



HAL
open science

Biophysique environnementale des insectes endophytes.

Sylvain Pincebourde

► **To cite this version:**

Sylvain Pincebourde. Biophysique environnementale des insectes endophytes.. Ecologie, Environnement. Université François Rabelais - Tours, 2005. Français. NNT: . tel-00108243

HAL Id: tel-00108243

<https://theses.hal.science/tel-00108243>

Submitted on 20 Oct 2006

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

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



UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS - TOURS

École Doctorale : Santé, Sciences et Technologies
Année Universitaire : 2005/2006

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOURS

Discipline : Sciences de la Vie
Présentée et soutenue publiquement par :

SYLVAIN PINCEBOURDE

Le 5 décembre 2005

BIOPHYSIQUE ENVIRONNEMENTALE DES INSECTES ENDOPHYTES

Directeur de thèse :
Professeur Jérôme Casas

Membres du Jury

Mr Jérôme CASAS	Professeur, IRBI, Université François Rabelais, Tours
Mr Stephan HÄTTENSCHWILER	Docteur, CNRS, CEFE, Montpellier
Mr Brian HELMUTH	Professeur, Université de Caroline du Sud, Columbia
Mr Claudio LAZZARI	Professeur, IRBI, Université François Rabelais, Tours
Mr Hervé SINOQUET	Docteur, INRA, PIAF, Clermont-Ferrand



UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS - TOURS

École Doctorale : Santé, Sciences et Technologies
Année Universitaire : 2005/2006

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOURS

Discipline : Sciences de la Vie
Présentée et soutenue publiquement par :

SYLVAIN PINCEBOURDE

Le 5 décembre 2005

BIOPHYSIQUE ENVIRONNEMENTALE DES INSECTES

ENDOPHYTES

Directeur de thèse :
Professeur Jérôme Casas

Membres du Jury

Mr Jérôme CASAS	Professeur, IRBI, Université François Rabelais, Tours
Mr Stephan HÄTTENSCHWILER	Docteur, CNRS, CEFÉ, Montpellier
Mr Brian HELMUTH	Professeur, Université de Caroline du Sud, Columbia
Mr Claudio LAZZARI	Professeur, IRBI, Université François Rabelais, Tours
Mr Hervé SINOQUET	Docteur, INRA, PIAF, Clermont-Ferrand

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement mon mentor durant ces dernières années, Jérôme Casas. Pour moi, la ‘révélation’ est arrivée lors de mon entretien avec toi pour mon stage de maîtrise, et je te remercie de ta confiance en m’ayant accueilli dans ton équipe. Je te remercie, Jérôme, pour ton aide très largement présente durant ces années, ta disponibilité sans failles pour tes doctorants, tes conseils, les très nombreuses discussions enrichissantes (surtout pour moi !) que nous avons eu, aussi bien sur des sujets ‘sciences’ que du domaine privé. Tu auras largement contribué positivement à mon épanouissement personnel, et à mon évolution en tant que scientifique.

Je remercie sincèrement Stephan Hättenschwiler et Brian Helmuth pour leur intérêt, leur gentillesse et pour avoir accepté d’être les rapporteurs de mon travail de thèse. Je remercie également Hervé Sinoquet et Claudio Lazzari, non seulement pour avoir accepté d’être examinateur de mon travail mais aussi pour leur aide tout au long de ces trois années. Je remercie Hervé Sinoquet, Ela Frak, Didier Combes et Jean Luc Regnard pour leur collaboration efficace et riche en enseignements, leur accueil chaleureux lors de mes passages dans leur laboratoire (INRA PIAF Clermont Ferrand, INRA Lusignan et INRA ENSAM Montpellier) et leur aide matérielle et scientifique.

Un grand nombre de personnes m’ont apporté un soutien scientifique et matériel durant ces trois années (dans le désordre) : Christelle Magal, Eric Thibout, Dominique Pierre, Marc Théry, Nicolas Donès, Olivier Dangles, David Giron, Nathalie Guivarc’h, Xavier Crété, Thaïana Rivière, Géraldine Groussier, Sophie Delaïde. Un grand merci aussi à toutes les personnes qui ont accepté de s’occuper de l’arrosage des pommiers durant mes absences: Aurore, Simon, Magda, Fanny, David, Fabrice, Arnold. Je remercie chaleureusement

Christine, Sonia et Dominique pour leur efficacité et leur gentillesse au moment de faire les ordres de mission (au dernier moment comme il se doit !).

Je remercie également Francesco Pennachio pour m'avoir permis de participer à l'école doctorale européenne en biotechnologie de l'insecte, ainsi que les membres du « board of professors » avec lesquels j'ai pu interagir, Klaus Hoffmann, Charles Godfray et Jim Hardy.

Une mention très spéciale pour Aurore, qui aura réussi à me supporter pendant ces trois années, et sans qui cette thèse n'aurait pas été aussi palpitante ! Olivier, qui m'aura énormément apporté en souvenirs impérissables, depuis l'aventure Costa Rica aux séances de films excellents de M6 le mardi soir ! Je remercie également mes voisins de bureau (passés et présents), David, Arnold, Aurélie, Fabienne, Bruno, Sébastien, pour les bons souvenirs que je garde (et les tortures mentales aussi !). Et enfin Jean et Dominique pour avoir fait don à la science de leur pommier, et surtout pour leur soutien, leur aide, leur gentillesse et leur accueil très chaleureux durant l'été 2004 qui restera inoubliable !

Merci enfin à toute la bande de jeun's, pour les soirées, les pique niques à la Rochecorbon etc. Merci à l'ensemble de l'IRBI pour la bonne humeur générale, et la bonne ambiance de travail. Je tient également à remercier mes parents pour leur soutien, ainsi que toute ma famille et mes amis d'enfance qui ont été particulièrement patient et indulgent durant ces trois dernières années...

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

CHAPITRE I. 5

Leaf miner-induced changes in leaf transmittance cause variations
in insect respiration rates

INTRODUCTION	6
MATERIALS AND METHODS	8
<i>Biology of the leaf miner</i>	8
<i>Optical properties</i>	10
<i>Insect respiration rate</i>	10
<i>Insect body temperature</i>	12
<i>Statistical analysis</i>	12
RESULTS	13
<i>Transmittance of upper surfaces</i>	13
<i>Body temperature and respiration rate</i>	14
DISCUSSION	16

CHAPITRE II. 21

The CO₂ released by leaf mining insects induces stomatal closure
and benefits photosynthesis

INTRODUCTION	22
MATERIALS AND METHODS	23
<i>Plants and insects</i>	23
<i>Leaf and mine gas exchange</i>	24
<i>Intercellular air space CO₂ resistance of leaves and mines</i>	26
<i>Insect respiration</i>	27
<i>Modelling CO₂ diffusion inside a leaf and a mine</i>	27
<i>Model simulations</i>	30

<i>Statistical analysis</i>	31
RESULTS	32
<i>Miner effects on $g_{s\max}$, $A_{net\max}$, R_d and r_i</i>	32
<i>Miner effects on stomatal conductance and photosynthesis light responses</i>	34
<i>Insect CO_2 release in response to increasing irradiance</i>	34
<i>Predicted C_c light response of mines and intact leaves</i>	36
<i>Effects of the miner on the CO_2 diffusive transport</i>	37
DISCUSSION	40
CHAPITRE III.	45
<hr/>	
Multitrophic biophysical budgets: Thermal ecology of an intimate herbivore insect-plant interaction	
INTRODUCTION	46
MATERIALS AND METHODS	48
<i>Insects and plants</i>	48
<i>The leaf temperature model</i>	49
The net radiation budget of a leaf	49
The sensible heat budget of a leaf	50
The latent heat budget of a leaf	50
The leaf temperature calculation	51
<i>The mine temperature model</i>	52
The net radiation budget of a mine	52
The sensible heat budget of a mine	52
The latent heat budget of a mine	53
The mine temperature calculation	54
<i>Predicting the larva's body temperature</i>	57
<i>Optical properties of intact leaves and mine tissues</i>	57
<i>Stomatal conductance of mines and intact leaves</i>	59
Stomatal conductance responses to climatic alterations	59
Leaf and mine maximal stomatal conductance	60
Test of the Jarvis hypothesis	60
<i>Testing the models</i>	60
Preparation of the climatic chamber	60

Measurement of leaf and mine temperatures	61
<i>Model simulations</i>	63
<i>Statistical analysis</i>	65
RESULTS	65
<i>Parameter estimation: optical properties</i>	65
<i>Parameter estimation: stomatal conductance</i>	67
<i>Validity of the models</i>	70
The Jarvis' hypothesis	70
The leaf temperature model	71
The mine temperature model	71
<i>Model exploration: influence of climatic variables on mine temperature</i>	73
Influence of air temperature	73
Influence of relative humidity	73
Influence of radiation level	73
Effects of wind speed	75
<i>Model exploration: influence of biotic parameters on mine temperature</i>	75
Effects of plant related modifications	75
Energy budgets	76
<i>Model exploration: larval body temperature</i>	78
DISCUSSION	79
<i>Assumptions and validity of the models</i>	79
<i>Feedback loops between biotic and abiotic parameters</i>	80
<i>The leaf miner's thermal environment: profitable but risky?</i>	81
<i>Evolutionary ecology of the leaf mining habit</i>	82
<i>Multitrophic biophysical heat budgets</i>	83
DISCUSSION GÉNÉRALE	85
<hr/>	
LA PHYSIOLOGIE FONCTIONNELLE DU MICROHABITAT DE <i>P. BLANCARDELLA</i>	87
<i>Les modifications physiques et physiologiques du végétal</i>	87
<i>Les conséquences physiques et écologiques du choix du lieu de ponte de la mère</i>	88
<i>Coûts et bénéfices pour le végétal</i>	89
<i>La mine : phénotype étendu de la larve ?</i>	91
LA DYNAMIQUE TEMPORELLE DE L'ENVIRONNEMENT THERMIQUE D'UNE MINE	92
<i>Le microclimat dépend du stade larvaire</i>	92

<i>La dynamique d'apparition des fenêtres de nourrissage</i>	92
<i>La dynamique du comportement stomatique</i>	96
<i>La durée du développement larvaire : les effets additifs</i>	98
ÉVOLUTION DES SENSIBILITÉS THERMIQUES DES ENDOPHYTES ET DE LEURS PARASITOÏDES	99
<i>Généralités sur les sensibilités thermiques</i>	99
<i>Variabilité des sensibilités thermiques au niveau intraspécifique</i>	100
<i>Analyse comparative : endophytes versus ectophytes</i>	101
Méthode d'analyse comparative	102
Résultats de l'analyse comparative	103
Les limites de l'analyse comparative	105
Patron évolutif des endophytes	106
<i>Évolution des sensibilités thermiques des parasitoïdes d'endophytes</i>	107
L'analyse comparative	107
Évolution des parasitoïdes d'endophytes	110
INGÉNIERIE DE L'ÉCOSYSTÈME : LA MINE À UN NIVEAU INTERSPÉCIFIQUE	112
<i>Le concept d'ingénieur de l'écosystème</i>	112
<i>Mineurs, galligènes et rouleurs : ingénieurs cryptiques de l'écosystème ?</i>	112
<i>Les avantages pour les utilisateurs secondaires des mines</i>	113
IMPACT DES CHANGEMENTS CLIMATIQUES SUR LE DÉVELOPPEMENT DES INSECTES	
MINEURS DE FEUILLE	115
<i>Les effets de l'élévation de la concentration atmosphérique en CO₂</i>	115
<i>Les effets de l'élévation de la température</i>	116
<i>Effets interactifs de l'élévation de la teneur en CO₂ et de la température</i>	117
CONCLUSIONS	121
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123
ANNEXE I.	139
Mesure ciblée des échanges gazeux avec la Li-Cor 6400: utilisation de l'huile végétale	
ANNEXE II.	145
Caractérisation, calibration et contrôle du microclimat de l'enceinte climatique	

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Aucun organisme, qu'il soit animal ou végétal, ne peut respirer et vivre sans échanger ou transformer de l'énergie et de la matière. L'environnement biophysique de l'organisme influence largement les aspects qualitatifs et quantitatifs de ces transferts d'énergie et de matière. L'environnement biophysique comprend à la fois l'environnement abiotique, i.e. le climat (température, radiations, humidité, vent etc.), et l'environnement biotique, i.e. d'autres organismes à proximité (Gates 1980 ; Campbell & Norman 1998 ; Nobel 1999). Les organismes interagissent avec leur environnement biophysique à travers leurs propriétés physiques et physiologiques. Par exemple, la capacité d'absorption des radiations solaires de la surface de l'organisme détermine la quantité d'énergie solaire captée par l'organisme et, chez les plantes, l'activité photosynthétique (Gates 1980). La température d'un organisme ectotherme est le résultat net des transferts d'énergie entre l'organisme et son environnement. Les variations de température corporelle indiquent donc des changements dans l'environnement biophysique ou bien dans la manière avec laquelle l'organisme ectotherme interagit avec son environnement. Par exemple, la température corporelle d'une moule est plus froide lorsqu'elle est située dans un groupe d'individus qu'en étant seule sur un rocher, la présence des congénères modifiant le microclimat radiatif (Helmuth 1998).

Les facteurs qui affectent les transferts d'énergie ont un impact direct sur la performance des organismes. Chez les organismes ectothermes, la température corporelle conditionne la plupart des fonctions biologiques telles que le taux métabolique de l'organisme (e.g. van Loon *et al.* 2005), le taux de nutrition (e.g. Kingsolver 2000), ou encore la durée du développement larvaire (e.g. Gilbert & Raworth 1996). La plupart des ectothermes montrent des préférences thermiques pour lesquelles leurs performances physiologiques sont optimisées (Huey & Kingsolver 1989). La quantification des interactions de l'organisme avec son environnement physique est donc une clé pour mieux comprendre le fonctionnement des espèces dans un environnement variable. Deux stratégies sont généralement identifiées. L'organisme peut (i) choisir dans son environnement le microclimat qui satisfera ses préférences, ou (ii) modifier la structure physique de son microclimat actuel de sorte à répondre à ses besoins thermiques. Les constructions animales font partie de ce deuxième cas. La capacité à restructurer l'environnement physique abiotique afin d'atteindre un microclimat plus favorable a été décrite chez de nombreuses espèces. Par exemple, l'architecture remarquable de certaines termitières africaines permet à leurs habitants de se développer dans un microclimat à température favorable et relativement stable en offrant la capacité de ventilation des galeries (Korb 2003 ; Turner 2004). L'architecture de la termitière semble être en fait le résultat d'un compromis entre thermorégulation et échanges gazeux (Korb &

Linsenmair 1999, 2000). Toutefois, on ne connaît encore que peu de choses sur la capacité de la plupart des organismes à modifier l'environnement biotique pour atteindre un microclimat en accord avec leurs préférences thermiques.

Les insectes endophytes sont des modèles d'étude adéquats pour analyser ces interactions biotiques dans lesquelles l'écologie physique de l'organisme joue un rôle prépondérant. Les endophytes sont des phytophages vivant à l'intérieur du végétal dont ils se nourrissent. Le style de vie endophyte prend plusieurs formes dans la nature : les insectes galligènes, les insectes mineurs de feuilles ou encore les insectes foreurs de tiges. Ces insectes modifient localement la structure du végétal. Certaines modifications sont parfaitement visibles telles que les changements de forme et de coloration des feuilles. Des modifications physiologiques peuvent aussi intervenir, comme par exemple modifier la perméabilité du végétal aux échanges gazeux (vapeur d'eau, oxygène, dioxyde de carbone). Les insectes endophytes doivent donc vivre dans un microclimat radicalement différent de celui des insectes ectophytes. A ma connaissance, seule l'étude de Turner (2000) tente d'expliquer comment la structure d'une construction d'un endophyte, une galle, peut influencer la température à l'intérieur du microhabitat d'un point de vue biophysique. Toutefois, l'auteur reconnaît lui-même que son approche est purement spéculative et sans grand fondement expérimental, et que son objectif était avant tout d'apporter des hypothèses novatrices dans le domaine. L'approche biophysique permet cependant à Turner (2000) de prédire que la température dans une galle doit être de quelques degrés plus chaude que l'air ambiant. Ses prédictions correspondent en partie aux mesures expérimentales de température de galles réalisées par Layne (1993).

Les objectifs de cette thèse sont de mesurer les modifications physiques et physiologiques du végétal provoquées par un insecte endophyte, puis de tester en retour l'impact de ces modifications sur l'environnement thermique de l'insecte. L'approche mécanistique de cette thèse permet d'identifier et de quantifier avec précision les effets à l'échelle de la feuille. Le modèle d'étude est le lépidoptère mineur de feuille *Phyllonorycter blancardella* (Gracillariidae). La larve solitaire effectue l'intégralité de son développement à l'intérieur d'une mine de la feuille du pommier (*Malus communis*). La mine est légèrement bombée par rapport à la surface de la feuille. Des petites tâches blanches, appelées 'fenêtres de nourrissage', caractérisent la surface supérieure de la mine et résultent de l'activité de nutrition de la larve. Le tégument inférieur de la mine est légèrement plissé et verdâtre. Nous verrons par la suite l'importance de ces 'détails' dans un budget global de température.

Les chapitres 1 et 2 identifient et quantifient les modifications physiques et physiologiques des tissus végétaux au niveau de la mine. Dans le **chapitre 1**, les propriétés optiques des fenêtres de nourrissage sont mesurées. Ce chapitre décrit le microclimat radiatif à l'intérieur de la mine et évalue son impact sur la température corporelle de la larve et son métabolisme respiratoire. Le **chapitre 2** étudie l'impact du rejet de CO₂ respiratoire et de l'activité alimentaire de la larve sur le fonctionnement des stomates de la mine. Le **chapitre 3** décrit et quantifie les mécanismes biophysiques influençant la température d'une mine. Un budget thermique prédit la température à l'intérieur de la mine à partir de nombreux paramètres physiques et physiologiques modifiés par la larve et des facteurs climatiques. Ce chapitre teste les hypothèses selon lesquelles (i) les modifications des propriétés optiques de la mine entraînent une hausse ou une baisse significative de la température dans la mine par rapport à la celle de la feuille, et (ii) l'impact de la larve sur l'ouverture stomatique entraîne une rétention ou une perte de chaleur latente accompagnant le gain/perte de vapeur d'eau et induisant une hausse/baisse de température dans la mine.

L'ensemble des résultats est discuté sur plusieurs aspects, des mécanismes biophysiques aux conséquences écologiques et évolutives. Le rôle de la mine sera aussi explicité à différentes échelles spatiales, du microhabitat à l'échelle de la canopée d'un arbre. Enfin, nous évaluerons l'impact des changements climatiques sur le développement des insectes mineurs de feuille.

CHAPITRE I.

Leaf miner-induced changes in leaf transmittance
cause variations in insect respiration rates

Pincebourde Sylvain & Casas Jérôme

Journal of Insect Physiology, sous presse.

INTRODUCTION

Activity in all living organisms is highly constrained by temperature. Most biological functions of ectotherms are under the influence of body temperature (reviewed in Chown & Nicolson 2004), such as metabolic rate (e.g. van Loon *et al.* 2005; Neven 2000), feeding rate (e.g. Kingsolver 2000) and development rate (e.g. Gilbert & Raworth 1996). Two general adaptive mechanisms are used by organisms to cope with the wide and unpredictable range of ambient temperatures they experience: behavioural thermoregulation, e.g. the organism moves from a place to another which is more thermally favourable (May 1979; Heinrich 1999); Physiological thermoregulation, e.g. heat production by metabolic activity (e.g. Bartholomew & Heinrich 1978; Ruf & Fiedler 2000) and production of heat shock proteins allowing survival under extreme temperatures (e.g. Dahlhoff & Rank 2000). Behavioural and physiological thermoregulations are often used together (e.g. Casey 1992; Van Dyck *et al.* 1997). The metabolism of ectotherms is the result of complex interactions between environmental parameters, behavioural choices, and the physiological state of the organism. Accurate understanding of behavioural and physiological ecology of an organism demands us to determine (i) the spatial scale allowing a complete evaluation of all environmental factors that impact the metabolism, (ii) the level of heterogeneity of the environment at this scale, and (iii) the existence of feedback loops between the animal and its environment. These aspects are detailed below.

The choice of study scale is clearly determinant in to find the environmental parameters altering significantly the insect metabolism. Body temperature is strongly altered by changes in the organism's physical environment, inducing a direct relationship between environmental parameters and the metabolism of the organism (Kingsolver 2000). The use of biophysical heat budgets in ecophysiology has been particularly useful to predict the body temperature of an organism in the field (e.g. Kingsolver 1979; Casey 1992; Helmuth 1998; Helmuth *et al.* 2005). This approach was revealed complex interactions between abiotic factors and physical properties of the organism in the determination of its body temperature at a microclimatic scale. The small size of insects allows them to exploit small scale variations of microclimate that are not available to larger animals. Consequently, there is a great diversity in the microclimatic conditions experienced by insects. Accurate identification and characterisation of the experienced microclimate at the proper scale is therefore necessary to quantify and interpret the metabolism of an insect species.

Quantification of spatial and temporal heterogeneity in the insect microclimate is a crucial pathway when studying physiological processes. In insect-plant interactions, the microclimate of an insect is closely related to that of the plant. The plant provides small organisms with a specific microclimate which is temporally and spatially variable (Willmer 1986). Leaf temperature can differ by several degrees from air temperature and a leaf surface is surrounded by a boundary layer of air which is nearly saturated for water vapour (Campbell & Norman 1998; Nobel 1999). For example, on clear days, the temperature of an apple leaf can reach 25 °C while air temperature is only 15 °C, but the same leaf can also be 10 °C colder than ambient air at air temperature 39 °C (Ferro & Southwick 1984). Relative humidity within cabbage leaf boundary layers, which range in thickness from several micrometers to 10 mm depending mainly on leaf size and wind speed, is about 20% higher than ambient air during summer days (Willmer 1986). Therefore, an insect resting on a leaf surface experiences a different microclimate than an insect living in ambient air. Although some studies have shown that insects clearly exploit the microclimatic variety of their food-plant by moving from a location to another within the plant during the day (Willmer 1986), the effects of leaf microclimate on metabolic rate of an insect resting on a leaf have never been directly measured. This is unfortunate as many studies on nutritional ecology of an insect feeding on a plant have yield wrong estimates of metabolic rates by neglecting the phyllosphere microclimate (van Loon *et al.* 2005).

Physiological feedbacks of feeding behaviour, related to nutrient acquisition, are well documented in insects (e.g. Edgecomb *et al.* 1994; Woods & Kingsolver 1999; Casas *et al.* 2005; for review see also Chown & Nicolson 2004), but very little is known about the existence of physical feedbacks which could be crucial for herbivores. The leaf microclimate is expected to be altered due to herbivore's attack as it modifies several leaf parameters that play a key role in a leaf heat budget. Characterisation of alterations in leaf microclimate and, subsequently, determination of their consequences for an insect's physiology might help to explain the evolution of feeding strategies. Externally-chewing feeders alter plant physiology and reduce leaf size (Zangerl *et al.* 2002). Leaf tying and leaf rolling insects modify leaf shape (Berenbaum 1978; Fitzgerald & Clark 1994; Fitzgerald *et al.* 1991). Herbivory by several sap sucking insects (acarids and aphids) could alter the leaf optical properties (Sylvain Pincebourde, personal observation). The feedback effects of such plant modifications on insect microclimate have however never been reported.

Leaf mining insects, as sessile organisms, are particularly suitable biological models to investigate the link between feeding pattern, microclimate and insect metabolism. Leaf

mining insects develop inside leaf tissues by tunnelling within to produce a structure called a mine, and feeding on the various chlorophyll-containing tissues within the leaf. Their feeding behaviour results in alteration of leaf coloration in the fed areas. In some species the mine appears brown (e.g. Raimondo *et al.* 2003) while in others the mine is greenish with white spots corresponding to the areas eaten (e.g. Djemai *et al.* 2000). The endophagous way of life of leaf mining insects has been assumed to protect them from radiation, especially harmful ultraviolet radiation, as well as protecting them against natural enemies (Connor & Taverner 1997).

We measured the changes in optical properties of mine tissues due to the feeding activity of the spotted tentiform leaf miner *Phyllonorycter blancardella* F. (Lepidoptera: Gracillariidae). We tested whether fed areas transmit more radiation than unfed areas within a mine. The effects of modifications in leaf optical properties on insect body temperature and respiration rate were investigated. We employed an infrared gas analyser to measure the CO₂ released by a larva under varying radiation level and when positioned below either uneaten tissues or fed areas. The method allowed us to study insect respiration under conditions as near as possible to the natural microclimate of the mine.

MATERIALS AND METHODS

Biology of the leaf miner

P. blancardella is a microlepidopteran herbivore with larval development divided into five instars (Pottinger & LeRoux 1971). During the first three sap feeding instars, larvae define the outline of their mine by separating the two leaf integuments. During the fourth and fifth instar larvae are tissue feeders and this feeding behaviour results in the formation of feeding windows (Djemai *et al.* 2000). Feeding windows are translucent patches remaining after tissues containing chlorophyll have been consumed (Fig. 1A). Feeding events are mainly located at the periphery of the mine, leaving out a relatively large unfed area in the centre of the mine (Djemai *et al.* 2000). The leaf miner was reared on one-year old apple seedlings (*Malus communis*) within a greenhouse under temperate conditions (daily natural variations: mean air temperature 22 °C, mean relative humidity 59.5 %, irradiance up to 718 W m⁻², and natural light/dark cycle 11:13 during experiments). Seedlings were watered daily with a nutritive solution (N:P:K 6:6:6). All experiments were made on last-instar larvae.

