TSB (3 g/l), Agar bactériologique (15 g/l)	Endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie	(Adams <i>et al.</i> , 2009; Cardoza <i>et al.</i> , 2009; Adams <i>et al.</i> , 2011)
6. Difco™ MacConkey agar (BD) Selon les directives du fabricant	Endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie	-

<p>7. Grace's insect cell culture medium (Gibco) + Agar bactériologique</p> <p>Grace's medium (45,7 g/l) Agar bactériologique (15 g/l) Les solutions de Grace's et Agar ont été stérilisées séparément</p>	Endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie	(Pontes & Dale, 2006; Nechitaylo <i>et al.</i> , 2014)
<p>8. Phloème + levures + Agar bactériologique</p> <p>Solution phloème : 75 g de phloème de mélèze Laricin sain humide fraîchement récupéré et broyé dans 430 ml d'eau Milli-Q</p> <p>Levures : 10 ml de culture de sept levures isolées chez <i>D. simplex</i> (AADf-05, 12, 14, 16, 17, 31, 35) séparément dans le milieu YME</p> <p>Agar bactériologique (15 g/l)</p> <p>Les solutions de phloème et d'agar ont été stérilisées séparément. Les trois solutions ont été combinées par la suite.</p>	Endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie	-
<p>9. Eau-agar bactériologique + terpènes</p> <p>Solution d'agar bactériologique (15 g/l) dans de l'eau du robinet</p> <p>Ajouter 1 ml d'α-pinène sur un papier filtre (Whatman, UK) stérile dans le couvercle du Pétris au moment de l'inoculation</p>	Endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie	(Adams <i>et al.</i> , 2009)
<p>10. Sucres</p> <p>Glucose (0,1M), Fructose (0,1M), Sucrose (0,1M)</p> <p>Solution d'agar bactériologique (15 g/l) dans de l'eau du robinet</p> <p>Les solutions de sucres ont été filtrées et ajoutées à l'agar après stérilisation</p>	Endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie pH 7 ; 9,5	Sucres (Woodruff, 2014)

<p>11. Sucres fermentés par les levures</p> <p>Sucres fermentés : 150 ml de culture de 5 levures isolées chez <i>D. simplex</i> (AADf-05, 12, 14, 16, 17) dans le milieu de culture M9 supplémenté en glucose (0,1M), fructose (0,1M) et sucrose (0,1M), chacune jusqu'à la phase stationnaire de culture. Conserver le filtrat des cultures.</p> <p>Agar bactériologique (15 g dans 300 ml d'eau)</p> <p>Combiner les 2 solutions après stérilisation de l'agar</p>	Endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie pH 7 ; 9,5	Sucres (Woodruff, 2014)
<p>12. Milieu sans azote</p> <p>K₂HPO₄ (6,3 g/l), NaH₂PO₄ (1,9 g/l), MgSO₄•7H₂O (0,1 g/l), Na₂MoO₄•2H₂O (0,008 g/l), C₆H₅FeO₇ (0,008 g/l), thioglycolate de sodium (0,5 g/l), extrait de levure (0,2 g/l), Résazurin (0,001 g/l), Glucose (20%)</p>	Endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie Enrichissement liquide	(Bridges, 1981)
<p>13. Milieu cellulose-agar</p> <p>K₂HPO₄ (0,5 g/l), MgSO₄ (0,25 g/l), α-cellulose (2 g/l), Gélatine (2 g/l), Agar bactériologique (15 g/l)</p>	Endomicrobiome	Aérobie Micro-aérophilie Enrichissement liquide	(Gupta <i>et al.</i> , 2012)
<p>14. Potato Dextrose Agar (PDA – Alpha Bioscience)</p> <p>Selon les directives du fabricant</p>	Ectomicrobiome	Aérobie	-
<p>15. Difco™ Malt Extract Agar (MEA – BD)</p> <p>Selon les directives du fabricant</p>	Ectomicrobiome	Aérobie	-
<p>16. Czapek solution Agar (Oxoid)</p> <p>Selon les directives du fabricant</p>	Ectomicrobiome	Aérobie	-
<p>17. Yeast Malt Extract Agar (YMEA)</p> <p>Extrait de levure (3 g/l), Extrait de Malt (3 g/l), Glucose (10 g/l), Tryptone (5 g/l), Agar (20 g/l),</p>	Ectomicrobiome	Aérobie pH 3,5	(Lou <i>et al.</i> , 2014)

En absence de précision, les géloses ont été préparées à pH 7 ou encore selon le pH recommandé dans les directives (milieux commerciaux).

Pour les milieux servant à la mise en culture des bactéries (#1 à #13), 100 mg/ml de cycloheximide, un inhibiteur de croissance des eucaryotes, a été ajouté après la stérilisation, alors qu'un mélange d'antibiotiques (1 mg/ml de streptomycine, 0,5 mg/ml de pénicilline, 0,05 mg/ml de chloramphénicol) a été additionné aux milieux servant à la mise en culture des champignons filamenteux et levures (#14 à #17). Le pH de certains milieux de culture a également été ajusté avant de couler les géloses par l'ajout de NaOH et HCl et vérifié à l'aide de papier indicateur de pH (Whatman).

8.2.2 Récupération et mise en culture des microorganismes

Les insectes utilisés pour la mise en culture des microorganismes ont été récoltés à Saint-Claude, dans la même plantation de mélèzes mentionnée précédemment. L'échantillonnage a été réalisé directement sur le site, sur divers mélèzes montrant des signes d'attaques par *D. simplex*. Les insectes ont été récupérés à l'aide de pinces entomologiques stériles en soulevant délicatement l'écorce de l'arbre, puis placés dans des microtubes de 2 ml pour leur transport jusqu'au laboratoire. Uniquement les insectes vivants ont été utilisés pour ces expériences. Dès l'arrivée au laboratoire, les microorganismes présents à la surface des adultes ont été récupérés en réalisant cinq lavages en série dans 1 ml de PBS supplémenté de 0,1 % de Triton X-100 et le tout placé sous agitation durant 1 min à l'aide d'un vortex. Afin de s'assurer d'obtenir une quantité suffisante de microorganismes associés à l'ectomicrobiome et d'obtenir un échantillonnage représentatif de la population, 10 insectes ont été choisis aléatoirement pour former un échantillon, et les épreuves ont été répétées deux fois. L'extérieur des insectes a par la suite été stérilisé à l'aide de trois lavages successifs dans 1 ml d'éthanol 70% sous agitation pendant 1 min, pour ensuite être rincés à l'eau ultrapure stérile, toujours avec agitation durant 1 min. Par la suite, les insectes ont été broyés à l'aide d'un bâton d'homogénéisation (VWR, Mont-Royal (Qc), Canada) dans la solution de PBS additionnée de Triton afin de récupérer les microorganismes associés à l'endomicrobiome.

Pour les solutions de lavages ainsi que les insectes broyés, des dilutions en séries de 10^{-2} à 10^{-4} ont été réalisées dans du PBS afin d'obtenir des colonies isolées sur gélose. Pour chaque dilution, 100 μ l de la suspension ont été étalés sur gélose avant d'être incubé à 25°C durant deux semaines. Afin de créer des conditions de micro-aérophilie, certaines géloses ont été placées dans des jarres avec un lampion allumé, puis fermées hermétiquement. Lorsque la majorité de l'oxygène était consommée et le lampion éteint, les jarres ont été incubées à 25°C durant deux semaines. Suite à l'incubation, chaque colonie de morphologie différente présente sur chaque gélose a été repiquée séparément sur le

même type de milieu, puis incubée de nouveau pendant une période de deux semaines. À l'obtention de colonies isolées, des cultures liquides dans 5 ml du même milieu ont été réalisées en vue de l'extraction d'ADN génomique.

8.2.3 Extraction d'ADN génomique, amplification PCR et RFLP

Afin d'extraire l'ADN des isolats purifiés sur géloses, 1 ml de culture liquide a été centrifugé dans un microtube de 1,5 ml à $16\ 873 \times g$ durant 10 min à la température de la pièce. Après avoir éliminé le surnageant, le culot a été resuspendu dans 1 ml de tampon d'extraction. L'extraction d'ADN génomique a été réalisée selon le protocole décrit à la section 5.4.2, à l'exception de la précipitation d'ADN qui a été réalisée à -20°C durant 2 heures. De plus, les paramètres du FastPrep ont été ajustés à 6 m/s durant 60 sec pour les champignons filamenteux.

Afin d'identifier les isolats bactériens obtenus, une amplification PCR du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a été réalisée selon le protocole décrit à la section 7.4.2. L'amplification a par la suite été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose à une concentration de 1,5 %.

Afin de sélectionner uniquement les isolats différents et d'éviter la redondance lors du séquençage, la technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) a été employée (Jensen *et al.*, 2002). Afin de déterminer les enzymes de restriction à employer, des expériences préliminaires ont été réalisées sur un seul isolat afin de sélectionner différentes enzymes donnant des patrons distincts. Sur cette base, les enzymes de restriction MspI, RsaI et TaqI (New England Biolab, É-U) ont été sélectionnées. L'ensemble des amplicons ont été digérés à l'aide de ces trois enzymes séparément. Pour chaque enzyme, un mélange réactionnel composé de 2 μl de tampon 10X, 1 μl de l'enzyme, 7 μl d'eau ultrapure stérile et 10 μl de l'amplicon a été utilisé. Les digestions ont été incubées à 37°C durant la nuit et les profils de digestion ont par la suite été visualisés sur un gel d'agarose à une concentration de 2 %.

Pour identifier les isolats de champignons filamenteux et de levures obtenus, une amplification PCR d'une partie des gènes codants pour les ARN ribosomaux 18S, 5.8S et 28S ainsi que les régions ITS1 et ITS2 a été réalisée en utilisant les amorces ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') et ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White *et al.*, 1990). Chaque réaction PCR a été réalisée dans un volume final de 50 μl qui contenait 25 mM de MgCl_2 , 10 μg BSA, 10 mM de chacune des amorces, 10 mM dNTP, 5 unités de Taq Polymérase, du buffer ThermoPol® 10X et 50 ng d'ADN génomique. Suivant une étape

de dénaturation initiale de 5 min à 94°C, 30 cycles d'amplification ont été réalisés (94°C durant 30 sec, 59°C durant 30 sec, 72°C durant 1 min) suivi d'une élongation finale de 10 min à 72°C. L'amplification a ensuite été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% et visualisation sous UV.

Comme pour les isolats bactériens, la technique de RFLP a été employée afin de sélectionner uniquement les isolats fongiques différents pour l'étape de séquençage. Pour ce faire, les enzymes de restriction *HaeIII*, *DdeI* et *Hinfl* (New England Biolab) ont été sélectionnées sur la base de travaux réalisés chez les levures (Bokulich *et al.*, 2012). Les amplicons ont été digérés selon le protocole décrit précédemment.

8.2.4 Séquençage des isolats obtenus

Pour chaque patron de digestion différent, deux isolats par milieu de culture différent ont été sélectionnés afin de réaliser le séquençage de type Sanger. Cependant, certains patrons de digestion étaient présents chez un seul isolat. En préparation pour le séquençage, une amplification PCR a été effectuée suivant le protocole décrit précédemment, puis les amplicons ont été purifiés à l'aide de la trousse commerciale «EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit» de BioBasic en suivant les recommandations du fabricant. Les amplicons purifiés ont par la suite été envoyés pour séquençage avec les mêmes amorces mentionnées précédemment. Suivant la réception des séquences nucléotidiques, celles-ci ont été analysées à l'aide du logiciel Geneious R9. Pour ce faire, les séquences sens et anti-sens obtenues ont été assemblées *de novo* afin d'obtenir une séquence consensus de qualité. Dans le cas des bactéries, les isolats ont été identifiés à l'aide de EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net>), alors que les isolats fongiques ont été identifiés par BLAST de nucléotides sur NCBI. L'identification taxonomique ayant la plus grande identité sur l'ensemble de la séquence a été retenue pour chacune des séquences.

Afin de pouvoir relier les isolats bactériens obtenus aux différentes OTU identifiées par séquençage à haut débit, un arbre phylogénétique de type «maximum likelihood» a été généré à l'aide du logiciel MEGA (Tamura *et al.*, 2011) en utilisant les séquences appartenant aux isolats, aux OTU ainsi qu'aux souches de références. Pour ce faire, les séquences ont été alignées avec l'algorithme MUSCLE, puis elles ont été coupées afin de conserver uniquement les régions présentes pour l'ensemble des séquences. Mille permutations de l'arbre obtenu ont été réalisées afin de connaître la force des nœuds. Cette comparaison n'a malheureusement pas été réalisée pour les isolats fongiques puisque les

gènes de références utilisés (gène codant pour l'ARNr 18S pour le séquençage à haut débit et les régions ITS pour le séquençage Sanger) n'étaient pas les mêmes.

8.2.5 Création d'une banque d'isolats

Dans le but d'étudier les fonctions des différents isolats identifiés chez *D. simplex*, une banque d'isolats a été créée. Ainsi, dans le cas des bactéries et levures, les cultures liquides ont été conservées dans du glycérol à une concentration finale de 15%. Pour les champignons filamenteux, cinq petits rectangles de culture ont été prélevés sur des géloses à l'aide d'un scalpel stérile et conservés dans un tube cryogénique contenant du glycérol 70%. Tous les tubes contenant les microorganismes ont ensuite été conservés à -80°C.

8.3 Résultats

8.3.1 Mise en culture des bactéries associées aux adultes de *D. simplex*

Tout au long du projet, plusieurs isolats bactériens ont été obtenus, dont certains ont été isolés à plusieurs reprises sur différents milieux de culture. Dans un premier temps, la mise en culture des isolats associés à l'ectomicrobiome des adultes pionniers a été réalisée en employant deux milieux de culture différents, résultant en l'obtention de près de 100 isolats. Parmi ceux-ci, 33 ont été sélectionnés afin d'être envoyés au séquençage sur la base des profils RFLP obtenus (Tableau 8.2). La majorité des OTU identifiées au genre et qui présentaient une forte abondance tant chez les adultes récoltés sur le mélèze hybride (Figure 5.2) et laricin (Figure 7.1) lors du séquençage à haut débit ont été isolées sur milieu de culture (Figure 8.1). Parmi celles-ci, on retrouve plusieurs isolats appartenant au genre *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas* et *Serratia*. De plus, certains isolats appartenant aux genres *Pantoea* et *Rouxiella* ont été identifiés, ainsi qu'un isolat appartenant au genre *Caballeronia* (appartenant anciennement au genre *Burkholderia*). Par contre, aucun isolat correspondant à *Yersinia* ou *Sphingomonas* n'a pu être cultivé pour l'ectomicrobiome.

Tableau 8.2. Isolats bactériens de l'ectomicrobiote des adultes de *D. simplex*.

No. isolat	Séquence de référence la plus proche	No. Accession	Identité (%)	Milieux de culture
Gammaproteobacteria				
AAD-39, 43, 56, 62	<i>Erwinia tasmaniensis</i> ET1/99	CU468135	98	1,4
AAD-12, 22, 23, 83, 104, 111	<i>Erwinia typographi</i> DSM 22678	GU166291	99	1, 4
AAD-18, 37, 38, 48	<i>Erwinia typographi</i> DSM 22678	GU166291	98	1, 4
AAD-46, 34	<i>Pantoea</i> sp. GM01	AKIU01000040	99	1
AAD-71	<i>Pseudomonas congelans</i> DSM 14939	FNJH01000022	97	1
AAD-15, 52	<i>Pseudomonas congelans</i> DSM 14939	FNJH01000022	96	1
AAD-42, 44, 50, 57	<i>Pseudomonas lutea</i> DSM 17257	JRMB01000004	98	1, 4
AAD-55, 101	<i>Pseudomonas yamanorum</i> 8H1	EU557337	99	1
AAD-10, 20, 31	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i> IMMIB AFH-5	AM418384	98	1, 4
AAD-36, 47, 65, 73	<i>Rouxiella silvae</i> 213	KX784908	99	1, 4
Betaproteobacteria				
AAD-05	<i>Caballeronia udeis</i> LMG 27134	FCOK01000155	100	1

Toutes les bactéries associées à l'ectomicrobiome ont été isolées en présence d'oxygène. Les isolats présents dans le tableau correspondent à ceux dont la séquence nucléotidique a été obtenue par séquençage de type Sanger, alors que plusieurs autres ont été mis en culture mais non séquencés puisqu'ils présentaient des patrons de digestions RFLP similaires. Pour l'ensemble des séquences obtenues, la couverture était de $\geq 99\%$.

Dans un deuxième temps, plusieurs expériences successives de mise en culture ont été réalisées au niveau de l'endomicrobiote des adultes afin d'isoler les bactéries associées à cet environnement. Cette mise en culture avait également pour but de nous permettre d'identifier plus précisément les OTU correspondant aux entérobactéries et

gammaprotéobactéries non-classifiées (Figures 5.2 et 5.3). En utilisant divers milieux de culture, plus de 400 isolats bactériens ont été isolés, dont 44 ont été sélectionnés pour l'envoi au séquençage sur la base des profils RFLP obtenus (Tableau 8.3). Parmi ceux-ci, plusieurs genres bactériens ont été isolés à plusieurs reprises sur les différents milieux, tels que *Erwinia*, *Rahnella*, *Microbacterium*, *Pantoea* et *Pseudomonas*. Au contraire, certains genres ont été cultivés uniquement sur des milieux spécifiques, tels que *Serratia* sur le milieu cellulose. Malheureusement, en regard du grand «cluster» de bactéries non-identifiées observé lors de l'étude sur l'endomicrobiome, l'alignement des séquences obtenues par le séquençage de type Sanger n'a pas permis d'identifier de correspondance avec les séquences appartenant aux OTU obtenues lors du séquençage à haut débit (Figure 8.1). Dans les faits, les isolats retrouvés correspondent plutôt aux bactéries présentes en plus faible abondance dans l'endomicrobiome.

Tableau 8.3. Isolats bactériens de l'endomicrobiote des adultes de *D. simplex*.

No. isolat	Séquence de référence la plus proche	No. Accession	Identité (%)	Milieux et conditions de culture
Actinobacteria				
AADb3-105	<i>Cellulomonas denverensis</i> W6929	AY501362	99	2 Micro-aérophilie
AADb3-124, 126	<i>Cellulomonas pakistanensis</i> JCM 18755	BBHV01000063	99	2, 10 Micro-aérophilie
AADb3-46 AADi-97, 137	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317	EF592577	99	1, 2, 4 Micro-aérophilie
AADb3-336	<i>Kocuria rhizophila</i> DSM 11926	Y16264	99	11
AADb3-24, 25, 27, 121, 175, 331	<i>Microbacterium proteolyticum</i> RZ36	KM359785	99	2, 11 O ₂ , Micro-aérophilie
AADi-76	<i>Mycobacterium peregrinum</i> ATCC 14467	KI912270	98	1

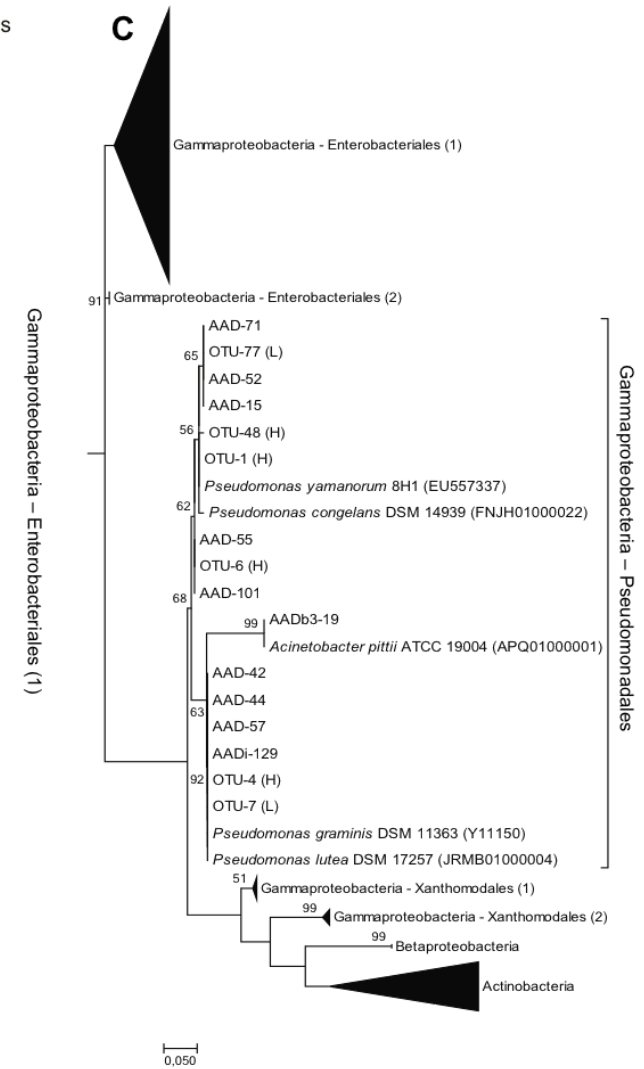
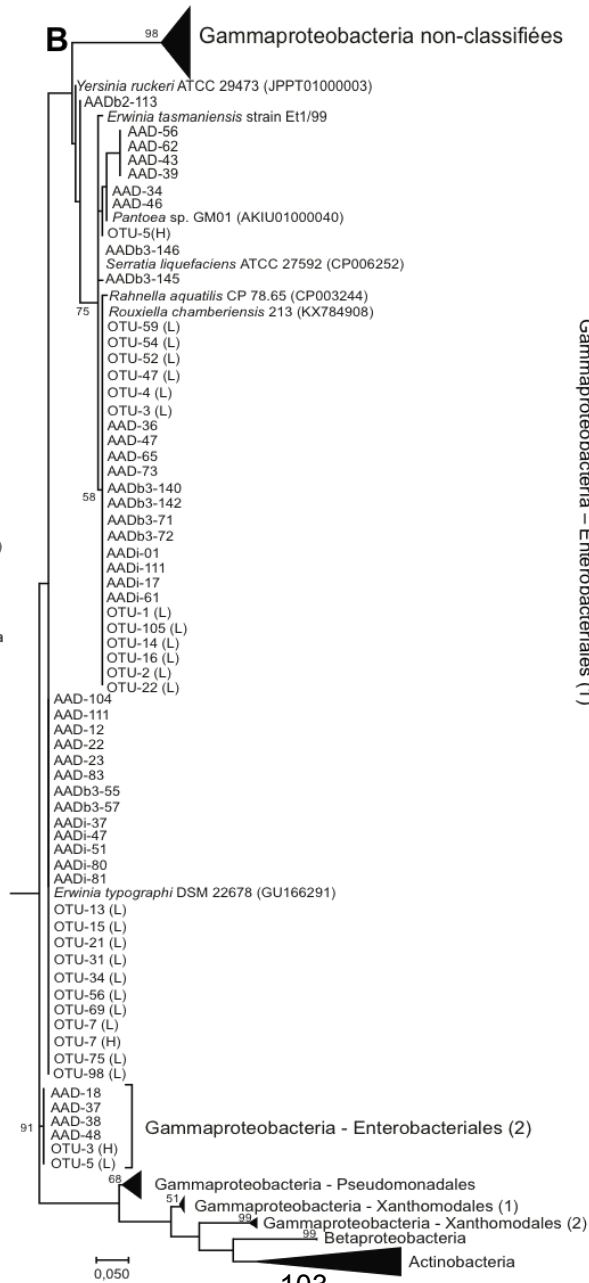
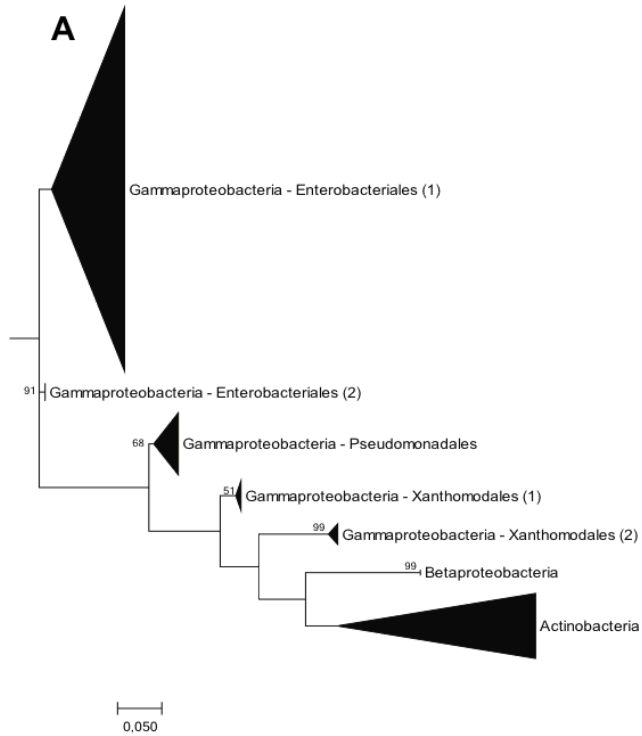
Gammaproteobacteria

AADb3-19	<i>Acinetobacter pittii</i> ATCC 19004	APQP01000001	99	2
AADi-20, 23, 31, 53, 85, 91	<i>Dyella thiooxydans</i> ATSB10	CP014841	98	1, 4, 5
AADb3-55 AADb2-57 AADi-80, 81, 37, 47, 51	<i>Erwinia typographi</i> DSM 22678	GU166291	99	1, 2, 3, 4, 6
AADb2-99	<i>Erwinia typographi</i> DSM 22678	GU166291	98	3
AADi-78, 129	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363	Y11150	98	4, 5 O ₂ , Micro- aérophilie
AADi-140	<i>Pseudoxanthomonas</i> <i>spadix</i> IMMIB AFA-5	AM418384	99	5 Micro- aérophilie
AADi-01, 17, 61, 111 AADb3-71, 72, 140, 142	<i>Rahnella aquatilis</i> CP 78.65	CP003244	98	1, 4, 5, 12, 13 O ₂ , Micro- aérophilie
AADb3- 145, 146	<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC 27592	CP006252	100	13
AADb3-41	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> MTCC 434	JALV01000036	99	2
AADb2-113	<i>Yersinia ruckeri</i> ATCC 29473	JPPT01000003	98	3

Les isolats présents dans le tableau correspondent à ceux dont la séquence nucléotidique a été obtenue par séquençage de type Sanger, alors que plusieurs autres isolats ont été mis en culture mais non séquencés puisqu'ils présentaient des patrons de digestions RFLP similaires. Pour l'ensemble des séquences obtenues, la couverture était de $\geq 99\%$. En absence de précision, les isolats bactériens ont été isolés en présence d'oxygène.