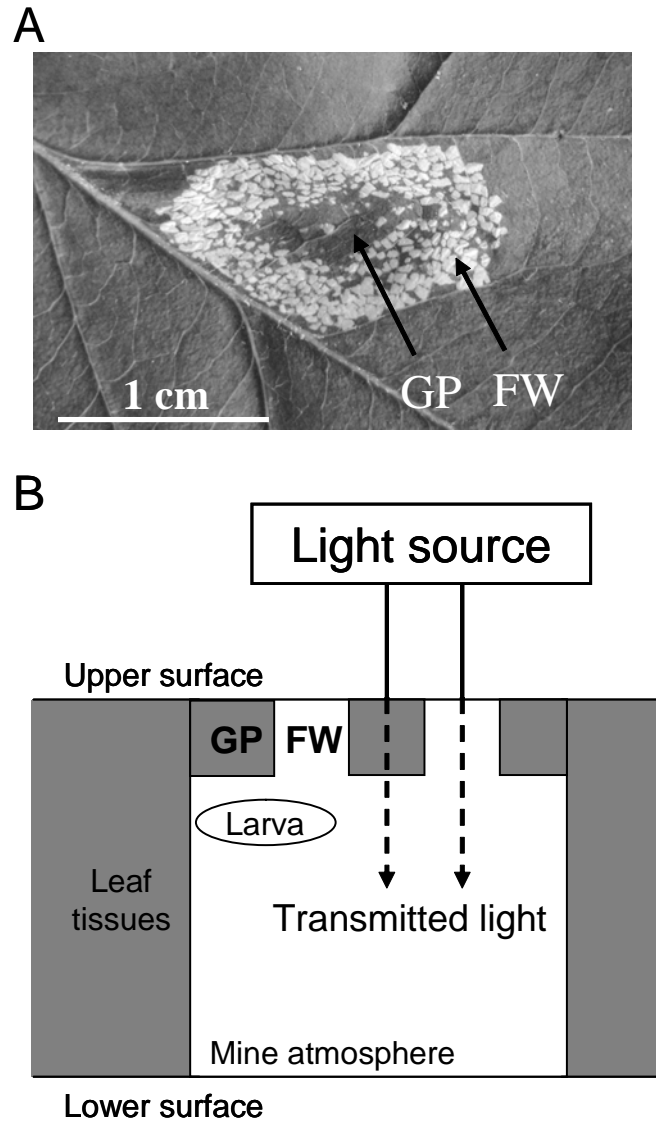


Figure 1. (A) Upper surface of a mine containing a larva of *Phyllonorycter blancardella*. Insect feeding activity results in the formation of feeding windows (FW). Green patches (GP) correspond to the chlorophyll-containing tissues of the mine. The particular feeding pattern of a larva leads to the appearance of a large unfed area in the middle of the mine surface. A mine contains only one larva. (B) Schematic cross section of a mine. We measured the portion of incoming radiation which is transmitted within the mine space by feeding windows (FW) and green patches (GP). A larva moves within the mine on the upper side such that it could be positioned below feeding windows or green patches as well.

Optical properties

Transmittance spectra of feeding windows and green patches (Fig. 1B) were measured using an Ocean Optics S2000 (Dunedin, FL, U.S.A.) directional spectroradiometer and a deuterium-halogen lamp DH-2000 relative to a 99 % (300-700 nm) reflectance standard (SpectralonTM). A directional spectroradiometer measures the amount of light transmitted perpendicularly to a surface. Transmittance was measured using a 1.5 mm diameter light emitter sensor equipped with a quartz window cut at 45° angle to avoid specular reflectance. The measured surface was illuminated from the top. A 1.5 mm diameter receptor sensor was positioned below the illuminated surface. Spectral measurements were made on freshly isolated upper integuments of last instar mines. The transmittance was determined at each wavelength from 300 to 850 nm on 43 feeding windows (from 20 different mines), 30 green patches (from the same 20 mines) and 50 intact leaf tissues (from 25 different intact leaves).

Insect respiration rate

The amount of CO₂ released by leaf miner larvae at different radiation levels was measured using the LI-6400 infrared gas analyzer (IRGA)-chamber system (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, U.S.A.). This system precisely measures the amounts of water vapour and CO₂ in the incoming air flux and in the air leaving the sample chamber. Temperature, relative humidity and CO₂ concentration within the sample chamber are under control. The computer associated to the IRGA system calculates assimilation or production of CO₂ by the sample using the general gas exchange formula of von Caemmerer and Farquhar (1981). A slow flow rate of 52 $\mu\text{mol s}^{-1}$ was used to improve the signal-to-noise ratio of the system (see Salvucci & Crafts-Brandner 2000). Respiration of single larvae was too low to be measured individually and a group of ten larvae was used for each measurement.

Mines of last instar larvae were excised and living larvae were collected. Each larva was placed in a separate open plastic capsule (7 mm in depth and 5 mm in diameter). The capsules were translucent and reflected less than 2 % incoming radiation. Four small holes (1mm in diameter) were made through the capsule wall to allow CO₂ to diffuse without resistance into the measuring chamber. The ten capsules were transferred into the LI-6400 leaf chamber. Conditions within capsules were therefore similar to that within the whole chamber. To recreate mine conditions within the capsules, relative humidity was high (maintained between 80 to 90%), capsule temperature as measured with a copper-constantan thermocouple (0.2

mm in diameter) inserted within the capsules was 25°C and CO₂ concentration was kept at the same level as that predicted within mines for different irradiance levels (cf. **chapter 2**). CO₂ concentration was 350 μmol CO₂ mol⁻¹ in the dark, 270 μmol CO₂ mol⁻¹ at radiation level 45 W m⁻² and 240 μmol CO₂ mol⁻¹ at radiation level 673 W m⁻², with a linear decrease between each point. The radiation level was altered by changing the distance between the sample and a 250W metal iodide bulb positioned above it. Larvae were not directly irradiated and two groups were formed. In a first group of larvae, pieces of upper mine integuments, having at least 90 % of their surface occupied by feeding windows, were cut out, dried to ensure that they stopped respiring and placed above each open capsule with the external surface facing the light source. In a second group, the capsules were covered with a dry piece of intact leaf tissues following the same method.

The amount of CO₂ released by larvae (μL CO₂ g⁻¹ min⁻¹, see below for method of conversion) was measured at several radiation levels ranging from 0 to 673 W m⁻² (this value corresponded to about full sun light in the field) for seven groups of ten larvae below feeding windows (total N = 70) and for five groups of ten larvae below intact leaf tissues (total N = 50). For each radiation level, samples were allowed to stabilise for 20 min before measurements were taken. The values given are the mean of ten measurements taken every ten seconds. Insects respire cyclically and discontinuously (Lighton 1996), but we ensured to measure an accurate mean respiration rate by measuring ten larvae simultaneously.

The LI-6400 IRGA measures respiration rate per individual or per unit of sample surface. For example, Salvucci and Crafts-Brandner (2000) gave respiration rates in mol CO₂ time⁻¹ insect⁻¹ using the same apparatus. In order to express the amount of CO₂ release by unit of body mass, we first expressed respiration rates per unit of insect body surface. Eventually, it was translated using a relationship between body surface area and body mass. This transformation was applied on each group of ten larvae and allowed us to eliminate the between-group variation induced by a difference in the whole body mass. Dimensions of each larva (length and diameter) were measured to quantify the gas exchange surface of the insect. The body of the larva was considered as a cylinder for the purpose of these calculations. We established a relation between body mass and body surface on a further set of 14 freshly excised larvae. Larvae were weighed individually (Supermicro Sartorius, Richmond, U.K.) and their body length and diameter were immediately measured. Body mass was correlated positively and linearly to body surface (linear regression: body mass [mg] = 0.1179 body surface [mm²] - 0.1048, $R^2 = 0.93$, $P < 0.001$). This strong relationship indicates that even if body surface area is not a suitable unit to express respiration rate, it is helpful to convert

values from the IRGA program into body mass unit. Finally, respiration rate was converted in $\mu\text{L g}^{-1} \text{min}^{-1}$ which is the usual unit.

Insect body temperature

In a further set of experiments, larval body temperature was measured as a function of radiation level. Three open plastic capsules, each containing four last instar larvae, were prepared as described above. The capsules were transferred to the LI-6400 sample chamber and each capsule was covered with a dry upper mine or leaf integument prepared as above. Conditions within the sample chamber were the same than before. Two fine copper-constantan thermocouples (0.2 mm in diameter) were inserted into each capsule, the first being in contact with the body of larvae while the second measured air temperature within the capsules. Body temperatures were recorded for three groups of three capsules covered with dry mine integuments containing feeding windows ($N = 9$), and for three groups of three capsules covered with dry intact leaf integuments ($N = 9$), at several radiation levels ranging from 0 to 673 W m^{-2} using a Campbell data logger (CR10X, Campbell Scientific Ltd., Leicestershire, U.K.). All samples were allowed to stabilise for 20 min before measurements were taken. This stabilisation time permitted us to determine the body temperature excess compared to temperature within the capsule. We concentrated on the body temperature excess compared to mine (or capsule) temperature to establish a comparative analysis between the two positions, below feeding windows vs. green patches.

Statistical analysis

Linear regression models were used to assess the significance of the measured relationships between (i) body temperature excess and radiation level, (ii) respiration rate and radiation level, and (iii) mean body temperature excess and mean respiration rate. We tested for the difference between the slopes of the regression lines using a one sided t -test (Zar 1998). For all statistical tests, the probability threshold was 0.05.

RESULTS

Transmittance of upper surfaces

The mean transmittance spectrum of green patches was similar to that of intact leaf tissues (Fig. 2A). Green patches transmitted very low amount of radiation within a mine in the visible range. By contrast, feeding windows transmitted a large portion of radiation within a mine. Higher transmittance levels were obtained at long wavelengths (Fig. 2B). Feeding windows transmitted a mean of 34.5 % incident light whereas intact leaf tissues transmitted only a mean 1 % incident light in the visible range.

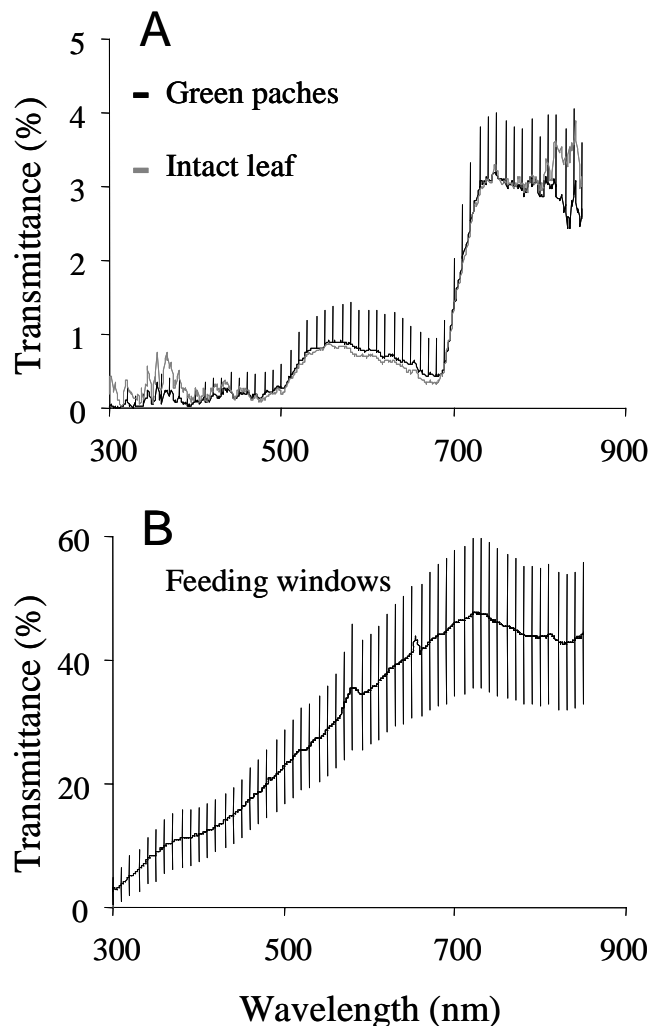


Figure 2. Optical properties of upper integuments. (A) Mean transmittance spectra (\pm SD) of green patches at the mine surface (black dots) and of intact leaf tissues (grey dots, SD not shown for clarity) in the ultraviolet, visible and near infrared ranges. (B) Mean transmittance spectrum (\pm SD) of feeding windows at the mine surface in the ultraviolet, visible and near infrared ranges. For all, standard deviations are shown every 10 nm.

Body temperature and respiration rate

Larvae ($N = 120$) had a mean length of 3.25 ± 0.71 mm and a mean diameter of 0.55 ± 0.10 mm, resulting in a mean body surface area of 6.10 mm^2 and mean body mass 0.61 mg.

At a constant capsule temperature of $25 \text{ }^\circ\text{C}$, the body temperature of fully protected larvae (i.e. positioned below green patches) increased only slightly with radiation level (Fig. 3A; linear regression: $y = 0.0013 x - 0.017$, $R^2 = 0.97$, $P = 0.01$). By contrast, body temperature of larvae below feeding windows increased strongly with radiation level (Fig. 3A; linear regression: $y = 0.0034 x + 0.0293$, $R^2 = 0.99$, $P < 0.001$). The slopes of the two regression lines were significantly different (t -test: $t_{38} = 9.34$, $P < 0.0001$). At a radiation level of 673 W m^{-2} , the body of a larva below feeding windows was $2.4 \text{ }^\circ\text{C}$ warmer than the capsule temperature, and $1.5 \text{ }^\circ\text{C}$ warmer than the body of a protected larva.

The respiration rate of protected larvae increased with radiation level (linear regression: $y = 0.0468 x + 33.916$, $R^2 = 0.99$, $P = 0.002$) and was less than two-fold higher at radiation level 673 W m^{-2} than in the dark (Fig. 3B). The CO_2 production of a fully exposed larva also increased linearly with radiation level (Fig. 3B; linear regression: $y = 0.114 x + 30.329$, $R^2 = 0.97$, $P < 0.001$). At radiation level 673 W m^{-2} , the amount of CO_2 released reached $109.5 \text{ } \mu\text{L CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Respiration rate increased of about 480 % from a dark situation to radiation level 673 W m^{-2} . The respiration rate of larvae below feeding windows was about twice that below uneaten leaf tissues at high radiation level and the slopes of the two regression lines were statistically different (t -test: $t_{86} = 8.39$, $P < 0.0001$). The respiration rate of larvae below feeding windows was strongly correlated with body temperature excess (Fig. 3C; linear regression: $y = 32.603 x + 29.934$, $R^2 = 0.94$, $P < 0.001$). A similar correlation was obtained between respiration rate and body temperature excess for larvae positioned below intact leaf tissues (Fig. 3C; linear regression: $y = 35.12 x + 33.825$, $R^2 = 0.97$, $P = 0.01$).

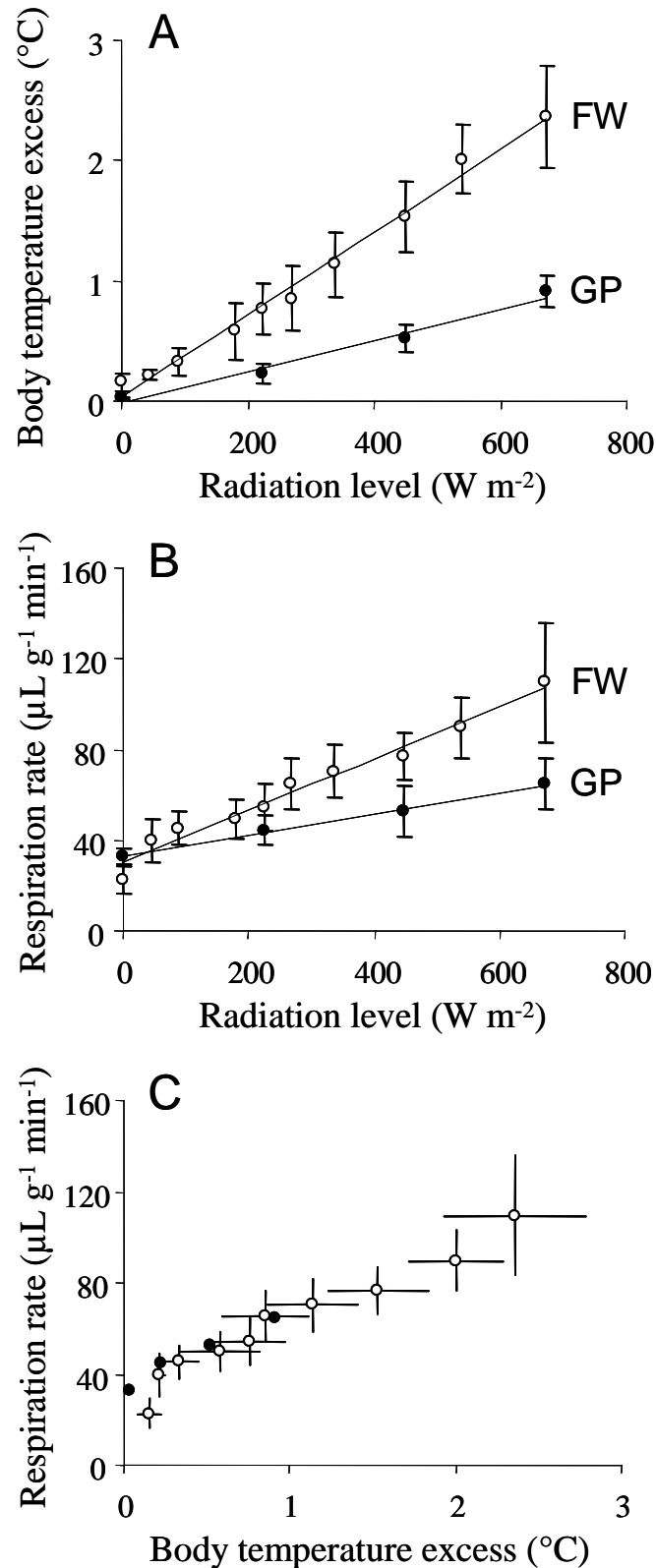


Figure 3. Insect body temperature and respiration rate. (A) Mean body temperature excess (\pm SD) and (B) mean respiration rate (\pm SD) of larvae as a function of radiation level at constant air temperature of 25°C, as measured for fully exposed larvae (FW) and for protected larvae (GP). (C) Mean respiration rate as a function of mean body temperature excess for a protected larva (●) and for a fully exposed larva (○). Bars represent standard deviations on each axis and are shown only for exposed larvae, for clarity.

DISCUSSION

Larvae of *P. blancardella* feed on leaf tissues in a meticulous way. Fourth and fifth instar larvae eat the palisade tissue such that chlorophyll-containing tissues are absent below the feeding windows. The transmittance spectrum we recorded for feeding windows is highly similar to that measured by Manetas (2004) for isolated periderm from twigs, two elements of similar structural properties. Optical properties of the green patches do not differ from that of intact and non infested leaf tissues. Because the chlorophyll content of leaf tissues is well correlated with optical properties (Maccioni *et al.* 2001), we conclude that the chlorophyll content in the green patches is not affected nor is the capacity of the pigment to absorb radiation. This was confirmed by measurements of photosynthetic activity (cf. **chapter 2**). However, measurements made with a directional spectroradiometer, which records the light transmitted perpendicularly to the surface, might under-estimate the transmittance of the surfaces. Leaves usually transmit a scattered and isotropic light, i.e. in all directions (180° solid angle), below the surface (Breece & Holmes 1971). It is not known whether feeding windows and green patches transmit scattered light; Unfortunately these areas are too small areas to be measured with a hemispherical spectroradiometer. However, the transmittance spectra of intact leaf tissues, as measured with a hemispherical spectroradiometer (Sylvain Pincebourde, unpublished data), was also lower than the potentially under-estimated spectrum of feeding windows presented here, indicating that the use of a directional spectrometer was sufficient to show the higher transmittance of feeding windows.

Changes in optical properties of the mine surface due to the formation of feeding windows have strong implications for the light environment of the leaf miner. Two aspects are considered below: (i) the quality of light and its heterogeneity within a mine, and (ii) the role of light heterogeneity at the mine scale as an interface between the physiology and the behaviour of larvae.

The strategy employed by leaf miners, galling organisms, leaf tiers and leaf rollers has been often seen as a mean to avoid radiation (Berenbaum 1978; Connor & Taverner 1997; Stone & Schönrogge 2003; Hansell 2005). Here we clearly show that it is not always the case. Feeding windows transmit a predominantly red light within the mine whereas green patches transmit a small quantity of green light. Therefore, larvae live within a small but highly heterogeneous light environment. The mine could be seen from the inside as a mosaic of small areas transmitting different qualities of radiation. Moreover, feeding windows transmit waves in the ultraviolet range. Up to 11 % of incident light is transmitted in the ultraviolet

range (300 to 400 nm, Fig. 2B). By contrast, ultraviolet radiation is not transmitted within the mine by the green patches. A protective role against harmful ultraviolet radiation has been evoked to explain the advantages of living within a mine (Connor & Taverner 1997). For example, it was found in four leaf miner species that the mine surface transmitted less than 5 % of ultraviolet radiation (Connor & Taverner 1997). The leaf miner *P. blancardella* is obviously more protected even when positioned below feeding windows from ultraviolet radiation than a free-air living insect. However, it is not known whether the observed significant amount of ultraviolet radiation transmitted by feeding windows (11 %) is sufficient to induce physiological damages in caterpillars having a very thin integument.

The heterogeneity of the mine's light environment translates into a larval position-dependent metabolism. The transmittance of radiation through feeding windows alters the physiological state of larvae whereas green patches do not transmit enough radiation to impact severely on larval metabolism. Body temperature of caterpillars is determined by the amount of radiation they receive and absorb through physical processes (Casey 1992). The observed increase in body temperature leads to an increase in respiration rate. This is due to the ectothermy of the leaf miner which results in a strong link between body temperature and general metabolism, including respiration. The relationship between body temperature and respiration rate was linear rather than exponential as it is usually the case, certainly because the range of body temperature tested here is too narrowed (25 to 27.5 °C). Because both body temperature and respiration rate were measured under constant air temperature but varying radiation regime within capsules, our results clearly reveal the direct effect of radiation transmitted by feeding windows on larval metabolism. Temperature within a mine is however also expected to increase with radiation level, as it is the case for leaf temperature (Nobel 1999), leading to higher alterations in larval metabolism than that we measured at constant capsule temperature. The heterogeneous light environment within the mine offers larvae the possibility to regulate their metabolism behaviourally by moving within the mine between exposed locations and positions where they are protected from radiation. Behavioural thermoregulation could be significant when mine temperature approaches lethal temperature of the larvae since they are able to decrease their temperature by about 1.5 °C at high radiation levels (Fig 3A). It is well known that solar radiation corresponds to an important heat source, and numerous insect species develop thermoregulatory behaviours in order to maximise or minimise the amount of radiative heat absorbed according to their thermal needs (May 1979; Chapman 1998; Heinrich 1999; Chown & Nicolson 2004). The pattern of the leaf miner's behavioural thermoregulation would be closely related to the mine design, i.e. the

geometry of the mine surface or relative position of feeding windows and green patches. Indeed, Djemai *et al.* (2000) demonstrated that the mine is built in such a way that a large area occupied exclusively by green patches remains in the middle of the mine surface, allowing a larva to be fully exposed or fully protected according to its position (Djemai *et al.* 2000).

Feeding activity has a large and direct impact on insect metabolism. For example, respiration rate increases during feeding and digestive activities (e.g. McEvoy 1984; Kukul & Dawson 1989). Food quality also directly alters metabolic efficiency of insects (e.g. Levesque *et al.* 2002) and production of secondary compounds by plant tissues had been shown to affect larval development (e.g. Beninger & Abou-Zaid 1997). These nutritional state-dependent mechanisms usually affect respiration rates by a factor of 1.5 to 5 in caterpillars (van Loon *et al.* 2005). The indirect effects of feeding activity, acting independently of the organism's nutritional state, on the insect metabolism have been however so far largely ignored (Fig. 4). The feeding activity of the leaf miner *P. blancardella* results in the formation of feeding windows in the upper integument of its mine. Radiation transmitted by feeding windows induces larval body to warm through radiative energy absorption, a process independent from nutritional state, leading subsequently to a five-fold increase in respiration rate. Therefore, such physical feedbacks of herbivory have to be taken into consideration when attempting to predict the physiological state of an insect since they could be as important as nutritional state-dependent feedbacks. Physical feedbacks of herbivory determine key physiological parameters like growth rate and metabolic efficiency. In response to these feedbacks, a herbivore might develop a second layer of adaptive behavioural (e.g. thermoregulation) or physiological (e.g. heat shock protein synthesis) mechanisms. The understanding of intimate insect-plant relationships requires the consideration of physical feedbacks and ensuing behavioural adaptations.

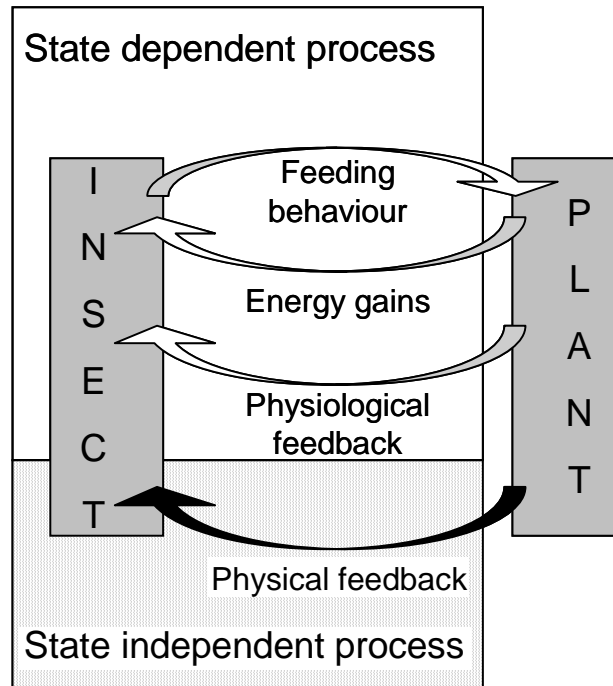


Figure 4. Feedbacks of herbivory in insect-plant relationships from the insect' point of view. Feeding behaviour induces two physiological nutritional (or state) dependent feedbacks: the first is energy acquisition and the second comprises the effects related to the production of plant secondary compounds. Physical feedbacks are insect state independent and correspond to modifications in the insect microclimate.

CHAPITRE II.

The CO₂ released by leaf mining insects induces stomatal closure and benefits photosynthesis

Pincebourde Sylvain, Frak Ela, Sinoquet Hervé, Regnard Jean Luc & Casas Jérôme
Plant, Cell and Environment, en révision.

INTRODUCTION

Stomatal behaviour is of great interest to plant physiologists and ecologists because stomata play a central role in transpiration and photosynthesis (Willmer & Fricker 1996). Stomata provide the main short-term control of all gas exchange (CO_2 , water vapour, O_2) taking place at the plant-atmosphere interface (Jones 1998). Indeed, plants constantly face a trade-off between stomatal closure, which prevents water loss, and stomatal opening, which favours CO_2 uptake for fixation in leaf tissues (Ziegler 1987). Many studies have explored the impact of abiotic factors on stomatal conductance at leaf scale (Jarvis 1976; Willmer & Fricker 1996; Campbell & Norman 1998). Leaf stomatal conductance increases with higher leaf irradiance but decreases when the leaf is exposed to drier air (e.g. Sharkey & Ogawa 1987; Grantz 1990; Monteith 1995; Le Roux *et al.* 1999). Rising CO_2 concentration outside the leaf generates feedback effects leading to stomatal closure (e.g. Morison 1987; Jarvis & Davies 1998). Finally, stomata respond to soil water stress via a mechanism that involves an abscisic acid signal being sent from the roots (Tardieu & Davies 1992).