Certains des isolats obtenus pour l'ecto- et l'endomicrobiote correspondent à la même souche de référence, tel que *Erwinia typographi* et *Pseudoxanthomonas spadix*. De plus, certaines souches de références, tels que *Rouxiella silvae* et *Rahnella aquatilis* sont très proche phylogénétiquement, rendant leur identification précise difficile par le gène

codant pour l'ARN 16S. Tel que mentionné précédemment, ces isolats appartiennent aux OTU présentes en faible abondance dans l'ectomicrobiome, et pourraient être partagées entre les trois environnements de l'insecte (ecto-, endomicrobiote et galeries).



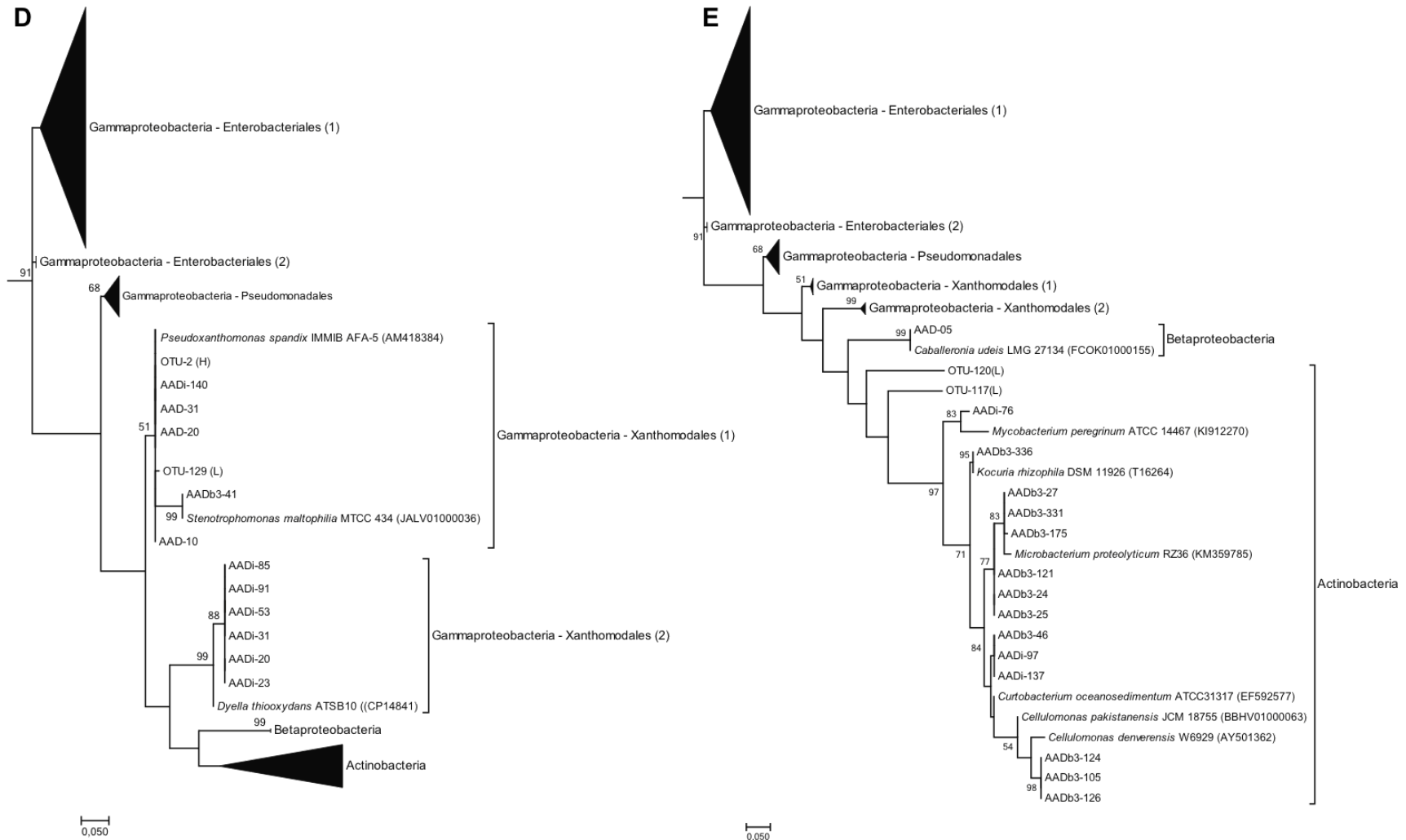


Figure 8.1. Arbre phylogénétique «Maximum likelihood» représentant les isolats bactériens de l'ecto- et endomicrobiote des adultes de *D. simplex*, les souches de références ainsi que les OTU retrouvées en abondance lors du séquençage à haut débit.

A : Arbre complet ; B, C et D : Séquences appartenant à la classe des Gammaproteobacteria ; E : Séquences appartenant à la classe des classes des Betaproteobactéries et Actinobactéries. La grosseur du triangle est proportionnelle au nombre de séquences. Le chiffre représente la robustesse des nœuds, obtenue à l'aide de 1000 permutations de l'arbre obtenu. Uniquement les valeurs supérieures à 50 sont présentées.

8.3.2 Mise en culture des champignons filamenteux et levures associés aux adultes de *D. simplex*

Plusieurs isolats fongiques ont également été récupérés lors de ce projet. Puisque les deux microbiotes étudiés chez l'insecte renferment une richesse spécifique comparable, l'ectomicrobiote des adultes a été utilisé afin d'obtenir des cultures pures des champignons filamenteux et levures associés à *D. simplex*. En utilisant quatre milieux de cultures différents, 70 isolats fongiques ont été caractérisés dont 27 ont été envoyés au séquençage sur la base des profils RFLP obtenus (Tableau 8.4, Figure 8.2). Une majorité de levures ainsi que quelques champignons filamenteux composent les organismes isolés et reflètent la composition du microbiome fongique retrouvé chez le stade adulte de l'insecte (Figure 6.2). Plusieurs isolats appartenant au genre *Candida* ont été obtenus, représentant le genre de levure le plus abondant observé lors du séquençage à haut débit. D'autres genres de levures identifiés en abondance par pyroséquençage ont également été obtenus en culture pure, tels que *Kuraishia*, *Yamadazyma* et *Wickerhahomyces*. Quelques champignons filamenteux ont également été retrouvés sur gélose, notamment plusieurs isolats appartenant au genre *Ophiostoma* retrouvé en abondance chez le dendroctone du mélèze. Enfin, des isolats se rattachant aux champignons filamenteux et à des levures non-abondantes lors du séquençage à haut débit ont été retrouvés. Ainsi, de façon générale, le séquençage des isolats fongiques a révélé un portrait étroitement associé aux OTU les plus abondantes identifiés par séquençage à haut débit. Malheureusement, il nous a été impossible de relier ceux-ci par la phylogénie comme pour les isolats bactériens, puisque les gènes de références utilisés pour le séquençage à haut débit et le séquençage de type Sanger n'étaient pas les mêmes. Finalement, certains genres identifiés par séquençage à haut débit sont toujours manquants, tel que *Ogataea*.

Tableau 8.4. Levures et champignons filamenteux isolés de l'ectomicrobiote des adultes de *D. simplex*.

No. isolats	Séquence de référence la plus proche	No. Accession	Identité (%)	Milieux de culture
Levures				
AADb2-09	<i>Candida</i>	FJ96790.1	99	8
AADf-38	<i>arabinofermentans</i> ATCC MYA-4484			

AADf-16	<i>Candida blankii</i> CBS:6427	KY101968	90	14
AADf-57, 05, 34, 48	<i>Candida oregonensis</i> CBS:5623	KY102260.1	99	14, 17
AADf-09, 21, 26	<i>Candida hylophila</i> UCDFST 79-1005	KU609536.1	99	14, 17
AADf-12, 23, 30	<i>Candida tenuis</i> CBS:2308	KY102436.1	99	14, 17
AADf-14, 17, 51	<i>Kuraishia molischiana</i> CBS:7030	KY103915.1	98	14, 17
AADf-31	<i>Wickerhamomyces</i> <i>bisporus</i> CBS :1890	KY105897.1	94	17
AADf-35, 39, 43	<i>Yamadazyma scolyti</i> CBS :5731	KY105949.1	99	14, 17

Champignons filamenteux

AADf-65	<i>Cordyceps confragosa</i> isolate LG4	KJ093501.1	99	16
AADf-55	<i>Lecanicillium</i> <i>attenuatum</i> CGMCC5328	JQ901939.1	99	14
AADf-36, 50	<i>Mortierella</i> sp. 04NY05	JX270372.1	99	16
AADf-62	<i>Ophiostoma</i> sp. CMW27318	DQ674369.1	99	14
AADf-44	<i>Ophiostoma abietinum</i> WIN(M) 1579	HM363169.1	99	14
AADf-70	<i>Ophiostoma pallidulum</i> 90bSSW	KY568133.1	95	14

Tous les champignons filamenteux et levures associés à l'ectomicrobiote ont été isolés en présence d'oxygène. Les isolats présents dans le tableau correspondent à ceux dont la séquence a été obtenue par séquençage de type Sanger, alors que plusieurs autres isolats ont été mis en culture mais non séquencés puisqu'ils présentaient des patrons de digestions RFLP similaires. Pour l'ensemble des séquences obtenues, la couverture était de $\geq 99\%$. L'identification taxonomique correspond au nom courant trouvé sur MycoBank.

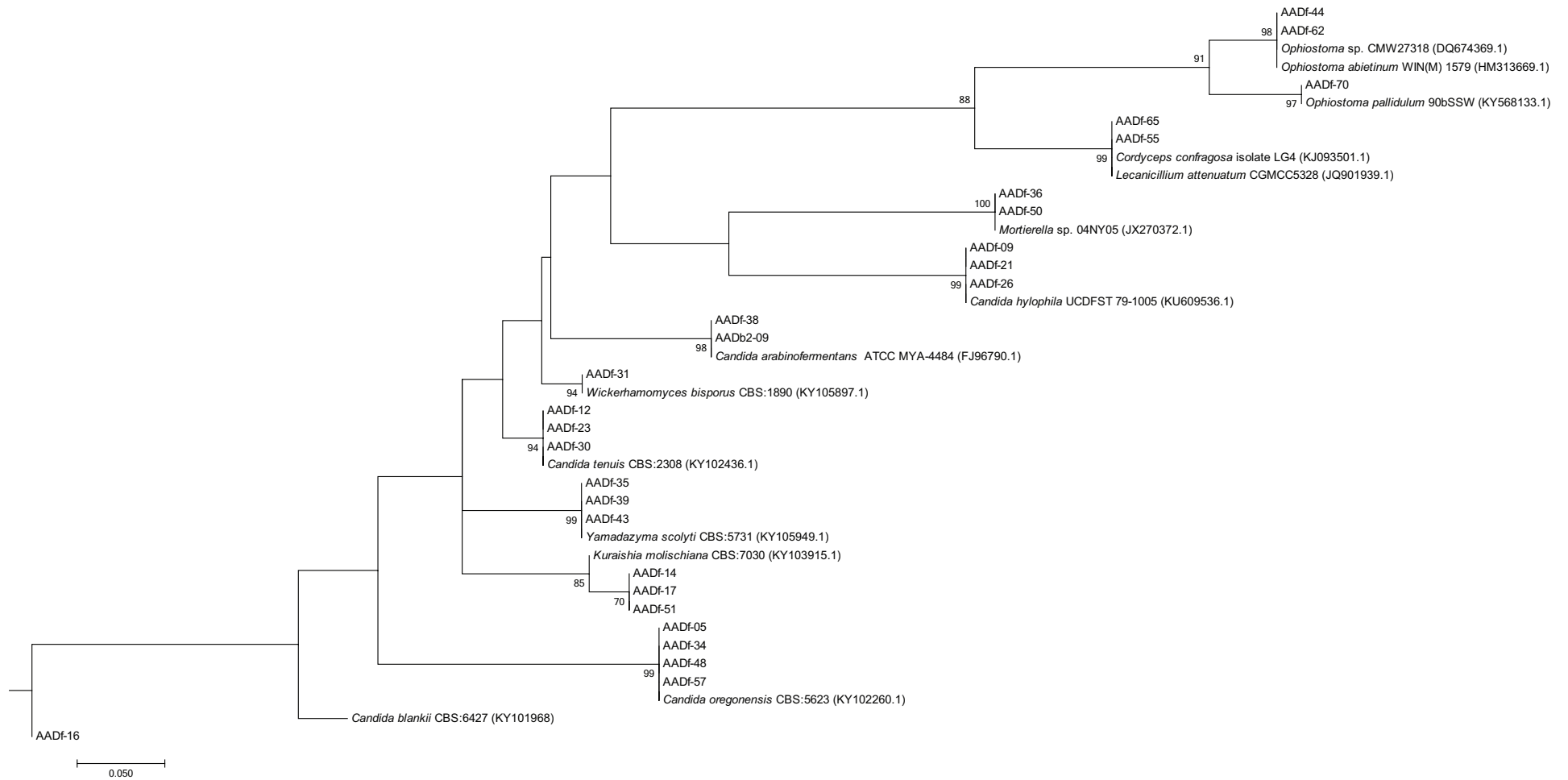


Figure 8.2. Arbre phylogénétique «Maximum likelihood» représentant les isolats fongiques associés aux adultes de *D. simplex* ainsi que les souches de références.

Le chiffre représente la robustesse des nœuds, obtenue à l'aide de 1000 permutations de l'arbre obtenu. Uniquement les valeurs supérieures à 50 sont présentées.

8.4 Discussion

La caractérisation du microbiome associé au dendroctone du mélèze par séquençage à haut débit nous a permis d'identifier un vaste ensemble des microorganismes présents au sein de celui-ci, soit des bactéries, champignons filamenteux et levures. Cette caractérisation nous a également permis d'observer leur succession en fonction des différents stades de développement de l'insecte. En se basant sur la littérature relative aux scolytes, plusieurs hypothèses ont été proposées sur l'implication de ces microorganismes dans le cycle de vie des Dendroctones. C'est d'autant plus vrai dans le cas des adultes pionniers responsables de l'attaque et de la colonisation de l'arbre, puisqu'il est généralement admis qu'ils transportent avec eux les microorganismes possédant des fonctions permettant leur établissement et leur survie sous l'écorce (Six & Wingfield, 2011; Popa *et al.*, 2012). Ainsi, dans l'éventualité d'approfondir les connaissances sur les fonctions exactes des microorganismes associés à *D. simplex*, il est essentiel de cultiver et isoler ces microorganismes. Dans cette optique, une banque d'isolats bactériens et fongiques associés à ces adultes pionniers a été mise en place au laboratoire. Pour ce faire, une variété de milieux et de conditions de culture a été employée afin de recréer les conditions idéales pour la croissance de ces microorganismes.

Dans un premier temps, la mise en culture des bactéries associées à l'ectomicrobiote de *D. simplex* a été réalisée. Lors du séquençage à haut débit, il a été remarqué que la composition de l'ectomicrobiome variait selon l'essence de l'arbre sur laquelle l'insecte se développait (laricin ou hybride), alors que la composition de l'endomicrobiome restait stable. Une hypothèse a donc été proposée voulant que les terpènes produits par l'arbre puissent varier d'une essence à l'autre, et donc influencer la richesse spécifique chez l'insecte (Tableau 11.4, annexe 1). C'est dans le but d'identifier le déterministe de ces essences sur l'ensemble des bactéries associées à l'insecte et leur abondance que des mises en culture des microorganismes ont été réalisées. Ainsi, il a été possible d'isoler des bactéries associées aux OTU les plus abondantes obtenues par séquençage à haut débit pour ces deux essences (Figure 8.1), tels que *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas* et *Serratia*, parfois même en multiples copies. Ces isolats pourront donc être utilisés afin de tester les fonctions proposées au chapitre 7, tels que la production de composés antifongiques, la dégradation de terpènes, ou encore l'implication dans la production de phéromones chez l'insecte. Malheureusement, aucun isolat ne correspondant au genre *Yersinia* ou *Sphingomonas* n'a pu être isolé. Lors du séquençage à haut débit, plusieurs OTU retrouvées en abondance au niveau de l'ecto- et de

l'endomicrobiome chez le mélèze laricin ont été identifiées comme appartenant au genre *Yersinia*. Par contre il faut être prudent avant de conclure sur ce résultat. En effet, le séquençage à haut débit génère de courts fragments de 500 paires de bases (pb), ce qui impacte la précision de l'identification taxonomique, normalement plus faible que lors de l'emploi du gène de référence complet comptant 1500 pb (Wang *et al.*, 2007a). Il se peut donc que les OTU identifiées comme *Yersinia* lors du séquençage à haut débit soient en fait d'autres entérobactéries s'y rapprochant, expliquant son absence chez les isolats obtenus. De plus, un isolat correspondant à *Yersinia* a été obtenu pour l'endomicrobiome sur un milieu de culture standard, laissant croire que sa mise en culture aurait été possible au niveau de l'ectomicrobiome.

Dans un second temps, la mise en culture des bactéries associées à l'endomicrobiome a été réalisée. Plusieurs expériences séquentielles ont été effectuées, tout en modifiant à chaque fois les milieux et les conditions de culture. Au terme des expériences, plusieurs isolats ont été obtenus correspondant aux OTU présentes en faible abondance chez cette microflore, tels que *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Serratia* et *Yersinia*. Ces isolats concordent à ce qui est régulièrement identifié par mise en culture chez les insectes du genre *Dendroctonus* (Vasanthakumar *et al.*, 2006; Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Adams *et al.*, 2010; Morales-Jimenez *et al.*, 2013), et pourraient jouer un rôle au niveau de la nutrition chez l'insecte et devront être testé à cet effet. Malheureusement, aucun isolat ne correspondait à notre «cluster» de gammaprotéobactéries non-identifiées retrouvé pour l'endomicrobiome de *D. simplex* par séquençage à haut débit. Parmi celles-ci, certaines pourraient être associées à des symbiontes primaires de l'insecte, puisque malgré les nombreuses tentatives de mise en culture avec des milieux et conditions variés, et compte tenu de leur grande abondance au niveau de l'endomicrobiome, ces bactéries n'ont jamais poussées sur géloses (Gibson & Hunter, 2010). De plus, ces bactéries sont regroupées dans un grand «cluster» distinct ne correspondant à aucune bactérie connue des bases de données disponibles (Figure 5.3). Finalement, bien que leur abondance varie, ces bactéries sont présentes chez tous les stades de développement de l'insecte, appuyant ainsi l'hypothèse d'une relation étroite conduisant à des symbiontes primaires. Ceci expliquerait qu'elles soient difficilement cultivables et absentes chez les isolats obtenus.

Aucune croissance bactérienne n'a été observée sur certains milieux de culture, tel que le milieu eau-agar contenant de l' α -pinène utilisé pour la mise en culture des bactéries de l'endomicrobiome. Celui-ci a été employé auparavant afin d'isoler les bactéries responsables de la dégradation des terpènes chez deux espèces du genre *Dendroctonus* (Adams *et al.*, 2009). Dans ce dernier cas, des insectes complets avaient été utilisés pour la

mise en culture. Il est important de se rappeler que seules les bactéries provenant de l'endomicrobiome ont été mises en culture sur ce milieu dans notre étude. Cette différence dans l'approche expérimentale pourrait expliquer l'absence de croissance sur ce milieu. Sur la base des expériences préliminaires menées au laboratoire, cela indique que la dégradation des terpènes serait réalisée par les bactéries présentes au niveau de l'ectomicrobiome de l'insecte. Cela ajoute à la proposition voulant que les bactéries responsables de détoxifier l'environnement subcortical du mélèze seraient transportées par les insectes pionniers, où elles seraient un élément composant la communauté microbienne de l'ectomicrobiome. Cette fonction pourrait être remplie par les espèces appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Rahnella*, tel que mentionné précédemment (Adams *et al.*, 2013).

D'autre part, le milieu de culture contenant uniquement des sucres présents dans le phloème n'a permis d'obtenir qu'une très faible croissance bactérienne. Au contraire, le milieu contenant les mêmes sucres préalablement fermentés par les levures associées à l'insecte a conduit à une plus grande croissance bactérienne. Ce résultat semble appuyer l'hypothèse voulant que les levures jouent un rôle nutritif, puisqu'elles apparaissent capables de métaboliser les sucres présents au niveau du phloème de l'arbre, alors que les bactéries semblent moins performantes à ce niveau.

Certains milieux spécifiques ont également été employés lors de la mise en culture des microorganismes, permettant ainsi de proposer des fonctions. À cet effet, *Rahnella aquatilis* était la seule bactérie isolée en absence d'azote dans le milieu de culture, suggérant une capacité à fixer l'azote atmosphérique. Ce résultat laisse croire que la fixation de l'azote pourrait être remplie par celle-ci au sein du microbiote de *D. simplex*. De plus, cette fonction a déjà été rapportée chez *R. aquatilis* chez deux autres espèces du genre *Dendroctonus* (Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Morales-Jimenez *et al.*, 2012a). De même, *R. aquatilis* et *Serratia liquefaciens* ont été isolés sur un milieu contenant uniquement de la cellulose comme source de carbone. Il s'agit d'une démonstration de leur capacité à dégrader ce composé. Des études ont démontré que certaines souches d'espèces appartenant à ces genres de bactéries étaient en mesure de dégrader la cellulose (Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Morales-Jimenez *et al.*, 2012a; Seipke *et al.*, 2012), ce que ne peuvent faire les insectes. Elles pourraient donc jouer un rôle dans la nutrition de *D. simplex*. Dans les faits, cette fonction a déjà été rapportée pour ces deux genres bactériens chez deux autres espèces du genre *Dendroctonus* (Hu *et al.*, 2014; Briones-Roblero *et al.*, 2017b). Elle doit cependant être validée chez le dendroctone du mélèze.

Finalement, la mise en culture des champignons filamenteux et des levures associées au dendroctone du mélèze a été réalisée. Puisque la richesse spécifique était similaire au niveau des deux parties du microbiome de l'insecte (Figure 7.2), l'ectomicrobiote

des adultes a été employé afin de faciliter les manipulations. Tel qu'attendu, une majorité de levures a été isolée, représentant les OTU trouvées en abondance chez l'insecte, appartenant notamment aux genres *Candida*, *Kuraishia* et *Yamadazyma*. Tel que proposé au chapitre 7, ces levures pourraient avoir un rôle au niveau de la nutrition et cette fonction devra être testée dans de futurs travaux. Malheureusement, certains genres de levures identifiés par séquençage à haut débit sont manquants, notamment *Ogataea*, retrouvé couramment chez les insectes du genre *Dendroctonus* (Hunt & Borden, 1990; Davis & Hofstetter, 2011; Davis *et al.*, 2011). Plusieurs rôles et fonctions ont été attribuées à cette levure, tels que la production de composés antifongiques ou la tolérance aux terpènes (Davis & Hofstetter, 2011; Davis *et al.*, 2011). Il aurait donc été intéressant d'obtenir un isolat associé à ce genre afin de pouvoir vérifier certaines de ces fonctions chez *D. simplex*. Dans la littérature, *Ogataea pini* a été isolée à plusieurs reprises sur des milieux de composition similaire à ce qui a été employé (Davis & Hofstetter, 2011; Davis *et al.*, 2011). Il se peut donc que la faible abondance de cette levure chez les adultes soit la raison principale expliquant qu'elle n'ait pas été récupérée lors de la mise en culture. Deux genres de champignons filamenteux ont également été identifiés par séquençage à haut débit, tous deux appartenant aux champignons ophiostomatoïdes, couramment associés aux scolytes. Plusieurs isolats du genre *Ophiostoma* ont été obtenus lors de la mise en culture, alors qu'aucun isolat associé à *Ceratocystiopsis* n'a pu être cultivé. Dans la littérature, plusieurs espèces appartenant au genre *Ophiostoma* ont été isolées chez les scolytes et plusieurs fonctions ont été proposées (Bentz & Six, 2006; Adams & Six, 2007). Ces champignons filamenteux semblent être importants pour *D. simplex*, puisqu'il s'agit du seul genre présent tout au long de son développement. Ainsi, malgré le fait que plusieurs champignons filamenteux et levures ont été obtenus, près de la moitié des genres retrouvés en abondance lors du séquençage à haut débit sont absents sur milieu de culture et ce malgré l'utilisation d'approches couramment employées pour la croissance de ces microorganismes. Des tentatives plus poussées sont à prévoir, notamment en travaillant avec un plus grand nombre d'insectes et en variant les milieux de culture ainsi que les conditions d'incubation, afin de mettre en culture les champignons filamenteux et levures qui n'ont pas été cultivés à présent. De plus, les isolats fongiques obtenus devront également être séquencés avec le même gène de référence que pour le séquençage à haut débit (gène codant pour l'ARNr 18S) afin de pouvoir faire le parallèle entre les isolats et les OTU obtenus.

Les résultats obtenus pour la mise en culture, tant au niveau des bactéries que des champignons, reflètent ce qui est généralement isolé chez les espèces du genre *Dendroctonus*. En effet, la majorité des isolats bactériens rapportés appartiennent aux

genres *Pseudomonas*, *Serratia*, *Rahnella* et *Cellulomonas*, reflétant ce qui a été retrouvé chez *D. simplex* (Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Winder *et al.*, 2010; Morales-Jimenez *et al.*, 2012a; Morales-Jimenez *et al.*, 2013). Par contre, certains de nos isolats pour l'endomicrobiote, tels que ceux appartenant aux genres *Curtobacterium*, *Dyella*, *Kocuria*, *Mycobacterium* et *Microbacterium*, n'ont jamais été rapportés comme isolés chez les dendroctones. L'utilisation de divers milieux non traditionnels ainsi que les variations au niveau des conditions de culture pourraient expliquer ces différences. Aucune fonction présumée n'est donc rapportée pour ces isolats. Puisque ceux-ci ont été retrouvés au niveau de l'endomicrobiome, ils pourraient jouer un rôle au niveau de la nutrition de l'insecte. Il serait donc intéressant d'approfondir les recherches sur ceux-ci. Pour ce qui est des champignons filamenteux et levures, les études précédentes se sont majoritairement concentrées sur le groupe de champignons ophiostomatoïdes, considéré comme symbiotique chez plusieurs dendroctones (Bentz & Six, 2006; Adams & Six, 2007). De ce fait, les champignons filamenteux cultivés dans cette étude ont tous déjà été rapportés dans la littérature. Les levures appartenant aux genres *Candida*, *Yamadazyma* (*Pichia*) et *Kuraishia* sont également souvent isolées chez les espèces du genre *Dendroctonus* (Adams *et al.*, 2008). On peut donc conclure que la majorité des isolats obtenus en culture correspondent à ce qui est normalement isolé chez les dendroctones. Comme plusieurs hypothèses sur leurs fonctions ont déjà été proposées, il serait intéressant de voir si les isolats obtenus pourraient remplir des fonctions similaires chez *D. simplex*. Plus encore, il serait également intéressant de pousser d'avantage les essais afin d'identifier les bactéries appartenant à notre «cluster» d'intérêt. Puisqu'aucune des tentatives de mise en culture n'a fonctionné, une approche moléculaire serait à préconiser pour le futur.

En conclusion, l'ensemble des manipulations a permis la constitution d'une banque d'isolats bactériens et fongiques qui compte près de 600 isolats différents. Pour l'ectomicrobiote, la vaste majorité des OTU identifiées ont été domestiquées, alors qu'une très faible proportion de l'endomicrobiote a été obtenue sur milieu de culture. Malgré le fait que l'ensemble de la diversité microbienne n'a pu être récupérée, les éléments isolés pourront servir à élucider leur fonction et à proposer un rôle écologique dans les interactions existantes entre l'insecte et sa plante hôte. Elles pourront notamment contribuer à mieux comprendre la dynamique de l'établissement de l'insecte sous l'écorce.

9 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif principal du projet de recherche visait la caractérisation du microbiote (bactéries, champignons filamenteux et levures) associé au dendroctone du mélèze. Cette caractérisation avait pour but de mieux comprendre le rôle joué par les microorganismes dans les mécanismes d'attaque des hôtes par l'insecte et de suivre l'évolution des communautés microbiennes tout au long de son cycle de développement sous l'écorce. Le projet s'inscrit dans un objectif plus large visant à trouver de nouvelles stratégies de lutte biologique efficaces contre ce ravageur forestier. En tenant compte que seulement une partie des microorganismes sont cultivables au laboratoire avec les techniques courantes de microbiologie, une approche de biologie moléculaire a été préconisée pour ce projet. De cette façon, il nous a été possible d'obtenir un aperçu global de la grande majorité de la diversité microbienne associée au dendroctone du mélèze. Dans un premier temps, la caractérisation des bactéries associées aux adultes pionniers de *D. simplex* nous a permis de constater la présence de deux microbiomes spécifiques chez l'insecte, soit l'ecto- et l'endomicrobiome. De plus, il a été possible de remarquer que l'ectomicrobiome représente une communauté distincte des galeries de l'insecte. Ensuite, la diversité fongique associée aux différents stades de développement a été caractérisée, nous permettant de conclure que les stades actifs (adultes et larves) étaient étroitement associés aux levures, alors que le stade inactif (pupes) était fortement associé aux champignons filamenteux. Plus encore, la caractérisation de la diversité bactérienne associée aux stades de développement a révélé une succession au niveau des bactéries présentes en abondance en fonction du stade de développement de l'insecte. Finalement, plusieurs isolats bactériens et fongiques associés aux adultes pionniers ont été cultivés au laboratoire, nous permettant de confirmer l'identification taxonomique réalisée précédemment. À plus long terme, ces isolats serviront à identifier les fonctions de ceux-ci au sein du microbiote de l'insecte. L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de dresser un portrait global de la composition du microbiote (bactéries, champignons et levures) associé à *D. simplex* tout au long de son cycle de développement dans un peuplement de mélèze sous infestation endémique. Grâce à celui-ci, plusieurs hypothèses sur les fonctions de ces microorganismes ont pu être émises, sur la base des informations présentes dans la littérature ainsi que des besoins de l'insecte sous l'écorce.

Deux techniques distinctes d'identification des microorganismes ont été utilisées dans le cadre de ce projet. Dans le cas des bactéries, les résultats obtenus pour la mise en culture justifient l'approche par séquençage à haut débit, puisqu'un grand nombre des bactéries identifiées par cette technique n'ont pas été retrouvées lors de la mise en culture.

En effet, les bactéries présentes au niveau de l'ectomicrobiome de l'insecte ont été en majeure partie cultivées au laboratoire. En revanche, peu d'OTU identifiées en abondance par séquençage à haut débit au niveau de l'endomicrobiome correspondent aux isolats cultivés pour cette même microflore, et ce même en employant plusieurs milieux et conditions de culture. En effet, les OTU non identifiées appartenant aux Gammaprotéobactéries et Entérobactéries, majoritaires lors des analyses, n'ont pas été retrouvées sur géloses. Ceci confirme que l'approche utilisée pour l'identification des communautés microbiennes était la bonne, puisque les outils conventionnels d'identification des microorganismes n'auraient pas permis d'identifier l'ensemble des bactéries présentes chez l'insecte malgré leur abondance, entraînant un biais majeur dans le cas de l'endomicrobiote. En comparant nos résultats avec la littérature, il est possible de constater que la mise en culture reflète le portrait des communautés bactériennes dressé chez les autres espèces du genre *Dendroctonus*, ces études ayant été réalisées principalement par culture ou DGGE (Vasanthakumar *et al.*, 2006; Morales-Jimenez *et al.*, 2009; Morales-Jimenez *et al.*, 2012a; Briones-Roblero *et al.*, 2017b). Plus récemment, une étude utilisant le séquençage à haut débit a été réalisée sur le microbiome intestinal chez les stades de développement de *D. rhizophagus* (Briones-Roblero *et al.*, 2017a). Dans celle-ci, les auteurs ont identifié l'ensemble des bactéries jusqu'au genre, n'obtenant aucune OTU non identifiée. De plus, les genres bactériens identifiés reflètent ce qui est généralement retrouvé par mise en culture, soit *Pseudomonas*, *Serratia* et *Rahnella* en forte abondance. Par contre, les auteurs précisent que l'identification taxonomique la plus proche a été employée pour certaines OTU dans cette étude. Cette affirmation explique sans doute les différences observées par rapport aux résultats obtenus lors de notre étude, puisque nous avons plutôt choisi le rang taxonomique possédant 80% de confiance et plus. Le manque d'étude utilisant les technologies de séquençage à haut débit ne nous permet donc pas de comparer les résultats obtenus. Il est donc difficile de savoir si ce type d'OTU non identifiée serait présent chez d'autres espèces du genre *Dendroctonus*. Les techniques actuelles de séquençage à haut débit ainsi que les outils de bioinformatique et banque de données ne nous permettent donc pas d'identifier l'ensemble des microorganismes présents au sein du microbiote de *D. simplex*.

Comme mentionné précédemment, ces bactéries non identifiées pourraient représenter des symbiotes primaires de l'insecte, expliquant à la fois le fait que ces OTU ne soient pas retrouvées dans les banques de référence et notre incapacité à les cultiver au laboratoire. Chez certains insectes, les bactéries symbiotiques sont retrouvées au sein de structures spécifiques. Ainsi, la présence de bactéries au niveau de certaines structures de l'intestin d'insectes a déjà été observée (Dillon & Dillon, 2004; Kikuchi *et al.*, 2007; Engel &

Moran, 2013). Elles peuvent être aussi associées aux corps gras, au niveau des gonades ou encore dans des bactériomes (Bressan *et al.*, 2009; Douglas, 2011). Chez *D. simplex*, la présence de microvillosités au niveau de l'intestin moyen ainsi que de corps gras a été observée (Figure 9.1). Les bactéries symbiotiques du dendroctone du mélèze pourraient donc se trouver au niveau de ces structures, expliquant leur présence dans tous les stades de développement de l'insecte. Ces observations convergent avec notre hypothèse voulant qu'il existe une association forte entre l'insecte et ces bactéries. D'autres expériences, telles qu'une approche par FISH, pourraient confirmer cette hypothèse, ou encore indiquer un nouvel emplacement pour ces bactéries.

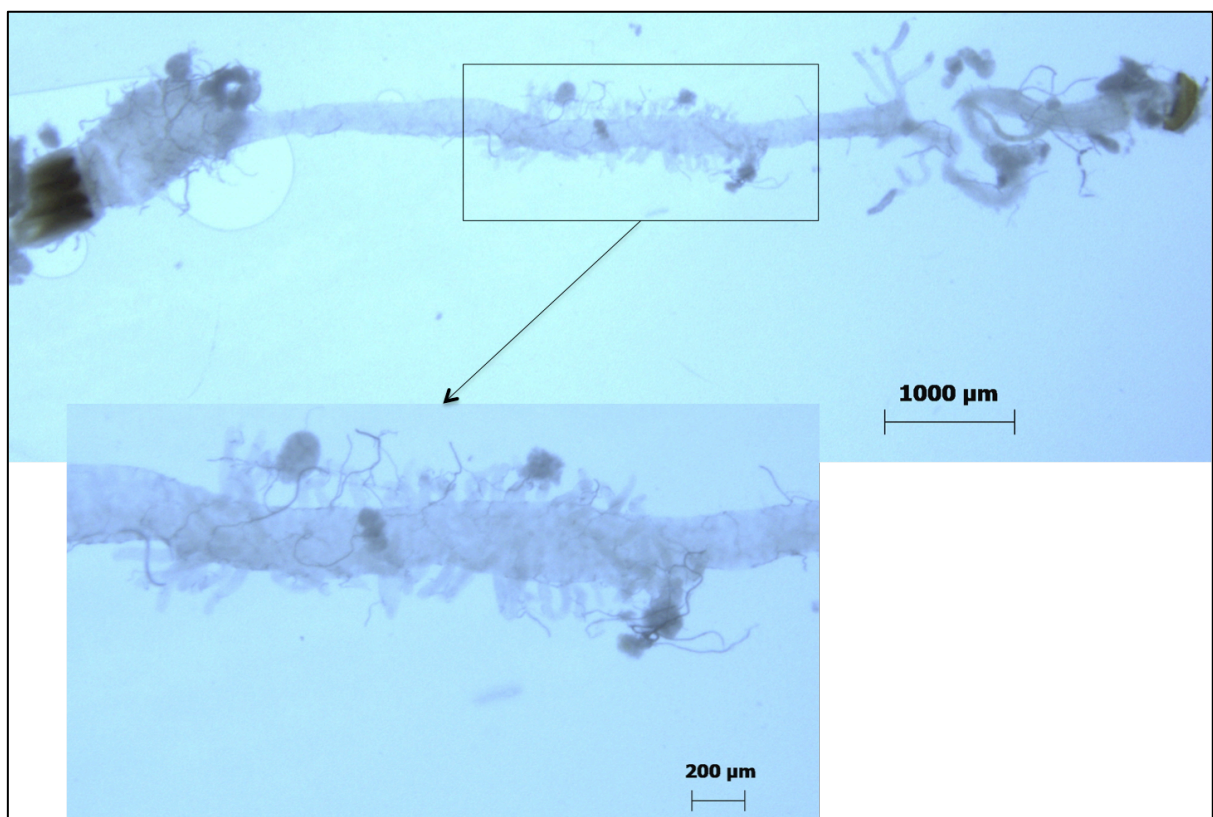


Figure 9.1. Tract intestinal complet d'un adulte de *D. simplex* : présence de microvillosités et de corps gras au niveau de l'intestin moyen.
(Crédit photo Valentin Popa, laboratoire Guertin)

Tel que mentionné précédemment, le dendroctone du mélèze s'attaque principalement aux mélèzes laricins, mais peut également s'attaquer à certaines espèces de mélèzes hybrides (Langor & Raske, 1989a; Seybold *et al.*, 2002). Lors de nos premières analyses sur les adultes pionniers, les insectes ont été récoltés sous l'écorce de mélèzes hybrides (chapitre 1), alors que les insectes servant à la caractérisation du microbiome au

cours du développement de l'insecte ont été récoltés sous l'écorce de mélèzes laricins (chapitre 3). Cette stratégie d'échantillonnage nous a permis d'observer des distinctions au niveau des communautés bactériennes en fonction de l'essence de l'arbre hôte. En effet, des différences au niveau de l'abondance et de la richesse spécifique ont été observées pour l'ectomicrobiome (Annexe 1, tableau 11.4). Plus précisément, une très forte abondance d'OTU appartenant au genre *Pseudomonas* (>90%) a été retrouvée chez les insectes provenant de mélèzes hybrides, alors qu'une plus faible proportion de ce genre bactérien a été trouvée chez les insectes récoltés sur les mélèzes laricins, laissant place à d'autres genres bactériens tels qu'*Erwinia*, *Serratia* et *Yersinia*. Au contraire, l'endomicrobiome reste stable indépendamment de l'essence hôte. Cette distinction pourrait être expliquée par des différences au niveau des mécanismes de défense de l'arbre hôte, puisque celle-ci n'est observable que pour l'ectomicrobiome. Selon nos hypothèses, les microorganismes présents au niveau de l'ectomicrobiote chez les adultes pionniers seraient impliqués dans les mécanismes de défense de l'insecte face à son hôte. Différentes molécules de terpènes sont produites par les conifères, en proportions différentes selon l'espèce, mais peu d'information est disponible à ce sujet. Par contre, une capacité de dégradation des terpènes variable par les microorganismes en fonction des différents composés a déjà été observée (Adams *et al.*, 2011; Davis & Hofstetter, 2011; Boone *et al.*, 2013a). Il se pourrait donc qu'une composition en terpènes différente chez l'arbre hôte explique cette variation chez les deux populations d'insectes, puisqu'une dégradation des terpènes par certains de ces genres bactériens a déjà été observée auparavant (Adams *et al.*, 2013; Boone *et al.*, 2013a). D'autres facteurs au niveau de la plante pourraient aussi influencer ces changements. Cependant, l'année et la localisation des sites d'échantillonnage n'influencent pas ces variations, puisque les expériences ont été répétées sur deux années consécutives pour le site de Saint-Claude, ainsi que sur un autre site dans la région de Québec (données de Jean-Philippe Buffet, non présentées) et les communautés bactériennes restent stables indépendamment de ces facteurs.

La dégradation des terpènes étant un facteur important dans la réussite de l'établissement des insectes sous l'écorce, cette fonction mériterait une attention particulière dans de futurs travaux au laboratoire. Parmi les isolats obtenus, certains candidats intéressants seraient à tester, tels que les bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Rahnella*, ayant déjà démontré la capacité à dégrader de tels composés *in vitro* et possédant les gènes nécessaires dans plusieurs cas (Adams *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2013). Certaines levures ont également démontré une capacité à dégrader les terpènes *in vitro*, tel que *O. pini*, représentant un autre candidat possible pour cette fonction (Davis & Hofstetter, 2011). Différentes approches pourraient être employées afin d'identifier la

présence de dégradation des terpènes chez les microorganismes, soit en identifiant la présence et l'activation de gènes de dégradation (Adams *et al.*, 2013), ou encore en suivant la dégradation de certains composés au sein de cultures (Davis & Hofstetter, 2011). Malheureusement, aucun isolat appartenant au genre *Ogataea* n'a été obtenu lors de la mise en culture. Il serait donc intéressant d'effectuer une nouvelle tentative afin de récupérer certains isolats associés, étant donné la multitude de rôles attribués à ce dernier dans la littérature (Hofstetter *et al.*, 2015).

Une autre fonction méritant une attention particulière dans le futur serait la production de composés antifongiques. Comme mentionné précédemment, la production de molécules antifongiques contre les champignons antagonistes présents dans le milieu ou encore contre les champignons entomopathogènes utilisés en lutte biologique a déjà été observée. Ces composés antifongiques ayant été rapportés comme produits par les bactéries et les levures, ces deux types de microorganismes devraient être testés (Hofstetter *et al.*, 2015). Ainsi, à l'aide de tests de confrontation sur géloses, il serait possible de déterminer la production de ces composés par un ou plusieurs des microorganismes isolés chez *D. simplex*. Puisque l'utilisation de l'isolat *Beauveria bassiana* INRS-242 pour lutter contre cet insecte ravageur a déjà été optimisée au laboratoire, il serait primordial de l'utiliser lors des expériences (Srei *et al.*, 2016). Dans l'éventualité où des composés antifongiques seraient identifiés, il serait possible de sélectionner un isolat fongique résistant à ceux-ci afin de l'utiliser comme agent de lutte biologique contre ce ravageur forestier. Puisque les champignons antagonistes se retrouvent dans l'environnement de l'insecte, il est fort probable que la production d'antifongiques soit une fonction remplie par les microorganismes associés à l'ectomicrobiome de l'insecte. Parmi les candidats intéressants à tester, les isolats appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Serratia*, abondants au niveau de l'ectomicrobiome de l'adulte, seraient à considérer puisque plusieurs composés antifongiques sont produits par ces genres bactériens (Cardoza *et al.*, 2006; Naik & Sakthivel, 2006; Park *et al.*, 2012). Pour leur part, les levures appartenant au genre *Ogataea* seraient également des candidats intéressants, puisqu'une inhibition de la croissance de *B. bassiana* par *O. pini* a déjà été rapportée (Davis & Hofstetter, 2011). Les levures appartenant aux genres *Candida* et *Pichia* (*Yamadazyma*) seraient également intéressantes à tester, puisqu'elles ont démontré une réduction de la croissance de champignons symbiotiques appartenant aux insectes (Adams *et al.*, 2008).

Une autre fonction d'intérêt serait le rôle nutritionnel de certains microorganismes associés à *D. simplex*. Tel que mentionné précédemment, nous avons pu constater que les stades s'alimentant (adultes et larves) étaient fortement associés aux levures, menant à l'hypothèse du rôle nutritionnel de celles-ci. De plus, cette fonction a souvent été

mentionnée par les chercheurs, sans toutefois être testée (Six, 2013; Davis, 2014). Au sein du laboratoire, des efforts ont été déployés afin de réaliser un élevage de *D. simplex*. Seulement 1% des insectes ont complété leur développement larvaire, démontrant un manque au niveau des éléments essentiels au développement de l'insecte (Srei, 2017). Il se peut qu'un de ces éléments soit l'absence de levures colonisant les galeries, puisque les insectes ont été maintenus dans des boîtes de Pétri avec une section de branche de mélèze, ne laissant pas la possibilité aux adultes de creuser des galeries et d'y inoculer leurs microorganismes associés. De cette façon, les larves ne pouvaient s'alimenter des levures, ne laissant que le phloème comme source alimentaire. D'ailleurs, un développement complet des larves chez un scolyte se nourrissant d'une levure appartenant au genre *Pichia* a déjà été observé (Kabir & Giese, 1966). Becher et collaborateurs (2012) ont également démontré l'importance des levures comme source nutritionnelle dans le développement des drosophiles au laboratoire. Ces observations vont donc dans le même sens que notre hypothèse sur la fonction nutritive des levures. Il serait donc intéressant de tester cette hypothèse au laboratoire en effectuant des tests de préférence alimentaire sur géloses, ou encore inoculer des sections de mélèze avec un mélange des levures identifiées chez *D. simplex* lors d'une prochaine tentative d'élevage au laboratoire (Srei, 2017).

Les différentes fonctions pourront donc être testées *in vitro* afin de déterminer si un ou plusieurs microorganismes sont capables de les effectuer. Par contre, peu de fonctions pourront être testées *in vivo*, puisque des insectes axéniques seraient nécessaires pour y arriver. En l'absence de ceux-ci, il serait impossible d'attribuer une fonction précise à un microorganisme sans qu'il puisse s'agir de l'action conjointe d'un autre membre du consortium. Il sera donc très difficile de prouver hors de tout doute que les microorganismes testés remplissent une fonction donnée au sein du microbiote de *D. simplex* dans leur milieu naturel.

D'autres approches pourraient également être employées afin d'identifier les fonctions des microorganismes qui n'ont pas été cultivés au laboratoire, tels que les technologies «omiques». En effet, des techniques tels que la métagénomique nous permettraient d'identifier la présence de gènes fonctionnels au sein du microbiome de l'insecte, nous renseignant sur de possibles fonctions comme il a été le cas chez *D. ponderosae* (Adams *et al.*, 2013). Par contre, ces approches demeurent très théoriques et nécessitent une bonne couverture des gènes ainsi que des banques de références complètes afin de pouvoir analyser adéquatement les résultats obtenus. De plus, la présence d'ADN provenant de l'insecte peut également compliquer les analyses. Plus récemment, des approches de «single-cell genomics» sont développées afin d'isoler les

génomés d'intérêts et de les séquencer par la suite (Dichosa *et al.*, 2014). Ce type d'approche pourrait permettre, d'une part, d'identifier les bactéries non cultivées jusqu'à présent, et nous renseignerait également sur leurs possibles fonctions au sein du microbiome de *D. simplex*. Cette approche devrait donc être considérée dans de futurs travaux.

Le projet de recherche visait l'élucidation de la présence et de la composition du microbiote associé au dendroctone du mélèze. Notre approche combinant la mise en culture et la biologie moléculaire était idéale pour ce projet, puisqu'elle nous a permis d'identifier la grande majorité des microorganismes présents, mais également d'obtenir des isolats au laboratoire afin de pouvoir tester les hypothèses émises au sujet des fonctions de ces microorganismes. Les résultats obtenus nous ont permis de mieux comprendre la dynamique des communautés microbiennes associées à *D. simplex* en fonction du développement de l'insecte. De plus, ceux-ci nous ont également permis de trouver des candidats intéressants à cibler dans une optique de lutte biologique. En combinant les résultats obtenus lors de ce projet et les connaissances déjà acquises au laboratoire au sujet du dispositif d'autodissémination, des avancées importantes en lutte biologique contre cet insecte pourront être réalisées. Les méthodes développées au cours de ce projet pourront également être employées afin de contrôler les populations d'autres ravageurs forestiers.

L'hypothèse de départ du projet était qu'il y a présence d'un microbiote associé au dendroctone du mélèze, dont l'abondance des microorganismes qui lui sont associés varie en fonction du cycle de développement de l'insecte. La présence d'un tel microbiote a pu être démontrée, ainsi que sa variation au cours du temps. Plus encore, les résultats obtenus semblent démontrer que certains des microorganismes identifiés auraient une relation symbiotique avec l'insecte. Ce complexe symbiotique permettrait donc l'établissement et la survie de l'insecte sous l'écorce de son arbre hôte.

10 REFERENCES

- Aanen DK, Slippers B & Wingfield MJ (2009) Biological pest control in beetle agriculture. *Trends Microbiol.* 17: 179-182.
- Adams AS, Adams SM, Currie CR, Gillette NE & Raffa KF (2010) Geographic variation in bacterial communities associated with the red turpentine beetle (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 39: 406-414.
- Adams AS, Aylward FO, Adams SM, Erbilgin N, Aukema BH, Currie CR, Suen G & Raffa KF (2013) Mountain pine beetles colonizing historical and naïve host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes contributing to terpene metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 3468-3475.
- Adams AS, Boone CK, Bohlmann J & Raffa KF (2011) Responses of bark beetle-associated bacteria to host monoterpenes and their relationship to insect life histories. *J. Chem. Ecol.* 37: 808-817.
- Adams AS, Currie CR, Cardoza YJ, Klepzig KD & Raffa KF (2009) Effects of symbiotic bacteria and tree chemistry on the growth and reproduction of bark beetle fungal symbionts. *Can. J. For. Res.* 39: 1133-1147.
- Adams AS & Six DL (2007) Temporal variation in mycophagy and prevalence of fungi associated with developmental stages of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 36: 64-72.
- Adams AS, Six DL, Adams SM & Holben WE (2008) In vitro interactions between yeasts and bacteria and the fungal symbionts of the mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*). *Microb. Ecol.* 56: 460-466.
- Anonyme (2010) *Dendroctone du mélèze*. Ressource Naturelle Canada),
- Armendáriz-Toledano F & Zúñiga G (2017) Illustrated Key to Species of Genus *Dendroctonus* (Coleoptera: Curculionidae) Occurring in Mexico and Central America. *J. Insect Sci.* 17: 34.
- Aylward FO, Suen G, Biedermann PHW, Adams AS, Scott JJ, Malfatti SA, Glavina del Rio T, Tringe SG, Poulsen M, Raffa KF, Klepzig KD & Currie CR (2014) Convergent bacterial microbiotas in the fungal agricultural systems of insects. *mBio* 5: e02077-02014.
- Ayres MP, Wilkens RT, Ruel JJ, Lombardero MJ & Vallery E (2000) Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. *Ecology* 81: 2198-2210.
- Becher PG, Flick G, Rozpędowska E, Schmidt A, Hagman A, Lebreton S, Larsson MC, Hansson BS, Piškur J & Witzgall P (2012) Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Funct. Ecol.* 26: 822-828.
- Benoît P & Blais R (1984) Pertes de bois causées par le dendroctone du mélèze. *Phytoprotection* 65: 89-94.
- Bentz BJ (2004) Bark Beetles in the genus *Dendroctonus*. *Encyclopedia of Entomology*, Springer. p 234-235.
- Bentz BJ & Six DL (2006) Ergosterol content of fungi associated with *Dendroctonus ponderosae* and *Dendroctonus rufipennis* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99: 189-194.