By contrast, the impact of biotic agents, including phytophagous insects and pathogens, on leaf stomatal conductance has seldom been reported. For example, soybean's stomata close under the influence of a chemical factor derived from the interaction between the fungal pathogen, *Phytophthora sojae*, and the host plant, and this short-time response is completely reversible (McDonald & Cahill 1999). Stomata sense internal CO_2 concentration rather than CO_2 concentration at the leaf surface or in the stomatal pore (Assmann 1999). Thus, leaf miner insects, living and respiring inside the leaf within a sealed sack called a mine, provide a powerful biological model for assessing the impact of biotic agents on stomatal conductance. Larvae feed on parenchyma cells and destroy the substomatal cavities connecting all stomata, which remain functional in the lower mine epidermis (Whittaker 1994; Raimondo *et al.* 2003), to the same cavity. Inside a mine, a larva is a source of CO_2 . The fed areas within the mine of the spotted tentiform leaf miner transmit large amount of incoming radiation leading to an increase in larval body temperature and, subsequently, to an increase in respiration rate as leaf irradiance increases (**chapter 1**). Insect activity (feeding, respiration) could therefore strongly modify the CO_2 concentration within intercellular space and alter the CO_2 transfer to mesophyll cells. Stomata are expected to react to these changes.

We explored the effects of the spotted tentiform leaf miner, *Phyllonorycter blancardella* F. (Lepidoptera: Gracillariidae), on the stomatal conductance and photosynthetic response of apple leaves (*Malus domestica* Borkh) to changes in leaf irradiance. Then, we focused on the

effects of the miner on the CO₂ diffusive pathways within the mine. We expected larvae to alter both (i) the resistance of the mesophyll air space to CO₂ diffusion through larval feeding activity (lesion effect), and (ii) the stomatal resistance to CO₂ diffusion through the response of stomata to the CO₂ released by larvae (larval CO₂ effect). We measured the CO₂ released by larvae in response to increasing irradiance. A model of CO₂ diffusive transport within leaves was used to (i) verify that stomata adjust their opening level such that the chloroplast CO₂ concentration within mines is similar to that predicted for intact leaves, and (ii) to quantify the relative impact of the lesion vs. larval CO₂ effects. The lesion effect was evaluated by comparing gas exchanges of intact leaves and empty mines, and the larval CO₂ effect was assessed by comparing gas exchanges of empty mines and mines occupied by a larva.

MATERIALS AND METHODS

Plants and insects

The study was conducted during September 2004 on a set of 29 one-year apple seedlings (*Malus domestica*) on which several mature leaves were infested with *Phyllonorycter blancardella* miners. Seedlings were grown within a greenhouse under temperate conditions (daily natural variations: air temperature, $T_{air} = 15$ to 29 °C; relative humidity, RH = 40 to 85 % and PAR irradiance, Q up to $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and were watered daily with a nutritive solution (N:P:K 6:6:6). As leaf-age affects stomatal conductance (Field 1987; Jones 1992), the emergence date of each leaf was recorded and leaves of the same age were chosen throughout the study (32.1 ± 2.5 days, N = 102).

P. blancardella is a microlepidopteran for which the larval development is divided into five instars. During the first three sap feeding instars, larvae define the outline of their mine by separating the two leaf integuments. During the fourth and fifth instars larvae are tissue feeders and their feeding behaviour results in the formation of feeding windows (Pottinger & LeRoux 1971; Djemai *et al.* 2000): translucent patches remaining after chlorophyll-containing tissues have been consumed (Fig. 1). In this study, the physiological measurements were performed on leaves containing one or two mines of last instars. Empty mines were obtained after an ectoparasitoid larva *Pnigalio pectinicornis* (Hymenoptera: Eulophidae) had fed the

leaf miner and left the mine through a small circular hole (0.5 mm in diameter) in the lower mine integument (Pottinger & LeRoux 1971).

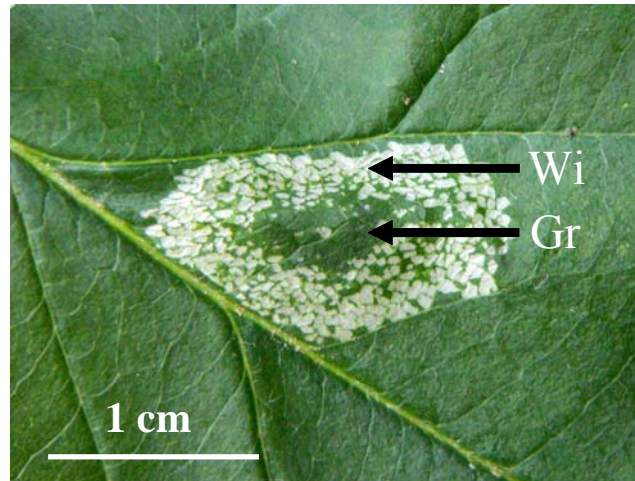


Figure 1. The upper surface of a mine (x 2.8). The feeding windows (Wi) result from the feeding activity of the larva within the mine whereas green patches (Gr) correspond to the chlorophyll-containing tissues of the mine. A single mine always contains only one larva.

Leaf and mine gas exchange

Leaf gas exchanges were measured with an infrared gas analyzer equipped with a 2x3 cm leaf chamber system (LI-6400, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). CO_2 stomatal conductance ($g_s : \text{m s}^{-1}$), assimilation (A_{Ll}) and dark respiration (R_d) rates ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were calculated by the LI-6400 data analysis program using the general formula of von Caemmerer & Farquhar (1981). Measurements were performed on three categories of fully exposed apples leaves: intact leaves, leaves with occupied mines and leaves with empty mines. In order to measure only mine integument stomatal behaviour (empty and occupied mines), a thin layer of vegetal oil was used to coat the intact lower face of the leaves. The conductance for water vapour and CO_2 of intact leaves having both lower and upper surfaces fully coated was null (Sylvain Pincebourde, unpublished data). In the case of empty mines, the small hole made by the parasitoid in the lower mine integument was filled with a drop of vegetal oil.

Preliminary experiments showed that maximal stomatal conductance ($g_{s,\text{max}}$) is obtained at irradiance level $Q = 1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for intact leaf tissues and $Q = 600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for

empty and occupied mines, whereas maximal assimilation rate ($A_{LI\max}$) was measured at $Q = 1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for all leaf categories. Four pre-illuminated leaves of each category were used to measure $g_{s\max}$ and $A_{LI\max}$ under standard conditions (ambient CO_2 concentration $C_a = 14.35 \text{ mmol m}^{-3}$ ($= 35 \text{ Pa}$), leaf temperature $T_l = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ and leaf water vapour pressure deficit $VPD = 1 \text{ kPa}$) (Le Roux et al. 1999). For each leaf a g_s - Q and an A - Q response curve were established at nine irradiance levels, from 1500 down to $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($C_a = 14.35 \text{ mmol m}^{-3}$, $T_l = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $VPD = 1 \text{ kPa}$). Leaf irradiance was controlled by varying the distance between the sample and a 250 W metal iodide bulb. Leaves were allowed to equilibrate for 20 to 30 min before any measurements were taken and data were discarded if stomatal conductance was not stable after 45 min. After acclimation to darkness (30 min), respiration rate (R_d) was measured under similar conditions. Stomatal conductance, assimilation rate and dark respiration were expressed as quantity per unit of transpiring leaf area. Gas exchanges of mines were compared to intact leaf tissues having 2 cm^2 free of vegetal oil. Preliminary experiments showed that the size of the uncovered intact leaf area does not affect stomatal conductance and net assimilation rate when expressed per unit transpiring area (Sylvain Pincebourde, unpublished data).

The LI-6400 calculations are based on differences in CO_2 concentration of input and output air flows. The assimilation rate of intact leaf tissues and empty mines calculated by the LI-6400 program corresponds therefore to the net assimilation rate, i.e. $A_{net} = A_{LI}$ for the two categories. However, a secondary CO_2 source (i.e. larval respiration) occurring within a mine is not taken into account by the LI-6400 for the calculation of net assimilation rates. This presumably underestimates the net photosynthetic rate of occupied mines. The net assimilation rate of occupied mines was calculated from

$$A_{net} = A_{LI} + R_{larva} \quad (1)$$

Where R_{larva} is the rate of CO_2 production by a larva ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The method used to measure R_{larva} is explained below (see 'Insect respiration'). The three terms must be expressed in the same unit surface (e.g. mine surface). Net assimilation rate of the surface occupied by green patches in occupied mines was compared to that of empty mines. For this purpose, both the mine surface occupied by green patches and the surface of the larval body are required for each mine. Leaves with empty and occupied mines were cut after gas exchange measurements and numerical images of the mine surfaces were obtained using a scanner. Scans were analysed using the Scion Image software (Scion Corporation, Frederick,

MD, USA) which quantified the portion of the total mine surface occupied by green patches and feeding windows. The mean total area of occupied and empty mines was $1.08 \pm 0.12 \text{ cm}^2$ and $0.89 \pm 0.17 \text{ cm}^2$, respectively, with $0.69 \pm 0.20 \text{ cm}^2$ and $0.71 \pm 0.18 \text{ cm}^2$ being green patches. The portion of mine surface made from green patches is larger in empty mines ($80 \pm 10 \%$) than in occupied mines ($63 \pm 12 \%$) because the parasitoid had killed the leaf miner before it eats most chlorophyll-containing tissues. Dimensions (length and diameter) of the four larvae, extracted from the four occupied mines used to measure gas exchanges (see above), were measured and their body considered as a cylinder to quantify the gas exchange surface of the insect. The mean body surface of the four larvae was $8.18 \pm 1.50 \text{ mm}^2$.

We also verified that the CO_2 conductance of the upper integument (which does not contain stomata) of occupied mines is not significantly increased in comparison to intact leaf tissues (CO_2 conductance was 0.137 and 0.046 mm s^{-1} for occupied mines and intact leaves, respectively, corresponding to less than 10% of maximal conductance in the two cases).

Intercellular air space CO_2 resistance of leaves and mines

The intercellular air space resistance ($r_i: \text{ s m}^{-1}$) of mines and intact leaves was estimated according to Syvertsen *et al.* (1995) and Piel *et al.* (2002) as

$$r_i = \frac{\alpha L(1-\varepsilon)}{\left(\frac{f_{ias}}{1-\varepsilon}\right)^{1.55}} \quad (2)$$

Where L is the leaf thickness (mm), ε is the fraction of leaf thickness occupied by epidermis, f_{ias} is the fraction of total leaf or mine volume occupied by air space, and α is a fitted constant ($= 1.63 \text{ m s } \mu\text{mol}^{-1}$, see Syvertsen *et al.* 1995). The term $f_{ias}/(1-\varepsilon)$ corresponds to the fraction of mesophyll volume occupied by intercellular space. The 1.55 power accounts for the tortuosity in the diffusion pathway (Ball 1981). Leaf thickness and the fraction occupied by epidermis were measured using optical microscopy with hand made leaf sections on 10 leaves from five different seedlings. The mean leaf thickness L was $267 \pm 25 \mu\text{m}$ and the mean fraction of leaf thickness occupied by epidermis ε was $10 \pm 2 \%$.

The fraction of mine (containing a larva) and intact leaf volume occupied by air space were estimated according to Piel *et al.* (2002) by vacuum infiltration using a solution of distilled water and 0.1% Triton X-100 (Sigma Chemicals). Ten leaf discs of about 1 cm^2 and ten mines were collected. Each disc and mine was individually weighted (Supermicro Sartorius,

Richmond, U.K.) immediately before and after infiltration. The intercellular air space fraction was calculated from

$$f_{ias} = 1 - \frac{FW}{IW} \quad (3)$$

Where FW is the fresh weight before infiltration and IW is the weight after infiltration.

Insect respiration

The amount of CO_2 released by larvae was measured using the LI-6400 infrared gas analyzer-leaf chamber system at ten PAR irradiance levels ranging from 1500 to 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A slow flow rate (52 $\mu\text{mol s}^{-1}$) was used to improve the signal-to-noise ratio of the system. However, as respiration of a single larva was too low to be measured individually, a group of ten larvae was used for each measurement. Mines were excised and living larvae were collected and placed into the LI-6400 leaf chamber in individual perforated open plastic capsule (9 mm in length and 6 mm in diameter) mimicking mine conditions. These were RH = 80 to 90 %, T within capsules = 25 °C and C_a = intercellular CO_2 concentration predicted in intact leaves (see model below). Larvae were not directly irradiated; upper mine integuments containing the feeding windows were cut out, dried (to ensure that they do not respire anymore) and placed above each capsule with the external surface facing the light source. The irradiance level was altered by changing the distance between the sample and a 250W metal iodide bulb. The amount of CO_2 released by larvae (R_{larva} : $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was measured on four groups of ten larvae and for each group 10 measurements were taken every 10 seconds at each irradiance level after 20 min of acclimation to chamber conditions. Dimensions of each larva (length and diameter) were measured and their body considered as a cylinder to quantify the gas exchange surface of the insect. Knowing the relative surfaces of mine and larval body, R_{larva} was converted in μmol per unit of mine surface area to be compared to assimilation and dark plant respiration values. Further results about larval respiration are being published elsewhere (**chapter 1**).

Modelling CO_2 diffusion inside a leaf and a mine

The diffusive transport of CO_2 from ambient air to assimilation sites within chloroplasts is determined by the deviation in their CO_2 content (Nobel 1999). This deviation is due to the

resistance of each component of the system, from the leaf boundary layer to the chloroplast membrane, which the CO₂ has to cross to attain the carboxylation sites (Fig. 2). There are three major compartments on the CO₂ pathway from ambient air to carboxylation sites: the intercellular space, the intracellular liquid phase space (within mesophyll cells but outside chloroplasts) and the chloroplast space (Fig. 2). We wrote the CO₂ balance for each compartment in a hypostomatous leaf assuming that there is no CO₂ storage. For a given compartment, CO₂ sources (positive terms in equations) compensate for CO₂ sinks (negative terms in equations) at the CO₂ concentration equilibrium.

The CO₂ balance of the chloroplast space for an intact leaf is

$$\frac{C_m - C_c}{r_c} - A_{brut} = 0 \quad (4)$$

Where C_m and C_c are the CO₂ concentrations (mol m⁻³) in the mesophyll and chloroplast spaces respectively, r_c is the CO₂ resistance (s m⁻¹) of chloroplast components (limiting membranes and stroma), and A_{brut} is the brut assimilation rate (mol m⁻² s⁻¹). The brut assimilation rate is

$$A_{brut} = A_{net} + A_{r,pr} \quad (5)$$

Where A_{net} is the net assimilation rate (mol m⁻² s⁻¹) and $A_{r,pr}$ is the rate of CO₂ production by plant respiration and photorespiration (mol m⁻² s⁻¹). The difference between mesophyll and chloroplast spaces can therefore be written from equations (4) and (5) as

$$C_m - C_c = (A_{net} + A_{r,pr}) r_c \quad (6)$$

The CO₂ balance of the mesophyll liquid phase space for an intact leaf is

$$A_{r,pr} + \frac{C_i - C_m}{r_i + r_m} - \frac{C_m - C_c}{r_c} = 0 \quad (7)$$

Where C_i is the CO₂ concentration (mol m⁻³) in the intercellular air space, r_i and r_m are the CO₂ resistances (s m⁻¹) of the intercellular air space and mesophyll liquid phase respectively. Equation (7) can be arranged using the equation (6), giving

$$C_i - C_m = A_{net} (r_i + r_m) \quad (8)$$

The CO₂ balance of the intercellular space for an intact leaf is

$$\frac{C_a - C_i}{r_s + r_b} - \frac{C_i - C_m}{r_i + r_m} = 0 \quad (9)$$

Where C_a is the ambient air CO₂ concentration (mol m⁻³), r_s and r_b are the CO₂ resistances (s m⁻¹) due to stomata and boundary layer respectively. Equation (9) is arranged using equation (8) such that

$$C_a - C_i = A_{net} (r_s + r_b) \quad (10)$$

Equations (6), (8) and (10) are summed member-to-member. Solving the resulting expression for the chloroplast CO₂ concentration gives

$$C_c = C_a - A_{net} (r_b + r_s + r_i + r_m + r_c) - A_{r,pr} r_c \quad (11)$$

This equation corresponds to the model given in Nobel (1999). It predicts the CO₂ concentration within chloroplasts in intact leaves. In the light, photorespiration rate (A_{pr}) was estimated to be 27 % of net photosynthesis at ambient CO₂ concentration in several plant species (Haupt-Herting *et al.* 2001). Pinelli & Loreto (2003) suggested that mitochondrial respiration is not inhibited in light and that CO₂ produced by mitochondrial respiration is mostly re-assimilated under ambient air CO₂ content of 14.35 mmol m⁻³. The rate of non-photorespiratory CO₂ production within plant tissues in light is therefore similar to that in dark (R_d). These considerations allow us to calculate the rate of CO₂ production by respiratory and photorespiratory mechanisms in light from

$$A^{r,pr} = 0.27 A_{net} + R_d \quad (12)$$

In dark, this term reduces to R_d .

This model was modified to integrate the rate of CO₂ production by a larva (R_{larva} : mol m⁻² s⁻¹) as a further CO₂ source within the intercellular air space (Fig. 2). Only the CO₂ balance of the intercellular air space is affected by this novel internal source. Equation (9) therefore becomes

$$R_{larva} + \frac{C_a - C_i}{r_s + r_b} - \frac{C_i - C_m}{r_i + r_m} = 0 \quad (13)$$

The model predicting the chloroplast CO₂ concentration within a mine occupied by a larva can be obtained applying the same reasoning as before and is

$$C_c = C_a - (A_{net} - R_{larva}) (r_b + r_s) - A_{net} (r_i + r_m + r_c) - A_{r,pr} r_c \quad (14)$$

By eliminating the R_{larva} term, equation (14) becomes equation (11), which corresponds to the model for an intact leaf.

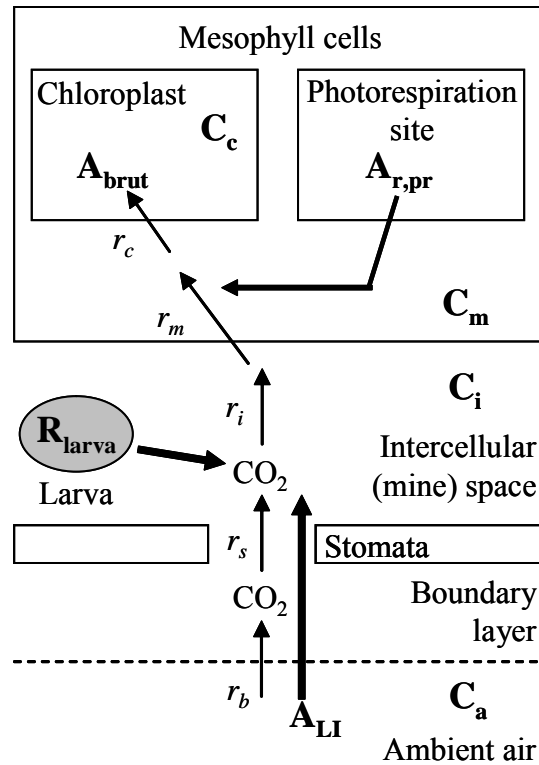


Figure 2. CO₂ fluxes into an illuminated mine. CO₂ diffusion depends on (i) CO₂ concentration in ambient air (C_a), intercellular space (C_i), intracellular space (C_m , cytosol of mesophyll cells) and chloroplast space (C_c), (ii) resistance to CO₂ diffusion of the boundary layer (r_b), stomata (r_s), intercellular air space (r_i), mesophyll liquid phase (r_m) and chloroplast components (r_c) and (iii) brut assimilation rate (A_{brut}). Brut assimilation rate is the sum of (i) CO₂ produced from respiration and photorespiration in mine tissues ($A_{r,pr}$), (ii) CO₂ produced by a larva within the intercellular space at a rate R_{larva} , and (iii) CO₂ entering through stomata at a rate A_{LI} . The apple leaf is hypostomatous (i.e. stomata are located on the abaxial side).

Model simulations

In this study, we report stomatal CO₂ conductance ($g_s = 1/r_s$) rather than stomatal CO₂ resistance because stomatal CO₂ conductance is related positively to stomata opening level. Stomatal conductance for CO₂ is related to stomatal conductance for water vapour (g_w) by $g_s = g_w/1.6$ (Evans & von Caemmerer 1996; Nobel 1999). All simulations were conducted using a standard ambient CO₂ concentration $C_a = 14.35 \cdot 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$ (= 35 Pa) and using representative values of mesophyll and chloroplast resistances $r_m = 140 \text{ s m}^{-1}$ and $r_c = 100 \text{ s m}^{-1}$ (Nobel 1999). The leaf boundary layer resistance for CO₂ r_b was 28.52 s m^{-1} in all leaf

categories, as calculated by the LI-6400 data analysis program using the formula given in von Caemmerer & Farquhar (1981).

The chloroplast CO₂ concentration response to changes in irradiance in intact leaf tissues was predicted using the model for intact leaves (equation (11)) integrating the parameters A_{net} , r_s , r_i and R_d that we recorded on intact leaf tissues during experiments detailed above. Similarly, the chloroplast CO₂ concentration response of empty mines was predicted using the model for intact leaves incorporating the parameters A_{net} , r_s , r_i and R_d , which were recorded on empty mines. The chloroplast CO₂ concentration response of occupied mines was predicted by running the model for occupied mines (equation (14)) using the parameters A_{net} , r_s , r_i and R_d that were measured on occupied mines and R_{larva} .

Model simulations were carried out to test for the significance of the impact, on the CO₂ balance, of (i) the lesion effect (i.e. alteration of r_i) and (ii) the larval CO₂ effect (i.e. CO₂ production by the larva, R_{larva}). We assessed whether model predictions are significantly affected (i) if the lesion effect is neglected, by comparing the original predictions of the empty mine model to predictions using r_i value of intact leaf tissues (called virtual empty mines thereafter) and (ii) if the larval CO₂ effect is neglected by comparing the predictions for occupied mines from the model computed with measured R_{larva} and subsequently with $R_{larva} = 0$ (called virtual occupied mines thereafter).

Statistical analysis

Means were always provided with their standard deviation (SD). Maximum values of stomatal conductance and net assimilation rate were compared using the Mann-Whitney statistical test. The responses of stomatal conductance, assimilation rate and chloroplast CO₂ concentration to varying irradiance were analyzed using non-linear models under TableCurve 2D (SYSTAT Software Inc.). To test whether these non-linear models fitted the data adequately, we performed a least squares analysis (Johnson & Omland 2004) and the residuals were controlled for their uniform distribution. *F*-statistic analysis was used to test for differences between two datasets by comparing entire curves having the same equation. Probabilities were compared to the threshold value (α) of 0.05 and confidence intervals were set at a 95 % probability.

RESULTS

Miner effects on $g_{s\max}$, $A_{net\max}$, R_d and r_i

The maximal stomatal conductance for CO₂ ($g_{s\max}$) was strongly reduced in occupied and empty mines as compared to intact leaves (Table 1). The maximal net photosynthetic rate of empty and occupied mines expressed per unit green patch area ($A_{net\max\ patch}$) were not significantly different from intact leaves (Table 1). By contrast, occupied mines exhibited significantly lower $A_{net\max}$ values (i.e. net assimilation rate expressed per unit total mine surface) than intact leaves and empty mines (Table 1). Leaf dark respiration (R_d) was significantly higher for empty mines than for intact leaves and dark respiration of occupied mines was similar to that of empty mines (Table 1). The volume fraction of leaf tissues occupied by air space was increased by a factor two in mines containing a larva compared to intact leaf tissues (Table 2). This difference led to a three-fold lower intercellular air space CO₂ resistance (r_i) in mines compared to intact leaf tissues (Table 2). The r_i measured on occupied mines also applies to empty mines since the two categories show the same morphology.

Table 1. Gas exchange. Maximal CO₂ stomatal conductance ($g_{s\max}$), maximal net assimilation rate ($A_{net\max}$) and dark respiration (R_d) of intact apple leaves, empty mines and occupied mines; $g_{s\max}$, $A_{net\max}$ and R_d are means (\pm SD) of four measurements performed under standard conditions ($Q = 1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for intact leaves and $Q = 600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for mines, $C_a = 14.35 \text{ mmol m}^{-3}$, $VPD = 1 \text{ kPa}$ and $T_l = 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Net CO₂ assimilation rate for occupied and empty mines was expressed per unit mine area ($A_{net\max}$) and per unit green patch area ($A_{net\max\text{ patch}}$). Significant differences between means in a row are indicated by letters (Mann-Whitney test, $\alpha = 0.05$).

	Intact leaf	Empty mine	Occupied mine
$g_{s\max}$ (mm s ⁻¹)	5.39 \pm 0.72 <i>a</i>	3.09 \pm 0.42 <i>b</i>	2.20 \pm 0.81 <i>b</i>
$A_{net\max}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	9.17 \pm 1.48 <i>a</i>	8.01 \pm 0.47 <i>a</i>	6.03 \pm 0.95 <i>b</i>
$A_{net\max\text{ patch}}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	9.17 \pm 1.48 <i>a</i>	10.64 \pm 1.76 <i>a</i>	9.68 \pm 1.38 <i>a</i>
R_d ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	1.76 \pm 0.26 <i>a</i>	3.95 \pm 1.30 <i>b</i>	3.07 \pm 0.72 <i>b</i>

Table 2. The intercellular air space. The volume fraction of leaf thickness occupied by air space (f_{ias}) and the intercellular air space CO₂ resistance (r_i) of intact leaf tissues and occupied mines (means \pm SD). Occupied and empty mines have the same morphology and therefore the same r_i value. Significant differences between means in a row are indicated by letters (Mann-Whitney test, $\alpha = 0.05$).

	Intact leaf	Occupied mine
f_{ias}	0.38 \pm 0.08 <i>a</i>	0.75 \pm 0.03 <i>b</i>
r_i (s m ⁻¹)	104.12 \pm 35.29 <i>a</i>	34.08 \pm 2.08 <i>b</i>

Miner effects on stomatal conductance and photosynthesis light responses

Stomatal conductance for CO₂ (g_s) was normalized using maximal stomatal conductance of intact leaves ($g_{s\max}$) and was expressed as relative value ($g_s / g_{s\max}$). For intact leaves, the relative stomatal conductance increased over the irradiance range tested (Fig. 3A). By contrast, stomatal conductance reached a maximum value for empty and occupied mine integuments at a mean irradiance level $571 \pm 156 \mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Occupied mines always exhibited significantly lower relative stomatal conductance than intact leaves and empty mines (Fig. 3A). At high irradiance, stomatal conductance of occupied mines represented only 18 % of maximal stomatal conductance of intact leaves. In empty mines, slightly higher relative values in comparison to intact leaves were measured at low irradiance (0-300 $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$), thereafter at high irradiance stomatal conductance decreased to about 38 % of that of intact leaves (Fig. 3A).

Net assimilation rates of intact leaves, empty and occupied mines increased non-linearly with irradiance up to the saturation level (Fig. 3B). At high irradiance, empty mines exhibited slightly lower assimilation values than these of intact leaves but the response curves of empty mines and intact leaves were not statistically different ($F_{1,64} = 0.40$, $P = 0.53$). Though maximal values at the plateau were significantly different (see Table 1), the net assimilation rate response curve of occupied mine integuments was similar to that of empty mines ($F_{1,63} = 0.48$, $P = 0.49$) (Fig. 3B).