- Bleiker KP & Six DL (2007) Dietary benefits of fungal associates to an eruptive herbivore: Potential implications of multiple associates on host population dynamics. *Environ. Entomol.* 36: 1384-1396.
- Bokulich NA, Hwang C-F, Liu A, Boundy-Mills KL & Mills DA (2012) Profiling the yeast communities of wine fermentation using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 63: 185-194.
- Boone CK, Keefover-Ring K, Mapes AC, Adams AS, Bohlmann J & Raffa KF (2013a) Bacteria associated with a tree-killing insect reduce concentrations of plant defense compounds. *J. Chem. Ecol.* 39: 1003-1006.
- Boone CK, Keefover-Ring K, Mapes AC, Adams AS, Bohlmann J & Raffa KF (2013b) R 838. *J. Chem. Ecol.* 39: 1003-1006.
- Bressan A, Arneodo J, Simonato M, Haines WP & Bourdon-Padieu E (2009) Characterization and evolution of two bacteriome-inhabiting symbionts in cixiid planthoppers (Hemiptera: Fulgoromorpha: Pentastirini). *Environ. Microbiol.* 11: 3265-3279.
- Bridges JR (1981) Nitrogen-fixing bacteria associated with bark beetles. *Microb. Ecol.* 7: 131-137.
- Briones-Roblero CI, Hernández-García JA, Gonzalez-Escobedo R, Soto-Robles LV, Rivera-Orduña FN & Zúñiga G (2017a) Structure and dynamics of the gut bacterial microbiota of the bark beetle, *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae) across their life stages. *PLoS ONE* 12: e0175470.
- Briones-Roblero CI, R. R-D, Santiago-Cruz JA, Zuniga G & Rivera-Orduna FN (2017b) Degradation capacities of bacteria and yeasts isolated from the gut of *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae). *Folia Microbiol. (Praha)* 62: 1-9.
- Brownlie JC & Johnson KN (2009) Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol.* 17: 348-354.
- Buée M, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson R, Uroz S & Martin F (2009) 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol.* 184: 449-456.
- Cale JA, M. CR, Klutsch JG, Kanekar SS, Hussain A & Erbilgin N (2016) Fungal Volatiles Can Act as Carbon Sources and Semiochemicals to Mediate Interspecific Interactions Among Bark Beetle-Associated Fungal Symbionts. *PLoS ONE* 11: e0162197.
- Canada Rn (2010) *Dendroctone du mélèze.* (Ressources Naturelles Canada), p 1.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Gonzalez Pena A, Goodrich J, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone C, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J & Knight R (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7: 335-336.
- Cardoza YJ, Klepzig KD & Raffa KF (2006) Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi. *Ecol. Entomol.* 31: 636-645.
- Cardoza YJ, Vasanthakumar A, Suazo A & Raffa KF (2009) Survey and phylogenetic analysis of culturable microbes in the oral secretions of three bark beetle species. *Entomol. Exp. Appl.* 131: 138-147.
- Chararas C, Pignal M-C, Vodjdani G & Bourgeay-Causse M (1983) Glycosidases and B group vitamins produced by six yeasts strains from digestive tract of *Phoracantha*

- semipunctata* larvae and their role in the insect development. *Mycopathologia* 83: 9-15.
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porrás-Alfaro A, Kuske CR & Tiedje JM (2013) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42: D633-D642.
- Comeau AM, Harding T, Galand PE, Vincent WF & Lovejoy C (2012) Vertical distribution of microbial communities in a perennially stratified Arctic lake with saline, anoxic bottom waters. *Sci. Rep.* 2: 1-10.
- Davis TS (2014) The Ecology of Yeasts in the Bark Beetle Holobiont: A Century of Research Revisited. *Microb. Ecol.* 69: 723-732.
- Davis TS & Hofstetter RW (2011) Reciprocal interactions between the bark beetle-associated yeast *Ogataea pini* and host plant phytochemistry. *Mycologia* 103: 1201-1207.
- Davis TS & Hofstetter RW (2012) Plant secondary chemistry mediates the performance of a nutritional symbiont associated with a tree-killing herbivore. *Ecology* 93: 421-429.
- Davis TS, Hofstetter RW, Foster JT, Foote NE & Keim P (2011) Interactions between the yeast *Ogataea pini* and filamentous fungi associated with the western pine beetle. *Microb. Ecol.* 61: 626-634.
- Dichosa AEK, Daughton AR, Reitenga KG, Fitzsimons MS & Han CS (2014) Capturing and cultivating single bacterial cells in gel microdroplets to obtain near-complete genomes. *Nat. Protoc.* 9: 608.
- Dillon RJ & Charnley AK (1988) Inhibition of *Metarhizium anisopliae* by the gut bacterial flora of the desert locust: Characterization of antifungal toxins. *Can. J. Microbiol.* 34: 1075-1082.
- Dillon RJ & Dillon VM (2004) The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.*:71-92.
- Dillon RJ, Vennard CT & Charnley AK (2002) A Note: Gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *J. Appl. Microbiol.* 92: 759-763.
- Dohet L, Gregoire J-C, Berasategui A, Kaltenpoth M & Biedermann PH (2016) Bacterial and fungal symbionts of parasitic *Dendroctonus* bark beetles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92: fiw129.
- Douglas AE (2009) The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Funct. Ecol.* 23: 38-47.
- Douglas AE (2011) Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host Microbe* 10: 359-367.
- Durand A-A, Bergeron A, Constant P, Buffet J-P, Déziel E & Guertin C (2015) Surveying the endomicrobiome and ectomicrobiome of bark beetles: The case of *Dendroctonus simplex*. *Sci. Rep.* 5: 17190.
- Durand A-A, Buffet J-P, Constant P, Déziel E & Guertin C (2017) Fungal communities associated with the eastern larch beetle: diversity and variation within developmental stages. *BioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/220780>.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C & Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194-2200.
- Engel P & Moran NA (2013) The gut microbiota of insect - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 37: 699-735.

- Fernandez A, Huang S, Seston S, Xing J, Hickey R, Criddle C & Tiedje J (1999) How stable is stable? Function versus community composition *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3697-3704.
- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA & Olsen GJ (2008) Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2461-2470.
- Gibson CM & Hunter MS (2010) Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecol. Lett.* 13: 223-234.
- Gupta A, Nayduch D, Verma P, Shah B, Ghate HV, Patole MS & Shouche YS (2012) Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 79: 581-593.
- Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA & F. MB (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 1-11.
- Hofstetter RW, Dinkins-Bookwalter J, Davis TS & Klepzig KD (2015) Symbiotic associations of bark beetles. *Bark Beetles*, Vega F E & Hofstetter R W (Édit.) Elsevier, USA.
- Hu X, Li M & Chen H (2015) Community structure of gut fungi during different developmental stages of the Chinese white pine beetle (*Dendroctonus armandi*). *Sci Rep* 5.
- Hu X, Yu J, Wang C & Chen H (2014) Cellulolytic Bacteria Associated with the Gut of *Dendroctonus armandi* Larvae (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Forests* 5: 455-465.
- Hulcr J, Adams AS, Raffa KF, Hofstetter RW, Klepzig KD & Currie CR (2011) Presence and diversity of *Streptomyces* in *Dendroctonus* and sympatric bark beetle galleries across North America. *Microb. Ecol.* 61: 759-768.
- Hulcr J & Dunn RR (2011) The sudden emergence of pathogenicity in insect-fungus symbioses threatens naive forest ecosystems. *Proc. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 278: 2866-2873.
- Hulcr J, Rountree NR, Diamond SE, Stelinski LL, Fierer N & Dunn RR (2012) Mycangia of ambrosia beetles host communities of bacteria. *Microb. Ecol.* 64: 784-793.
- Hunt DWA & Borden JH (1990) Conversion of verbenols to verbenone by yeast isolated from *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *J. Chem. Ecol.* 16: 1385-1397.
- Hurst GDD & Darby AC (2009) The inherited microbiota of arthropods, and their importance in understanding resistance and immunity. *Insect Infection and Immunity Evolution, Ecology and Mechanisms*, Rolff J & Reynolds S E (Édit.) Oxford University Press, Oxford, U.K. p 119-136.
- Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML & Welch DM (2007) Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol.* 8: R143.141-149.
- Janda JM & Abbott SL (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2761-2764.
- Jensen S, Bergh Ø, Enger Ø & Hjeltne B (2002) Use of PCR RFLP for genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry. *Can. J. Microbiol.* 48: 379-386.
- Kabir A & Giese RL (1966) The Columbian timber beetle, *Corthylus columbianus* (Coleoptera: Scolytidae). II. Fungi and staining associated with the beetle in soft maple. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 59: 894-902.

- Khadempour L, LeMay V, Jack D, Bohlmann J & Breuil C (2012) The relative abundance of mountain pine beetle fungal associates through the beetle life cycle in pine trees. *Microb. Ecol.* 64: 909-917.
- Kikuchi Y (2009) Endosymbiotic bacteria in insects: Their diversity and culturability. *Microbes and Environments* 24: 195-204.
- Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K & Fukatsu T (2012) Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 8618-8622.
- Kikuchi Y, Hosokawa T & Fukatsu T (2007) Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4308-4316.
- Klepzig KD, Adams AS, Handelsman J & Raffa KF (2009) Symbioses: A key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environ. Entomol.* 38: 67-77.
- Klepzig KD & Six DL (2004) Bark beetle-fungal symbiosis: Context dependency in complex associations. *Symbiosis* 37: 189-205.
- Korabecna M (2007) The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*: 783-787.
- Kwong WK & Moran NA (2013) Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Neisseriaceae* of the *Betaproteobacteria*, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of *Orbaceae* fam. nov., *Orbales* ord. nov., a sister taxon to the order 'Enterobacteriales' of the *Gammaproteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 2008-2018.
- Langor DW & Raske AG (1987a) Emergence, host attack, and overwintering behavior of the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* LeConte (Coleoptera: Scolytidae), in Newfoundland. *Can. Entomol.* 119: 975-983.
- Langor DW & Raske AG (1987b) Reproduction and development of the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* LeConte (Coleoptera: Scolytidae), in Newfoundland. *Can. Entomol.* 119: 985-992.
- Langor DW & Raske AG (1987a) Reproduction and development of the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* LeConte (Coleoptera: Scolytidae), in Newfoundland. *Can. Entomol.* 119: 985-992.
- Langor DW & Raske AG (1987b) Emergence, host attack, and overwintering behavior of the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* LeConte (Coleoptera: Scolytidae), in Newfoundland. *Can. Entomol.* 119: 975-983.
- Langor DW & Raske AG (1989a) The eastern larch beetle, another threat to our forests (Coleoptera: Scolytidae). *Forest. Chron.* 65: 276-279.
- Langor DW & Raske AG (1989b) A history of the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* (Coleoptera: Scolytidae), in North America. *The Great Lakes Entomologist* 22: 139-154.
- Langor DW & Raske AG (1989c) A history of the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* (Coleoptera: Scolytidae), in North America. *Great Lakes Entomol.* 22: 139-154.
- Lazarovits G, Goettel MS & Vincent C (2007) Adventures in Biocontrol. *Biological Control a global perspective*, Vincent C, Goettel M S & Lazarovits G (Édit.) CAB International, Wallingford, UK. p 1-7.

- Lederberg J & McCray AT (2001) Ome SweetOmics--A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist* 15: 8-8.
- Lieutier F, Yart A & Salle A (2009) Stimulation of tree defenses by *Ophiostomatoide* fungi can explain attack success of bark beetles on conifers. *Ann. For. Sci.* 66: 1-22.
- Lou Q-Z, Lu M & Sun J-H (2014) Yeast diversity associated with invasive *Dendroctonus valens* killing *Pinus tabulaeformis* in China using culturing and molecular methods. *Microb. Ecol.* 68(2), 397-415.
- Lozupone C, Hamady M & Knight R (2006) UniFrac - An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* 7: 371-385.
- Lozupone C & Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8228-8235.
- Margulis L & Fester R (1991) *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. Mit Press.
- Martin KJ & Rygielwicz PT (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol.* 5: 1-11.
- McKee FR & Aukema BH (2015) Influence of temperature on the reproductive success, brood development and brood fitness of the eastern larch beetle *Dendroctonus simplex* LeConte. *Agricultural and Forest Entomology* 17: 102-112.
- Miao X-X, Gan M & Ding C-D (2003) The role of bacterial symbionts in amino acid composition of black bean aphids. *Entomol Sinica* 10: 167-171.
- Moore ML & Six DL (2015) Effects of temperature on growth, sporulation, and competition of mountain pine beetle fungal symbionts. *Fungal Microbiology* 70: 336-347.
- Morales-Jimenez J, Vera-Ponce de León A, García-Domínguez A, Martínez-Romero E, Zuniga G & Hernandez-Rodriguez C (2013) Nitrogen-fixing and uricolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus rhizophagus* and *Dendroctonus valens* (Curculionidae: Scolytinae). *Microb. Ecol.* 66: 200-210.
- Morales-Jimenez J, Zuniga G, Ramirez-Saas HC & Heranadez-Rodriguez C (2012a) Gut-associated bacteria throughout the life cycle of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and their cellulolytic activities. *Microb. Ecol.* 64.
- Morales-Jimenez J, Zuniga G, Ramirez-Saas HC & Heranadez-Rodriguez C (2012b) Gut-associated bacteria throughout the life cycle of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and their cellulolytic activities. *Microb. Ecol.* 64: 268-278.
- Morales-Jimenez J, Zuniga G, Villa-Tanaca L & Hernandez-Rodriguez C (2009) Bacterial community and nitrogen fixation in the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Microb. Ecol.* 58: 879-891.
- Mueller UG & Gerardo NM (2002) Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 15247-15249.
- Mueller UG, Gerardo NM, Aanen DK, Six DL & Schultz TR (2005) The evolution of agriculture in insects. *Annu. Rev. Ecol. Evol. and Syst.* 36: 563-595.
- Naik PR & Sakthivel N (2006) Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res. Microbiol.* 157: 538-546.
- Nechitaylo TY, Westermann M & Kaltenpoth M (2014) Cultivation reveals physiological diversity among defensive '*Streptomyces philanthi*' symbionts of beewolf digger wasps (Hymenoptera, Crabronidae). *BMC Microbiol.* 14: 202.

- O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo J-M & Vilgalys R (2005) Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5544-5550.
- Paine TD, Raffa KF & Harrington TC (1997) Interactions among scolytid bark-beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annu. Rev. Entomol.*:179-206.
- Park GK, Lim JH, Kim SD & Shim SH (2012) Elucidation of antifungal metabolites produced by *Pseudomonas aurantiaca* IB5-10 with broad-spectrum antifungal activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 326-330.
- Persson Y, Ihrmark K & Stenlid J (2011) Do bark beetles facilitate the establishment of rot fungi in Norway spruce? *Fungal Ecology* 4.
- Phillips MA & Croteau RB (1999) Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci.* 4: 1360-1385.
- Pontes MH & Dale C (2006) Culture and manipulation of insect facultative symbionts. *Trends Microbiol.* 14: 406-412.
- Popa V, Déziel E, Lavallée R, Bauce E & Guertin C (2012) The complex symbiotic relationships of bark beetles with microorganisms: A potential practical approach for biological control in forestry. *Pest Manag. Sci.* 68: 963-975.
- Price MN, Dehal PS & Arkin AP (2010) FastTree 2 – Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* 5: e9490.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J & Glöckner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35: 7188-7196.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J & Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41: D590-D596.
- Rivera FN, Gonzalez E, Gomez Z, Lopez N, Hernandez-Rodriguez C, Berkov A & Zuniga G (2009) Gut-associated yeast in bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Biol. J. Linn. Soc.* 98: 325-342.
- Roets F, Crous PW, Wingfield MJ & Dreyer LL (2009) Mite-mediated hyperphoretic dispersal of *Ophiostoma* spp. from the infructescences of South African *Protea* spp. *Environ. Entomol.* 38: 143-152.
- Roets F, Wingfield MJ, Wingfield BD & Dreyer LL (2011) Mites are the most common vectors of the fungus *Gondwanamyces proteae* in *Protea* infructescences. *Fungal Biology* 115: 343-350.
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R & Fierer N (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME journal* 4: 1340.
- Saeed AI, Sharov V, White JR, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V & Quackenbush J (2003) TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34: 374-378.
- Safranyk L, Shore TL, Moeck HA & Whitney HS (2002) *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, Mountain Pine Beetle (Coleoptera: Scolytidae). *Biological Control Programmes in Canada, 1981-2000*, Mason P G & Huber J T (Édit.) CAB International, Wallingford, UK. p 104-110.

- Salyers AA & Whitt DD (2002) *Bacterial pathogenesis a molecular approach*. ASM PRESS, Washington, D.C. USA, deuxième édition. 539 p.
- Scarborough CL, Ferrari J & Godfray HCJ (2005) Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* 310: 1781.
- Schirmer M, Ijaz UZ, D'Amore R, Hall N, Sloan WT & Quince C (2015) Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Res.* 43: e37-e37.
- Schloss PD, Gevers D & Westcott SL (2011) Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS ONE* 6: e27310.
- Schloss PD & Handelsman J (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1501-1506.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ & Weber CF (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-7541.
- Schmitt S, Tsai P, Bell J, Fromont J, Ilan M, Lindquist N, Perez T, Rodrido A, Schupp PJ, Vacelet J, Webster NS, Hentschel U & Taylor MW (2012) Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *The ISME Journal* 6: 564-576.
- Scott JJ, Oh DC, Yuceer MC, Klepzig KD, Clardy J & Currie CR (2008) Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science* 322: 63.
- Seema D, Alam M, Kalani K, Khaliq A, Samad A, Srivastava SK & Patra DD (2012) Production, purification, and characterization of antifungal metabolite from *Pseudomonas aeruginosa* SD12, a new strain obtained from tannery waste polluted soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 674-683.
- Seipke FR, Kaltentpoth M & Hutchings MI (2012) *Streptomyces* as symbiont: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiol. Rev.* 36: 862-876.
- Seybold SJ, Albers MA & Katovich SA (2002) Eastern Larch Bettle. *Forest Insects & Disease Leaflet* 175: 1-10.
- Shi W, Guo Y, Xu C, Tan S, Miao J, Feng Y, Zhao H, St. Leger RJ & Fang W (2014) Unveiling the mechanism by which microsporidian parasites prevent locust swarm behavior. *PNAS* 111: 1343-1348.
- Siqueira JFJ, Fouad AF & Rôças IN (2012) Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of Oral Microbiology* 4: 1-18.
- Six DL (2003a) Bark Beetle Fungus Symbioses. *Insect Symbiosis*, Bourtzis K & Miller T A (Édit.) CRC Press LLC, Vol 1. p 97-114.
- Six DL (2003b) A comparison of mycangial and foretic fungi of individual mountain pine beetles. *Can. J. For. Res.* 33: 1331-1334.
- Six DL (2012) Ecological and evolutionary determinants of bark beetle — fungus symbioses. *Insects* 3: 339-366.
- Six DL (2013) The bark beetle holobiont: Why microbes matter. *J. Chem. Ecol.* 39: 989-1002.
- Six DL & Bracewell R (2015) *Dendroctonus. Bark Beetles*, Elsevier, USA. p 305-350.

- Six DL, De Beer ZW, Duong TA, Carroll AL & Wingfield MJ (2011) Fungal associates of the lodgepole pine beetle, *Dendroctonus murrayanae*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 100: 231-244.
- Six DL & Klepzig KD (2004) *Dendroctonus* Bark Beetles as Model Systems for Studies on Symbiosis. *Symbiosis* 37: 207-232.
- Six DL & Paine TD (1998) Effects of mycangial fungi and host tree species on progeny survival and emergence of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *Environ. Entomol.* 27: 1393-1401.
- Six DL & Wingfield MJ (2011) The role of phytopathogenicity in bark beetle–fungus symbioses: a challenge to the Classic Paradigm. *Annu. Rev. Entomol.*:255-272.
- Srei N (2017) *Impact de la transmission horizontale d'un champignon entomopathogène chez le dendroctone du mélèze, Dendroctonus simplex LeConte (Coleoptera: Scolytinae)*. Philosophie doctor (INRS-Institut Armand-Frappier). 130 p.
- Srei N, Lavallée R & Guertin C (2016) Susceptibility of *Dendroctonus simplex* to Hypocreales fungi: towards the development of a biological control strategy. *J. Appl. Entomol.* 141: 487-495.
- Steinhaus EA (1946) *Insect microbiology. An account of the microbes associated with insects and ticks with special reference to the biologic relationships involved*. Comstock Publishing Company Inc., Ithaca, New York.
- Stewart EJ (2012) Growing unculturable Bacteria. *J. Bacteriol.* 194: 4151-4160.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Vasanthakumar A, Delalibera Jr I, Handelsman J, Klepzig KD, Schloss PD & Raffa KF (2006) Characterization of gut-associated bacteria in larvae and adults of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann. *Environ. Entomol.* 35: 1710-1717.
- Villari C, Battisti A, Chakraborty S, Michelozzi M, Bonello P & Faccoli M (2012) Nutritional and pathogenic fungi associated with the pine engraver beetle trigger comparable defenses in Scots pine. *Tree Physiol.* 32: 867-879.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje J & Cole JR (2007a) Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5261-5267.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM & Cole JR (2007b) Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5261-5267.
- White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor J (1990) *Amplification of direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. Academic Press, New York.
- Willey JM, Sherwood LM & Woolverton CJ (2008) *Prescott's microbiology*. McGraw-Hill, New York, NY USA. 1070 p.
- Winder RS, Macey DE & Cortese J (2010) Dominant bacteria associated with broods of mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *J. Entomol. Soc. B. C.* 107: 43-56.
- Woese CR & Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5088-5090.
- Wood S (2007a) *Bark and ambrosia beetles of South America*. Brigham Young University, Provo, Utah, USA. 900 p.

- Wood SL (1982) *The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae) a taxonomic monograph*. Brigham Young University, Provo (Utah). 1327 p.
- Wood SL (2007b) *Bark and ambrosia beetles of South America (Coleoptera: Scolytidae)*. Brigham Young University, Provo, Utah USA. 900 p.
- Woodruff DR (2014) The impacts of water stress on phloem transport in Douglas-fir trees. *Tree Physiol.* 34: 5-14.
- Wu D, Daugherty SC, Van Aken SE, Pai GH, Watkins KL, Khouri H, Tallon LJ, Zaborsky JM, Dunbar HE & Tran PL (2006) Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biol.* 4: e188.
- Xu L, Lou Q, Cheng C, Lu M & Sun J (2015) Gut-associated bacteria of *Dendroctonus valens* and their involvement in verbenone production. *Microb. Ecol.* 70: 1012-1023.
- Yuceer C, Hsu CY, Erbilgin N & Klepzig KD (2011) Ultrastructure of the mycangium of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae): complex morphology for complex interactions. *Acta Zoologica* 92: 216-224.

11 ANNEXE 1 : INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES SUR LES DONNEES BRUTES ET ANALYSES DE SEQUENÇAGE A HAUT DEBIT

11.1 Identification des bactéries associées aux adultes de *D. simplex* ainsi qu'aux galeries (section 5)

Tableau 11.1. Nombre de séquences obtenues et répartition des OTU générées suite aux analyses de bioinformatiques portant sur les bactéries associées aux adultes de *D. simplex* ainsi qu'à leurs galeries.

Nombre de séquences brutes obtenues : 108 447 séquences		
Nombre de séquences de qualité obtenues : 48 380 séquences		
Nombre de séquences de qualité par échantillon : 537 séquences		
Nombre total d'OTU pour l'analyse : 278 OTU		
Répartition des OTU selon les échantillons :		Moyenne
Ecto_1	12 OTU	12 OTU
Ecto_2	11 OTU	
Endo_1	132 OTU	111 OTU
Endo_2	97 OTU	
Endo_3	103 OTU	
Gal_1	43 OTU	36 OTU
Gal_2	20 OTU	
Gal_3	46 OTU	

11.2 Identification des champignons associés aux stades de développement de *D. simplex* (section 6)

Tableau 11.2. Nombre de séquences obtenues et répartition des OTU générées suite aux analyses de bioinformatiques portant sur les champignons associés aux stades de développement de *D. simplex*.

Nombre de séquences brutes obtenues : 117 949 séquences		
Nombre de séquences de qualité obtenues : 85 216 séquences		
Nombre de séquences de qualité par échantillon : 2 641 séquences		
Nombre total d'OTU pour l'analyse : 1623 OTU		
Répartition des OTU selon les échantillons :		Moyenne
Ecto_Adu_1	332 OTU	329 OTU
Ecto_Adu_2	317 OTU	
Ecto_Adu_3	337 OTU	
Ecto_Lar_1	310 OTU	304 OTU
Ecto_Lar_2	306 OTU	
Ecto_Lar_3	297 OTU	
Ecto_Pup_1	225 OTU	279 OTU
Ecto_Pup_2	322 OTU	
Ecto_Pup_3	291 OTU	
Endo_Adu_1	126 OTU	225 OTU
Endo_Adu_2	271 OTU	
Endo_Adu_3	277 OTU	
Endo_Lar_1	166 OTU	262 OTU
Endo_Lar_2	368 OTU	
Endo_Lar_3	251 OTU	
Endo_Pup_1	258 OTU	261 OTU
Endo_Pup_2	285 OTU	
Endo_Pup_3	239 OTU	

11.3 Identification des bactéries associées aux stades de développement de *D. simplex* (section 7)

Tableau 11.3. Nombre de séquences obtenues et répartition des OTU générées suite aux analyses de bioinformatiques portant sur les bactéries associées aux stades de développement de *D. simplex*.

Nombre de séquences brutes obtenues : 339 881 séquences		
Nombre de séquences de qualité obtenues : 159 052 séquences		
Nombre de séquences de qualité par échantillon : 1 744 séquences		
Nombre total d'OTU pour l'analyse : 4009 OTU		
Répartition des OTU selon les échantillons :		Moyenne
Ecto_Adu_1	274 OTU	334 OTU
Ecto_Adu_2	303 OTU	
Ecto_Adu_3	426 OTU	
Ecto_Lar_1	210 OTU	232 OTU
Ecto_Lar_2	287 OTU	
Ecto_Lar_3	198 OTU	
Ecto_Pup_1	217 OTU	333 OTU
Ecto_Pup_2	458 OTU	
Ecto_Pup_3	325 OTU	
Endo_Adu_1	682 OTU	717 OTU
Endo_Adu_2	689 OTU	
Endo_Adu_3	779 OTU	
Endo_Lar_1	150 OTU	312 OTU
Endo_Lar_2	259 OTU	
Endo_Lar_3	528 OTU	
Endo_Pup_1	1058 OTU	965 OTU
Endo_Pup_2	822 OTU	
Endo_Pup_3	1016 OTU	

11.4 Comparaison mélèzes hybrides et laricins (section 9)

Tableau 11.4. Comparaison entre le nombre d'OTU bactériennes obtenues chez les adultes provenant de mélèzes hybrides et laricins.

Nombre de séquences de qualité par échantillon : 1287 séquences					
Répartition des OTU selon les échantillons :					
Hybrides					
Ecto_Adu1	Ecto_Adu2			Endo_Adu1	Endo_Adu2
111 OTU	166 OTU			452 OTU	733 OTU
Laricins					
Ecto_Adu1	Ecto_Adu2	Ecto_Adu3	Endo_Adu1	Endo_Adu2	Endo_Adu3
236 OTU	234 OTU	398 OTU	520 OTU	521 OTU	595 OTU

12 ANNEXE 2 : DOCUMENT DE PASSAGE DIRECT AU DOCTORAT

1. PROBLÉMATIQUE

Au Canada et dans le nord des États-Unis, le dendroctone du mélèze, *Dendroctonus simplex* LeConte, est un insecte ravageur causant d'importants dommages aux forêts. Depuis les dernières années, un accroissement des attaques de ces insectes est remarqué dans les peuplements de mélèzes. Le dendroctone s'alimente du phloème des arbres en formant des galeries qui entraînent une réduction de l'apport d'éléments nutritifs essentiels à la survie de l'hôte. Cette espèce subcorticale est caractérisée par quatre stades larvaires avant sa transformation en adulte. À la fin de leur développement, les adultes entreprennent un comportement de vol afin d'aller attaquer d'autres arbres, et de reprendre leur cycle de vie.

Chez plusieurs espèces de dendroctones, la présence d'un complexe symbiotique composé de champignons et de bactéries a été déterminée. Ces microorganismes facilitent l'établissement de l'insecte sur l'arbre-hôte, notamment par la dégradation de la lignine. Plus encore, certaines bactéries jouent un rôle, en protégeant l'insecte contre certains agents antagonistes, particulièrement en produisant des substances antifongiques.

Afin de vérifier si les populations du dendroctone du mélèze possèdent un complexe symbiotique et, éventuellement, de déterminer son rôle dans le succès de leur établissement sur l'essence-hôte, une caractérisation des bactéries et champignons associés aux insectes est une prémisses essentielle. Cette caractérisation est d'autant plus importante dans le contexte de l'augmentation des attaques par le dendroctone, puisqu'elle pourrait aussi permettre l'élaboration de stratégies de lutte contre ce ravageur.

En regard des objectifs de la recherche, des travaux préliminaires ont été réalisés afin de mettre au point les approches expérimentales et d'établir les protocoles qui permettront de caractériser la biodiversité bactérienne associée aux populations de *D. simplex*. Jusqu'à présent, ces travaux ont permis de déterminer la marche à suivre pour extraire les bactéries, que ce soit celles retrouvées à l'extérieur (ectobactéries) ou à l'intérieur (endobactéries) des insectes. À ce stade du projet, les premiers résultats explorant la diversité microbienne associée aux adultes de *D. simplex* devraient être connus prochainement. Ces données proviennent du séquençage à haut débit d'échantillons d'endobactéries et d'ectobactéries prélevés sur une population pionnière.

Dans le cadre d'études doctorales, une comparaison de la diversité microbienne spécifique à chaque stade de développement de l'insecte est envisagée. Ainsi, l'étude de la diversité bactérienne et fongique sera considérée.

2. MISE EN CONTEXTE

2.1. Dendroctonus simplex LeConte

2.1.1. Biologie de l'insecte

Le dendroctone du mélèze, *Dendroctonus simplex* LeConte, est un insecte ravageur de la famille des Curculionidae et de la sous-famille des Scolytinae. Comme son nom l'indique, cet insecte semble être monophage puisqu'il se nourrit principalement du mélèze larcin, *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch. Le dendroctone du mélèze possède la même aire de distribution que son hôte principale, soit de Terre-Neuve jusqu'en Colombie-Britannique et de l'Alaska jusqu'au nord des états américains (Langor & Raske, 1987a).

Le dendroctone du mélèze est un insecte subcortical. Il creuse des galeries sous l'écorce de l'arbre afin d'accomplir son cycle de développement. Suivant son parcours, il se nourrit du phloème, ce qui engendre une grande détérioration de l'arbre, ainsi que sa mort au bout de deux ans. Selon Langor et Raske (1987a), lorsqu'une femelle pénètre le tronc d'un arbre, elle creuse une galerie de ponte verticalement et ce n'est que lorsque la galerie sera prête que le mâle arrivera pour féconder la femelle. Selon ces auteurs, une fois la fécondation terminée, la femelle déposera les œufs à intervalle irrégulier le long de cette galerie, par groupe d'un à quatre œufs. De plus, la femelle entourerait les œufs d'un mélange de sciures et d'excréments. Plusieurs couples de dendroctones peuvent utiliser les mêmes trous d'entrée, mais chacun d'entre eux construira sa propre galerie de ponte.

Au rythme de leur développement, les larves de *D. simplex* creusent des galeries perpendiculaires à la galerie de ponte (Langor & Raske, 1987b). Quatre stades larvaires sont observés chez cet insecte. Durant leur développement, les larves se nourrissent du phloème et des champignons qui poussent dans leur galerie (Langor et Raske, 1987b). Le dernier stade larvaire se transforme en puppe, puis cette dernière deviendra un individu ténéral (adulte au corps mou) puis un adulte au corps dur découlant de la scarification de la chitine formant l'exosquelette des insectes (Langor & Raske, 1987b).

La période d'attaque massive des arbres par le dendroctone du mélèze se produit lors de l'accumulation de degrés-jours (différence entre la température moyenne d'un jour

donné et une température de référence) supérieurs à 10°C. Normalement, elle se produit vers la fin du mois de mai, début de juin (S.L. Wood, 1982; Langor & Raske, 1987b). Selon Langor et Raske (1987b), le développement de *D. simplex* s'effectue de façon asynchrone, puisque les attaques ne se déroulent pas toutes au même moment. De façon générale, la nouvelle génération d'insecte passe l'hiver sous forme d'adulte, la maturation finale ne s'effectuant qu'au printemps de l'année suivante (Canada, 2010).



Figure 1. Schéma représentant la durée des stades de développement chez *D. simplex* (Canada, 2010)

2.1.2. Stratégie d'attaque du dendroctone du mélèze

En condition endémique, le dendroctone du mélèze possède une stratégie d'attaque dite secondaire, puisqu'il ne s'attaque qu'aux arbres affaiblis ou encore récemment morts (S.L. Wood, 1982; Langor & Raske, 1987b). Les premiers individus à attaquer un arbre sont désignés par le terme « pionniers ». Lors de la période de vol, ces individus sont attirés par des substances volatiles libérées par les tissus de l'arbre, les dirigeant ainsi vers celui-ci et permettant l'attaque d'un hôte approprié. Le rôle principal de ces pionniers est de permettre l'établissement de leurs champignons symbiotiques, afin que ceux-ci colonisent les canaux résinifères de l'arbre (Six et Wingfield, 2011). De cette façon, le système de défense de l'hôte sera affaibli, réduisant sa capacité à se défendre contre les nouveaux insectes. Les pionniers libèrent par la suite des phéromones d'agrégations, servant à attirer d'autres membres de l'espèce, et ainsi pouvoir attaquer l'arbre massivement. Grâce à ce grand nombre d'attaques, la colonisation de l'arbre pourra avoir lieu avec succès (S. Wood, 2007a). Cependant, il est important de noter que lorsque les niveaux de populations atteignent des seuils épidémiques, les adultes peuvent également s'attaquer aux arbres sains, causant ainsi d'importants dommages aux peuplements de mélèzes (S. Wood, 2007a).

Des attaques massives du dendroctone du mélèze sont signalées depuis maintenant plus de 100 ans. Récemment, en observant les taux d'attaques dans les peuplements de

mélèzes, on constate un changement de stratégie d'attaque chez l'insecte. En effet, le dendroctone du mélèze exhiberait davantage une stratégie primaire d'attaque (attaque d'arbres sains) (Langor & Raske, 1989a). Avec les changements climatiques et la période de températures chaudes qui se prolonge, il est à prévoir que celui-ci deviendra encore plus agressif au fil du temps, causant d'autant plus de dommages aux populations et plantations de mélèzes.

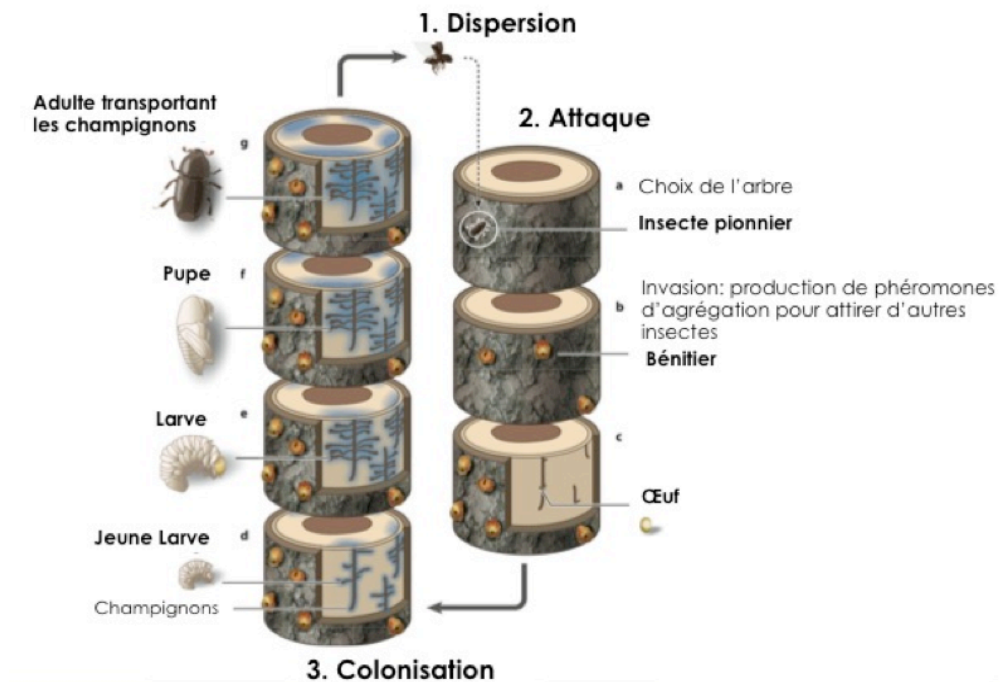


Figure 2. Attaque et développement des dendroctones (Six & Wingfield, 2011)

2.1.3. Dommages causés par l'insecte

Les signes d'attaque par le dendroctone sont visibles en observant l'écorce de l'arbre. L'observation de résine et de sciures de bois sur le tronc est une indication de la présence d'insectes sous l'écorce. Lorsque le nombre de galeries dans le phloème est abondant, la sève ne peut plus circuler correctement, ce qui entraîne un dessèchement de l'arbre (Canada, 2010). De plus, le réseau formé par les galeries de ponte et les galeries larvaires facilite le décollement de l'écorce. Le jaunissement prématuré des aiguilles survient rapidement à la suite d'une attaque par une population de dendroctone, et la mort complète de l'arbre est normalement observée dans les deux années suivant l'attaque initiale.

Les insectes du genre *Dendroctonus* sont parmi les ravageurs les plus importants en Amérique du Nord (S. Wood, 2007a). L'augmentation du stress causé par plusieurs facteurs environnementaux, tels que le feu, les inondations et les changements climatiques, joue un

rôle majeur dans l'établissement de populations de dendroctones, puisqu'il prédispose les peuplements d'arbres aux attaques par les dendroctones. Dans plusieurs provinces du Canada et certains états du nord des États-Unis, une augmentation des peuplements de mélèzes attaqués par le dendroctone du mélèze est observée (Langor & Raske, 1989a). La situation globale pour le Québec n'est pas encore bien établie. Cependant, dans le sud du Québec, on estimait que plus de 50% des peuplements de mélèzes montraient des signes d'attaques par *D. simplex* (Benoît & Blais, 1984).

2.1.4. Stratégies de lutte déjà existante

La lutte contre les dendroctones est complexifiée du fait que ces insectes se retrouvent sous l'écorce de l'arbre pour la majeure partie de leur cycle biologique. Différentes stratégies de lutte existent déjà pour contrer les insectes appartenant au genre *Dendroctonus*. Pour être efficaces, ces approches doivent être en mesure d'atteindre l'insecte qui se retrouve à sous l'écorce. Parmi les moyens de lutte directe connus, des méthodes de lutte physique sont employées, comme la destruction de l'insecte par coupe de l'arbre ou encore par brûlis. La lutte chimique est également employée par l'utilisation de différents pesticides (Safranyk *et al.*, 2002). Bien que cette dernière approche puisse être efficace pour de petites populations, ce moyen de lutte ne peut être envisagé sur de grandes étendues en considérant les coûts prohibitifs et les effets néfastes pour l'environnement.

La lutte biologique se définit comme l'utilisation d'organismes vivants pour contrôler les populations d'espèces ravageuses (Lazarovits *et al.*, 2007). Cette approche peut représenter une solution intéressante pour contrôler les populations de dendroctones, tout en ayant des risques réduits pour l'environnement. L'utilisation d'insectes prédateurs ou de compétiteurs a déjà été envisagée comme moyen de contrôle des populations chez certaines espèces de dendroctones avec des succès mitigés (Safranyk *et al.*, 2002).

Dans la littérature, il est mentionné que les microorganismes associés au complexe symbiotique des dendroctones jouent un rôle de premier plan dans l'immunité de l'insecte (Hurst & Darby, 2009). En effet, plusieurs articles font l'état de la présence de bactéries symbiotiques protégeant l'insecte contre les agents entomopathogènes utilisés en lutte biologique (Dillon & Charnley, 1988; Scarborough *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2008). Récemment, il a été observé que des bactéries symbiotiques conféraient une résistance à certains pesticides organophosphorés (Kikuchi *et al.*, 2012). Ces résultats laissent entendre que les microorganismes compris dans le complexe symbiotique des insectes joueraient un rôle essentiel dans les mécanismes de défense. Dans le cas du dendroctone du mélèze,

ceci pourrait être un facteur expliquant qu'aucun moyen de lutte efficace n'ait pu être mis au point pour contrer les dommages causés par cet insecte.

2.2. Complexe symbiotique

2.2.1. Définitions

Le terme symbiose définit une association étroite entre deux organismes différents, sur une portion significative de leur vie (Seipke *et al.*, 2012). En appliquant cette définition aux insectes, la symbiose peut se définir comme une relation intime et durable entre un insecte et un microorganisme, entraînant un bénéfice mutuel. Deux types de symbiose sont retrouvés, soit l'ectosymbiose lorsque le microorganisme vit à la surface de l'hôte, et l'endosymbiose lorsque le microorganisme vit à l'intérieur de l'hôte. Dans le cas où plusieurs microorganismes vivent en symbiose avec un même hôte, on parle alors d'un complexe symbiotique.

2.2.2. Description du complexe symbiotique

La présence d'un complexe symbiotique est observée chez plusieurs espèces d'insectes xylophages (Klepzig *et al.*, 2009). Comme ceux-ci se nourrissent et se développent sous l'écorce, la présence de microorganismes facilite ce mode de vie, ces derniers agissant au niveau de la protection et de l'alimentation. Les champignons symbiotiques amenés par les pionniers jouent un rôle essentiel de première ligne, puisqu'ils perturbent les mécanismes de défense de l'arbre, favorisant les attaques massives par les congénères (Six & Wingfield, 2011). Plusieurs symbiotes peuvent être retrouvés dans ce type de complexe, apportant chacun un bénéfice à l'insecte le transportant, mais fournissant également un soutien aux autres microorganismes du complexe (Six, 2003a). D'autres organismes n'étant pas associés aux dendroctones (arthropodes, nématodes, etc.) sont également retrouvés dans les galeries afin d'accomplir une fonction de vecteur de dispersion (Roets *et al.*, 2009; Roets *et al.*, 2011). Finalement, des facteurs environnementaux, tels que la température, influencent aussi le complexe symbiotique et ses membres (Popa *et al.*, 2012).

Plusieurs relations sont donc présentes au sein d'un complexe symbiotique chez les insectes xylophages, permettant ainsi à ceux-ci de s'adapter à leur environnement, en dépit de la réaction de l'hôte.

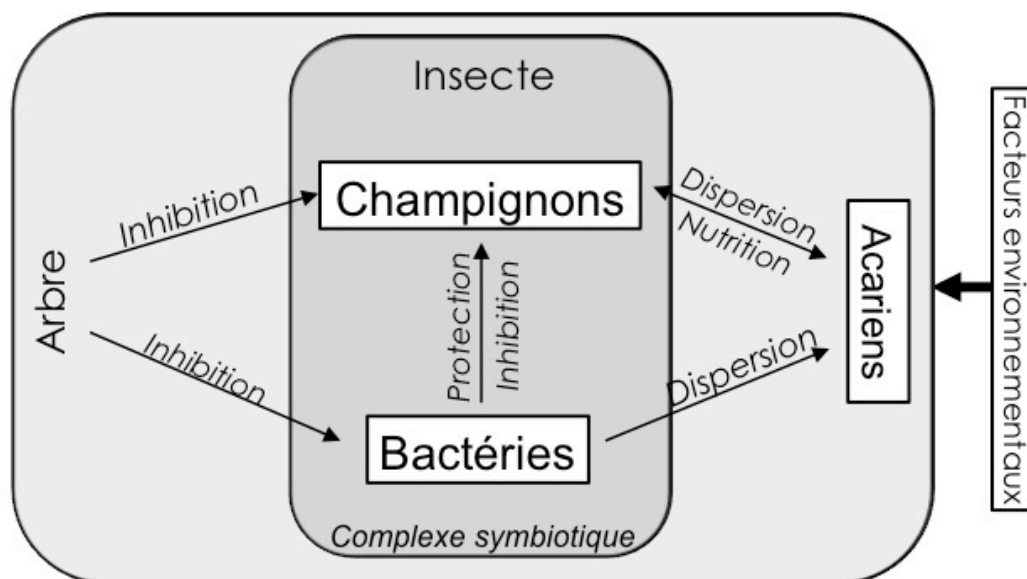


Figure 3. Schéma représentant un complexe symbiotique typique chez les insectes xylophages (adapté de Popa *et al.*, 2012)

2.2.3. Fonction des différents symbiotes au sein du complexe symbiotique

Chez les insectes ravageurs du genre *Dendroctonus*, de nombreux exemples de complexe symbiotique sont retrouvés au niveau de la littérature. La présence de ces complexes semble faciliter l'établissement sur leur essence-hôte. Comme mentionnés précédemment, plusieurs symbiotes prennent part aux complexes de certaines espèces de dendroctones, exécutant chacun une fonction spécifique au sein de l'organisation.

Les champignons du genre *Ophiostoma* semblent jouer un rôle dans la nutrition, autant au niveau larvaire qu'au niveau adulte, chez certaines espèces de dendroctones, comme *Dendroctonus ponderosae* Hopkins (Bleiker & Six, 2007). Ces symbiotes apportent des éléments nutritifs essentiels et supplémentent les pauvres valeurs nutritives du phloème dans la diète des insectes. Ces mêmes champignons possèderaient également un rôle d'inhibiteur du système de défense de l'hôte en colonisant les canaux résinifères de l'arbre, ce qui empêche la résine de couler. Ainsi, l'insecte peut pénétrer l'écorce plus facilement (Paine *et al.*, 1997).

Certaines bactéries pourraient également jouer un rôle important au sein du complexe. Plusieurs espèces appartenant au genre *Streptomyces* produisent des substances antifongiques, comme la mycangimicine, qui aideraient à protéger le complexe symbiotique de l'insecte contre les champignons antagonistes présents dans le milieu (Aanen *et al.*, 2009). D'autre part, comme les champignons, certaines bactéries

occuperaient aussi une place importante au niveau de la nutrition des insectes. Un exemple connu est présent chez le dendroctone méridional du pin, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann, où la bactérie *Enterobacter agglomerans* fournit des acides aminés essentiels à l'insecte (Bridges, 1981). Les bactéries procurent également d'autres éléments nutritifs entrant dans la diète du dendroctone, tels que des vitamines et de l'azote (Popa *et al.*, 2012). Plus encore, ces mêmes bactéries symbiotiques métabolisent également les composés chimiques produits par l'arbre dans le but de se défendre. Ainsi, le dendroctone pourra coloniser son hôte avec succès (Douglas, 2009).

La présence de complexe symbiotique chez le genre *Dendroctonus* semble donc répandue et semble conférer une protection à l'insecte contre les agents antagonistes du milieu. Malgré toute l'information touchant ce sujet, peu de renseignements sont disponibles sur la présence d'un tel complexe chez *D. simplex*. Dans ce contexte, une étude portant sur la présence d'un complexe symbiotique chez cette espèce est essentielle à une meilleure compréhension des interactions pouvant exister entre ce dernier et sa plante-hôte. Elle est aussi la prémisse à l'élaboration de stratégie de lutte efficace contre le dendroctone du mélèze. Ces outils seront certainement mis à contribution dans le contexte des changements climatiques et des perturbations qu'ils peuvent engendrer, notamment dans le cas de peuplements forestiers sensibles à ces changements.

3. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

3.1. Hypothèse de travail

La présence d'un complexe symbiotique joue un rôle facilitateur pour l'établissement des insectes du genre *Dendroctonus* sur leur essence-hôte à travers différents mécanismes. De plus, les microorganismes présents représentent une source alimentaire essentielle au développement de l'insecte. Ce complexe procure également une protection à l'insecte contre les agents pathogènes présents dans le milieu environnant, réduisant ainsi les mécanismes de lutte disponibles pour conter ces insectes. En observant les niveaux d'attaques enregistrés ces dernières années, l'hypothèse suivante est émise :

Il y a présence de bactéries associées à Dendroctonus simplex, dont certaines font partie d'un complexe symbiotique permettant l'établissement et le développement des insectes dans l'environnement subcortical du mélèze.

3.2. Objectifs

Le projet de recherche s'inscrit dans une démarche globale devant conduire à la caractérisation du complexe symbiotique chez *D. simplex*. Cette caractérisation passe par une étude de la diversité microbienne associée aux populations de l'insecte. Ainsi, des travaux exploratoires ont été entrepris afin d'identifier les bactéries et champignons associés à *D. simplex*. En regard de l'hypothèse de travail, seul le volet bactérien sera présenté.

L'acquisition des bactéries peut se faire de différentes façons, soit par la transmission verticale de la mère vers sa progéniture, ou par voie horizontale lors de la circulation des individus dans l'environnement. Ainsi, la composition microbienne présente au niveau de l'environnement où évolue *D. simplex* et chez les différents stades de développement sera observée. Aux fins du projet, des objectifs spécifiques ont été élaborés :

- Identification de sites attaqués par *D. simplex* et récolte des insectes ;
- Extraction des bactéries associées à *D. simplex* ;
- Quantification des ecto- et endobactéries associées aux adultes de *D. simplex* ;
- Caractérisation de la microflore bactérienne associée à *D. simplex*.

4. MÉTHODOLOGIE

Il existe peu d'information liée à l'identification des bactéries associées aux insectes. Dans la majorité des cas, l'identification touche uniquement les bactéries cultivables, ce qui entraîne un biais, puisque seulement une faible proportion de la diversité bactérienne peut ainsi être obtenue. L'approche envisagée pour surmonter cette difficulté dans l'identification des bactéries associées à *D. simplex* passe par des techniques d'extraction d'ADN total couplées au séquençage à haut débit d'une portion du gène codant de l'ARN ribosomal 16S.

Avant de pouvoir entreprendre ces travaux, la mise au point de certaines techniques d'extraction des bactéries à la surface de l'insecte devait être réalisée. Afin de faciliter l'acquisition des données, seul les bactéries cultivables ont été considérées lors de ces expériences, puisqu'il n'y a aucune raison de croire que les bactéries dites non-cultivables ne seraient extraites. Les données obtenues sont essentielles, puisqu'elles seront considérées dans l'élaboration des expériences subséquentes.