Insect CO₂ release in response to increasing irradiance

A positive linear relationship was observed between larval respiration (R_{larva}) and irradiance at a constant air temperature around larval body (Fig. 4). The amount of CO₂ released by a larva increased from about $0.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in the dark, to $1.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (these values are expressed per unit of mine area, as for g_s , A_{net} and R_d). Larval respiration rate corresponds therefore to up to 20 % and 40 % of maximal assimilation rate and dark respiration of occupied mines, respectively.

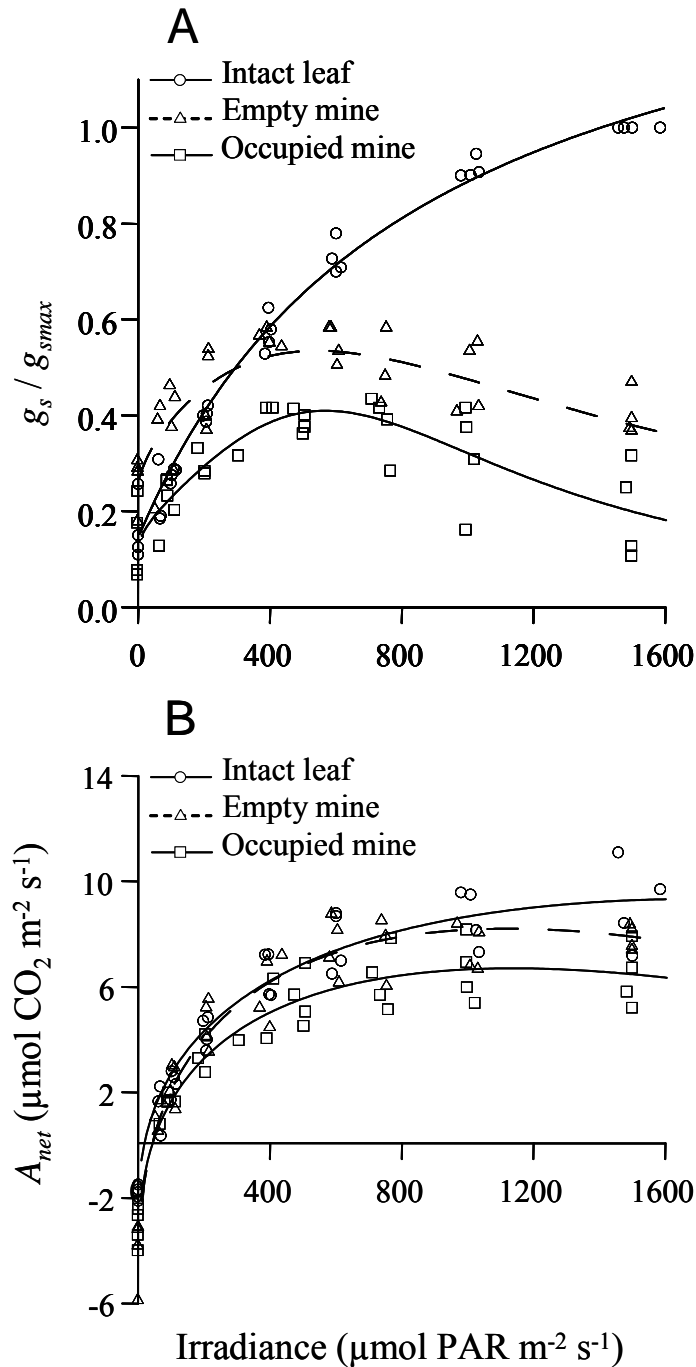


Figure 3. Plant ecophysiology. (A) Stomatal conductance for CO_2 as a function of leaf irradiance. Stomatal conductance values are relative to the mean maximal stomatal conductance value obtained for intact leaf tissues ($g_s / g_{s,max}$). Non linear regressions: Intact leaf, $y = (1.515 x + 118.04) / (x + 843.35)$, $R^2 = 0.98$; Empty mine, $y = (0.234 + 2.21 \cdot 10^{-3} x^{0.5}) / (1 - 0.044 x^{0.5} + 1.03 \cdot 10^{-3} x)$, $R^2 = 0.65$; Occupied mine, $y = (0.13 - 5.917 \cdot 10^{-4} x^{0.5}) / (1 - 0.059 x^{0.5} + 1.21 \cdot 10^{-3} x)$, $R^2 = 0.63$; $P < 0.001$ for all. (B) Net assimilation rate, A_{net} , as a function of leaf irradiance. Non linear regressions: Intact leaf, $y = -2.13 - 6.547 \cdot 10^{-3} x + 0.547 x^{0.5}$, $R^2 = 0.93$; Empty mine, $y = -4.011 - 0.011 x + 0.736 x^{0.5}$, $R^2 = 0.95$; Occupied mine, $y = -3.22 - 8.8 \cdot 10^{-3} x + 0.593 x^{0.5}$, $R^2 = 0.94$; $P < 0.001$ for all.

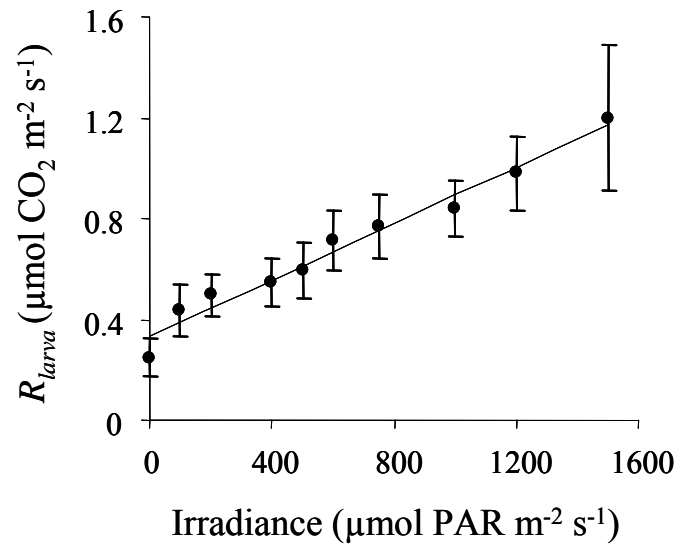


Figure 4. Insect ecophysiology. Respiration rate, R_{larva} (mean \pm SD), of a single larva as a function of irradiance level at air temperature around insects 25 °C and RH 80 to 90%. Each point represents the mean of four replicates. Linear regression: $y = 0.0006 x + 0.332$, $R^2 = 0.97$, $P < 0.001$. R_{larva} is expressed in $\mu\text{mol CO}_2$ per unit mine surface per unit time.

Predicted C_c light response of mines and intact leaves

A non linear decrease was observed for the chloroplast CO_2 concentration (C_c) predicted by the models for intact leaves, empty mines and occupied mines with increasing irradiance (Fig. 5). The response curves of empty mines and occupied mines did not differ significantly from that of intact leaf tissues although a difference of $\sim 0.9 \text{ mmol m}^{-3}$ can be observed at high irradiance ($F_{1,63} = 0.37$, $P = 0.55$ and $F_{1,60} = 0.20$, $P = 0.65$, respectively) (Fig. 5).

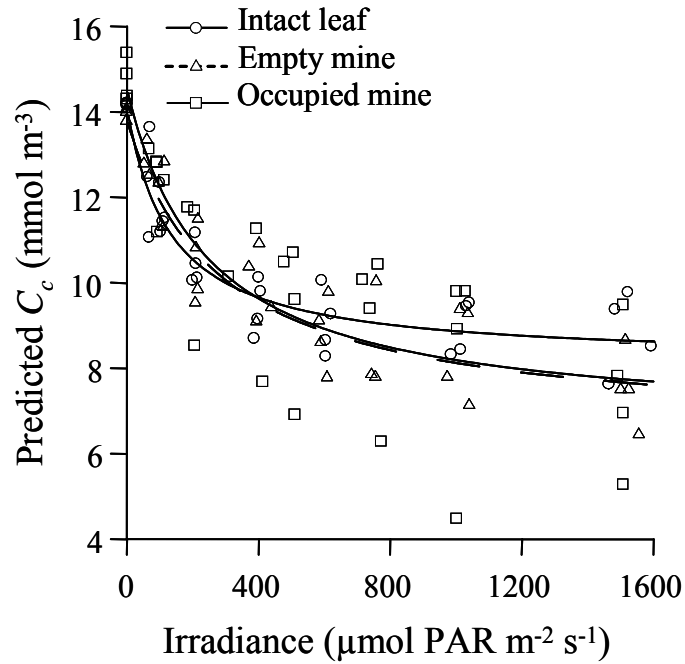


Figure 5. Predicted chloroplast CO_2 concentration (C_c) as a function of leaf irradiance for intact leaf tissues, empty mines and occupied mines. The fitted model was $[y = (a + cx)/(1 + bx)]$ for the three categories: Intact leaf, $a = 14.24$, $b = 7.71 \cdot 10^{-3}$, $c = 0.06$, $R^2 = 0.88$, $F_{2,28} = 112.94$; Empty mine, $a = 13.99$, $b = 3.57 \cdot 10^{-3}$, $c = 0.02$, $R^2 = 0.87$, $F_{2,31} = 115.02$; Occupied mine: $a = 14.69$, $b = 4.20 \cdot 10^{-3}$, $c = 0.03$, $R^2 = 0.68$, $F_{2,28} = 35.26$; $P < 0.001$ for all.

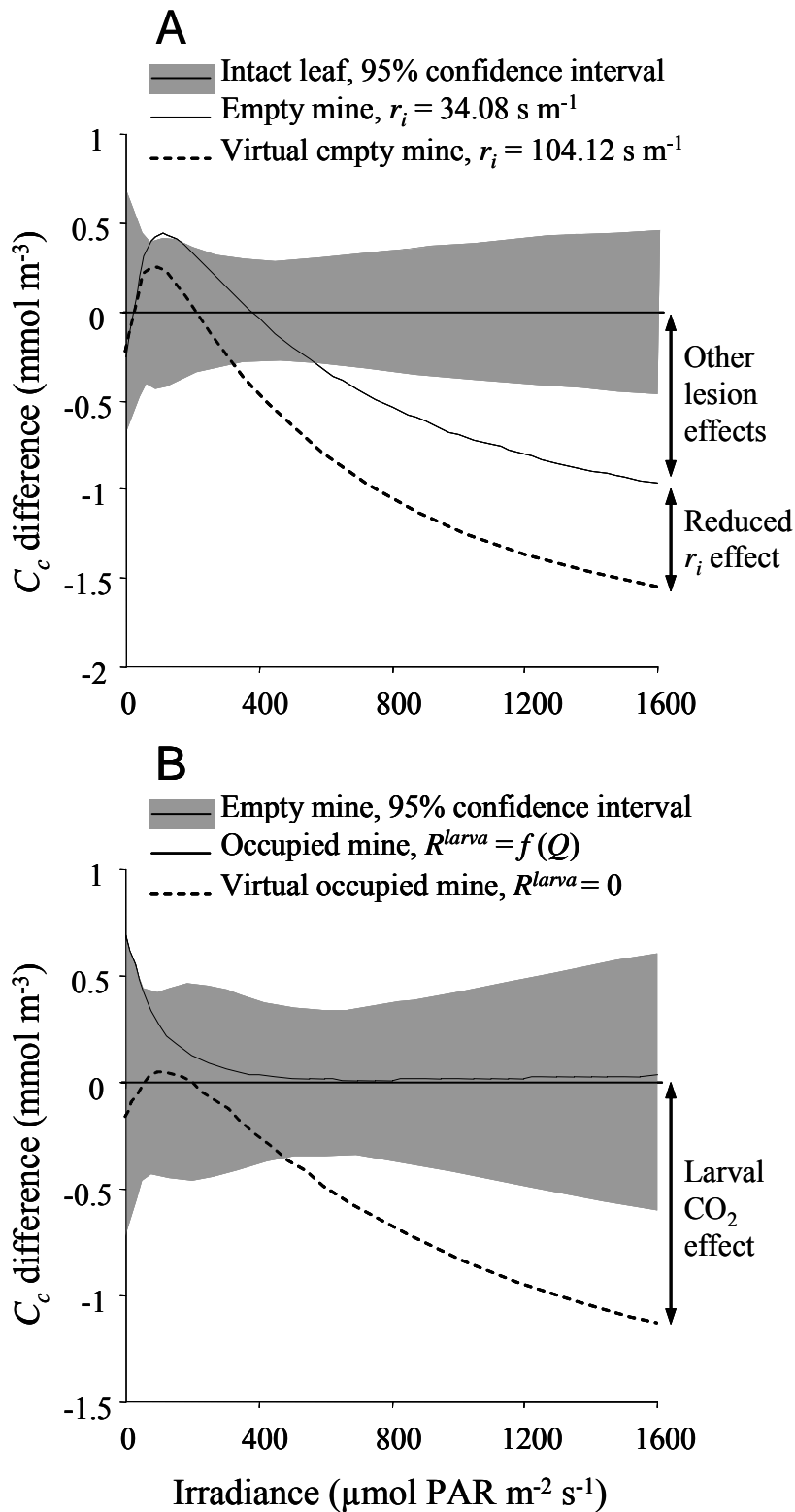
Effects of the miner on the CO_2 diffusive transport

We tested whether C_c predictions of virtual mines are significantly lower than those of both empty and occupied mines, which would indicate that the observed stomatal closure is significantly caused by the alteration in r_i and/or by the larval CO_2 .

The non linear model $[y=(a + cx)/(1 + bx)]$ was fitted on the C_c light response of virtual empty mines (non linear regression, not shown: $a=14.02$, $b=3.64 \cdot 10^{-3}$, $c=0.02$, $R^2 = 0.88$, $F_{2,31}=121.83$, $P < 0.001$). We then calculated two differences, between the regression line of intact leaf tissues (shown on Fig. 5) and (i) the regression line of empty mines (using r_i measured on empty mines, shown on Fig. 5) (Δ_{I-E}), (ii) the regression line of virtual empty mines (Δ_{I-VE}). Virtual empty mine predictions were $\Delta_{I-E} = 1.55 \text{ mmol m}^{-3}$ ($=3.8 \text{ Pa}$) lower than that of intact leaf tissues at high irradiance (Fig. 6A). C_c predictions of virtual empty mines were well below original predictions of empty mines (Fig. 6A). The difference was up to 0.6 mmol m^{-3} ($=1.5 \text{ Pa}$) between empty mines and virtual empty mines, corresponding to about 40

% of the whole difference between virtual empty mines and intact leaf tissues (Δ_{I-VE}). This indicates that the reduced r_i participated significantly to stomatal closure but it only explained 40 % of the whole lesion effect.

The same non linear model as above was fitted on the C_c light response of virtual occupied mines (not shown: $y=(a + cx)/(1+ bx)$, $a=13.83$, $b=2.33 \cdot 10^{-3}$, $c=0.01$, $R^2 = 0.64$, $F_{2,28}=29.63$, $P < 0.001$). We calculated two differences, between the regression line of empty mines (shown on Fig. 5) and (i) the regression line of occupied mines (with $R^{larva} = f(Q)$, shown on Fig. 5) (Δ_{I-O}), (ii) the regression line of virtual occupied mines (with $R^{larva} = 0$) (Δ_{I-VO}). The predictions for virtual occupied mines were well below the 95% confidence interval of empty mine predictions whereas the predictions for occupied mines did not differ from that of empty mines (Fig. 6B). C_c predictions of virtual occupied mines were $\Delta_{I-VO} = 1.10 \text{ mmol m}^{-3}$ ($=2.7 \text{ Pa}$) lower than that of occupied mines at high irradiance (Fig. 6B). Therefore, stomata responded significantly by closing to the CO_2 released by a larva. The difference between occupied and empty mines is fully explained by the larval CO_2 effect.



DISCUSSION

We showed that feeding activity of *Phyllonorycter blancardella* leads to 13 % and 34 % lower maximal net CO₂ assimilation rates in empty and occupied mines, respectively, as compared to intact leaves (Table 1). This loss of photosynthetic activity is proportionally related to the mine area occupied by feeding windows, which is larger in occupied mines than in empty mines (20 % and 36 % in empty and occupied mines, respectively), the photosynthetic activity of green patches being not altered. This result is consistent with that reported by Raimondo and colleagues (2003) for another leaf miner species. This response seems specific to endophagous herbivores and strongly contrasts with the case of ectophagous herbivores for which the decrease in assimilation rate could be six times larger than the area removed by feeding (Zangerl *et al.* 2002).

Moreover, the decrease in stomatal conductance in occupied mines at high irradiance (82 %) was more than two times higher than that in assimilation rate (34 %). This ratio between water and photosynthetic loss that we observed at the mine scale could apply also at the whole leaf scale assuming that gas exchange in leaf tissues adjacent to the mines are not altered (Table 3). This assumption can be tested confronting our data with that given in Proctor *et al.* (1982). These authors measured a decrease of only 23 % in the whole apple leaf net assimilation rate despite the presence of 20 mines on leaves of 33 cm² area. In our study, a single mine area corresponds to an area of 0.4 cm² feeding windows. Therefore, the feeding window area corresponding to 20 mines is 8 cm² and occupies 24 % of a 33 cm² leaf surface, leading to a reduction of 24 % in net assimilation rate which matches with observations reported by Proctor *et al.* (1982). By contrast, the same calculation for stomatal conductance leads to a reduction of 54 % for 20 mines (Table 3). This mismatch between water and photosynthetic losses can be explained by the fact that a larva is a CO₂ source within a mine. By sensing the intercellular CO₂ concentration within a mine, stomata adapt their opening level such that the chloroplast CO₂ concentration reaches a level allowing an optimal functioning of the CO₂ assimilation (Morison 1987; Assmann 1999; Huxman & Monson 2003; Tuzet *et al.* 2003). At high leaf irradiance, stomata are closing so that stomatal conductance for CO₂ and water vapour strongly decreases. The CO₂ released concurrently by a larva increases and allows green patches to maintain a high photosynthetic rate. The mechanism causes a large increase (133 %) in water-use efficiency (CO₂ fixed : H₂O transpired ratio) at the mine scale (Table 3). This result contrasts with that reported by Aldea *et al.* (2005), who found that attacks from an ectophagous insect cause transpiration rate to

increase whereas assimilation rate was not affected, leading therefore to a lower leaf water-use efficiency. We also predict that the presence of 20 mines on a single leaf leads to an increase of 65 % in the whole leaf water-use efficiency (Table 3). Therefore, the negative effects of endophagous insects' feeding activity on leaf tissues are mitigated by the positive effects due to a large reduction in water loss and a trapping of larval CO₂.

Table 3. The unbalance between photosynthetic and water loss at high irradiance level ($Q = 1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The reduction in net assimilation rate and stomatal conductance in a single mine (mine scale) was assessed by comparing values obtained on intact leaf tissues and occupied mines (shown in Table 1). The reduction in net assimilation rate and stomatal conductance was calculated for a typical apple leaf (area 33 cm², whole leaf scale) containing (i) a single mine and (ii) 20 mines, assuming that gas exchange in the intact leaf tissues adjacent to the mines are not altered. Calculation rules were that (i) the decrease in net assimilation rate is directly proportional to the area occupied by feeding windows, and (ii) absolute stomatal conductance values were calculated for both the intact area and the mined surface of a leaf, and subsequently added to each other and expressed per squared meter to be compared to the maximal leaf stomatal conductance value that was measured (see Table 1). Water-use efficiency (net assimilation : transpiration rate ratio, in mol m⁻² s⁻¹ for the two terms) of intact leaf tissues and occupied mines was 0.0029 CO₂/H₂O and 0.0069 CO₂/H₂O, respectively. The transpiration rate was recorded by the infrared gas analyzer during gas exchange measurements. Water-use efficiency at the whole leaf scale was predicted using the percentage of reductions in net assimilation and stomatal conductance.

	% reduction or increase at $Q = 1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$		
	Measured at mine scale	Predicted at whole leaf scale	
		1 mine	20 mines
Net assimilation rate	-34 %	-1 %	-24 %
Stomatal conductance	-82 %	-3 %	-54 %
Water-use efficiency	+133 %	+2 %	+65 %

For leaves with occupied mines, we hypothesized that CO₂ released by a larva is entirely re-assimilated and does not diffuse outside the leaf, as it is assumed for leaf photorespiratory and respiratory CO₂ release. The results recently reported by Pinelli & Loreto (2003) support this idea and show that only a small amount of CO₂ (0.5 μmol m⁻² s⁻¹) could leave intercellular space. This amount is negligible compared to the values of assimilation and stomatal conductance, in particular at high irradiance, and would not cause significant deviations in model predictions. The simulation of an empty mine using the dark respiration value of intact leaf tissues gave predictions that did not differ from the predictions obtained using the dark respiration directly measured on empty mines (not shown), although it was about two-fold that of intact plant tissues (Table 1). This result suggests that enhanced dark respiration, which is assumed to occur as well in the dark as in the light, does not alter the CO₂ diffusive transport within a mine. Indeed, in a mine placed in the dark, the plant respiratory CO₂ might diffuse more easily outside the leaf due to the very low intercellular air space resistance to CO₂, explaining the increase in dark respiration we observed in mines.

The light response curves we report for both net assimilation rate and stomatal conductance in an intact leaf are consistent with those generally found for C3 plants (e.g. Morison 1987; Jones 1992; Huxman & Monson 2003). The intracellular CO₂ concentration drops from irradiance 0 to ~ 400 μmol m⁻² s⁻¹ (Fig. 6) because the slope of the net assimilation rate response curve is higher than that of the stomatal conductance curve (Fig. 3). By contrast, from moderate to high irradiance, the CO₂ diffusing through stomata strictly compensates for the CO₂ assimilated by leaf tissues, leading to a fairly stable intracellular concentration. Several studies have demonstrated that inter- and intracellular CO₂ content are directly driven by the relative dynamics of assimilation rate and stomatal conductance in a variable light environment (e.g. Morison 1987; Tenhunen *et al.* 1987). Here we show that the dynamics of chloroplast CO₂ content within a mine is similar to that predicted in intact leaf tissues despite the much different pattern of stomatal conductance. The CO₂ released by a larva increases with leaf irradiance due to the large portion of radiations transmitted by the feeding windows within the mine, inducing increased body temperature and respiration rate (**chapter 1**). By sensing intercellular CO₂ concentration, stomata are directly affected by the linear increase in larval respiration as irradiance increases. From moderate to high irradiance, net assimilation rate approaches saturation level and only slightly increases. By contrast, the rate of increase in larval respiration rate is unchanged, so that stomatal conductance linearly decreases (Fig. 3). Therefore, the optimal level of chloroplast CO₂ content is maintained within a mine due to the ability of stomata to adjust their opening level in response to both the lower intercellular air

space CO₂ resistance and the larval CO₂ production. Stomata react to these perturbations in the same way as they respond to an increase in atmospheric CO₂ content, i.e. by closing (Assmann 1999; Jarvis *et al.* 1999).

The modelling approach allowed us to quantify the relative impact of the lesion and larval CO₂ effect. Usually, the gaseous phase resistance is a minor constraint on mesophyll conductance, the liquid phase being the main component (Syvertsen *et al.* 1995). We found in intact apple leaves that the intercellular air space resistance is of the same order of magnitude as the liquid phase resistance value. By eliminating most internal leaf tissues (75% of a mine volume is air), a larva severely lowers the intercellular air space resistance. Therefore, the liquid phase resistance becomes the only constraint on the internal CO₂ conductance in mines. The model fails to explain the lesion effect since predictions for empty mines dropped significantly from moderate to high irradiance compared to predictions for intact leaf tissues (Fig. 6 A). This indicates that stomatal closure in empty mines is higher than expected by considering only the reduced intercellular resistance. The results show that the reduced intercellular air space resistance amounted to ~ 40 % of the lesion effect. Whatever the exact mechanism is for the lesion effect, our results clearly show that the stomata in occupied mines close in response to the CO₂ released by the larva. Simulations of virtual occupied mines indicate that by eliminating the larval CO₂ source and by keeping the observed pattern of stomatal closure, the chloroplast CO₂ concentration is significantly lower than that of empty mines from moderate to high irradiance (Fig. 6 B). Therefore, the participation of the larval CO₂ to stomatal closure is significant. The lesion and the larval CO₂ effects impact almost equally the CO₂ balance of a mine.

The responses of stomata to lesion and larval effects are tightly coupled, as the very low intercellular air space resistance permits a faster diffusion of the larval CO₂ within the mesophyll. Overall, as leaf irradiance increases, the mechanism of CO₂ diffusive transport shifts from an open system - the atmospheric CO₂ diffusing from open stomata - to a closed circuit - closed stomata and larval CO₂ diffusing easily through the mesophyll. Most studies dealing with the impact of herbivory on plant gas exchange and productivity usually report and quantify the physiological response of the plant in term of tissues losses and in term of chemical weapon (e.g. McDonald & Cahill 1999; Zangerl *et al.* 2002). Our results stress the existence of a neglected mechanism that is of high physiological importance for the plant: the perturbations in the CO₂ diffusive transport caused by the herbivore presence.

CHAPITRE III.

Multitrophic biophysical budgets: Thermal ecology
of an intimate herbivore insect-plant interaction

Pincebourde Sylvain & Casas Jérôme
Ecological Monographs, sous presse.

INTRODUCTION

Temperature is a strong selection pressure for ectothermic organisms which respond through two main mechanisms. Some species behaviorally select a thermal environment naturally present in their habitat that permits some optimal or at least survivable range of body temperatures. In this case, habitat selection has strong consequences on the organism physiology and species are expected to develop sensory and behavioral mechanisms allowing detection and discrimination of a suitable thermal environment (Huey 1991). The use of thermal cues to detect a favorable thermal environment has been found, for example, in reptiles (e.g. Pringle *et al.* 2003) and arthropods (e.g. Goldsborough *et al.* 2004). Other species have evolved physiological and behavioral processes that allow them to directly modify their microclimate by manipulating their physical microhabitat (Danks 2002). Selection pressures partly act on strategies used by organisms to modify their proximate environment which in turn provides them with an altered thermal environment. A beautiful example is given by the social tent building caterpillars *Eriogaster lanestris*. The tent wall, built by the larvae, shields the tent from most of incoming radiation and reduces heat exchanges with ambient air. This allows caterpillars to stabilize their body temperature over a wide range of ambient temperatures by adjusting the level of collective metabolic heat production (Ruf & Fiedler 2000, 2002).

Body temperature has a pervading influence on most biological functions in insect species, including metabolic rate (e.g. van Loon *et al.* 2005), feeding rate (e.g. Kingsolver 2000), development time (e.g. Gilbert & Raworth 1996; Rombough 2003), mate location (e.g. Van Dyck & Matthysen 1998) and general physiological performance (e.g. Huey & Kingsolver 1989). Predicting body temperature is a difficult task because it could be influenced by both abiotic variables of the microclimate (e.g. microclimate temperature, incoming radiation, and relative humidity) and biotic elements positioned close to the organism (e.g. conspecifics, predators), as well as by characteristics of the organism itself. Thus, feedback loops can be expected between abiotic and biotic factors (Helmuth 1998, 2002). Modeling heat budgets has been proven to be a powerful approach to elucidate the biophysical mechanisms determining the body temperature of many organisms (Gates 1980). This biophysical approach was applied on plant leaves (Campbell & Norman 1998; Nobel 1999), cacti (Nobel 1988), several insect species (e.g. Kingsolver & Moffat 1982; Casey 1992; Lactin & Johnson 1998), mussels (Helmuth 1998) and reptiles (e.g. Spotila *et al.* 1972; Grant & Porter 1992; O'Connor & Spotila 1992; O'Connor 1999). These models are highly sophisticated because they predict

not only body temperature but also the relative influence of the surrounding microclimate on the organism. Thus, their flexible feature allows these models to include behavioral or physiological components of the organism (e.g. Casey 1992). However, these energy budgets usually deal with the influence of abiotic components on the thermal budget of the organism and few studies have incorporated the impact of biotic factors on organism's temperature. Helmuth (1998) showed that the body temperature of a solitary mussel is warmer than the one of individuals in a mussel bed under extreme climatic conditions. Patiño *et al.* (1994) demonstrated that *Ficus* fruit physiology is regulated such that fruit temperature is below the upper lethal temperature of its mutualistic pollinator wasp. Few other studies tackle the thermal interaction between plants and their pollinators, but without reference to any mechanistic heat budget (e.g. Herrera 1995; Orueta 2002; Seymour *et al.* 2003). Furthermore, no study attempted so far has established a comprehensive heat budget of multitrophic relationships in which the budgets of both partners have been detailed. Here we use a mechanistic heat budget to explore the thermal ecology of an insect – plant relationship.

Insects living inside or at the leaf surface experience a thermal environment which is regulated by the plant. The plant thermal regulation system determines directly leaf temperature (Campbell & Norman 1998) and involves a tight control of the stomata opening level (Ziegler 1987). This mechanism allows leaf temperature to be colder or warmer by several degrees than ambient air (e.g. Jones 1999). However, some insects such as galling insects, leaf miners, leaf rollers and leaf tiers, do manipulate leaves and other plant parts. These insects might modify the temperature regulation system of the leaf in order to achieve an altered microclimate. For example, galls can be warmer by several degrees than ambient during sunny days. Temperature within galls remains, however, highly temporally variable (Layne 1993). Turner (2000) suggests that some galling insects live in a warm environment due to the design of their gall which stands out of the leaf boundary layer. Overall, very little is known about the way endophagous insects manipulate their host plant and the extent to which this may alter their microclimatic environment.

Leaf miners are sessile organisms allowing a study of the tight coupling between the insect and host plant physiology in great detail. The leaf miner *Phyllonorycter blancardella* F. (Lepidoptera, Gracillariidae) was found to induce stomatal closure in the attacked leaf parts as a result of both plant tissue reactions to larval feeding pattern and the CO₂ released by larvae within the mine (**chapter 2**). Stomatal closure considerably limits water vapor loss out of a mine and probably leads to retention of latent heat linked to evaporation. This could affect the thermal budget of a mine and thereby the temperature within it. Moreover, the leaf areas fed

by leaf miners transmit most incident radiations within the mine whereas intact tissues in the mine epidermis transmit radiations only weakly (**chapter 1**). Body temperature could therefore be determined not only by microhabitat temperature but also by radiation level and by the use of microhabitat by larvae, i.e. whether larvae position themselves below fed or intact mined tissues.

We investigated the thermal environment of the leaf miner *Phyllonorycter blancardella* (Lepidoptera, Gracillariidae) in great detail. We built a biophysical model to predict the temperature within a mine from climatic, ecophysiological and physical parameters. This model is based on the energy budget of a leaf and incorporates the measured modifications that a leaf miner causes on plant tissues. These are related to the induced changes in both optical properties of the leaf surface and stomatal behavior. Model temperature predictions were verified against experimental measurements made under controlled conditions. Model explorations allowed us to quantify the effects of these different modifications on the microclimate temperature larvae undergo and to quantify the extent of the temperature decoupling between host leaves and insect microhabitat. Body temperature was then determined using predicted mine temperatures and an empirical relationship between body-to-mine temperature deviation and radiation level.

MATERIALS AND METHODS

Insects and plants

The spotted tentiform leaf miner *P. blancardella* develops on apple leaves and larvae grow within the leaf lamina, inside a ‘sealed sack’ called a mine. Stomata in mined leaf tissues are the only bridges between the mine and the ambient atmosphere. Larval development is divided into five instars (Pottinger & LeRoux 1971). The first three instars are characterized by a sap feeding behavior that defines the outline of the mine by separating leaf tissues into upper and lower sides. Larvae are tissue feeders during the fourth and fifth instars. This feeding behavior results in the formation of translucent patches called feeding windows (Djemai *et al.* 2000), which remain after chlorophyll-containing tissues have been consumed (Fig 1 A). The mine of a last instar larva usually has a surface of $\sim 1 \text{ cm}^2$ and offers a relatively large space for a larva, as the upper mine integument bulges [larval volume is ~ 2.8

mm³ and the total mine volume is ~ 95.0 mm³ (S. Pincebourde, unpublished data)]. The lower mined leaf tissues remain flat.

Six-month old apple seedlings (*Malus communis*) were reared in a greenhouse at mean air temperature of 19.9°C, mean relative humidity of 59.5 % and maximal irradiance 1500 μmol m⁻² s⁻¹. Seedlings were planted in earthenware pots (11.5 cm in diameter) and watered every two days with a nutritive solution (NPK 6:6:6). The emergence date, corresponding to full expansion of each leaf, was recorded to control for leaf age.

The leaf temperature model

The temperature of a leaf is determined by an energy balance model of a leaf (Campbell & Norman 1998; Nobel 1999) which is

$$R_n + H + E = 0 \quad (1)$$

Here, R_n represents the net radiation heat flux, H corresponds to the sensible heat flux (heat transferred by conduction and convection due to a temperature difference) and E is the latent heat flux (heat lost through water evaporation). All processes are expressed in flux rate density (W m⁻²) and values are positive or negative depending on the direction of the heat transfer (gained or lost by the leaf, respectively). Very little energy is stored or metabolized in a leaf, so that both energy storage and heat absorption during photosynthesis can be neglected (Campbell and Norman 1998; Nobel 1999). We followed the procedures of Campbell and Norman (1998) to detail the different balances, which are averaged between upper and lower surfaces.

The net radiation budget of a leaf — Leaves absorb radiation in the visible (or PAR, photosynthetically active radiation, from 400 nm to 700 nm), near infrared (from 800 nm to 2500 nm) and thermal infrared ranges (above 2500 nm) (Campbell & Norman 1998). Leaves also emit radiation in the thermal infrared range. The net radiation budget is

$$R_n = a_L^{VIS} I^{VIS} + a_L^{NIR} I^{NIR} + a_L^{TIR} I^{TIR} - \varepsilon_L \sigma T_L^4 \quad (2)$$

The net radiation budget depends on leaf absorbance a_L^{VIS} , a_L^{NIR} and a_L^{TIR} in the visible, near infrared and thermal infrared ranges respectively and on leaf emissivity in the thermal infrared range, ε_L . These parameters determine directly the portion of the total incident radiations (direct and diffuse) that a leaf absorbs in the visible (I^{VIS}), near infrared (I^{NIR}) and thermal infrared (I^{TIR}) regions respectively (all in W m⁻²). The emission of thermal infrared radiations by a leaf depends on the Stephan-Boltzman constant ($\sigma = 5.67 \cdot 10^{-8}$ W m⁻² K⁻⁴) and on leaf

temperature T_L (K), assuming a leaf as a black body (Campbell & Norman 1998). According to the Kirchoff's law, absorbance in the thermal infrared range equals the emissivity. This value is around 0.97 for leaves, i.e. $a_L^{TR} = \varepsilon_L = 0.97$ (Campbell & Norman 1998).

The sensible heat budget of a leaf – The sensible heat flux leaving a leaf is determined by

$$H = c_p g_L^{ha} (T_L - T_{air}) \quad (3)$$

where c_p is the specific heat of the air ($29.3 \text{ J mol}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$), g_L^{ha} is the leaf boundary layer conductance for heat ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), and T_{air} is air temperature (K). During forced convection processes, the leaf boundary layer conductance for heat is calculated from

$$g_L^{ha} = 1.4 * 0.135 \sqrt{\frac{u}{d_L}} \quad (4)$$

The boundary layer conductance for heat depends on wind velocity, u (m s^{-1}), and on leaf characteristic dimension, d_L (m). The factor 0.135 is obtained from values of air viscosity, air density and air diffusivity (Campbell & Norman 1998). The characteristic dimension of a leaf is estimated from

$$d_L = 0.72 l_L \quad (5)$$

where l_L is the maximal width of the leaf (m).

The latent heat budget of a leaf – A leaf loses water vapor through its lower and upper tissues (stomata and epidermis, respectively). The latent heat lost during this evaporation process is determined by

$$E = \lambda g_L^v \left(\frac{e_s(T_L) - e_a}{p_a} \right) \quad (6)$$

Here, λ is the latent heat of vaporization for water ($\lambda = 44 \text{ kJ mol}^{-1}$ at 25°C), g_L^v is the leaf conductance for water vapor transfer ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), $e_s(T_L)$ is the saturated water vapor pressure (Pa) at leaf temperature T_L ($^\circ\text{C}$), e_a is the water vapor pressure in the air (Pa) and p_a is the atmospheric pressure ($p_a = 101.3 \cdot 10^3 \text{ Pa}$). The term $e_s(T_L) - e_a$ corresponds to the leaf water vapor pressure deficit (D_L). Equation (6) is based on the assumption that the internal atmosphere of a leaf is saturated for water vapor. This assumption is reasonable since relative humidity within the leaf atmosphere is higher than 95 % (Nobel 1999). The Tetens empirical

equation is convenient to calculate the saturation water vapor pressure from leaf temperature ($^{\circ}\text{C}$)

$$e_s(T_L) = 0.611 \text{EXP} \left(\frac{17.502 T_L}{T_L + 240.97} \right) \quad (7)$$

The water vapor pressure in the air e_a could be determined from air temperature and relative humidity hr , which are parameters easier to measure than e_a , from

$$e_a = hr * e_s(T_{air}) \quad (8)$$

Air is said to be saturated when $hr = 1$. The saturation water vapor pressure in the air is determined using equation (7). The leaf conductance for water vapor is computed by combining the boundary layer conductance (g_L^{va}) and the tissue conductance (stomatal conductance, g_L^{vs} and epidermis conductance, g_L^{ve}) for water vapor. The leaf conductance for a hypostomatous leaf, i.e. having stomata only on the lower side, is

$$g_L^v = \frac{0.5}{\frac{1}{g_L^{va}} + \frac{1}{g_L^{vs}}} + \frac{0.5}{\frac{1}{g_L^{va}} + \frac{1}{g_L^{ve}}} \quad (9)$$

The boundary layer conductance for water vapor is

$$g_L^{va} = 1.4 * 0.147 \sqrt{\frac{u}{d_L}} \quad (10)$$

The factor 0.147 results from the use of water vapor viscosity, density and diffusivity. The stomatal conductance is determined by environmental variables. We used the model of Jarvis (1976) according to which the effect of each variable is independent from each other (non-synergetic interactions). Stomatal conductance was therefore calculated by

$$g_L^{vs} = g_L^{s\max} f_L^1(Q) f_L^2(D_L) f_L^3(T_L) \quad (11)$$

where $g_L^{s\max}$ is the maximal stomatal conductance ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), attained under specific levels of leaf irradiance (Q : $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$), leaf water vapor pressure deficit (D_L : Pa) and leaf temperature (T_L : $^{\circ}\text{C}$), and f_L^1 , f_L^2 , and f_L^3 are the functions describing the variations of the stomatal conductance relative to the maximal value following a change in leaf irradiance level, leaf water vapor pressure deficit and leaf temperature respectively.

The leaf temperature calculation — Returning to the equation (1) and replacing each term by its full expression, we solved the equation for leaf temperature using iterative procedures for non-linear equations. The solution cannot be expressed explicitly because (i) leaf temperature is expressed at the fourth power in the thermal infrared emittance term

(equation (2)), (ii) leaf temperature is expressed within an exponential in the term for saturation water vapor pressure (equation (6) and (7)) and (iii) leaf temperature is included within the complex expression of the stomatal conductance term (equation (11)).

The mine temperature model

The model we built computes the energy balance of a mine using the same concepts and procedures as before. The sensible heat being exchanged between a mine and adjacent leaf tissues was furthermore integrated into the model (Fig. 1 B). The energy budget of a mine is then

$$R_n + H_a + R_s H_l + E = 0 \quad (12)$$

R_n is the net radiation heat flux, H_a is the sensible heat flux exchanged between a mine and ambient air, H_l is the sensible heat flux exchanged between a mine and adjacent leaf tissues and E is the latent heat flux (Fig. 1 B). The balances R_n , H_a and E are expressed in watts per unit of mine area (W m^{-2}) whereas the balance H_l is expressed in watts per unit of mine-leaf contact surface (W m^{-2}). We employed the term R_s to convert H_l in watts per unit of mine area. This term was calculated following

$$R_s = \frac{P_M}{S_M} \quad (13)$$

where P_M is the area of the mine-leaf interface (m^2) and S_M is the mine area (m^2).

The net radiation budget of a mine — As for a leaf, a mine receives radiation from the visible, near infrared and thermal infrared ranges. The net radiation budget of a mine is

$$R_n = a_M^{VIS} I^{VIS} + a_M^{NIR} I^{NIR} + a_M^{TIR} I^{TIR} - \varepsilon_M \sigma T_M^4 \quad (14)$$

where a_M^{VIS} , a_M^{NIR} and a_M^{TIR} are mine absorbance in the visible, near infrared and thermal infrared ranges respectively. The term of emitted thermal radiations depends on mine temperature, T_M (K) and on mine emissivity, ε_M . Since a mine is made from plant tissues we assume that $a_M^{TIR} = \varepsilon_M = 0.97$.

The sensible heat budget of a mine — A mine is assumed to be a flat surface. Implications of this assumption are discussed later. The sensible heat flux exchanged between a mine and ambient air can be written as

$$H_a = c_p g_M^{ha} (T_M - T_{air}) \quad (15)$$

where g_M^{ha} is the mine boundary layer conductance for heat ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A mine (area of 1 cm^2) is considered as being a part of the leaf structure and boundary layer considered identical to the one of the whole leaf (i.e. $g_M^{ha} = g_L^{ha}$). It is therefore calculated from equation (4) under forced convection process. The sensible heat flux exchanged between a mine and adjacent leaf tissues is computed from

$$H_l = c_p g_{ML}^{hl} (T_M - T_L) \quad (16)$$

Here g_{ML}^{hl} is the conductance for heat at the mine-leaf interface ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). We assume that wind velocity within a mine is zero. Consequently, heat is conducted between a mine and adjacent leaf tissues through free convection mechanisms only. The conductance for heat at the mine-leaf interface in free convection is

$$g_{ML}^{hl} = 0.05 \left(\frac{T_M - T_L}{P_M} \right)^{0.25} \quad (17)$$

P_M being the area of the mine-leaf interface (m^2). The mine-leaf interface is assumed here to be a rectangular flat surface for which the large length corresponds to the perimeter of the mine and the small length to the thickness of the leaf. The factor 0.05 results from the use of air properties (Campbell & Norman 1998).

The latent heat budget of a mine — Latent heat lost by a mine when water vapor leaves the system is determined by

$$E = \lambda g_M^v \left(\frac{e_s(T_M) - e_a}{P_a} \right) \quad (18)$$

Here g_M^v is the mine conductance for water vapor ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and $e_s(T_M)$ is the saturation water vapor pressure (Pa) at temperature T_M ($^{\circ}\text{C}$). The term $e_s(T_M) - e_a$ corresponds to the water vapor pressure deficit of the mine (D_M ; Pa). The relation (18) implies that the air inside the mine is near saturation for water vapor, as it is for the leaf internal atmosphere. This assumption is supported by the observation of water condensation inside the mine after a rapid drop in mine temperature (Sylvain Pincebourde and Jérôme Casas, personal observation). The saturation water vapor pressure $e_s(T_M)$ is determined by the equation (7) from the mine temperature. The conductance term g_M^v is computed from

$$g_M^v = \frac{0.5}{\frac{1}{g_M^{va}} + \frac{1}{g_M^{vs}}} + \frac{0.5}{\frac{1}{g_M^{va}} + \frac{1}{g_M^{ve}}} \quad (19)$$

where g_M^{va} is the mine boundary layer conductance, g_M^{vs} is the mine stomatal conductance and g_M^{ve} is the upper mine epidermis conductance for water vapor. This equation is given for an hypostomatous leaf. Following the logic explained for the boundary layer conductance for heat, the mine boundary layer conductance for water vapor is expected to equal the leaf boundary layer conductance for water vapor, g_L^{va} , which is computed from equation (10). The model from Jarvis (1976) was used to determine the mine stomatal conductance

$$g_M^{vs} = g_M^{smax} f_M^1(Q) f_M^2(D_M) f_M^3(T_M) \quad (20)$$

where g_M^{smax} is the maximal stomatal conductance of mined leaf tissues ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), attained under specific levels of leaf irradiance (Q), mine water vapor pressure deficit (D_M : Pa) and mine temperature (T_M : °C). f_M^1 , f_M^2 , and f_M^3 are the functions describing variations of stomatal conductance relative to the maximal value following a change in leaf irradiance, mine water vapor pressure deficit and mine temperature, respectively.

The mine temperature calculation — As for the computation of the leaf temperature, each term in equation (12) was replaced by its full expression. The thermal balance of the mine was expressed as a complex polynomial expression which was solved by an iterative process. The two models (leaf temperature and mine temperature) were combined in order to predict leaf and mine temperature from the driving variables air temperature, air relative humidity and irradiance level. All driving variables and model parameters experimentally measured are given in Table 1. The changes in leaf tissues caused by the leaf miner were also quantified (see below).

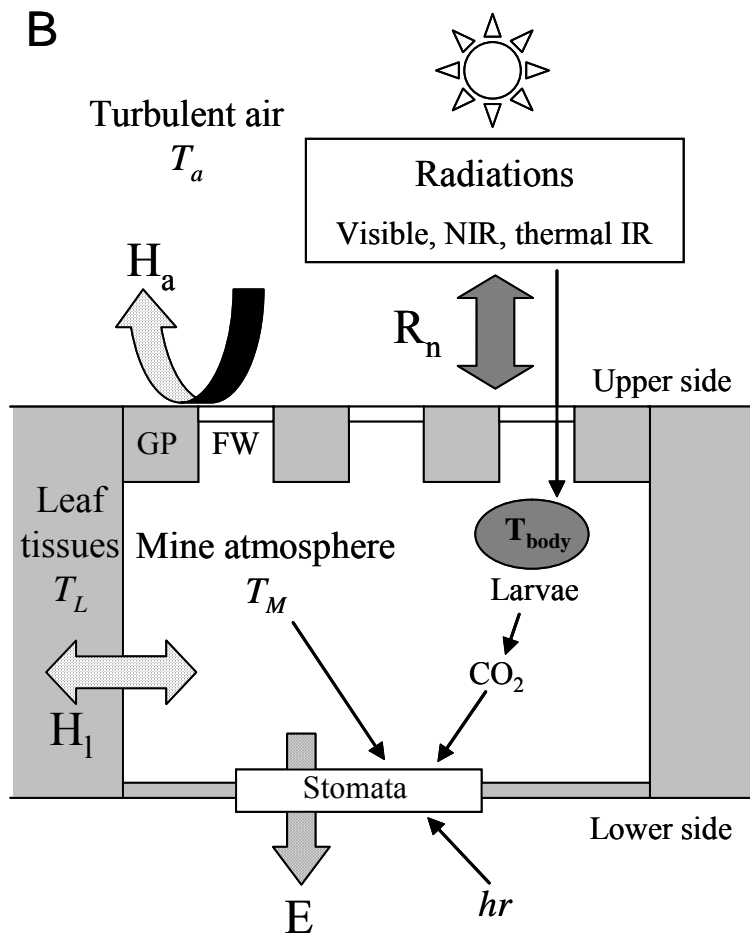
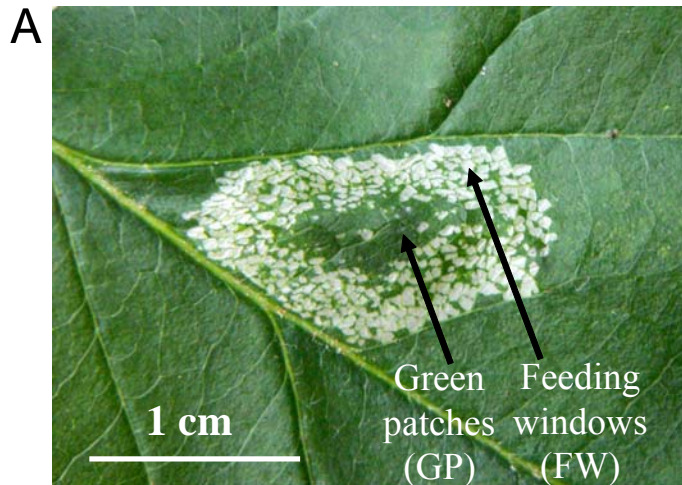


Figure 1. The mine structure. **(A)** The upper surface of a mine. The feeding activity of a larva results in the formation of feeding windows (FW). Green patches (GP) correspond to intact chlorophyll-containing leaf tissues remaining in the mine. Mines of last instars larvae are oblong shaped. **(B)** Schematic cross section of a mine and determinants of heat transfer. The surface of the mine is assumed to be flat. Body temperature of a larva (T_{body}) is affected by temperature within the mine (T_M) and by the amount of radiation transmitted through the feeding windows. Mine temperature is determined by (i) the net radiation budget (R_n), (ii) sensible heat exchanged between the mine and ambient air (H_a) which is at temperature T_a (forced convection processes), (iii) sensible heat exchanged between the mine and adjacent leaf tissues (H_1) which are at temperature T_L (free convection processes), and (iv) latent heat lost by the mine (E) during transpiration process through stomata. E depends on the opening level of stomata which is affected by mine temperature, radiation level, relative humidity (hr) in the air and the CO_2 released by the larva within the mine. A mine always contains only one larva.

Table 1. Values of the measured parameters and range of the driving variables used in the model. Legends: PAR, photosynthetically active radiations; VIS, visible; NIR, near infrared; max, maximal; D , water vapor pressure deficit; T_L , leaf temperature; T_M , mine temperature. Equations of the stomatal response functions are given in the table 2. Conductance of upper surfaces were picked up from **chapter 2**.

Parameters	Symbols	Values (units)	Sources
Climatic variables:			
Air temperature	T_{air}	12-36°C	Driving variable
Wind velocity	u	0.4 m s ⁻¹	Driving variable
Air relative humidity	hr	20-90 %	Driving variable
Irradiance (PAR)	Q	0-1600 μmol m ⁻² s ⁻¹	Driving variable
Global radiations	Rad	0-720 W m ⁻²	Driving variable
Proportion of Rad in the VIS	I^{VIS}	37 %	This study
Proportion of Rad in the NIR	I^{NIR}	63 %	This study
Radiation budget:			
VIS leaf absorbance	a_L^{VIS}	0.84	This study
NIR leaf absorbance	a_L^{NIR}	0.02	This study
VIS mine absorbance	a_M^{VIS}	0.48	This study
NIR mine absorbance	a_M^{NIR}	0.44	This study
Plant conductance: upper surface			
Upper leaf epidermis	g_L^{ve}	0.003 mol m ⁻² s ⁻¹	Chapter 2
Upper mine epidermis	g_M^{ve}	0.009 mol m ⁻² s ⁻¹	Chapter 2
Plant conductance: lower surface			
Leaf max. stomatal cond.	g_L^{smax}	0.274 mol m ⁻² s ⁻¹	This study
Mine max. stomatal cond.	g_M^{smax}	0.227 mol m ⁻² s ⁻¹	This study
Leaf stomatal response to Q	$f_L^1(Q)$	See table 2	This study
Mine stomatal response to Q	$f_M^1(Q)$	See table 2	This study
Leaf stomatal response to D_L	$f_L^2(D_L)$	See table 2	This study
Mine stomatal response to D_M	$f_M^2(D_M)$	See table 2	This study
Leaf stomatal response to T_L	$f_L^3(T_L)$	See table 2	This study
Mine stomatal response to T_M	$f_M^3(T_M)$	See table 2	This study
Metric parameters:			
Leaf characteristic dimension	d_L	4.64 10 ⁻² m	This study
Mine-leaf interface area	P_M	1.40 10 ⁻⁵ m ²	This study
Mine surface	S_M	1.02 10 ⁻⁴ m ²	This study

Predicting the larva's body temperature

We employed an empirical model to predict the body temperature of the leaf miner. Body temperature depends on (i) mine temperature which is calculated by the biophysical model described above and (ii) the amount of radiation transmitted by the upper mine epidermis which reaches the larva's body. Feeding windows transmit much more radiation than green patches (**chapter 1**). Therefore, body temperature depends on the position of larvae within the mine (i.e. positioned below feeding windows or green patches). The body temperature of a larva was computed from

$$T_{body} = T_M + f_{body}^k(Q) \quad (21)$$

where $f_{body}^k(Q)$ is the empirical function describing the body-to-mine temperature deviation as a function of leaf irradiance (Q) at the k position. This function is, for feeding windows (FW) and green patches (GP) (**chapter 1**),

$$f_{body}^{FW} = (0.0034Q) + 0.0293 \quad (22)$$

$$f_{body}^{GP} = (0.0013Q) - 0.017 \quad (23)$$

These two functions, related to larval position within a mine, describe how much body temperature is warming compared to mine temperature under a given radiation level. These relationships were measured at a mine temperature of 25°C (**chapter 1**). We assumed that they are applicable to other mine temperatures because *P. blancardella*'s larvae are not able to thermoregulate physiologically. Indeed, for an insect with a small body size living in an environment nearly saturated for water vapor, evaporative cooling cannot be employed to decrease body temperature (Prange 1996). The mine habit is saturated for water vapor whatever the relative humidity in the ambient air (see above). A leaf miner larva cannot release the radiative energy it gains below the mine integument, inducing a linear relationship between the amount of radiation and the increase in body temperature.

Optical properties of intact leaves and mined leaf tissues

Optical properties of intact leaf tissues and mined leaf tissues were measured with a LI-1800 spectroradiometer coupled with a LI-1800-12 integrating sphere (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). This system records the amount of reflected and transmitted light from all directions (hemispherical, 180° solid angle) above the measured surface (1.77 cm² disc).