4.1. Identification de sites attaqués par *D. simplex* et récolte des insectes

La localisation de deux sites d'infestation de peuplements de mélèzes par *D. simplex* a été réalisée. Un premier site est situé à Stoneham, dans la région de Québec, et le second à St-Claude, près de Sherbrooke. Le site de Stoneham présente une forte densité d'insectes. Au cours de l'hiver 2012, des récoltes d'écorces supportant une population de dendroctones ont ainsi été réalisées. Les insectes ont été récupérés en laboratoire et ont été utilisés pour le développement et la mise au point des approches expérimentales. Pour sa part, certains arbres du peuplement de mélèze du site de St-Claude présentent des signes d'attaques récentes par le dendroctone. La caractérisation de la biodiversité bactérienne associée au dendroctone a été réalisée à partir de cette population. Ce choix a été fait afin de réduire les interférences pouvant être liées à un site infesté depuis plusieurs années, où des signes d'attaques d'années antérieures étaient fort probable.

Un arbre infesté par l'insecte a été sélectionné sur la base du nombre de signes d'attaque présents sur le tronc et a été coupé en tronçons afin de faciliter son transport vers le laboratoire. Afin d'obtenir des individus fraîchement établis, la coupe de l'arbre a été réalisée quelques jours suivant la période de vol, soit au début du mois de juin. Les bûches ont été conservées à 4°C jusqu'à la récolte des insectes, afin de réduire leur activité de nutrition et leur développement, et de ralentir la multiplication des bactéries associées aux dendroctones. Au moment venu, les bûches ont été délicatement décortiquées et les adultes ont été récoltés et placés individuellement dans des tubes Eppendorfs. L'ensemble des opérations de récolte s'est déroulé en condition aseptique. La présence d'œufs dans les galeries a été notée, et ces derniers ont été récupérés dans les mêmes conditions.

4.2. Extraction des bactéries associées à *D. simplex*

4.2.1. Extraction et localisation des bactéries présentes à la surface des adultes de *D. simplex*

Afin de déterminer la charge bactérienne associée à *D. simplex*, plusieurs expériences ont été réalisées pour définir la meilleure approche permettant d'extraire les bactéries. Une de ces expériences avait pour visée de déterminer si les élytres des insectes représentaient le réservoir des ectobactéries.

Les insectes utilisés dans cette expérience ont été sélectionnés aléatoirement et placés dans deux cohortes distinctes. Pour chaque insecte de la première cohorte, les élytres ont été soigneusement coupés à leur base et placés dans 1 ml de tampon phosphate (PBS) et 1 μ l de Triton X-100 (surfactant) afin de permettre le détachement des bactéries. Les insectes de la deuxième cohorte ont été placés individuellement dans 1 ml de la même solution. Les expériences ont été effectuées en triplicata. Après avoir agité les échantillons durant une minute au vortex pour libérer les bactéries, une série de dilutions (100%, 10% et 1%) a été préparée. Pour chacune des dilutions, 100 μ l ont été prélevés et ont été ensemencés sur un milieu gélosé R2A contenant 100 μ g/ml de cycloheximide, un antifongique qui empêche la synthèse protéique chez les cellules eucaryotes. Les géloses ont ensuite été incubées à 25°C durant 14 jours. La moyenne du nombre d'unité formatrice de colonies (UFC) a été calculée pour les deux cohortes de trois individus.

4.2.2. Extraction de l'ensemble des bactéries associées à la surface de *D. simplex*

Pour obtenir une caractérisation précise de la diversité des bactéries associées à *D. simplex*, le développement d'une approche d'extraction assurant une récolte de la totalité des microorganismes est primordial. Une série d'expériences a donc été réalisée afin de définir les paramètres expérimentaux permettant le détachement du maximum de bactéries.

Dans un premier temps, une comparaison de deux méthodes physique pour extraire les bactéries, soit l'agitation et la sonication, a été réalisée afin d'établir laquelle offrait la meilleure efficacité. Pour ce faire, des insectes ont été divisés en deux cohortes et soumis à une série de lavages. Ainsi, chaque cohorte a été astreinte à huit lavages. Les individus de chaque cohorte ont été placés dans un tube de 1,5 ml dans lequel 200 μ l d'une solution d'un tampon phosphate contenant 0,2 μ l de Triton X-100 avaient été ajoutés. Les insectes de la première cohorte ont été soumis à une agitation à l'aide d'un vortex pendant une minute, tandis que ceux de la deuxième ont été astreints à une sonication pour une même durée. Pour chaque cohorte, la totalité du tampon contenant les bactéries extraites a été récupérée

à l'aide d'une micropipette et ensemencée sur un milieu gélosé R2A contenant 100µg/ml de cycloheximide, avant d'être incubée à 25°C durant 14 jours. Pour les lavages subséquents, les insectes ont de nouveau été immergés dans un volume identique de la solution tampon, soumis à l'agitation ou à la sonication, et les suspensions de chaque lavage ont été ensemencées sur un milieu de culture. Ces expériences ont été réalisées en triplicata (deux cohortes de trois individus), et la moyenne du nombre d'unité formatrice de colonie (UFC) a été estimée

Lors d'une deuxième expérience, une comparaison entre l'efficacité de deux solutions de tampon a été effectuée, afin de déterminer celle permettant de récupérer toutes les bactéries présentes à la surface des insectes. Comme précédemment, des insectes ont été assignés aléatoirement à deux cohortes. Les insectes de la première cohorte ont été placés dans 200 µl de tampon phosphate contenant 0,2 µl de Triton X-100, alors que ceux de la deuxième cohorte ont été déposés dans 200 µl de tampon phosphate contenant 0,2 µl de Triton X-100 et 0,4 µl de pyrophosphate de sodium ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), avant d'être soumis à une agitation d'une minute au vortex. Toute la suspension de tampon contenant les bactéries a été ensemencée sur milieu gélosé R2A contenant 100µg/ml de cycloheximide. Par la suite, les insectes utilisés pour le premier lavage étaient repris afin d'effectuer le second lavage, et ainsi de suite jusqu'au huitième. L'ensemble des boîtes de Petris contenant les milieux ensemencés a été incubé à 25°C durant 14 jours. Pour chaque traitement et chaque lavage, la moyenne du nombre d'unité formatrice de colonie (UFC) a été déterminée sur la base des résultats obtenus dans chacun de trois répliquas.

4.3. Quantification des ecto- et endobactéries associées aux adultes de *D. simplex*

Après avoir déterminé la meilleure procédure pour extraire les bactéries de la surface des adultes de *D. simplex*, une expérience a été élaborée, afin de permettre la quantification du nombre de bactéries présentes à l'extérieur de l'insecte (ectobactéries) et celles se retrouvant à l'intérieur de l'insecte (endobactéries). Afin d'accroître la sensibilité de la détection, une approche par PCR quantitatif (qPCR) a été mise en place, les résultats devant ainsi fournir des données sur la quantité totale de bactéries et non seulement sur ce qui est cultivable.

Dans un premier temps, une courbe d'étalonnage a été préparée en utilisant un amplicon obtenu grâce à une amplification par PCR du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S avec les amorces pA-27f-YM (5' AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG 3') et pH (5' AAG

GAG GTG ATC CAR CCG CA 3') réalisé sur de l'ADN génomique provenant d'une culture bactérienne pure de *Escherichia coli*. Suite à cette réaction, une quantification de l'ADN a été réalisée grâce à la trousse commerciale *Quant-it™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit* de la compagnie Invitrogen. Suite à l'obtention de la concentration d'ADN, une conversion a été réalisée afin de déterminer le nombre de copies du gène correspondant. Sur la base du résultat obtenu, une série de dilutions a été effectuée afin d'obtenir une courbe standard avec des concentrations allant de 10^8 à 10^1 copies / 5 μ l de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S. Ainsi, à partir de la courbe standard, il est possible de déterminer le nombre exact de copies de ce gène se retrouvant dans nos échantillons. Le nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 16S a été déterminé par qPCR en utilisant les amorces universelles Eub338 (5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3') et Eub518 (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') produisant un fragment de 200 pb (Fierer *et al.*, 2005).

Afin de connaître le nombre de bactéries présentes à l'extérieur et à l'intérieur des adultes du dendroctone du mélèze, les échantillons ont été divisés en deux cohortes. Afin de récolter les ectobactéries, cinq lavages consécutifs dans 1 ml de tampon phosphate contenant 1 μ l de Triton X-100 ont été réalisés. Suite à une concentration des bactéries par filtration sur membrane de cellulose de 0.22 μ m, l'extraction de l'ADN total a été réalisée selon un protocole utilisant une lyse mécanique et une précipitation des protéines avec de l'acétate d'ammonium, suivi d'une quantification à l'aide de la trousse de quantification de l'ADN. Dans le cas des endobactéries, suite aux cinq lavages effectués précédemment, une stérilisation des insectes a été effectuée par trois trempages dans 1 ml d'éthanol à 70%, afin d'éliminer toutes les bactéries résiduelles. Après avoir bien rincé les insectes dans de l'eau Milli-Q stérile, ceux-ci ont été broyés dans la solution de tampon phosphate additionné de Triton X-100 (0,1%) afin de libérer les bactéries présentes à l'intérieur de l'insecte. Une approche par dilutions a permis de déterminer s'il y avait présence d'inhibition dans les échantillons. Les données recueillies ont été exprimées en nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 16S par insecte.

4.4. Caractérisation de la microflore bactérienne associée à *D. simplex*

4.4.1. Caractérisation de la microflore associée aux adultes

Afin de connaître le nombre d'insectes nécessaires à l'obtention d'une quantité suffisante d'ADN bactérien, plusieurs extractions d'ADN total, selon le protocole décrit précédemment, ont été réalisées avec différentes quantités d'insectes. La préparation des

différents échantillons a été réalisée de la même façon que pour la réalisation du qPCR (section 4.3). Des échantillons de cinq, dix et 50 insectes (valeurs de n) ont été préparés aux fins de l'extraction de l'ADN bactérien total. Par la suite, cet ADN a été quantifié à l'aide de la trousse commerciale *Quant-it™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit*. Les observations ont été consignées en terme de concentration d'ADN (ng/ μ l) total, par n insectes.

4.4.2. Caractérisation de la microflore associée aux œufs

Lors de la récupération des adultes dans les galeries, la présence d'œufs a été observée. Afin de définir s'ils étaient porteurs de bactéries, une caractérisation de leur microflore bactérienne a été entreprise. Ainsi, 50 œufs ont été récupérés des galeries de ponte et placés délicatement dans un tube de 1,5 ml. La surface externe des œufs a été stérilisée par immersion dans une solution diluée 1 : 200 d'eau de Javel (NaClO) à 6%, durant 15 minutes, avant de les rincer avec 25 ml d'eau Milli-Q stérile. Les œufs ont été récupérés à l'aide d'un entonnoir et d'un papier filtre préalablement stérilisés. Enfin, ils ont été broyés dans une solution de tampon phosphate contenant du Triton X-100 (0,1%). L'extraction ainsi que la quantification de l'ADN total ont été réalisées selon les protocoles utilisés à la section 4.3. Afin de confirmer la présence de bactéries au niveau de l'intérieur des œufs, une réaction PCR a été effectuée avec les amorces pA-27f-YM et pH (section 4,3). Le résultat de l'amplification a par la suite été révélé sur gel d'agarose 1,5%.

5. RÉSULTATS ET DISCUSSION

5.1. Extraction des bactéries associées à *D. simplex*

5.1.1. Extraction et localisation des bactéries présentes à la surface des adultes de *D. simplex*

Afin d'orienter les travaux, une estimation de la quantité de bactéries présentes à la surface de l'insecte s'avérait nécessaire. Ainsi, une première expérience avait pour objectif de déterminer si les bactéries se trouvant à la surface des insectes se retrouvaient principalement associées aux élytres. Certaines structures externes sont connues pour être porteuses de bactéries chez certains insectes, notamment chez *Dendroctonus frontalis* Zimmermann où l'on retrouve la présence d'un mycangium, situé au niveau du prothorax, destiné au transport des bactéries (Yuceer *et al.*, 2011). Chez le dendroctone du mélèze, il

n'existe aucune structure connue pour le transport des bactéries. Les élytres (paire d'ailes rigides externes protégeant les ailes destinées au vol) représentent une région propice où il serait probable de retrouver ces bactéries. En effet, les observations montrent qu'il s'agit d'une structure mobile sur laquelle on retrouve de multiples microsculptures. Ces dernières pourraient permettre aux bactéries d'adhérer à leur surface.

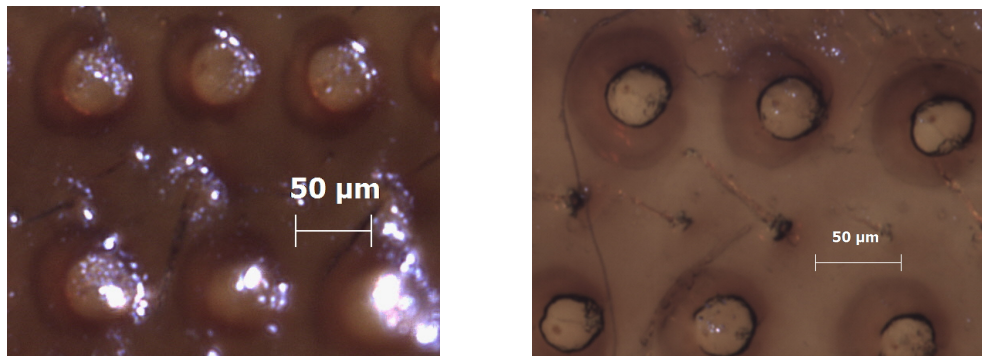


Figure 4. Photo de la surface supérieure (à gauche) et de la surface inférieure (à droite) d'un élytre chez *D. simplex*

Suite à l'observation de la croissance des bactéries sur les différentes boîtes de gélose, le décompte des bactéries pour les échantillons venant des élytres et des insectes complets a été effectué sur celles ayant la forte dilution. Le tableau 1 présente les valeurs moyennes observées du nombre de bactéries retrouvées sur la surface de l'insecte et pour les élytres.

Tableau 1. Nombre moyen de bactéries retrouvé à la surface des insectes par rapport à celles retrouvées au niveau des élytres chez *D. simplex*

UFC ± ET ¹	
Surface des insectes	Élytres
7 570 ± 1 010	6 700 ± 700

¹ UFC±ET, Unité formatrice colonie ± écart-type

Dans un premier temps, aucune différence significative (Test de Student $P=0,6476$, $N=3$) n'a été observée entre le nombre moyen de colonies retrouvées à la surface des insectes et celles recouvrées sur les élytres. Ce résultat suggère que les élytres constituent le réservoir des ectobactéries chez *D. simplex* puisqu'elles se retrouvent à près de 90%

associées à ces structures. De plus, les données indiquent qu'une importante quantité de bactéries se retrouvent à l'extérieur des insectes, puisque près de 8 000 colonies bactériennes sont retrouvées par insecte.

Cette première expérience est révélatrice de la présence de bactérie à la surface des insectes. Comme attendu, les élytres semblent jouer un rôle de réservoir bactérien puisque la majeure partie des bactéries y sont associées. Cependant, les résultats indiquent que d'autres structures sont probablement porteuses de bactéries. Les parties articulées de l'exosquelette, notamment les pattes et l'abdomen, sont certainement des sites propices pour l'accumulation de bactéries. Cependant, les élytres demeurent le réservoir le plus important.

5.1.2. Extraction de l'ensemble des bactéries associées à la surface de *D. simplex*

Lors de l'expérience réalisée avec les élytres, les résultats ont montré que la méthode utilisée pour extraire les bactéries de la surface de l'insecte ne permettait pas une récupération totale de celles-ci. En effet, il restait près de 10% des bactéries résiduelles sur la surface des insectes. Afin de parfaire l'approche d'extraction des bactéries, une première expérience a été réalisée afin de comparer l'agitation à l'aide du vortex et à la sonication. L'abondance des bactéries récupérées à la surface des adultes en fonction de ces deux traitements et du nombre de lavages est présentée au tableau 2.

Tableau 2. Abondance des bactéries récupérées à la surface des adultes de *D. simplex* en fonction des traitements (agitation et sonication) et du nombre de lavages

Nombre de lavages	Abondance des bactéries ¹	
	Traitements	
	Agitation	Sonication
1 ^{er}	++++	++++
2 ^e	++++	++++
3 ^e	++++	+++
4 ^e	+++	+++
5 ^e	+++	++

6 ^e	+	++
7 ^e	+	+
8 ^e	+	+

¹Abondance: +, ≤10 ; ++, 11-50 ; +++, 51-99 ; +++++, ≥100 UFC/insecte

Les résultats de cette expérience indiquent que l'utilisation de l'une ou l'autre des techniques ne semble conférer un avantage pour la récupération des bactéries. Aucune différence significative du patron d'abondance entre l'agitation et la sonication n'a été notée (test de Khi carré, $X^2 < 12,59$; $v=6$; $\alpha=0,05$). La sonication ne représente donc pas une méthode plus efficace. Cependant, ses effets sur les insectes semblent plus invasifs. En effet, on a constaté une mortalité plus élevée chez les insectes soumis à la sonication que chez ceux ayant subi une agitation à l'aide du vortex (données non montrées).

Peu importe le nombre de lavages effectués, les approches utilisées ne permettent pas de récupérer l'ensemble des bactéries se trouvant à la surface des adultes de *D. simplex*. En effet, les données montrent la présence de bactéries à la surface de l'insecte, même après le huitième lavage. Cependant, une diminution dans l'abondance des bactéries est observée après le cinquième lavage chez les insectes soumis à l'agitation. Sur la base de ces résultats, un minimum de cinq lavages avec agitation à l'aide d'un vortex est préconisé pour déloger le plus grand nombre de bactéries.

Afin d'accroître l'efficacité de l'extraction des bactéries présentes à la surface des adultes de *D. simplex*, une nouvelle expérience comparative a été réalisée pour déterminer si l'ajout de pyrophosphate de sodium ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) au tampon de lavage était efficace. En utilisant l'approche par agitation présentée précédemment, l'abondance des bactéries en fonction de la présence ou l'absence de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ est présentée au tableau 3.

Tableau 3. Abondance des bactéries récupérées à la surface des adultes de *D. simplex* en fonction de la présence ou l'absence de pyrophosphate de sodium ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) dans le tampon d'extraction et du nombre de lavages

Nombres de lavages	Abondance des bactéries ¹	
	Traitements	
	Tampon phosphate + Triton X-100 (0,1%)	Tampon phosphate + Triton X-100 (0,1%) + pyrophosphate de sodium (0,2%)
1 ^{er}	++++	++++
2 ^e	++++	+++
3 ^e	++++	+++
4 ^e	+++	+++
5 ^e	+++	++
6 ^e	+	+
7 ^e	+	+
8 ^e	+	++

¹Abondance: +, ≤ 10 ; ++, 11-50 ; +++, 51-99 ; +++++, ≥ 100 UFC/insecte

Aucune différence significative (test de Khi carré, $X^2 < 12,59$; $v=6$; $\alpha=0,05$) n'a été observée entre l'abondance des bactéries récoltées dans le tampon de lavage avec ou sans $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. En présence de pyrophosphate de sodium, on remarque une diminution de l'abondance des bactéries après le premier lavage. Cette baisse est observée après le troisième lavage pour le tampon non amendé. Une seconde diminution est également observée suite au sixième lavage en présence de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, alors que la diminution se produit au cinquième lavage en absence de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Cette observation suggère que le processus de libération des bactéries serait ralenti par l'ajout de pyrophosphate de sodium.

Ceci expliquerait la diminution observée après le premier lavage et celles subséquentes. Sur cette base, le relargage des bactéries en présence de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ requerrait plus de 8 lavages.

D'autre part, en absence de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, les résultats sont en accord avec ceux obtenus à l'expérience précédente. Ainsi, il est possible de prescrire qu'une série de cinq lavages avec une solution de tampon phosphate et Triton X-100 (0,1%) et une agitation au vortex devraient permettre d'extraire la majorité des bactéries se retrouvant à la surface des adultes de *D. simplex*.

5.2. Quantification des ecto- et endobactéries associées aux adultes de *D. simplex*

Une quantification des bactéries retrouvées à l'extérieur ainsi qu'à l'intérieur de l'insecte est une étape nécessaire avant d'entreprendre le séquençage à haut débit de nos échantillons. En effet, ces approches de pyroséquençage demandent de connaître précisément la quantité d'ADN devant être étudié. Un des objectifs du projet est de caractériser la diversité microbienne chez le dendroctone du mélèze. Ainsi, aux fins de la recherche, une évaluation des bactéries se retrouvant à la surface et à l'intérieur des insectes a été préconisée. Dans ce contexte, une approche par PCR quantitatif (qPCR) a donc été mise en place afin d'estimer le nombre d'endo- et d'ectobactéries.

La quantification du nombre de copie du gène codant pour l'ARNr 16S des ectobactéries et endobactéries retrouvées chez un insecte est présentée au tableau 4.

Tableau 4. Nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 16S par insecte, retrouvé à l'extérieur et à l'intérieur des adultes de *D. simplex*

Dilutions	Nombre de copies du gène 16S/insecte	
	Extérieur	Intérieur
Aucune	4,55E+06	14,42E+07
1/5	3,09E+06	11,53E+07
1/25	2,56E+06	4,69E+07

Les résultats obtenus grâce au qPCR suggèrent la présence de dix fois plus de copies du gène codant pour l'ARNr 16S à l'intérieur de l'insecte qu'à l'extérieur de celui-ci. Ceci confirme donc notre approche par séparation de ce que l'on retrouve à l'extérieur par rapport à ce qui est retrouvé à l'intérieur, pour éviter que l'abondance supérieure des bactéries à l'intérieur de l'insecte n'empêche la détection et l'identification des bactéries présentes à la surface de l'insecte. De plus, en effectuant le rapport entre le nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 16S obtenues en réalisant le qPCR (4,55E+06 copies présentes au niveau de l'extérieur) et le nombre de bactéries obtenues lors de la mise en culture ($7\,570 \pm 1\,010$ UFC sur l'ensemble de la surface de l'insecte), il est possible de constater qu'il s'agit effectivement de près de 1% des bactéries qui sont cultivables au laboratoire, assumant la présence d'une copie du gène par bactérie. Finalement, peu d'inhibition a été observée dans les échantillons, notamment dans ceux dilués 1/25, ce qui confère une fiabilité aux résultats obtenus.

5.3. Caractérisation de la microflore bactérienne associée à *D. simplex*

5.3.1. Caractérisation de la microflore associée aux adultes

Comme mentionné auparavant, la caractérisation de la microflore bactérienne associée au dendroctone du mélèze sera réalisée à l'aide de techniques de séquençage à haut débit (méthode 454). Cette méthode a été choisie puisqu'elle permet d'obtenir les séquences associées à chacune des bactéries présentes dans notre échantillon, tout en

offrant une composante quantitative. En vue d'obtenir de bons résultats lors du séquençage à haut débit, une quantité suffisante d'ADN doit être obtenue. L'expérience précédente a permis de conclure que la quantité d'ADN bactérien retrouvé à l'extérieur de l'insecte représente le facteur limitant, puisqu'il y a présence de dix fois moins de bactéries à la surface qu'à l'intérieur de celui-ci. Ainsi, les résultats de la quantification de la concentration d'ADN total moyenne obtenues à partir d'extractions de la surface et de l'intérieur des adultes est présentée au tableau 5.

Tableau 5. Valeur moyenne de la concentration d'ADN total retrouvée à l'intérieur et l'extérieur des adultes de *D. simplex* en fonction du nombre d'insectes

Nombre d'insectes	Concentration d'ADN total (ng/ μ l \pm écart type)		Probabilité
	Intérieur	Extérieur	
5	117,6 \pm 0,05	2,8 \pm 2,62	0,0002
10	115,0 \pm 2,86	3,0 \pm 0,05	0,0002
50	n.d.	5,0 \pm 1,06	-

Des différences très hautement significatives (tests de Student) sont observées entre la quantité d'ADN total récupérée à l'intérieur et celle récupérée à l'extérieur de l'insecte. Par contre, il faut comprendre que les valeurs associées aux échantillons de l'intérieur des insectes renferment l'ADN provenant des bactéries, mais aussi celui de l'hôte et de tous les autres organismes (champignons, parasites et/ou virus) pouvant y être associés. Par contre, les échantillons d'ADN provenant de l'extérieur des insectes sont probablement constitués contenaient probablement d'ADN bactérien et fongique, avec peu d'ADN de l'hôte.

De plus, on observe que pour les échantillons contenant cinq et dix insectes, la quantité d'ADN total retrouvée à l'extérieur est infime et que les valeurs retrouvées sont inférieures au seuil de détection de la technique utilisée. Pour cette raison, le nombre d'insectes a été augmenté à 50 adultes. Dans ce dernier cas, la quantité d'ADN est demeurée relativement faible, mais les valeurs retrouvées étaient au dessus du seuil de détection. Une amplification du gène codant pour l'ARNr 16S a été possible en utilisant les amorces pA-27f-YM et pH.

Sur la base des résultats obtenus, un échantillon de l'ADN total de l'extérieur de 50 insectes et un échantillon de l'ADN total de l'intérieur de dix insectes font actuellement l'objet d'une analyse par séquençage à haut débit. Les résultats sont attendus prochainement.

5.3.2. Caractérisation de la microflore associée aux œufs

Lors de l'échantillonnage des adultes, il a été possible d'observer la présence d'œufs déposés par groupe le long des galeries de ponte. Devant l'opportunité qui s'offrait, une exploration des bactéries pouvant se retrouver à l'intérieur des œufs a été entreprise.

Ainsi, à partir d'un échantillon de 50 œufs, une concentration de 11,3 ng/μl d'ADN total a été récupérée. Une amplification en utilisant les amorces les amorces pA-27f-YM et pH du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries a été réalisée (figure 4).