Reflectance and transmittance of both lower and upper sides were scanned every 5 nm from 400 to 1100 nm on 10 intact leaves and 11 mines as in Combes *et al.* (2000).

The mine surface (about 1 cm²) was smaller than the 1.77 cm² disc of the LI-1800-12. Therefore, a large piece of white paper having a high reflectance (Kodak Premium Picture paper) was perforated to create a 0.72 cm² hole. This piece of paper was placed on the mine surface such that the hole was fully covered by mined leaf tissues. Reflectance and transmittance spectra of the white paper were measured as a control. The white paper reflected 92 % and 93 % of incident light in the visible (400 to 700 nm) and near infrared (800 to 1100 nm) spectra, respectively. It transmitted 4 % and 7 % of incident light in the visible and near infrared spectra, respectively. These small amounts of reflected and transmitted light by the white paper were taken into account for mine absorbance calculations.

Surface-averaged absorbance a at wavelength i was determined by (Combes *et al.* 2000)

$$a_i = 1 - \left(\frac{R_i^{upper} + R_i^{lower} + T_i^{upper} + T_i^{lower}}{2} \right) \quad (24)$$

where R_i^{upper} and R_i^{lower} are the portion of incident light reflected by the upper and lower surface, respectively, T_i^{upper} and T_i^{lower} are the portion of incident light transmitted by the upper and lower surface, respectively. The use of equation (24) implies that lower and upper leaf surfaces have a similar optical behavior. We therefore tested this assumption in both leaf and mined leaf tissues. Mean absorbance was obtained averaging all values of a_i in the visible range (400 to 700 nm) and in the near infrared range (800 to 1100 nm) for both intact leaf (a_L^{VIS} and a_L^{NIR} , respectively) and mined leaf tissues (a_M^{VIS} and a_M^{NIR} , respectively). Absorbance values were a straight average of all values in each range of wavelength, and were not weighted by using measurements of incoming solar radiation. Indeed, we assumed that the irradiance spectrum of ambient light is flat in the visible and near infrared ranges (but differed between the two ranges, see below). For the simulation purposes, we assumed that absorbance in the range 1100 to 2500 nm equals that in the measured near infrared range 800 to 1100 nm. This assumption would not matter since there is no much incoming solar radiation from 1100 to 2500 nm (Campbell & Norman 1998).

Stomatal conductance of intact and mined leaf tissues

The apple leaf is hypostomatous, *i.e.* stomata are restricted to the lower epidermis. The stomatal conductance responses to leaf irradiance (Q), vapor pressure deficit (D_L or D_M) and temperature (T_L or T_M) were studied *in situ* on both intact leaf tissues and mined leaf tissues. Gas exchanges were measured with an infrared gas analyzer-leaf chamber system (LI-6400, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA), which allowed environmental variables within the leaf chamber (6 cm² area) to be controlled. Stomatal conductance (g_L^{vs} and g_M^{vs} : mol H₂O m⁻² s⁻¹) was calculated by the LI-6400 data analysis program using the general gas exchange formula from von Caemmerer and Farquhar (1981). A light source with a 250W metal iodide bulb (Sylvania Britelux HSI-T SX clear) was used to illuminate the leaf surface. All measurements were made under standard conditions for the ambient CO₂ concentration (35 Pa; Le Roux *et al.* 1999). The leaf chamber enclosed a 6 cm² leaf surface, an area much larger than that of a mine. Thus, we coated the intact lower face of leaves with a thin layer of vegetable oil using a fine brush, leaving only the mined leaf tissues uncovered. Water vapor could therefore only be lost through mined leaf tissues. The vegetable oil efficiently inhibits gas exchanges and does not alter stomatal behavior of the uncovered surfaces (**chapter 2**).

Stomatal conductance responses to climatic alterations — All response curves were measured on different leaves. All mines were located on separate leaves containing no more than two mines, each mine being used only once. The responses of g_L^{vs} and g_M^{vs} (mol m⁻² s⁻¹) to Q were measured on five intact leaves and five mines respectively according to ten irradiance levels decreasing from 1500 to 0 μmol m⁻² s⁻¹. The distance between the lamp and the sample was varied to attain different irradiance levels (from a maximal irradiance of 1600 μmol m⁻² s⁻¹ at 20 cm from the lamp to an irradiance of 50 μmol m⁻² s⁻¹ at about 150 cm from the lamp). The responses of g_L^{vs} and g_M^{vs} to increasing D_L were measured on four leaves and four mines (five steps from 1 to 3 kPa), respectively. The effect of a variation in T_L on g_L^{vs} and g_M^{vs} was determined on four leaves and four mines (three steps from 19°C to 30°C), respectively. For each measurement, the two other variables were hold at their reference value *i.e.* temperature of 25°C, irradiance level of 1500 μmol m⁻² s⁻¹ for intact leaves and 600 μmol m⁻² s⁻¹ for mines, and water vapor pressure deficit 1 kPa (Le Roux *et al.* 1999; **chapter 2**). All measurements were made on pre-illuminated leaves to ensure that stomata were active. An equilibration time of 20 to 30 min was imposed before any measurement. Measurements were

discarded if stomatal conductance was not stable after 45 min. Leaves containing the measured mines were cut following the measurements and images of the lower mines surface were obtained using a scanner. Scans were analyzed using Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) to measure mine areas in order to express stomatal conductance per unit of transpiring surface, i.e. mine surface (**chapter 2**).

Leaf and mine maximal stomatal conductance — Maximal stomatal conductance, $g_L^{s\max}$ and $g_M^{s\max}$ ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), were measured under the conditions allowing the stomatal conductance to be at its highest value on 20 intact leaves ($T_L = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $Q = 1500 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and $D_L = 1 \text{ kPa}$) and on 20 mines located on separate leaves containing no more than two mines ($T_M = 19^\circ\text{C}$, $Q = 600 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and $D_M = 1 \text{ kPa}$). All measurements were made on pre-illuminated leaves and a 20 to 30 min equilibration time was applied. Mined leaf tissue areas were measured using the same method as before.

Test of the Jarvis hypothesis — Changes in environmental parameters act independently from each other on the stomata opening level according to the Jarvis hypothesis. Predictions from the equations (11) and (20) were tested against independent measurements of stomatal conductance to test for the accuracy of the Jarvis hypothesis. An independent set of 19 intact leaves and 17 mines was used to measure first the maximal stomatal conductance ($g_L^{s\max}$ and $g_M^{s\max}$) under the reference conditions (see above). Then two variables (irradiance level, leaf vapor pressure deficit and/or leaf temperature) were altered such that the amplitude of the changes covered the interval of variation of these variables during stomatal conductance response measurements. All measurements were made on pre-illuminated leaves and a 20 to 30 min equilibration time was applied. Mined leaf tissues areas were measured using the same method as before. We incorporated the new values of the altered variables (irradiance level, leaf vapor pressure deficit and leaf temperature) in Jarvis' equations ((11) and (20)) to compare the Jarvis predictions to observed stomatal conductance.

Testing the models

Preparation of the climatic chamber — Mine and leaf temperature were recorded within a 1.33 m^3 climatic chamber (VB 1014-A, Vötsch, Balingen Frommern, Germany) that allows for the control of relative humidity (hr , $\pm 0.10 \text{ } \%$ point) and air temperature (T_{air} , $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$). Inner walls of the chamber were made of synthetic PVDF Polyvinylidene fluoride of “pure

white” color RAL9010 with a thermal emissivity of 0.9. Two 250 W metal halide bulbs (Sylvania Britelux HSI-T SX clear) were fixed within the chamber and irradiance level was altered by varying the distance between the sample and the lamps (lamps being fixed). The portion of total radiation emitted by the lamps in the visible and near infrared ranges was 0.37 and 0.63, respectively. The radiant flux incident to a surface at each point within the chamber was determined using (i) a pyranometer sensor (CM3, Campbell Scientific Ltd., Leicestershire, UK) connected to a CR10X data logger (Campbell Scientific Ltd.) which recorded incident global radiation (Rad , $W m^{-2}$) from 305 to 2800 nm, and (ii) a quantum sensor (LI-190SA, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) connected to a LI-1400 data logger (Li-Cor Inc.) which measured photosynthetically active radiation (Q : $\mu mol m^{-2} s^{-1}$) in the 400 to 700 nm waveband. The two sensors had a cosine corrected response allowing accurate measurements of flux densities through a plane surface. The simultaneous use of these two sensors gave us the possibility to convert the radiant flux from $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ to $W m^{-2}$ and vice versa for any measurements within the climatic chamber (linear regression, $[W m^{-2}] = 0.4889 [\mu mol m^{-2} s^{-1}]$, $R^2 = 0.99$, $P < 0.001$, $N = 91$ measured points).

Wind velocity (u) within the ventilated chamber was measured with a air velocity transducer (model 8465, TSI Incorporated, St. Paul, Minnesota, USA) connected to a Campbell CR10X data logger. Wind velocity was spatially homogeneous within the working section of the chamber, which was located at least at 30 cm from any wall. We verified that conditions for forced convection processes prevailed within the climatic chamber by calculating the ratio square Reynolds number : Grashof number. Nobel (1999) consider that forced convection dominates when this ratio is higher than 10. The Reynolds number R_e was computed from

$$R_e = \frac{u d_L}{\nu} \quad (25)$$

Where ν is the air kinematic viscosity ($\nu = 13.3 \cdot 10^{-6} m^2 s^{-1}$). The Grashof number G_r was determined using

$$G_r = \frac{g d_L^3 |T_L - T_{air}|}{T_{air} \nu^2} \quad (26)$$

Where g is the gravity ($g = 9.8 m s^{-1}$), T_{air} is the air temperature (K) and $|T_L - T_{air}|$ the absolute value of the leaf to air temperature deviation.

Measurement of leaf and mine temperatures — A set of 32 apple seedlings was chosen and one leaf per seedling was used for measurements of both mine and leaf temperature.

Leaves were selected such that they had approximately similar age at the time of experiment (mean \pm SD = 30.2 ± 4.9 days, N = 32) and approximately similar width (mean \pm SD = 6.45 ± 0.62 cm, N = 32). Each leaf had less than four mines (2.5 mines by mean). During experiments, all leaves were forced to be perpendicular to the incident light flux by adequately orientating the petiole using wires. Selected mines were scanned and images were analyzed under Scion Image to measure their perimeter and to control for homogeneity in mine areas.

Leaf temperature was estimated as the average of two fine copper-constantan thermocouples (type T, 0.2 mm in diameter; TCSA, Dardilly, France) placed on the lower leaf surface, the first in the middle of the leaf and the second at its periphery, both being far from any mine. Mine temperature was measured inserting a fine copper-constantan thermocouple (type T, 0.2 mm in diameter) through a feeding window located on the upper mined leaf tissues. The insertion point was covered with vegetable oil in order to avoid any leak. All thermocouples (leaf and mine) were connected to a Campbell CR10X data logger placed outside the climatic chamber. We verified that the insertion method did not alter maximal stomatal conductance of the mine system on a further set of 29 mines. Measures were taken with the LI-6400 infrared gas analyzer (using the same method as above) before and after insertion of a thermocouple through a feeding window and application of vegetable oil at mine temperature 25°C , irradiance $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and mine vapor pressure deficit 1 kPa. A 25 minutes equilibration time was allowed before any measurement. There were no statistically significant differences in mine maximal stomatal conductance before insertion (Mean \pm SD, $0.117 \pm 0.073 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and after insertion ($0.123 \pm 0.070 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, N = 29, *t*-paired test: $t_{28} = 0.66$, $P = 0.52$, NS).

Seedlings were placed within the climatic chamber. The temperature of each leaf and mine was measured under a different set of conditions of irradiance level (Q), air temperature (T_{air}) and air vapor pressure deficit (D_{air}), by keeping two parameters constant and varying the third. Relative humidity was adjusted in order to control for D_{air} (using equations (7) and (8)). Five leaves and five mines were measured at $T_{air} = 25^{\circ}\text{C}$ and $D_{air} = 1 \text{ kPa}$ (set A), and five other leaves and five other mines at $T_{air} = 19^{\circ}\text{C}$ and $D_{air} = 1 \text{ kPa}$ (set B). Leaf and mine temperatures were recorded at seven irradiance levels (Q decreasing from 1300 to $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for these two groups. Next, four leaves and three mines were measured at $Q = 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and $D_{air} = 1 \text{ kPa}$ (set C), and six leaves and four mines at $Q = 400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and

$D_{air} = 1$ kPa (set D). In the two cases, leaf and mine temperatures were measured at eight values of air temperature (from 12°C to 36°C). Finally, seven leaves and four mines were placed at $Q = 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and $T_{air} = 30^\circ\text{C}$ (set E), and six leaves and six mines at $Q = 400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and $T_{air} = 30^\circ\text{C}$ (set F), while leaf and mine temperatures were recorded at five levels for D_{air} ranging from 1 to 3 kPa. For all sets, a minimum of 40 minutes equilibration time was imposed between each measurement. Leaf and mine temperatures were averaged over 10 measures taken every minute. All mines were dissected to ensure that larvae were still alive after experiments. At the end of all experiments, leaves were dissected in order to measure their thickness under a binocular camera. Leaf thickness was measured in the middle of the leaf which corresponded to the usual mine localization (Pottinger & LeRoux 1971). The combination of conditions for the six independent datasets (A to F) is shown in figure 2. Model predictions were compared to leaf and mine temperature measurements to test the validity of the models.

Model simulations

Once the validity of the mine temperature model had been verified, the first step was to conduct simulations to identify the effect of a variation in each abiotic parameter. In each simulation, one climatic parameter (radiation level, air temperature, relative humidity or wind velocity) was varied while the others were held constant in order to quantify the impact of each variable on mine temperature. We used two parameters to estimate the degree with which mine temperature is changing separately from leaf temperature (i.e. quantification of the degree of decoupling between mine and leaf microclimates): (i) the temperature difference between a mine and intact leaf tissues, and (ii) the temperature excess of a mine when compared to ambient air. All other environmental parameters were held constant during these simulations. The third step was to simulate some situations that do not exist in nature, allowing us to distinguish the relative impact of insect-induced plant alterations on mine temperature, i.e. radiation absorption properties versus stomatal conductance. Simulations of mine temperature were conducted using the parameters of both radiation absorption and stomatal behavior of the intact leaf which corresponds to simulate virtual mines that do not alter plant tissues. This was obtained by replacing absorbance of the mine a_M^{VIS} and a_M^{NIR} by a_L^{VIS} and a_L^{NIR} in equation (14) and replacing in equation (20) the parameters $f_M^1(Q)$,

$f_M^2(D_M)$, $f_M^3(T_M)$ and g_M^{smax} by $f_L^1(Q)$, $f_L^2(D_L)$, $f_L^3(T_L)$ and g_L^{smax} , respectively. This was used as an internal check of our model for a mine. Next, mine temperature was simulated using absorbance parameters of intact leaf tissues and stomatal conductance parameters of mined leaf tissues. This corresponds to virtual mines that only affect stomatal physiology.

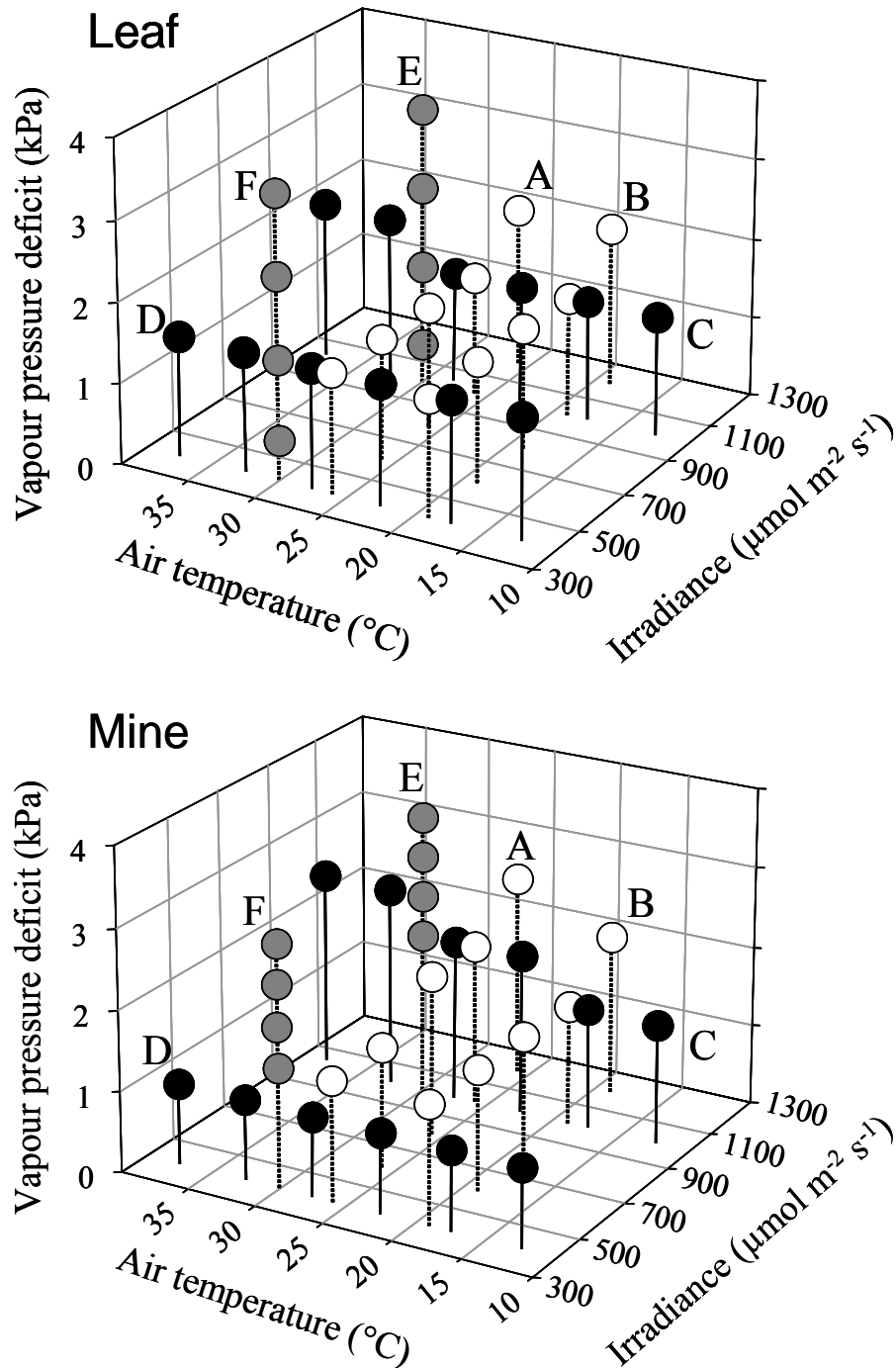


Figure 2. Schematic representation of the experimental setup showing climatic conditions used for leaf and mine temperature measurements. Each set of data (A to F) is independent from each other. The leaf and mine vapor pressure deficits were computed from the measured leaf and mine temperatures, the relative humidity and using equations (7) and (8). The shading of the different groups is only a visual aid.

Statistical analysis

The differences in optical properties between intact leaf tissues and mined leaf tissues were tested using a Mann-Whitney test. The stomatal conductance responses were analyzed under TableCurve 2D (SYSTAT Software Inc.) employing non-linear regressions, based on mechanistic models when possible, and performing least squares analysis (Johnson & Omland 2004). The difference in maximal stomatal conductance between leaves and mines was tested using a Student *t*-test (2 tails) after having tested for the assumption of normal distribution of the data (Lilliefors probability test). The models were tested for their accuracy performing Pearson correlations between predictions and measurements and calculating the root mean square error (RMSE) of the predictions from the 1:1 relationship (i.e. measured temperature equal predicted temperature).

RESULTS

Parameter estimation: optical properties

The mean absorbance of intact leaf tissues in the visible range ($a_L^{VIS} = 0.86 \pm 0.02$, N = 10) was higher than that in the NIR range ($a_L^{NIR} = 0.02 \pm 0.01$, N = 10; Mann-Whitney test: $P < 0.001$) (Fig. 3 A). By contrast, mined leaf tissues equally absorbed in the visible and NIR ranges ($a_M^{VIS} = 0.48 \pm 0.04$ and $a_M^{NIR} = 0.44 \pm 0.05$ respectively, N = 11; Mann-Whitney test: $P = 0.06$, NS) (Fig. 3 A). The mean absorbance of intact leaf tissues was higher than that of mined leaf tissues in the visible range (Mann-Whitney test: $P < 0.001$) but was lower in the NIR range (Mann-Whitney test: $P < 0.001$) (Fig. 3 A). The intact apple leaf had a high absorption in the blue (around 450 nm) and red (around 650 nm) wavelengths and a very low absorption in the NIR range (Fig. 3 B). On the contrary, the absorption spectrum of the mined leaf tissues appeared nearly flat from 500 to 1100 nm (Fig. 3 B). For both leaves and mines, absorption spectra when receiving radiation from below were similar to that when radiation were incident to the upper surface (not shown), due to the complex trajectories followed by the light within a leaf and a mine.

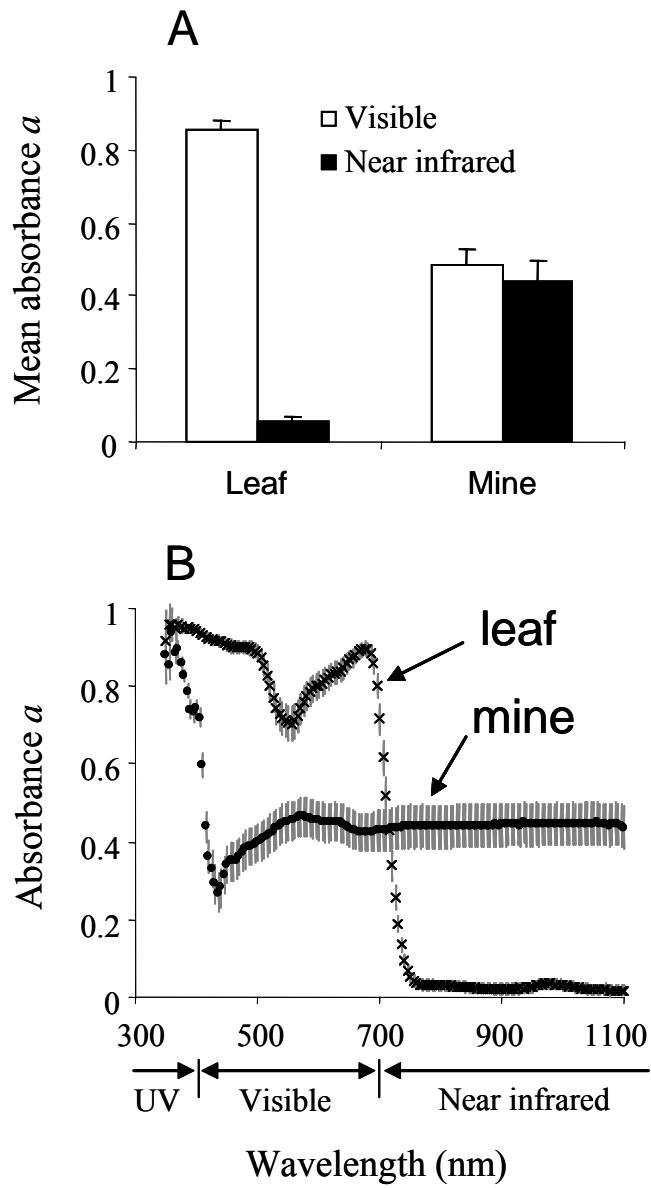


Figure 3. Optical properties of leaf and mined leaf tissues. (A) Mean absorbance of intact leaf and mined leaf tissues in the visible (white histograms) and near infrared (black histograms) ranges. Bars indicate standard deviations. (B) Absorption spectrum of intact leaf (×) and mined leaf tissues (●) in the ultraviolet (UV), visible and near infrared ranges. Grey bars show standard deviations.

Parameter estimation: stomatal conductance

The mean maximal stomatal conductance of mined leaf tissues ($0.227 \pm 0.108 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $N = 20$) was similar to that of intact leaf tissues ($0.274 \pm 0.088 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $N = 20$; Student t -test: $t_{2,19} = 1.29$, $P = 0.21$, NS) (Fig. 4 A). The stomatal conductance responses to irradiance, leaf water vapor pressure deficit and temperature for both intact leaf tissues and mined leaf tissues were expressed relative to their maximal stomatal conductance level. Stomatal conductance increased with irradiance level in intact leaf tissues whereas it increased at low irradiance levels but continuously decreased from moderate to high irradiance level in mined leaf tissues (Fig. 4 B, C). Stomatal conductance strongly decreased from low to high levels of leaf vapor pressure deficit in intact leaf tissues. This decrease was weaker in mined leaf tissues (Fig. 4 D, E). Stomatal conductance was maximal in intact leaf tissues at leaf temperature 25°C whereas this maximum was found in mined leaf tissues at mine temperature 19°C (Fig. 4 F, G). All non-linear regressions were statistically significant (Table 2).

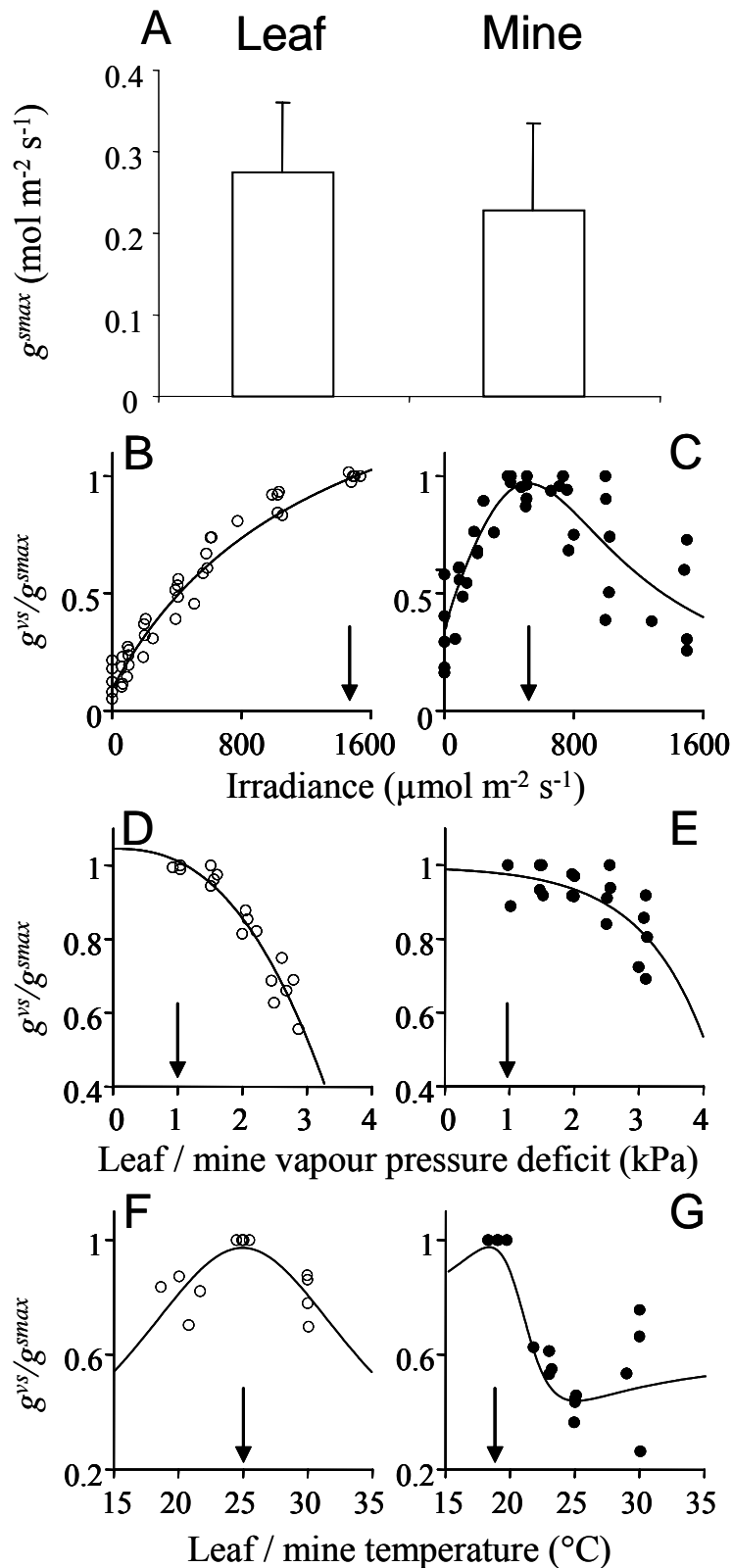


Figure 4. Stomatal conductance parameters. (A) Maximal stomatal conductance of intact leaf tissues (g_L^{smax}) and mined leaf tissues (g_M^{smax}). Bars indicate standard deviations. (B)-(G) Stomatal conductance responses of intact leaf tissues (\circ) and mined leaf tissues (\bullet) to a change in irradiance (B and C), leaf or mine vapor pressure deficit (D and E) and leaf or mine temperature (F and G). The stomatal conductance was expressed relative to the maximal value shown in (A). All non linear regressions were significant (see table 2 for statistics). Arrows on x-axis show the values of each parameters used to measure maximal stomatal conductance.

Table 2. Statistics of the non-linear models used to describe the relationships between stomatal conductance and irradiance (Q), water vapor pressure deficit (D) and temperature (T). The subscripts L and M refer to leaf and mine, respectively.

Relationship	Equation	Parameters	Statistics
$f_L^1(Q)$	$y = \frac{a(x-c)}{b+(x-c)}$ (Hyperbolic saturation)	a = 1.79 b = 1249.53 c = -73.46	$P < 0.001$ $R^2 = 0.96$ $F_{2,38} = 538.60$
$f_M^1(Q)$	$y = \frac{a+bx^{0.5}}{1+cx^{0.5}+dx}$ (Empirical equation)	a = 0.29 b = $-5.95 \cdot 10^{-4}$ c = -0.06 d = $1.34 \cdot 10^{-3}$	$P < 0.001$ $R^2 = 0.69$ $F_{3,36} = 31.19$
$f_L^2(D_L)$	$y = a+bx^c$ (Power equation)	a = 1.05 b = -0.03 c = 2.49	$P < 0.001$ $R^2 = 0.90$ $F_{2,14} = 79.87$
$f_M^2(D_M)$	$y = a+be^x$ (Empirical equation)	a = 0.10 b = -0.01	$P < 0.001$ $R^2 = 0.42$ $F_{1,17} = 16.14$
$f_L^3(T_L)$	$y = \frac{a}{1+\left(\frac{x-b}{c}\right)^2}$ (Lorentzian equation)	a = 0.97 b = 25.01 c = 11.15	$P = 0.03$ $R^2 = 0.36$ $F_{2,9} = 5.13$
$f_M^3(T_M)$	$y = \frac{a+bx+cx^2}{1+dx+ex^2}$ (Empirical equation)	a = 0.71 b = -0.06 c = $1.44 \cdot 10^{-3}$ d = -0.09 e = $2.30 \cdot 10^{-3}$	$P < 0.001$ $R^2 = 0.81$ $F_{4,18} = 26.05$

Validity of the models

The Jarvis' hypothesis — The predictions of the Jarvis' hypothesis (equations (11) and (20)) were well matched by the independent measurements of stomatal conductance in both intact leaf tissues (Pearson's $r = 0.96$, $P < 0.001$, $N = 19$) and mined leaf tissues (Pearson's $r = 0.81$, $P < 0.001$, $N = 17$) (Fig. 5). The root mean square error of prediction, RMSE, was $0.022 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for intact leaf tissues (corresponding to 8 % of the maximal leaf stomatal conductance) and $0.027 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for mined leaf tissues (corresponding to 12 % of the maximal mine stomatal conductance) (Fig. 5).

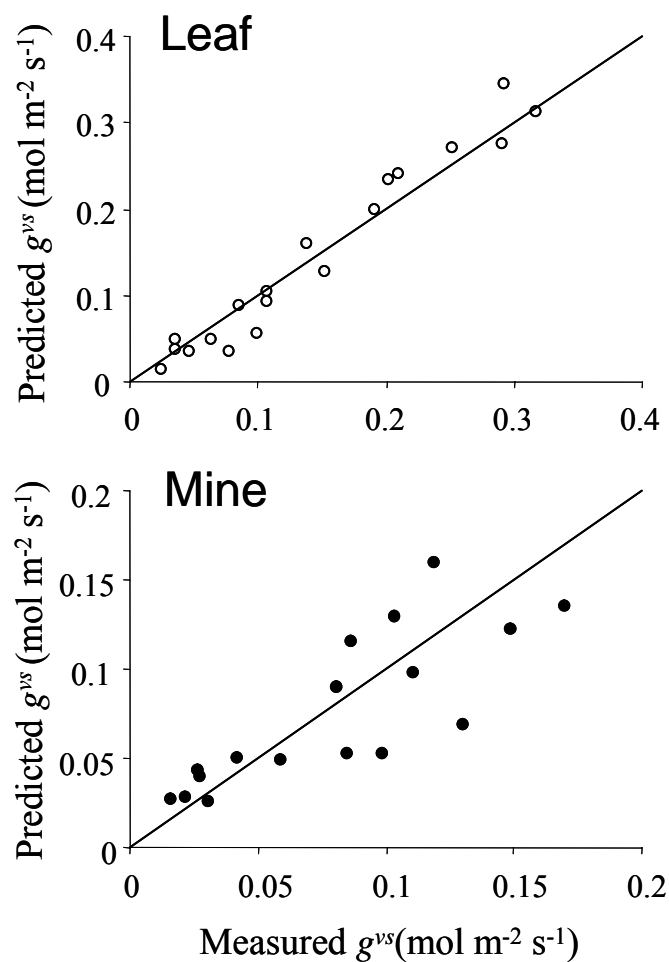


Figure 5. Accuracy of the Jarvis' hypothesis. Comparison between independent measurements of stomatal conductance and predictions using the Jarvis hypothesis for intact leaf tissues (○) and mined leaf tissues (●). Lines show the $x = y$ relation. See text for statistics.

The leaf temperature model — Wind velocity within the climatic chamber was 0.4 m s^{-1} and the measured leaves had a mean characteristic dimension of $4.64 \cdot 10^{-2} \pm 0.45 \cdot 10^{-2} \text{ m}$ (see table 1). Under these conditions, the square Reynolds number : Grashof number ratio was higher than 10 for a leaf-to-air temperature deviation ranging from 0 to 10°C in absolute value. This ratio was similar at air temperature 12°C and 36°C (Fig. 6). This shows that forced convection prevailed under the experimental conditions. The model predictions for leaf temperature were well matched by the independent measurements made under set A to set F climatic conditions (Pearson's $r = 0.99$, $P < 0.001$, $N = 190$ measurements) (Fig. 7). The RMSE of the whole dataset (i.e. merging the six different datasets from Fig. 2) was 0.81°C . Therefore, the model accurately predicts leaf temperature from 12°C to 42°C .

The mine temperature model — The mean perimeter of mines was $5.09 \pm 1.51 \text{ cm}$ and the mean leaf thickness was $267 \pm 25 \mu\text{m}$, leading to a mean mine-leaf interface area (P_M) of 0.14 cm^2 (see table 1). Mean mine surface was $1.02 \pm 0.28 \text{ cm}^2$. The predictions of mine temperatures were well matched by the independent measurements made under conditions of set A to set F (Pearson's $r = 0.99$, $P < 0.001$, $N = 172$ measurements) (Fig. 7). The RMSE of predictions calculated on the whole dataset was 0.85°C .

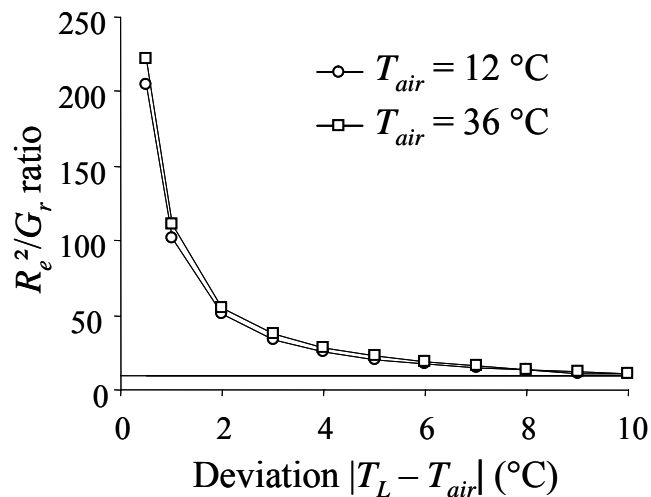


Figure 6. Determination of the convection patterns within the climatic chamber. Relationship between the square Reynolds number : Grashof number ratio and leaf temperature excess at air temperature 12°C and 36°C . The horizontal line shows the threshold, at $R_e^2/G_r = 10$, above which forced convections are prominent.

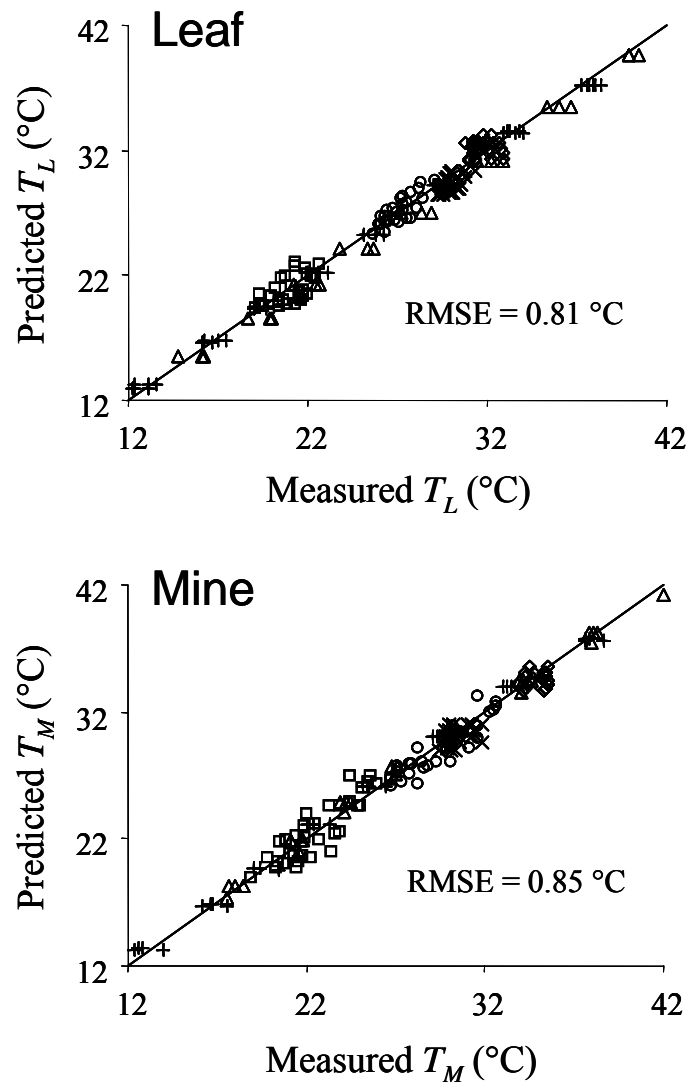


Figure 7. Accuracy of leaf and mine temperature predictions. Comparison between independent measurements of leaf and mine temperature and predictions of the temperature models. Experimental measurements were made under six different sets of climatic conditions (see Fig. 2): set A (\circ), set B (\square), set C (\triangle), set D ($+$), set E (\diamond) and set F (\times). Lines show the $x = y$ relation and the RMSE were calculated on whole datasets.

Model exploration: influence of climatic variables on mine temperature

Influence of air temperature — In the dark, leaves were predicted to be about 1.5 to 2°C colder than ambient air in a range of air temperature from 12°C to 36°C (Fig. 8 A). However, leaves were always warmer than ambient air at irradiance level above 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The leaf-to-air temperature deviation was higher at air temperature 12°C than at 36°C whatever the irradiance level (Fig. 8 A). For example, at irradiance level 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the leaf was about 2°C warmer than ambient at air temperature 12°C whereas it was near air temperature at 36°C (Fig. 8 A). Nevertheless, at high irradiance level (1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), the evolution of the leaf-to-air temperature deviation as air temperature increased was U-shaped rather than continuously decreasing. The smallest deviation (about 3.6°C above air temperature) was predicted at an air temperature of 25°C (Fig. 8 A). By contrast, the mine-to-air temperature deviation was continuously decreased at all irradiance levels from air temperature 12°C to 36°C (Fig. 8 B). For example, at irradiance level 950 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the mine was 5.5°C warmer than ambient air at air temperature 12°C whereas it was only 3.5°C above ambient air at 36°C (Fig. 8 B). Therefore, the mine microclimate behaves differently to variations in air temperature than the leaf microclimate. This decoupling between mine and leaf temperatures resulted in a mine-to-leaf temperature deviation that varied over the air temperature range at a given irradiance level (Fig. 8 C). For each irradiance level, the higher mine-to-leaf temperature deviation was obtained at air temperature about 25°C whereas the lowest deviation was predicted at air temperature 36°C (Fig. 8 C).

Influence of relative humidity — The leaf temperature was predicted to increase as relative humidity increased at all irradiance levels and air temperature 25°C (Fig. 8 D). A variation in relative humidity induced at best a change of about 2°C in leaf temperature at a given irradiance level. Similarly, the mine-to-air temperature deviation increased as air relative humidity increased and a variation in relative humidity induced at best a change of about 1.5°C in mine temperature (Fig. 8 E). Therefore, relative humidity weakly altered the mine-to-leaf temperature deviation irrespective of irradiance level (Fig. 8 F).

Influence of radiation level — Highest variations in leaf and mine temperatures were predicted when radiation level was altered. As a general pattern, an increase in radiation level resulted in an increase in leaf-to-air and mine-to-leaf temperature deviation at a given air temperature and relative humidity (Fig. 8). A variation in radiation level could induce a change in mine-to-leaf temperature deviation of up to 5°C.

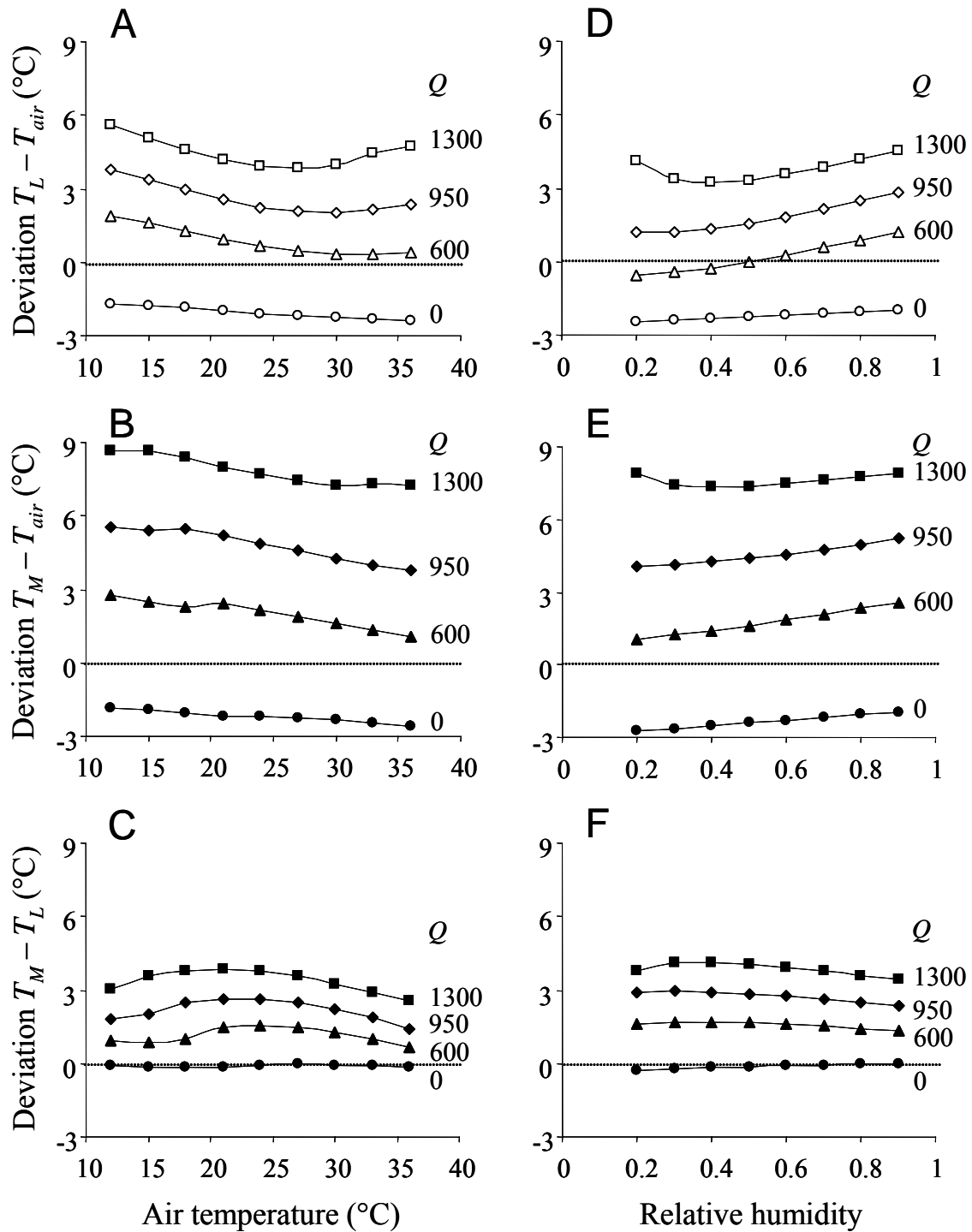


Figure 8. Influence of climatic parameters on temperature predictions. (A-C) Temperature deviation between predicted leaf temperature, predicted mine temperature and air temperature as a function of air temperature at relative humidity of 0.7. (D-F) Temperature deviation between predicted leaf temperature, predicted mine temperature and air temperature as a function of relative humidity at air temperature of 25°C. In each case, simulation were made at irradiance level (Q) 1300 (\square and \blacksquare), 950 (\diamond and \blacklozenge), 600 (\triangle and \blacktriangle) and 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (\circ and \bullet).

Effects of wind speed — Mine and leaf temperatures decreased non-linearly as wind speed increased (Fig. 9). At an irradiance level of $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and low velocities (i.e. $0 < u < 1 \text{ m s}^{-1}$), a small change in wind speed induced a large temperature drop whereas at high velocities (i.e. $u > 4 \text{ m s}^{-1}$) a change in wind speed weakly affected mine and leaf temperatures (Fig. 9). The mine-to-leaf temperature deviation is also altered by wind speed. This deviation rapidly decreased at small wind velocities and was stabilized at high wind speed (Fig. 9).

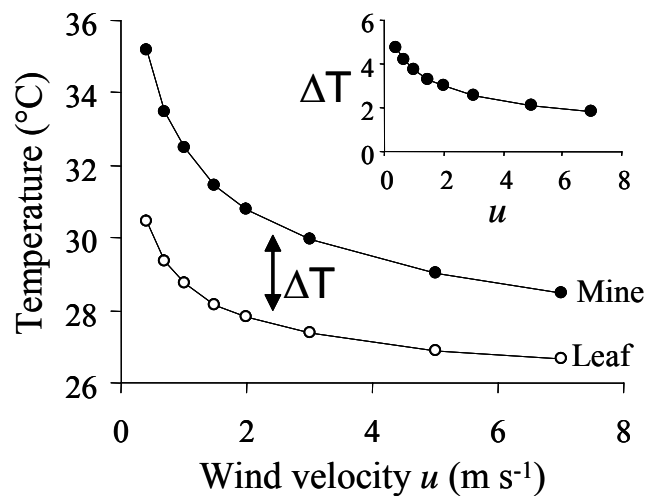


Figure 9. Effect of wind speed on leaf and mine temperature. Predictions of leaf and mine temperature as a function of wind speed at irradiance of $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (780 W m^{-2}), air temperature of 25°C and relative humidity of 0.7. The insert shows the mine-to-leaf temperature deviation (ΔT) as a function of wind speed.

Model exploration: influence of biotic parameters on mine temperature

Effects of plant related modifications — The leaf-to-air temperature deviation increased with irradiance at relative humidity 0.7 and air temperature 25°C (Fig. 10). At maximal irradiance levels ($1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a leaf was 5.4°C warmer than the air. The temperature within the mine also increased but at a higher rate than that of the leaf (Fig. 10). At irradiance $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ the mine was about 10°C hotter than the air and therefore about 5°C hotter than the leaf. The temperature of a virtual mine having non-altered optical and stomatal properties was predicted to be much close to leaf temperature at all irradiance levels, with a maximal deviation of 0.11°C (not shown). The temperature of a virtual mine with only altered

stomatal physiology (i.e. optical properties of intact leaf tissues) was predicted to increase with irradiance level (Fig. 10). Modifications of the stomatal conductance responses lead to an increase of about 2°C at maximal irradiance level (Fig. 10). The observed changes in absorbance of mined leaf tissues induced the remaining increase, amounting to about 3°C at maximal radiation level.

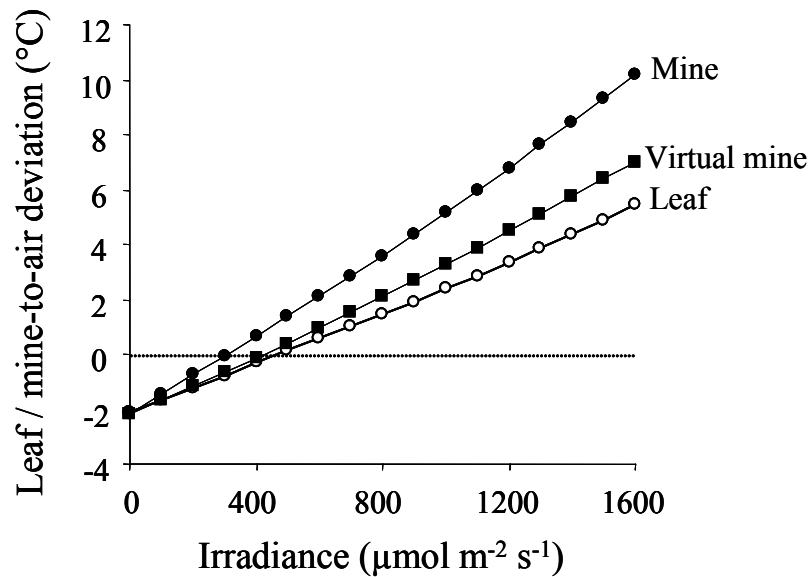


Figure 10. Influence of biotic components on temperature predictions. Deviation between predicted temperature and air temperature as a function of irradiance level for a mine (●), a virtual mine that does not alter optical properties of plant tissues (■) and a leaf (○) at air temperature of 25°C and relative humidity of 0.7.

Energy budgets — The radiative, sensible and latent heat budgets of a leaf (equations (2), (3) and (6)) and a mine (equations (14), (15), (16) and (18)) were computed as a function of radiation level at relative humidity 0.7 and air temperature 25°C. For any radiation level, the sum of the gains/loss was equal to zero in accordance to the equation (1). Both leaf and mine gained radiative heat as soon as the radiation level was above 90 W m^{-2} , a mine gaining always more radiative energy than a leaf (Fig. 11 A). This was due to the fact that a mine absorbed more radiation than a leaf in the near infrared range (see Fig. 3). Both leaf and mine lost sensible heat as radiation level increased (Fig. 11 B). The sensible heat loss of a mine was greater than for a leaf mainly due to a large amount of heat exchanged with ambient air. The amount of heat exchanged with adjacent leaf tissues was weak. This is a consequence of (i)

the high temperature deviation between mines and ambient air, and (ii) the small mine-leaf interface surface relative to the mine surface. Finally, both leaf and mine lost latent heat at all radiation levels. While a leaf lost an increasing amount of heat through transpiration with increasing radiation level, the latent heat loss of a mine remained constant from moderate to high radiation level (Fig. 11 C). This was due to the light-dependent stomatal closure in mined leaf tissues (see Fig. 4).