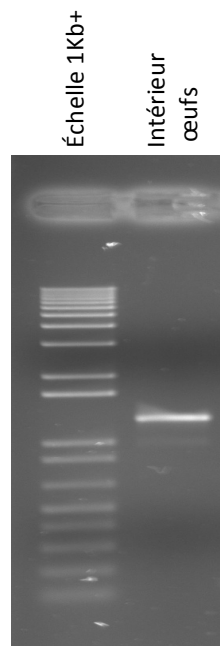


Figure 4. Gel d'agarose 1,5% représentant le résultat de la réaction PCR effectuées sur l'ADN total provenant de l'intérieur de 50 œufs

Les résultats obtenus confirment la présence de bactéries à l'intérieur des œufs de l'insecte, ce qui pourrait indiquer une transmission verticale de ces bactéries de la mère vers la progéniture. Afin d'identifier les bactéries présentes, une techniques de clonage utilisant le produit PCR ainsi que le vecteur « pGEM®-T Easy » sera utilisées, puisque, *a priori*, la diversité bactérienne devrait être moindre dans les œufs. Suite à l'obtention des clones, un séquençage sera réalisé afin d'identifier les bactéries présentes.

6. PERSPECTIVES AU DOCTORAT

Afin d'effectuer une caractérisation complète des microorganismes associés au complexe symbiotique chez *D. simplex*, l'étude entreprise doit explorer diverses avenues. Ainsi, une identification de l'ensemble des microorganismes associés à *D. simplex* (bactéries, champignons) devra être réalisée. Il va s'en dire que différentes populations de ce même insecte, présentes à différents endroits, devront être observées. Plus encore, une étude de la composition spécifique à chaque stade de développement de l'insecte est nécessaire pour bien documenter l'association de ces microorganismes avec le dendroctone du mélèze. Finalement, un regard à ce qui se trouve au niveau de l'environnement où évolue *D. simplex* sera également réalisé.

De cette façon, un portrait global de l'association entre les microorganismes et *D. simplex* pourra être obtenu. Une revue de littérature sera réalisée afin d'effectuer un rapprochement entre les bactéries identifiées précédemment chez *D. simplex* et leur fonction spécifique chez d'autres insectes xylophages. Des épreuves biologiques devront éventuellement être réalisées afin de confirmer ces fonctions.


Plusieurs objectifs spécifiques ont déjà été identifiés au niveau du doctorat :

- Extraction et identification des bactéries et des champignons associés à *D. simplex* ;
- Comparaison de la composition spécifique bactérienne en fonction des différents stades de développement de l'insecte (œufs, larves, adultes ténéraux et matures) ;
- Faire un rapprochement entre les bactéries identifiées et celles des complexes symbiotiques d'autres insectes ;
- Mise en culture des bactéries identifiées précédemment et établissement d'une banque de bactéries au laboratoire ;
- Détermination de l'activité antifongique des bactéries obtenues.

La réalisation de ces objectifs permettra, à long terme, une caractérisation complète du complexe symbiotique associé à *Dendroctonus simplex*. Cette caractérisation permettra également l'identification d'une nouvelle cible pour le biocontrôle de cet insecte ravageur. Les découvertes effectuées lors de ces travaux pourraient éventuellement mener au développement de nouveaux biocatalysateurs forts utiles dans le domaine de la valorisation de la biomasse.

**13 ANNEXE 3 : SURVEYING THE ENDOMICROBIOME AND
ECTOMICROBIOME OF BARK BEETLES : THE CASE OF
*DENDROCTONUS SIMPLEX***

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Surveying the endomicrobiome and ectomicrobiome of bark beetles: The case of *Dendroctonus simplex*

Received: 06 May 2015
Accepted: 26 October 2015
Published: 26 November 2015

Audrey-Anne Durand, Amélie Bergeron, Philippe Constant, Jean-Philippe Buffet, Eric Déziel & Claude Guertin

Many bark beetles belonging to the *Dendroctonus* genus carry bacterial and fungal microbiota, forming a symbiotic complex that helps the insect to colonize the subcortical environment of the host tree. However, the biodiversity of those bacteria at the surface of the cuticle or inside the body parts of bark beetles is not well established. The aim of this study was to characterize the bacterial microbiome associated with the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex*, using bacterial 16S rRNA gene pyrosequencing. The ecto- and endomicrobiome and the subcortical galleries were investigated. Several bacterial genera were identified, among which *Pseudomonas*, *Serratia* and *Yersinia* are associated with the surface of the beetle cuticle, and genera belonging to Enterobacteriaceae and Gammaproteobacteria with the interior of the insect body. The index of dissimilarity indicates that the bacterial microbiome associated with each environment constitutes exclusive groups. These results suggest the presence of distinct bacterial microbiota on the surface of the cuticle and the interior of *D. simplex* body. Additionally, the bacterial diversity identified in the galleries is substantially different from the ectomicrobiome, which could indicate a selection by the insect. This study reports for the first time the identification of the eastern larch beetle microbiome.

Symbiotic microorganisms are crucial for plant feeding insects: they are involved in the food digestion processes and provide supplemental nutrition and detoxification of plant defense compounds^{1–3}. Several bark beetles belonging to the *Dendroctonus* genus carry a symbiotic complex that helps the insects to colonize their host trees^{1,4}. Symbiotic bacteria supplement the phloem diet with amino acids^{5,6}, vitamins³ and nitrogen^{7–9}. For example, *Enterobacter agglomerans* and *Enterobacter* spp., which are associated with larvae and adults of *Dendroctonus terebrans*, are nitrogen-fixing bacteria⁷. Gammaproteobacteria and Actinobacteria isolated from *Dendroctonus rhizophagus* are capable of cellulose breakdown¹⁰. Furthermore, in response to the attacks of the beetles, coniferous trees secrete and release deterrent terpenes, which are toxic for phloeophagous insects¹¹. Some *Pseudomonas* species isolated from *Dendroctonus ponderosae* and *Dendroctonus valens* are capable to metabolize the terpenoid molecules, which seems to facilitate the colonization of the host trees by the beetles^{12,13}. The microorganisms may also be involved in immunity processes in some beetle species¹⁴. Accordingly, some bacteria of the symbiotic complex produce secondary metabolites, some with antifungal activities^{15–17}. These symbiotic bacteria may protect the insects against entomopathogenic fungi used as biological control agents^{17,18}. For example, *Streptomyces* isolated from *Dendroctonus frontalis* produces mycangimycin, an antifungal molecule that inhibits the growth of the antagonistic fungus *Ophiostomas minus*¹⁷.

The eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* LeConte (Coleoptera: Scolytinae), is a phloeophagous beetle for which the microbiome has not yet been characterized. This beetle is a secondary pest

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, H7V1B7, Canada. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.G. (email: claude.guertin@iaf.inrs.ca)

that usually attacks freshly dead or weakened trees. However, the eastern larch beetle may undergo epidemic outbreaks; in such cases they may attack healthy trees^{19,20}. During the dispersal phase, the pioneer beetles bore holes in the tree trunk and subsequently buildup galleries into the phloem layer. Gallery construction causes severe desiccation, bark decay and eventually tree death^{20,21}. The widespread outbreaks observed in the past suggest that the identification of these beetles as a secondary pest should be reconsidered²⁰.

The identification of microbial communities associated with *Dendroctonus* species has been mainly performed by using culture-dependent methods or through targeted sequencing following gene cloning^{10,22}. Even though fungi are crucial partner in insect's microbiome, this paper attempts to focus on bacteria. Symbiotic bacteria have been isolated from the inside or the outside of the insect body. Mainly, ectosymbiotic bacteria are related to the mouthparts and cuticles of the insects while endosymbiotic bacteria are mostly found in the body cavity, in the gut and within cells^{23–25}. More recently, high throughput sequencing and community metagenomic analyzes have been used to identify the microorganisms associated with bark beetles^{13,26}. These approaches allow for a better resolution of the existing diversity in the samples. However, none of the previous studies investigated the difference that may exist between the ectomicrobiome and the endomicrobiome of an insect. Therefore, bacterial 16S rRNA gene pyrosequencing was used to identify bacteria associated with the eastern larch beetle. The aim of this research was to characterize the bacterial diversity associated with the surface of the cuticle, the interior of the insect body, as well as that found in subcortical galleries. Analyzes were performed to compare the bacterial diversity from the different microenvironments. We report the first comprehensive characterization of the bacterial diversity associated with the surface of the cuticle and the interior of *D. simplex*. Our results revealed non-random mutually exclusive bacterial communities, which demonstrate a specific organization between the three different environments.

Materials and Methods

Site location and sample preparation. Eastern larch beetles, along with a sample from their galleries, were collected from a Quebec provincial larch plantation located in St-Claude (Québec, Canada; Lat. 45.6809, Long. –71.9969) with the permission of the ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs authority. To obtain pioneer beetles, newly attacked hybrid larch trees were selected and harvested, and logs were transported to the laboratory, just after the insect flight activity. The tree sections were kept overnight at 4°C until the insects were harvested. Each *D. simplex* adult was picked using sterilized tweezers and placed into separated sterile 2 ml microcentrifuge tubes. The insects were recovered by gently peeling off the bark from the entrance holes until the insects were reached. A 1 cm section of the galleries was also collected near the insect entrance hole and placed in a sterile microcentrifuge tube.

The bacterial microbiome associated with the surface of the cuticle and the interior of the insect body, and the galleries were investigated. For each environment, three replicates were prepared. For each replicate, fifty insects were randomly selected and pooled in 15 ml polypropylene tubes to recover sufficient bacterial genomic DNA from the surface of the cuticle. Five consecutive washes in 5 ml phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) containing 0.1% Triton X-100 with 1 min agitation (Fisher Vortex Genie 2, Ottawa, ON, Canada) were applied to each sample. The pooled microbial suspensions were then filtered through a 0.22 µm nitrocellulose filter (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) to concentrate the biomass. Each filter was placed in a Lysing matrix A tube (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) until DNA extraction.

For the endomicrobiome of *D. simplex*, ten adults among the 50 washed insects were randomly selected per replicate. The surface of the insects was sterilized with three serial washes in 1 ml 70% ethanol (EtOH) with 1 min vortexing. Finally, 1 ml sterile water was used to wash the remaining ethanol, and the insects were then carefully crushed in 200 µl PBS containing 0.1% Triton using sterilized mortar pestles fitting 1.5 ml microcentrifuge tubes (VWR, Mont-Royal, QC, Canada). For each sample, the homogenate was transferred into a 2 ml screw cap tube containing 200 mg of 0.1 mm glass beads (BioSpecs, Bartlesville, OK, USA). This material was used for DNA extraction.

The bacterial microbiome associated with the subcortical galleries was recovered from the galleries where the insects were collected. A total of 25 galleries were selected per replicate. First, insect frass was removed, and the inside galleries were carefully scraped using a sterile scalpel. For each selected galleries, the material was then placed in an individual sterile microtube. As previously described with ectomicrobiome of larch beetle, five washes and agitations with PBS-Triton X-100 solution were performed, followed by filtration to recover bacteria. Each filter was then transferred into a Lysing matrix A tube until DNA extraction.

DNA extraction and PCR amplification. Total DNA was extracted using mechanical lysis method. Briefly, 1 ml extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA-2Na, 3% SDS, pH 8.0) containing 20 µg/ml RNase A was added into tubes containing the ectobacteria, the endobacteria, and those from the corresponding galleries. Cell lysis was achieved using the FastPrep[®]-24 Instrument (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Two cycles of lysis at 4 m/s for 50 s followed by 5 min on the ice were performed. The tubes were then centrifuged at 16,800 × g for 5 min, and the supernatant recovered before the second lysis cycle. For each sample, ammonium acetate was added to the combined supernatants at a final concentration of 2 M. Tubes were briefly agitated by inversion and kept on ice for 5 min before centrifugation

at $20,800 \times g$ for 15 min at 4°C . The supernatant was collected and maintained on ice for 5 min before a second centrifugation with the same parameters was done. Supernatants were collected and DNA precipitated overnight at 4°C by adding an equal volume of isopropyl alcohol (2-Propanol). Centrifugation at $20,800 \times g$ at 4°C for 30 min was performed, and the supernatant discarded. Two DNA pellet washes with cold EtOH 70% and centrifugation at $20,800 \times g$ for 15 min at 4°C were finally done. The pellets were air-dried and suspended in sterile water. DNA concentration was estimated using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Life Technologies, Burlington, ON, Canada) following the manufacturer instruction.

In order to document the presence of bacterial DNA in each sample, the 16S rRNA gene was amplified by PCR using the universal primers pA-27-YM (5' AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG 3')²⁷ and pH (5' AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA 3')²⁸. All PCR reactions were carried out in a 50 μl volume containing 25 mM MgCl₂, 10 μg BSA, 10 mM dNTPs, 10 mM of each primer, 5 U Taq DNA polymerase and 10 \times ThermoPol® buffer (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada). Following the initial denaturation step of 5 min at 94°C , 30 amplification cycles were performed (94°C for 45 s, 55°C for 45 s, 72°C for 45 s) followed by a final extension step at 72°C for 10 min. Amplification was confirmed by electrophoresis of the PCR products on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light. A negative control containing all the extraction reactive but no insect was realized and no amplification was observed.

16S rRNA pyrosequencing. DNA samples were sequenced by Research and Testing Laboratory, LLC (Lubbock, TX, USA). PCR amplification of bacterial 16S rRNA gene was done using the universal primers 28F (5' GAG TTT GAT CNT GGC TCA G 3') and 519R (5' GTN TTA CNG CGG CKG CTG 3') covering the V1-V3 variable regions. The amplicons were pyrosequenced using Roche 454 Titanium chemistry. Elongation was performed from the forward primer. Raw data are available on NCBI under BioProject number PRJNA275539.

Sequence processing pipeline. The post-sequencing processing were completed using the open-source program mothur v.1.33.0 software (<http://www.mothur.org>)²⁹ following the pipeline described by Comeau *et al.*³⁰. Raw 454 reads were first processed to remove low-quality reads, such as (i) the presence of one or more uncertain bases (N), (ii) sequences shorter than 150 nt (nucleotides), (iii) unusually long reads that extended more than 100 nt over the amplicon size, (iv) reads that had long homopolymers sequences (more than 8), and (v) reads that had incorrect forward primer sequences. Sequences corresponding to forward primers were kept to facilitate the alignment of the sequences during subsequent analyzes. Contaminants, such as chloroplasts and mitochondria, were eliminated before removing the chimeras with UCHIME³¹, as implemented in mothur. The remaining filtered sequences were aligned by domain against the provided SILVA reference alignment³² using the *ksize* = 9 parameter in mothur. Manual alignment was performed to correct the misaligned sequences with BioEdit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Reads were also trimmed of all bases beyond the reverse primer. Singletons were finally removed after clustering into draft Operational Taxonomic Units (OTUs) to obtain the final quality reads. An equalization step was performed to obtain equal sampling depth for each sample. The final aligned reads were clustered into OTUs at $\geq 95\%$ similarity level using the furthest neighboring cluster in mothur, thus allowing for the identification of the bacterial genus³³. The measure of diversity and community similarity analysis were also obtained based on mothur analysis. Sequences were taxonomically identified using the Ribosomal Database Project (RDP) classifier version 2.6³⁴ trained on 16S rRNA training set 9.

Diversity analysis. Rarefaction curves were generated within the software mothur to evaluate the sufficiency of the sampling effort using equalized data (*i.e.* random selection of a determined number of sequences from each library according to the size of the smallest library to avoid bias due to variable sampling efforts). The abundance-based coverage estimator (Ace) and the Shannon index, also generated with mothur, were used to estimate the diversity among the bacterial populations using the same data.

To proceed with the diversity analyzes among the bacterial communities, a maximum likelihood phylogenetic tree was constructed with MEGA 5.2³⁵ using a representative sequence of each previously generated OTU and an Archaea sequence as the outgroup. A sample ID mapping file was also built to indicate to which sample each OTU belongs as well as the number of times each sequence was observed (sequence abundance). Finally, a category-mapping file was constructed to relate the sample names in the sample ID mapping file to their related data. A cluster of similarity was generated with Fast UniFrac (<http://bmf2.colorado.edu/fastunifrac/>)^{36,37} to compare all communities simultaneously and to observe which communities are phylogenetically similar. Average agglomerative clustering (UPGMA) based on computed UniFrac distances and the abundance of each OTU was calculated using a Jackknife procedure with 1,000 permutations and 75% of the sequences to verify whether partitioning of ribotyping profiles corresponded to the three ecological niches surveyed. To visualize the bacterial community across all samples, a heat map was generated on the log-transformed abundance using the MultiExperiment Viewer (MeV) v4.9³⁸. The representative sequence of each of the 90 OTUs found in abundance ($\geq 1\%$ of sample abundance), as well as their closely related sequences identified by BLASTN against NCBI database were aligned together with the MUSCLE³⁹ algorithm implemented in MEGA. A maximum

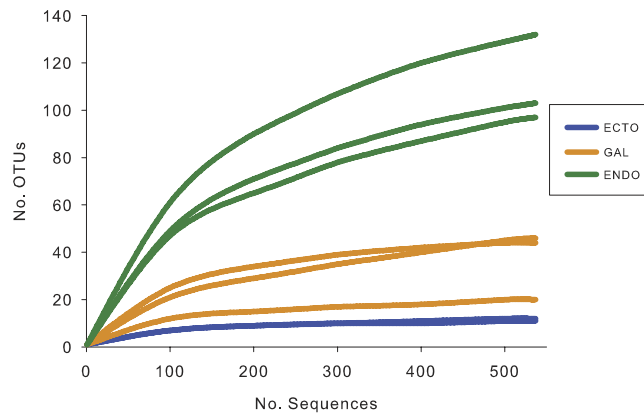


Figure 1. Rarefaction curves of OTUs diversity for each sample. Each of the samples contains 537 sequences to obtain equal sampling depth. “Ecto”, ectomicrobiome; “Gal”, microbiome of the galleries; “Endo”, endomicrobiome.

Environment	Shannon (sd)	Ace (sd)
ECTO	1.267 (0.008) ^a	16.684 (4.464) ^a
GAL	2.240 (0.377) ^b	60.931 (32.298) ^a
ENDO	4.150 (0.296) ^c	148.895 (18.453) ^b

Table 1. Diversity associated with the external surface and the interior of the eastern larch beetle body as well as the galleries. The abundance-base coverage estimator (Ace) and the Shannon diversity index were used to compare richness within the samples. Each of the samples contains 537 sequences to obtain equal sampling depths. All generated OTUs were used to calculate the diversity indexes. “Ecto”, ectomicrobiome; “Gal”, microbiome of the galleries; “Endo”, endomicrobiome; “sd”, standard deviation.

likelihood phylogenetic tree was built with FastTree 2.1.7⁴⁰ using the GTR model with 1,000 resampling to estimate node support values. Additionally, a Venn diagram was also generated with mothur to observe the partition of the OTUs across the three environments sampled. Finally, a principal coordinate analysis (PCoA) was also achieved with Fast UniFrac to assess whether different bacterial communities were distributed along the axes of variation using the same previous reference files.

Results

Bacterial diversity associated with the eastern larch beetle microbiome. To investigate the complete bacterial microbiome associated with the eastern larch beetle, ecto- and endobacteria, as well as the bacteria located in the galleries were recovered. For each environment, three replicates were analyzed, except for the ectobacteria, where the quantity of bacterial genomic DNA extracted from one of the pooled samples was not sufficient to perform pyrosequencing. A total of 108,447 raw sequences were obtained, and 48,380 high-quality-filtered sequences were recovered. The average read length was 422 bp. Comparison of the diversities between the endo-, the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries was performed on equalized-sequence number. Because one sample contained less sequences of quality than the other samples, 537 sequences were kept for each sample, representing a total of 4,296 sequences. After clustering at a 95% pairwise-identity threshold, 278 OTUs were recovered, from which only 26% enclosed a unique sequence. Fig. 1 shows the rarefaction curves associated with the eight samples. Asymptotes are reached for the samples coming from the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries, suggesting that the OTUs observed are representative of the whole bacterial diversities. As for the endomicrobiome, rarefaction curves tend to reach a plateau, indicating that most of the diversity was recovered, but not all of it. The endomicrobiome displays a higher bacterial richness than the other two environments. Hence, among the OTUs containing only one representative sequence, 74% were associated with the endomicrobiome. Consequently, the ectomicrobiome displays the lower richness, with only 6 OTUs representing 95% of the diversity.

The abundance-based coverage estimator (Ace) and Shannon diversity index for each of the samples were computed (Table 1). The Shannon indices show a significant difference between the endo-, the ectomicrobiome and microbiome of galleries with values, respectively, of 4.15, 1.27 and 2.24 (ANOVA test; $F = 60.14$; $p < 0.0003$). On the other hand, for Ace estimator results, the environment seems to have a significant effect on the microbial richness (ANOVA test; $F = 20.88$; $p < 0.0037$). However, no difference was observed between the ectomicrobiome (16.68) and the microbiome of the galleries (60.93).

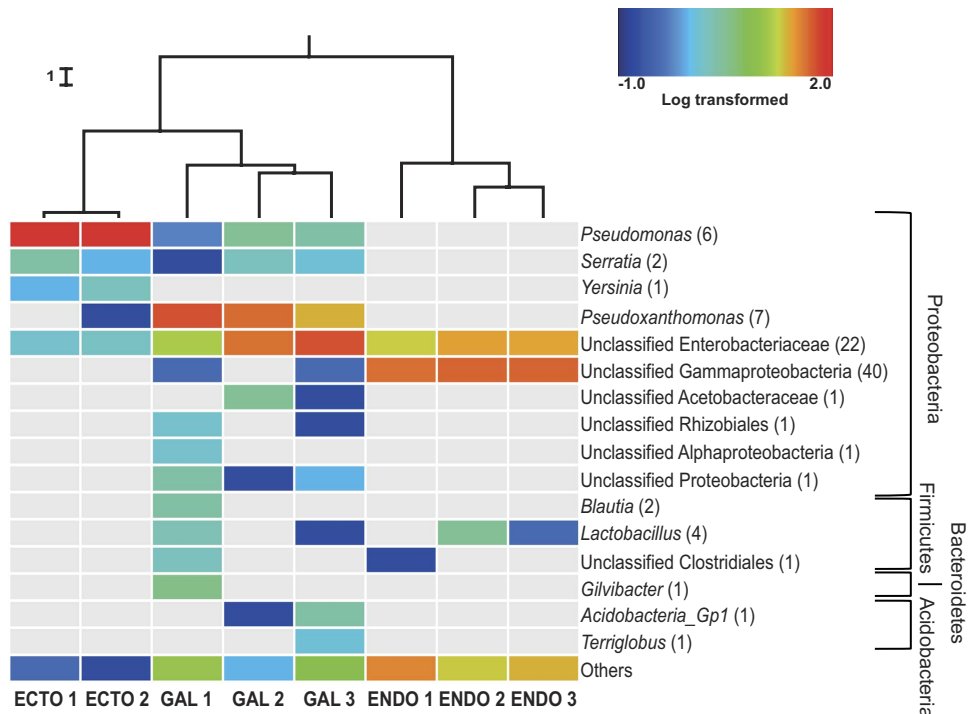


Figure 2. Bacterial community composition of the eastern larch beetle and the galleries. Only high quality filtered sequences were used to generate the heat map. Abundant OTUs ($\geq 1\%$ of the total abundance) are represented in the chart. The non-abundant OTUs ($< 1\%$) are grouped in the category named “others”. The heat map represents the log-transformed relative abundance and grey representing the absence of the OTU. Number in parenthesis represents the number of OTUs associated with each genus. Cluster of similarities regrouping the different samples is represented above the heat map, with each node supported by a Jackknife analysis with greater than 99.9% accuracy. “Ecto”, ectomicrobiome; “Gal”, microbiome of the galleries; “Endo”, endomicrobiome.

Endomicrobiome (148.90) shows a significant difference in the bacterial richness found in the two other environments.

Taxonomical composition and variability of bacterial communities associated with the eastern larch beetle. Each of the 278 OTUs was taxonomically identified using the RDP classifier. Most of the identified OTUs belong to the phyla Acidobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria (Fig. 2). Within the Proteobacteria, Gammaproteobacteria were largely predominant, although a few Alphaproteobacteria OTUs were also identified. Only one predominant bacterial genus, *Pseudomonas*, was associated with the surface of the cuticle with 95% of the sequences total abundance. Two other genera, *Serratia* and *Yersinia*, were also considered abundant, representing respectively 2% and 1% of the sequences. Unclassified bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family were also associated with the insect cuticle with about 2% of the total sequences found.

Unclassified Gammaproteobacteria are the most prevalent OTUs associated with the endomicrobiome, followed by bacteria from the Enterobacteriaceae family, which together represent approximately 70% of the total abundance. *Lactobacilli* were also found in two of the three samples. A great number of non-abundant bacteria were found in those samples, representing 20% to 35% of the diversity.

A higher number of abundant bacterial OTUs ($\geq 1\%$ of total abundance) were identified in the galleries samples than in the ecto- and endomicrobiome of *D. simplex*. For all replicates, bacterial OTUs belonging to the *Pseudoxanthomonas* genus and the Enterobacteriaceae family represent almost 80% of the total sequences abundance. Other genera were also identified, such as *Pseudomonas*, *Serratia*, *Acidobacteria Gp1* and *Lactobacillus*, each of them representing more than 1% of the galleries relative abundance. In addition, unclassified bacteria belonging to several phyla were found in these samples. Between 2% to 10% of the OTUs were placed in the category “others”, depending on the replicate. Experiments were conducted for a second year, and results were consistent with previous identification.

A weighted UniFrac UPGMA dendrogram (Fig. 2) was computed to assess differences between microbial communities based on phylogenetic information. For each environment (ectomicrobiome, endomicrobiome and microbiome of the galleries), the different replicates clustered together, showing the consistency of the sequences obtained and the specificity of each environment. Additionally, the samples coming from the insect’s cuticle and the galleries are more closely related, while OTUs associated

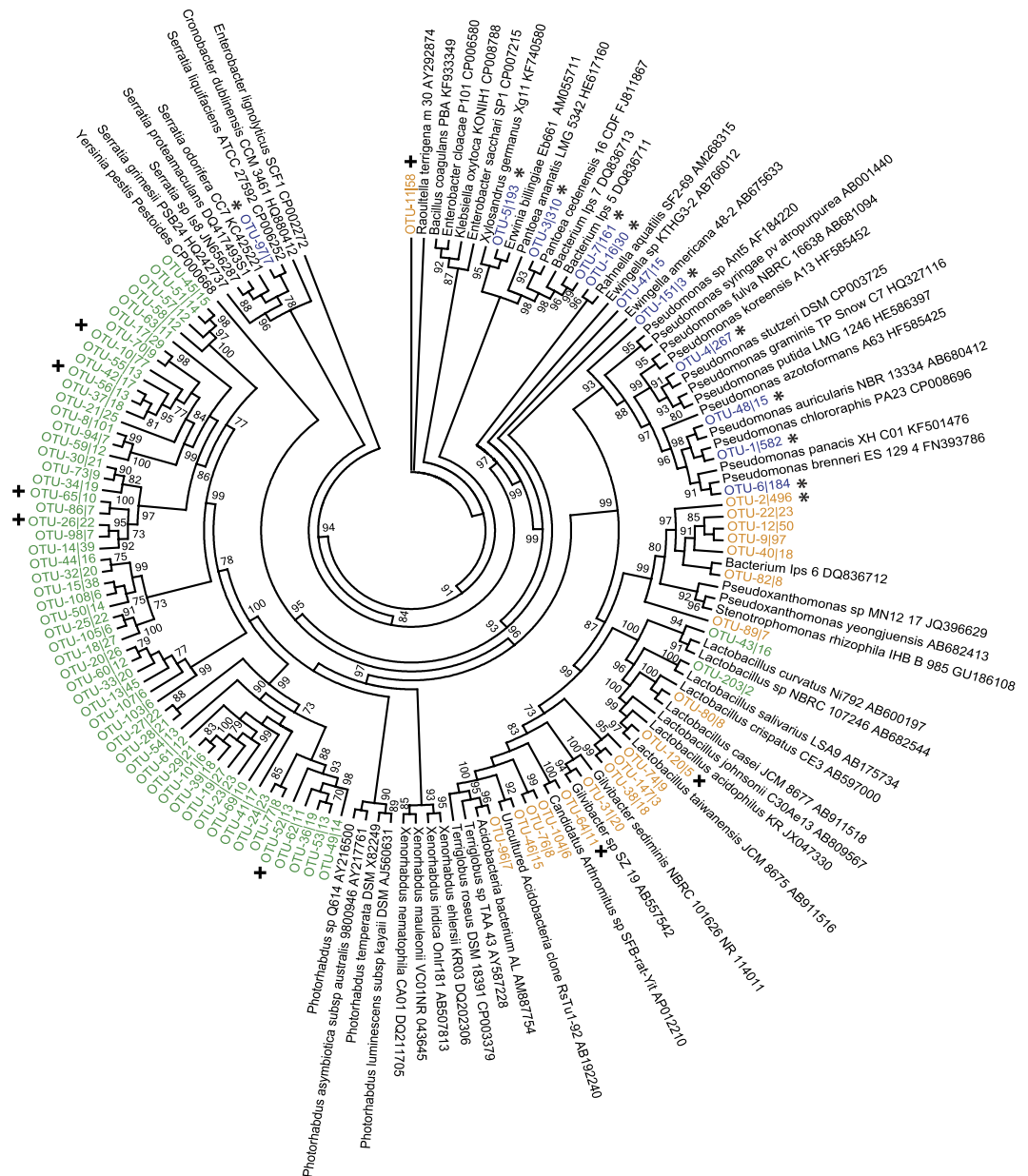


Figure 3. Phylogenetic affiliation of the abundant bacterial OTUs associated with the eastern larch beetle based on partial 16S rRNA gene sequences. Closely related sequences were identified using BLASTN against NCBI database. Sequences were aligned using the MUSCLE algorithm implemented in Geneious. Maximum phylogenetic tree was constructed with FastTree using the GTR model with 1,000 resampling. The colors used for the OTUs represent the environment they belong to (blue = ectomicrobiome, orange = microbiome of the galleries, green = endomicrobiome, * = presence in ectomicrobiome and galleries and + = presence in endomicrobiome and galleries).

with the endomicrobiome of *D. simplex* form a more distinct phylogenetic group. A Jackknife analysis was performed to establish the robustness of each node of the environmental cluster. Each node of the dendrogram was recovered with more than 99.9% accuracy, showing the validity of the similarity clustering.

To further investigate the taxonomic identification of the most abundant OTUs across the three ecological niches, a maximum likelihood phylogenetic tree was constructed using FastTree based on the representative 16S sequences of each OTU and their closely related sequences identified by BLASTN (Fig. 3). Phylogenetic analysis revealed taxa related to genera *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Rahnella*, *Serratia* and *Ewingella* on the surface of the insect's cuticle. Whereas, in the interior of the insect body, most OTUs (56) formed a well-delineated and monophyletic cluster representing potentially novel bacterial genera belonging to the family Enterobacteriaceae. Among the closest relatives of this cluster

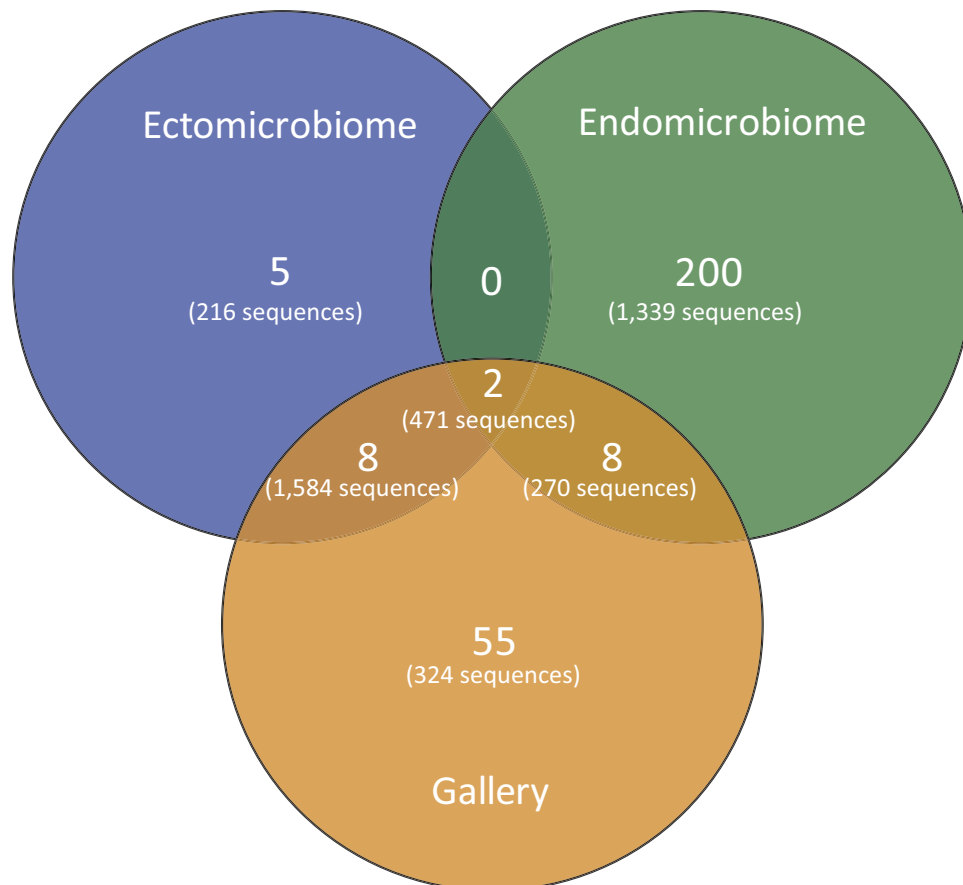


Figure 4. Venn diagram representing the distribution of the OTUs across the different environments.

Only the high quality filtered sequences clustered at a 95% pairwise-identity threshold were used to generate the diagram. The number of OTUs and sequences is shown for each environment type.

(85% identity) were *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. Likewise, for the endobacteria, two OTUs were affiliated to *Lactobacillus* (Firmicutes). Finally, the most frequently found OTUs in galleries exhibit phylogenetic relationships with *Pseudoxanthomonas*, *Gilvibacter*, *Terriglobus*, *Lactobacillus* and *Raoultella*. Furthermore, some OTUs highly abundant in the endomicrobiome have also been recovered from the galleries.

Bacterial community comparison between sampled environments. A Venn diagram was also constructed to visualize the partition of the OTUs across the different environment types (Fig. 4). As mentioned before, more OTUs were found associated with the endomicrobiome. Some OTUs are shared between the different niches, as observed in the heat map (Fig. 3). One important observation is that there is no OTU shared only between the ectomicrobiome and endomicrobiome, further highlighting the difference in bacterial communities between the surface of the cuticle and the interior of the insect body. Moreover, few OTUs are shared between the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries, as well as between the endomicrobiome and the microbiome of the galleries.

To ascertain whether different bacterial communities were distributed along the axes of variation, a principal coordinate analysis (PCoA) was performed. Figure 5 shows how the different bacterial populations are distributed. The first axis (P1) explains 79.1% of the variation and clearly distinguishes the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries from the endomicrobiome. However, this axis doesn't differentiate the ectomicrobiome and the galleries. The second axis (P2) explains 13.7% of the variation and mostly influences the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries. Together, these axes explain 92.7% of the variability observed between sampled environments. The PCoA analysis clearly distinguishes among the three environments, highlighting once again their specific divergence.

Discussion

The aim of this work was to characterize the bacterial microbiome associated with the eastern larch beetle. We examined the diversity of the ecto- and endomicrobiome of *D. simplex* adults. And since the immediate surroundings in which the beetles live may also influence their microbiome, the microbial diversity of the galleries from which the insects were sampled was also investigated. Such microorganisms

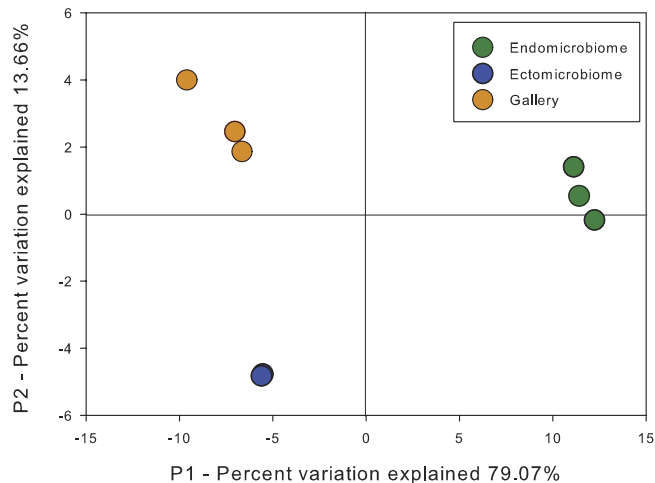


Figure 5. Principal coordinates analysis (PCoA) of bacterial communities associated with *Dendroctonus simplex* using Fast UniFrac. The percentages of variation explained by each axis are shown in parentheses. Equal sampling depths were used for each sample.

could have an impact on the eastern larch beetle's microbiome²². To identify the widest bacterial diversity possible, the 16S rRNA was sequenced by pyrosequencing, using the universal primer pair 28F-519R to cover the variable V1-V3 regions, widely used for the identification of bacteria. The V2 region is one of the two regions that provides the most accurate taxonomic classification with the lowest error rate³⁴. The rarefaction curves for these samples tend toward an asymptote, showing that the identified diversity was fully suitable for the aims of this study. However, a higher number of sequences would be necessary to detect all diversity associated with the endomicrobiome. It is noteworthy that the experiment was repeated the following year with insects sampled at the same location, and obtained results fully validated those presented here (unpublished).

In order to compare bacterial diversity between samples, diversity indexes were calculated (Table 1). The Shannon index lends importance to the rare OTUs and is sensitive to their abundance. In contrast, the Ace index does not give a greater importance to OTUs with fewer sequences and thus constitutes an appropriate diversity measure when the number of OTUs to analyze is small⁴¹. To better understand the diversity of the samples, both indexes were used. Shannon's diversity index showed a significant difference between the three environments, highlighting the specific bacterial communities identified. However, Ace showed a significant difference between the endomicrobiome and the two other conditions, but not between the ectomicrobiome and the microbiome associated to galleries. These results may indicate that diversity observed between the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries is influenced by the non-abundant OTUs. In the literature, a large number of bacteria have been isolated from gut of several insect species, revealing its diversity^{3,8,42,43}. Because many bacteria are significant factors for cellulose metabolism and for the acquisition of various nutrients, bacterial diversity of endomicrobiome of insects should be more complex. Despite the fact that some bacteria associated to bark beetles were previously recovered in the oral secretions or mouthparts^{15,44}, our results shown for the first time the presence of microbiome associated to the cuticle of the *D. simplex* adults. Some bark and ambrosia beetles possess mycangia, which are transport structures for symbiotic bacteria and fungi⁴⁵. However, the eastern larch beetle is one of the bark beetle species without mycangia⁴⁵. Thus, the associated bacteria may be carried on the cuticle of an insect, probably under the elytra (unpublished observations). The absence of bacterial transportation structure could explain the lower diversity related to the ectomicrobiome compare to that of the endomicrobiome of the eastern larch beetles.

Pseudomonas sp., *Rahnella* sp., *Serratia* sp., *Pantoea* sp. and *Erwinia* sp. have been previously detected and isolated from several *Dendroctonus* species^{12,13,46,47}. Experiments have shown that some of these bacteria can reduce terpene concentrations^{12,46}. A community metagenomic analysis of the mountain pine beetle (*D. ponderosae*) revealed that the majority of genes responsible for terpene degradation were associated with bacteria from the genera *Pseudomonas* and *Rahnella*¹³. Furthermore, *Pseudomonas* species produce a large variety of antifungal metabolites⁴⁸⁻⁵⁰. Because the antifungal production is one of the significant roles played by symbiotic bacteria across the *Dendroctonus* genus, it is possible that *Pseudomonas* sp. associated with *D. simplex* are also involved in that function^{16,17}. Consequently, terpene degradation and the production of antifungal metabolites might explain the presence of those bacteria to the *D. simplex* adult ectomicrobiome. Abundant bacteria found associated to the endomicrobiome were almost all Gammaproteobacteria, with also Firmicutes. In the phylogenetic tree (Fig. 3), the majority of endomicrobial OTUs are divergent from known bacterial species present in Genbank. These well-delineated

OTUs might belong to novel bacterial genera or/and species. Enterobacteriaceae bacteria have been already found in beetle's gut, where they were implicated in nitrogen-fixing processes and cellulolytic activities^{7–9,43}. *Pseudoxanthomonas*, *Gilvibacter*, *Terriglobus* and *Raoultella* are also associated with the gut of several *Dendroctonus* species^{8,10}. It is thus possible that some of these apparently new identified bacteria are involved in important nutritional roles. No shared bacterial genus was observed between the ectomicrobiome and endomicrobiome of *D. simplex*, which suggests that these distinct populations play exclusive roles, supporting a symbiotic implication.

Data observed are supported by the diversity analysis performed with mothur and Fast UniFrac. The environmental cluster regrouped the ectomicrobiome and the galleries sample closer together, thus clearly distinguishing the endomicrobiome. The Fast UniFrac analysis is based on the phylogeny and the relative abundance of the identified OTUs in each environment. Clearly, bacteria found on the surface of the insect cuticle and the interior of the insect body, are phylogenetically dissimilar, most probably because of environmental selection. The galleries and the ectomicrobiome cluster closer together, reflecting some overlap of the bacterial genera previously observed. Still, the PCoA analysis clearly distinguishes the three ecological niches (Fig. 5). The difference in the bacterial OTUs identified in the ectomicrobiome and the endomicrobiome was to be expected because of the difference in the environment they were recovered from. Surprisingly, the bacterial OTUs identified in the ectomicrobiome and the microbiome of the galleries harbor substantial differences, which, once again, reflect the high specificity of the bacterial communities identified in this study. This finding could indicate some selection of bacteria by the insect or a pressure from the environment. Altogether, our results indicate a specific organization between the bacterial communities. *D. simplex* also play a role as a vector of colonization of new ecological niches for microbes. Therefore, co-evolution may occur between the insect and its microbiome.

Finally, while significant bacterial diversity was found in the three niches investigated, a limited number of OTUs were predominant in each, with specific bacteria related to each of these ecological niches. Such a structured organization strongly suggests evolved specific interactions between *D. simplex* and its microbiome. Probably associated bacteria play different roles in each *D. simplex* environment, all of which may be complementary to the success of a beetle colonization attempt. The beetles used for this study were pioneers, as they were first to colonize the host tree. From a fitness perspective, these beetles should have carried the microorganisms conferring benefits related to initial host colonization.

This study is the first to report an association between the eastern larch beetle and a bacterial community. Moreover, it is the first to distinguish the ectomicrobiome and endomicrobiome of an insect and revealed significant differences. To get a complete picture of the microorganisms associated with *D. simplex*, investigation of the eukaryotic microbiome should be addressed. These findings will lead to the complete characterization of the eastern larch beetle symbiotic complex. Future directions will aim to isolate identified bacteria in order to investigate the functions in which they are involved.

References

1. Popa, V., Déziel, E., Lavallée, R., Bauce, E. & Guertin, C. The complex symbiotic relationships of bark beetles with microorganisms: A potential practical approach for biological control in forestry. *Pest Manag. Sci.* **68**, 963–975 (2012).
2. Brownlie, J. C. & Johnson, K. N. Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol.* **17**, 348–354 (2009).
3. Gibson, C. M. & Hunter, M. S. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecol. Lett.* **13**, 223–234 (2010).
4. Six, D. L. The bark beetle holobiont: Why microbes matter. *J. Chem. Ecol.* **39**, 989–1002 (2013).
5. Miao, X.-X., Gan, M. & Ding, C.-D. The role of bacterial symbionts in amino acid composition of black bean aphids. *Entomol Sinica* **10**, 167–171 (2003).
6. Douglas, A. E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Funct. Ecol.* **23**, 38–47 (2009).
7. Bridges, J. R. Nitrogen-fixing bacteria associated with bark beetles. *Microb. Ecol.* **7**, 131–137 (1981).
8. Morales-Jimenez, J. *et al.* Nitrogen-fixing and uricolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus rhizophagus* and *Dendroctonus valens* (Curculionidae: Scolytinae). *Microb. Ecol.* **66**, 200–210 (2013).
9. Morales-Jimenez, J., Zuniga, G., Villa-Tanaca, L. & Hernandez-Rodriguez, C. Bacterial Community and Nitrogen Fixation in the Red Turpentine Beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Microb. Ecol.* **58**, 879–891 (2009).
10. Morales-Jimenez, J., Zuniga, G., Ramirez-Saas, H. C. & Heranadez-Rodriguez, C. Gut-associated bacteria throughout the life cycle of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and their cellulolytic activities. *Microb. Ecol.* **64** (2012).
11. Phillips, M. A. & Croteau, R. B. Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci.* **4**, 1360–1385 (1999).
12. Adams, A. S., Boone, C. K., Bohlmann, J. & Raffa, K. F. Responses of bark beetle-associated bacteria to host monoterpenes and their relationship to insect life histories. *J. Chem. Ecol.* **37**, 808–817 (2011).
13. Adams, A. S. *et al.* Mountain pine beetles colonizing historical and naïve host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes contributing to terpene metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3468–3475 (2013).
14. Hurst, G. D. D. & Darby, A. C. in *Insect Infection and Immunity Evolution, Ecology and Mechanisms* (eds J. Rolff & S. E. Reynolds) Ch. 8, 119–136 (Oxford University Press, 2009).
15. Cardoza, Y. J., Klepzig, K. D. & Raffa, K. F. Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi. *Ecol. Entomol.* **31**, 636–645 (2006).
16. Aanen, D. K., Slippers, B. & Wingfield, M. J. Biological pest control in beetle agriculture. *Trends Microbiol.* **17**, 179–182 (2009).
17. Scott, J. J. *et al.* Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science* **322**, 63 (2008).
18. Scarborough, C. L., Ferrari, J. & Godfray, H. C. J. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* **310**, 1781 (2005).
19. Langor, D. W. & Raske, A. G. A history of the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* (Coleoptera: Scolytidae), in North America. *Great Lakes Entomol.* **22**, 139–154 (1989).
20. Langor, D. W. & Raske, A. G. The eastern larch beetle, another threat to our forests (Coleoptera: Scolytidae). *Forest. Chron.* **65**, 276–279 (1989).

21. Langor, D. W. & Raske, A. G. Emergence, host attack, and overwintering behavior of the eastern larch beetle, *Dendroctonus simplex* LeConte (Coleoptera: Scolytidae), in Newfoundland. *Can. Entomol.* **119**, 975–983 (1987).
22. Hulcr, J. *et al.* Presence and diversity of *Streptomyces* in *Dendroctonus* and sympatric bark beetle galleries across North America. *Microb. Ecol.* **61**, 759–768 (2011).
23. Kikuchi, Y., Hosokawa, T. & Fukatsu, T. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4308–4316 (2007).
24. Steinhaus, E. A. *Insect microbiology. An account of the microbes associated with insects and ticks with special reference to the biologic relationships involved.* 763 (Comstock Publishing Company Inc., 1946).
25. Kikuchi, Y. Endosymbiotic bacteria in insects: Their diversity and culturability. *Microbes Environ.* **24**, 195–204 (2009).
26. Hulcr, J. *et al.* Mycangia of ambrosia beetles host communities of bacteria. *Microb. Ecol.* **64**, 784–793 (2012).
27. Frank, J. A. *et al.* Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2461–2470 (2008).
28. Fernandez, A. *et al.* How stable is stable? Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 36973704 (1999).
29. Schloss, P. D. *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–7541 (2009).
30. Comeau, A. M., Harding, T., Galand, P. E., Vincent, W. F. & Lovejoy, C. Vertical distribution of microbial communities in a perennially stratified Arctic lake with saline, anoxic bottom waters. *Sci. Rep.* **2**, 1–10 (2012).
31. Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. & Knight, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200 (2011).
32. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**, D590–D596 (2013).
33. Schmitt, S. *et al.* Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *The ISME Journal* **6**, 564–576 (2012).
34. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5261–5267 (2007).
35. Tamura, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739 (2011).
36. Lozupone, C., Hamady, M. & Knight, R. UniFrac - An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* **7**, 371–385 (2006).
37. Lozupone, C. & Knight, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8228–8235 (2005).
38. Saeed, A. I. *et al.* TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**, 374–378 (2003).
39. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797 (2004).
40. Price, M. N., Dehal, P. S. & Arkin, A. P. FastTree 2 – Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* **5**, e9490 (2010).
41. Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A. & F. M. B. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**, 1–11 (2003).
42. Dillon, R. J., Vennard, C. T. & Charnley, A. K. A Note: Gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 759–763 (2002).
43. Morales-Jimenez, J., Zuniga, G., Ramirez-Saas, H. C. & Heranadez-Rodriguez, C. Gut-associated bacteria throughout the life cycle of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and their cellulolytic activities. *Microb. Ecol.* **64**, 268–278 (2012).
44. Cardoza, Y. J., Vasanthakumar, A., Suazo, A. & Raffa, K. F. Survey and phylogenetic analysis of culturable microbes in the oral secretions of three bark beetle species. *Entomol. Exp. Appl.* **131**, 138–147 (2009).
45. Wood, S. L. *Bark and ambrosia beetles of South America (Coleoptera: Scolytidae)*. (Brigham Young University, 2007).
46. Boone, C. K. *et al.* R 838. *J. Chem. Ecol.* **39**, 1003–1006, doi: 10.1007/s10886-013-0313-0 (2013).
47. Aylward, F. O. *et al.* Convergent bacterial microbiotas in the fungal agricultural systems of insects. *mBio* **5**, e02077–02014 (2014).
48. Naik, P. R. & Sakthivel, N. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res. Microbiol.* **157**, 538–546 (2006).
49. Seema, D. *et al.* Production, purification, and characterization of antifungal metabolite from *Pseudomonas aeruginosa* SD12, a new strain obtained from tannery waste polluted soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 674–683 (2012).
50. Park, G. K., Lim, J. H., Kim, S. D. & Shim, S. H. Elucidation of antifungal metabolites produced by *Pseudomonas aurantiaca* IB5-10 with broad-spectrum antifungal activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 326–330 (2012).

Acknowledgements

We would like to thank Marie-Christine Groleau, Fabrice Jean-Pierre, Valentin Popa, Julie Wilkin and Vincent Peck for the technical assistance. This work was supported by the iFor Consortium (NSERC) and ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs Quebec (DGPS) to CG. AAD was supported by a Wladimir A. Smirnoff Fellowship.

Author Contributions

A.A.D., E.D. and C.G. conceived and designed the experiments. A.A.D., A.B. and C.G. performed the experiments. A.A.D., P.C., J.P.B., E.D., C.G. analysed the data. A.A.D. and J.P.B. prepared the figures. E.D. and C.G. contributed reagents, materials and analysis tools. A.A.D., J.P.B., E.D. and C.G. wrote the main manuscript text. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Durand, A.-A. *et al.* Surveying the endomicrobiome and ectomicrobiome of bark beetles: The case of *Dendroctonus simplex*. *Sci. Rep.* **5**, 17190; doi: 10.1038/srep17190 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>