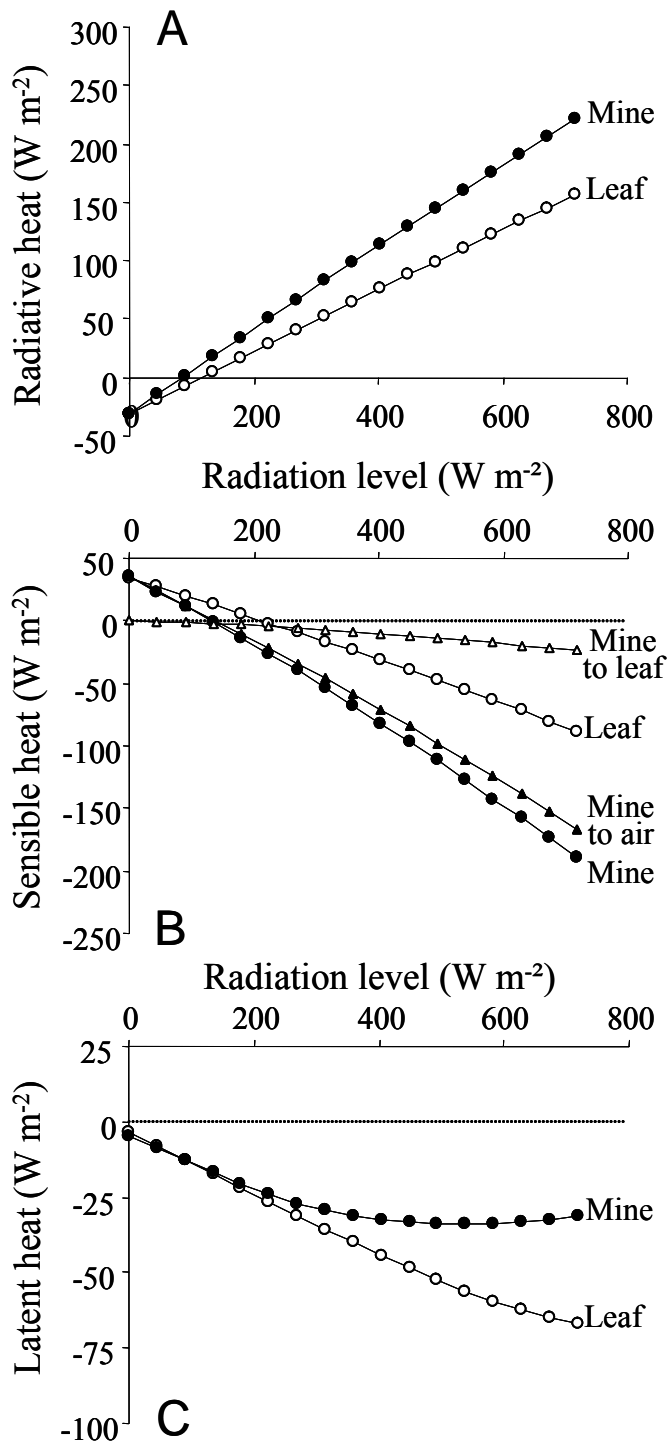


Figure 11. The predicted energy budgets. The radiative (A), sensible (B) and latent (C) heat budgets of a leaf (\circ) and a mine (\bullet) as a function of radiation level at air temperature of $25^{\circ}C$ and relative humidity of 0.7. The sensible heat budget of a mine was split into sensible heat exchanged between a mine and ambient air (Mine to air, \blacktriangle) and into sensible heat exchanged between a mine and adjacent leaf tissues (Mine to leaf, \triangle). Positive values indicate heat gains, and negative values imply heat loss.

Model exploration: larval body temperature

For a larva located below green patches or feeding windows, body-to-air temperature deviation continuously increased with radiation level (Fig. 12). Body temperature of a larva located below green patches was 1°C warmer than mine temperature at high radiation level. Body temperature of a larva positioned below feeding windows, which transmit much more radiations than green patches (**chapter 1**), was up to 1.4°C above that of a larva below green patches at high radiation level (Fig. 12).

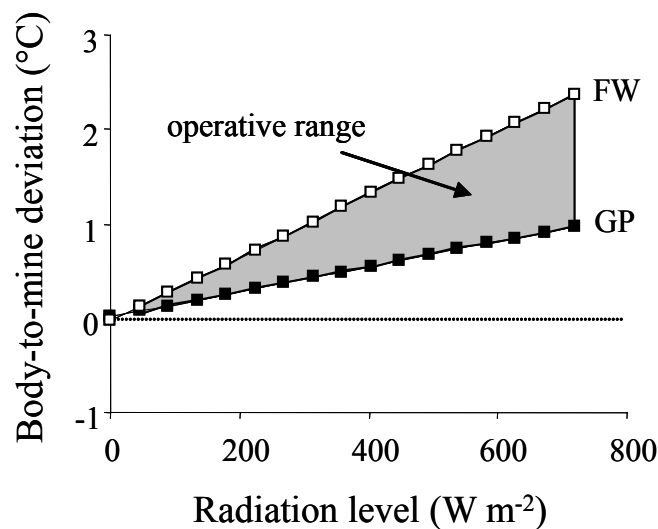


Figure 12. Body-to-mine temperature deviation as a function of radiation level, for a larva located below feeding windows (FW, □) and below green patches (GP, ■) at air temperature of 25°C and relative humidity of 0.7. The operative body temperature range (grey part), i.e. the expected body temperature of a larva within the mine, is function of its position relative to feeding windows.

DISCUSSION

Assumptions and validity of the models

The biophysical model was quite robust and predicted leaf and mine temperature with a surprising high precision (near 0.8°C) in the range from 12°C to 42°C. Such a powerful mechanistic model is an appropriate tool to evaluate the impact of changes in the organism's physical environment on its body temperature. As it is the case in any modeling works, several assumptions must be carefully considered when interpreting the model predictions.

The first assumption concerns the shape of the relationships describing the stomatal responses to leaf and mine water vapor deficits and to leaf and mine temperatures. These relations were used beyond the range of data used to establish them (Fig. 4 D to G). We extrapolated these relations according to published studies which reported curves with similar shape within the range of values we used (Jones 1992; Dang *et al.* 1997; Le Roux *et al.* 1999). For example, stomata in intact leaf tissues were shown to weakly respond to leaf water vapor deficit between 0 and 1 kPa (Jones 1992) and to rapidly close beyond 3 kPa (Jones 1992; Dang *et al.* 1997). By default, these extrapolations used in the leaf temperature model were also applied to the mine temperature model.

We found that the temperature of the intact portions of leaves infested by leaf miners was well predicted by the biophysical model of Campbell and Norman (1998) for an intact and non infested leaf. This confirms that a mine corresponds to local modifications of plant tissues only. For example, the stomatal conductance and the transpiration rate in the intact leaf tissues adjacent to the mines are not affected by the presence of these mines (Proctor *et al.* 1982). The sensible heat transferred from the mine to the adjacent leaf tissues significantly participated to lower mine temperature under high radiation level. From the leaf point of view however, this gain is negligible compared to the amount of sensible heat transferred from the leaf to ambient air. This is due to the small relative area of the mine-leaf contact surface which corresponds to only 0.58 % of the total leaf surface.

The biophysical model assumes a spatially homogenous mean temperature over a full leaf. The model does not take into account the heterogeneity in the temperature distribution over a leaf surface which is due to two phenomenon: (i) the stomatal patchiness which is a spatial and temporal heterogeneity in stomatal conductance over the leaf surface (e.g. Jones 1999; Mott & Buckley 2000), and (ii) the aerodynamic cooling at the leading edges (e.g. Roth-

Nebelsick 2001). The temperature within a mine should therefore be best compared to the temperature of its host leaf precisely at the mine location. This cannot be done in reality, nor with a model predicting a single mean leaf temperature. This assumption seems however reasonable considering the accuracy of model predictions. Our explanation is that the mined leaf area is probably disconnected from the stomatal patchiness occurring in the intact leaf portions, and mines are rarely found at the leaf margins which are the colder leaf regions.

The biophysical model also assumes that a mine is a flat surface. This assumption allows us to simplify the calculations of boundary layer conductance for both heat and water vapor transfers. However, the upper mine surface is bulging, not flat. This protuberance may decrease the boundary layer thickness above the mine, leading to increasing heat loss through conductance and convection mechanisms. However, this protuberance (less than 3 mm in height) is certainly within the leaf boundary layer at low wind velocity. Furthermore, the leaf boundary layer is thinner at the upwind or leading edge and thicker in the centre of a leaf (Nobel 1999). Mines were most frequently located in the centre of the leaves (Pottinger & LeRoux 1971; Sylvain Pincebourde, personal observation).

Feedback loops between biotic and abiotic parameters

Radiation level, air temperature and wind speed are the major abiotic factors that affect the thermal environment of a leaf miner. Wind speed is certainly the more temporally heterogeneous parameter in the field, with variations between 0 and 3 m s⁻¹ at the second scale (Sylvain Pincebourde, unpublished data). Mine temperature decreases by about 5°C while wind speed is increasing from 0.4 to 3 m s⁻¹ at high radiation level (Fig. 9). An increase in air temperature significantly leads to a warmer mine though the relationship is not strictly linear (i.e. the mine-to-air temperature deviation is about 2°C lower at air temperature 36°C than at 12°C; Fig. 8 B). The effect of a change in radiation level is more striking. An elevation of the radiation level from 0 to maximal level causes a change in mine temperature of about 12°C and body temperature is up to 14.5°C warmer under full radiation level than in the dark (Fig. 12). This impressive effect of radiation level is generated by the feedback loop between this abiotic factor and the biotic components of the system. From a biophysical point of view, radiation level acts on two distinct processes: (i) absorption of radiative heat and (ii) loss of latent heat (opening level of stomata). The leaf miner *P. blancardella* alters these two functions: absorbance properties are highly modified (Fig. 3) and stomatal behavior is altered (Fig. 4) in mined leaf tissues. The two effects alter mine temperature independently and

significantly. About 40 % of the mine temperature excess was caused by stomatal closure while changes in absorbance properties participated to 60 % of this excess (Fig. 10). Indeed, the observed modifications in absorbance properties cause mines to gain much more radiative heat than leaves due to a greater absorbance of the former in the near infrared range (Fig. 11 A). Moreover, latent energy is retained within mines in the higher radiation levels, when the opening level of stomata in mine tissues is very small (Fig. 11 C). The modifications provided by a larva to its biotic environment, i.e. plant tissues, induce changes in the effects of the abiotic parameters, i.e. radiation level, on the microclimate.

The modifications in absorbance properties directly result from the feeding activity of the larva. Its feeding behavior is highly organized and meticulous, resulting in the creation of feeding windows (Djemai *et al.* 2000; **chapter 1**). The shift in stomatal behavior in mine tissues is a response to both mine morphology and the CO₂ released by the larva within the mine (**chapter 2**). Therefore, modifications of plant tissues are directly linked to the activity of the larva within the mine. Larvae can therefore modulate the feedback loop between the biotic components (plant tissue properties) and the abiotic factors (radiation level) by altering its behavior.

The leaf miner's thermal environment: profitable but risky?

A mine acts as a little greenhouse with a highly efficient heating system (a mine absorbs more radiation than a leaf) and with a checked evaporative cooling system (a mine loses less latent heat than a leaf). Clearly, a mine is always warmer than a leaf during the day. Assuming that mine temperature is below the lethal threshold, an ectothermic organism directly benefits from this warm microclimate. In the dark, the temperatures of a mine and a leaf are not different, even under hot air temperature (Fig. 8). Therefore, a mine does not work as a buffer against extreme conditions. Instead, it enables herbivorous insects to decouple themselves from the microclimate of their host plant in order to gain extra heat when needed. However, this strategy seems risky at high radiation level and under extreme air temperature corresponding to conditions of clear sky during summer in Tours, France. The maximal air temperature at Tours (47° 27' N, 0° 43' E) during July and August, averaged along the period 1951-2002, is 34 °C (F. Decker, climatic database from <http://www.lameteo.org/>). Under these conditions, the mine-to-air temperature deviation was lowered so that the mine-to-leaf temperature deviation remains low under such extreme conditions (Fig. 8). Therefore, the internal working of a mine differs strikingly from that of a leaf, and allows the leaf miner to

control for overheating. This ability prevents mines from attaining upper lethal temperature (see below).

Moreover, our results indicate that the design of the mine offers the possibility for larvae to thermoregulate behaviorally. Larvae cannot thermoregulate physiologically, i.e. to enhance or decrease their body temperature, independently from the conditions, by metabolic means. Instead, body temperature is driven by mine temperature and radiation transmitted within the mine by the upper mine epidermis. A large area occupied exclusively by green patches is present at the centre of the mine (Djemai *et al.* 2000; see Fig. 1A). At high radiation level, a larva could decrease its body temperature by $\sim 1.5^{\circ}\text{C}$ when moving from under feeding windows to green patches. This deviation can be of crucial importance to avoid lethal temperatures. Indeed, during extreme conditions of hot air temperature (34°C) and high radiation level (e.g. 580 W m^{-2}), body temperature is about 43.3°C for a larva below feeding windows and 41.9°C for a larva below green patches. The upper lethal temperature of last instar *P. blancardella* larvae is 42°C (Sylvain Pincebourde, unpublished data). Klok *et al.* (2003) also report a lethal temperature of 42°C in another leaf miner species. Behavioral experiments are now needed to test whether leaf miners really exploit the potentialities offered by the mine design.

Evolutionary ecology of the leaf mining habit

Most leaf miner insects develop within their mine until adult emergence. The intimate relationship between leaf miner insects and their host plants evolved over a long period of time and shows a high specificity (Lopez-Valmonde *et al.* 2003). The leaf-mining habit is ancient and at least three subfamilies of *Gracillariidae* existed at the Early/Late Cretaceous boundary when Angiosperm radiation was still occurring (Labandeira *et al.* 1994). Here we provide the first evidence that the mine is built in such a way to offer a life in a warmer environment than insects living at air temperature or leaf temperature. As long as upper lethal temperatures are not attained, the metabolic rate of the larvae is enhanced due to the temperature excess, leading to increased developmental rate. The developmental rates of last instars larvae and pupae of *P. blancardella* increase linearly with temperature (Baumgartner & Severini 1987). A faster development can be viewed as a strategy to minimize the risk to be attacked by a parasitoid. Indeed, the shorter is the developmental time, the lower is the risk to be detected by a parasitoid according to the slow-growth-high-mortality hypothesis (Benrey & Denno 1997). This hypothesis remains however to be tested on a leaf mining insect.

Additionally, several non-mutually exclusive hypotheses have been proposed to explain the adaptive significance of the leaf-mining habit (all reviewed in Connor & Taverner 1997). First, being enclosed within mines, larvae might escape from natural enemies. Leaf-mining insects suffer a relatively lower mortality rate from pathogens and generalist predators in comparison to external feeding guilds. However, specialist parasitoids induce higher mortality rate in the leaf miner feeding guild than in the external feeding guild (Connor & Taverner 1997; Hawkins *et al.* 1997). Second, leaf mining may be a strategy to avoid plant defenses or layers of leaf tissues having a low nutritional value. Many leaf miner species concentrate their feeding on the most nutritious leaf tissue which is also the tissue with the lower structural defense content (Scheirs *et al.* 2001). The third main adaptive hypothesis is that the mine could protect larvae from the physical environment. The leaf miner *P. blancardella* is relatively protected from harmful ultraviolet radiations since both feeding windows and green patches only weakly transmit ultraviolet radiation inside a mine (**chapter 1**). Ultraviolet protection was also demonstrated in four other leaf miner species (Connor & Taverner 1997). Thus, our work adds a substantial body of understanding to the hypothesis of physical protection and interaction with climatic conditions in general.

Multitrophic biophysical heat budgets

Our work is the first to establish a complete heat budget of a herbivore insect – plant interaction. Our results show that the second trophic level manages and partially controls the first one, which in turn provides the insect with a modified thermal environment, even to the point of one trophic partner co-opting the physiology of the other. These reciprocal influences imply that heat budgets cannot be simply built for each trophic level independently. The integration of several trophic levels within a unique biophysical heat budget offers numerous possibilities. First, this approach allows us to identify and to quantify the feedback loops between climatic parameters and biotic factors. The control of abiotic parameters through the biotic environment within a single trophic is not new (e.g. Helmuth 1998). Here we show that these feedback loops are of high importance in herbivore insect-plant interactions and that herbivores can modify plant tissues in order to amplify and control the effects of abiotic factors on their microclimate. Second, multitrophic heat budgets propose some perspectives in evolutionary ecology and their interpretation would help to explain the evolution of some herbivore insect guilds. Finally, this model can now be extended to the third trophic level, parasitoids, as they are living in the thermal environment created by the herbivore. Such a

tritrophic biophysical model would be a powerful tool to study the dynamics of populations in a highly variable climatic environment, as it is the case in the field.

Recently, Helmuth *et al.* (2005) advocated for the inclusion of physiological insight when predicting the effects of climate change on populations and ecosystems and highlighted that the biophysical approach is a powerful tool for determining how organisms would be affected by changes in their physical environment. Such an approach highlights the difficulty of predicting the response of multitrophic interactions to climate changes, and our study is an important step in that direction. The stability of multitrophic interactions is indeed profoundly affected by perturbations in synchronicity, which is markedly affected by changes in temperature, as shown both theoretically and in the field (Hassell *et al.* 1993; Ives and Gilchrist 1993; Harrington *et al.* 1999; Edwards & Richardson 2004). Given the amplitude of expected climatic changes, multitrophic heat budgets as proposed here are the natural bridge between physiological ecology and population ecology necessary to explore the biotic consequences of the future climate changes.

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'endophagie est très répandue chez les insectes phytophages et prend des formes très variées (galles, mines, etc.). Les insectes galligènes ont été très étudiés pour leur capacité à induire l'élaboration de la galle par la plante, par des procédés chimiques, ce qui leur permet d'accéder à une source de nourriture plus riche qualitativement (Stone & Schönrogge 2003). En revanche, les aspects physiologiques inhérents à la construction d'une mine et les avantages écologiques du style de vie mineur de feuille sont encore mal connus (e.g. Connor & Taverner 1997). Pourtant, le style de vie mineur de feuille est très répandu. Le genre *Phyllonorycter* par exemple, avec ses 400 espèces décrites, est l'un des genres les plus riches de l'ordre des lépidoptères (Lopez-Vaamonde *et al.* 2003). Cette thèse est à ce jour l'étude la plus complète portant sur la physiologie de l'interaction entre un insecte mineur et sa plante hôte. Cette étude est aussi la première à décrire et quantifier avec précision l'environnement thermique d'un insecte herbivore endophage.

Cette synthèse est construite de façon à monter graduellement les échelles spatiales, de la mine à une méso échelle, et les niveaux trophiques, de la mineuse aux groupements d'espèces en passant par les prédateurs. La **1^{ère} partie** de cette discussion consiste à résumer ce qui fait l'originalité de la mine en tant que microhabitat biotique. La **2^{ème} partie** traite de la dynamique temporelle de l'environnement thermique de la mineuse tout au long de son développement. Les conséquences de cet environnement thermique sur l'évolution des sensibilités thermiques des principaux utilisateurs de la mine (les endophytes et leurs parasitoïdes) seront discutées dans la **3^{ème} partie**. Par la suite, nous démontrerons que les insectes mineurs sont des ingénieurs cryptiques de l'écosystème et que le microclimat de la mine peut profiter à d'autres espèces (**4^{ème} partie**). Enfin, dans la **5^{ème} partie**, nous discuterons de l'impact des changements climatiques sur les insectes mineurs de feuilles.

LA PHYSIOLOGIE FONCTIONNELLE DU MICROHABITAT DE *P. BLANCARDELLA*

Les modifications physiques et physiologiques du végétal

La mine offre à la larve un espace important au sein même des tissus du végétal. La méthode d'infiltration sous vide, utilisée pour quantifier la proportion de l'espace aérien intercellulaire (**chapitre 2**), permet de déduire le volume moyen d'une mine. Sachant que 1 mg d'eau équivaut à 1 mm³ en volume, la différence de masse de la mine avant et après infiltration de solution aqueuse nous renseigne directement sur le volume de la mine. Le volume d'une mine est en moyenne de 94 mm³ (± 32 mm³, N = 10 mines). Les dimensions des larves de stade L5, mesurées au cours des **chapitres 1 et 2**, permettent de calculer le volume moyen d'une larve en considérant son corps comme un cylindre. Le volume moyen d'une larve est de 2,9 \pm 1 mm³ (N = 116 larves). Ainsi la larve de dernier stade n'occupe en moyenne que 3 % du volume disponible.

L'environnement thermique de la mine se différencie de celui de la feuille suite aux modifications apportées par la larve. Ces modifications sont de deux ordres : les propriétés optiques et l'activité stomatique (**chapitres 1, 2 et 3**). Ces deux types de modifications se retrouvent invariablement sur toutes les mines (e.g. Fig. 1). Les deux modifications sont liées, et s'entraînent mutuellement. La modification des propriétés optiques de la mine induit un excès de température dans la mine. Les stomates réagissent à cette augmentation de température en se refermant sensiblement, entraînant une nouvelle augmentation de l'excès de température. Ce processus d'entraînement est en partie simultané, dû à l'effet immédiat des propriétés optiques sur l'absorption des radiations lorsque celles-ci augmentent, et en partie progressif, dû au temps nécessaire aux stomates pour parvenir à s'équilibrer (entre 20 et 30 minutes dans le cas des plants de pommiers utilisés lors de cette thèse). Les radiations agissent sur les deux types de modifications puisqu'elles sont absorbées par le tégument supérieur de la mine d'une part, et d'autre part, elles induisent la fermeture des stomates dans le tégument inférieur. Les manipulations physiques et physiologiques de la larve s'appliquent donc clairement aux deux zones d'action des radiations. Le niveau de radiation est pour cette raison le paramètre abiotique majeur dans le système, bien que les influences soient multiples.

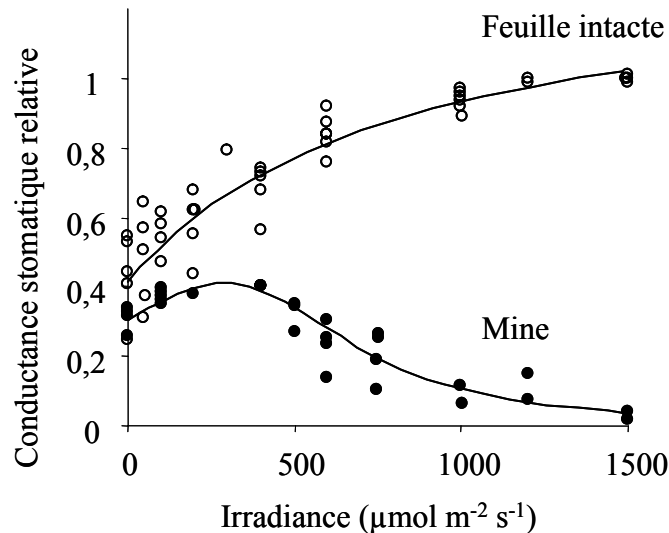


Figure 1. Conductance stomatique relative (ratio par rapport à la valeur maximale obtenue pour les feuilles intactes) des feuilles intactes ($N = 5$) et des mines ($N = 4$), mesurée sur un pommier dans un verger proche de Marsillargues (région de Montpellier, France) en août 2003. Le patron de fermeture stomatique dans la mine sur le terrain est similaire à celui observé sur des jeunes plants sous serre. Cette fermeture stomatique semble donc être la règle. Voir **chapitre 2** pour de plus amples informations.

Les conséquences physiques et écologiques du choix du lieu de ponte de la mère

La larve de *P. blancardella* reste à l'intérieur de la mine jusqu'à l'émergence de l'adulte. Le choix du lieu de ponte de la mère est donc déterminant puisqu'il conditionne en partie la qualité de l'environnement thermique de la larve en développement. Ce choix a un impact majeur à deux niveaux. A l'échelle de la canopée, tout d'abord, la position de la ponte a un impact important sur le développement futur de la larve puisqu'elle détermine si la mine sera exposée ou non aux radiations solaires. En effet, les feuilles situées en périphérie de la canopée d'un arbre peuvent recevoir en moyenne 30 fois plus de radiations que les feuilles situées au milieu de la canopée (e.g. Sinoquet *et al.* 2001, environ $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour les feuilles exposées contre $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour les feuilles d'ombre). Le budget thermique de la mine prédit qu'une mine (de soleil) recevant un niveau de radiation de $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ est plus de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ plus chaude qu'une mine (d'ombre) ne recevant que $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiations (**chapitre 3**). Enfin, un deuxième choix survient à l'échelle de la feuille, après sélection d'une zone de ponte dans la canopée. La taille de la feuille hôte joue un rôle non négligeable dans les échanges thermiques. La taille de la feuille détermine l'épaisseur de la couche limite et donc sa conductance pour la chaleur et la vapeur d'eau. Plus la feuille est grande, plus la couche limite est épaisse et les transferts de chaleurs 'ralentis'. Ainsi, une

mine positionnée sur une feuille de 9,5 cm de large est environ 4 °C plus chaude qu'une mine placée sur une feuille de 2,5 cm de large (Fig. 2). Cet effet taille de la feuille est atténué lorsque la vitesse du vent augmente. Le facteur vent intervient aussi dans les calculs de conductance de la couche limite (voir **chapitres 3**). En conclusion, l'environnement thermique le plus chaud est obtenu après sélection par la mère d'une grande feuille exposée. La mère sélectionne partiellement l'environnement thermique de sa descendance.

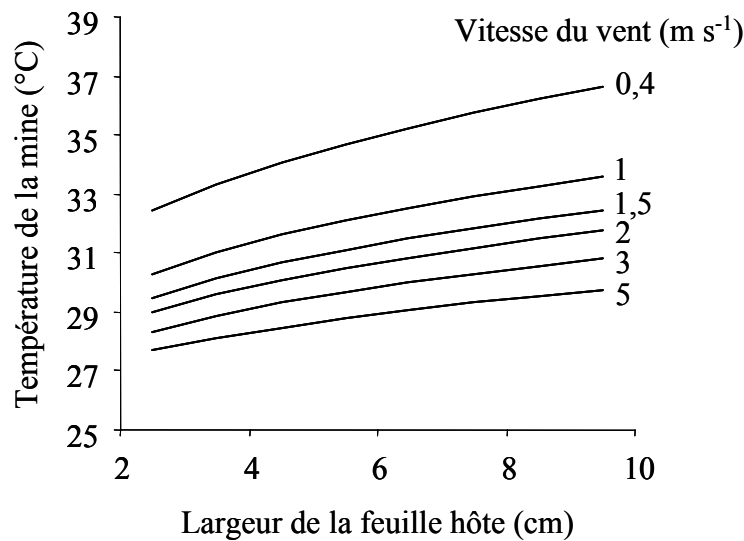


Figure 2. Température de la mine, prédite par le budget thermique de la mine, en fonction de la taille de la feuille hôte et de la vitesse du vent. Conditions : irradiance 1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, humidité relative 70 % et température de l'air 25 °C. L'intervalle des largeurs de feuille (de 2,5 à 9,5 cm) correspond à l'intervalle mesuré sur un pommier âgé de 20 ans. Voir **chapitre 3** pour de plus amples informations.

Coûts et bénéfices pour le végétal

La relation insecte plante induit clairement un coût pour le végétal puisque la mineuse se nourrit des fluides puis des tissus de la feuille. Néanmoins, plusieurs observations suggèrent que ce coût est partiellement contrebalancé par certains bénéfices.

Les tissus foliaires de la mine (patches verts) photosynthétisent normalement, si bien que le coût associé à la perte de tissus photosynthétiques est proportionnel à la surface occupée par les fenêtres de nourrissage et non à la surface totale de la mine (**chapitre 2**). La larve doit avoir un comportement de nourrissage très méticuleux et précis pour ne pas endommager les patches verts. Le CO₂ expiré par la larve est de plus disponible pour les tissus photosynthétiques, si bien que les stomates se referment (**chapitre 2**). L'efficacité de l'eau

(i.e. ratio carbone assimilé : transpiration) des tissus de la mine est considérablement augmentée. Cette meilleure efficacité de l'eau peut partiellement compenser le coût associé à l'herbivorie.

Enfin, la mineuse ne consomme jamais la totalité des tissus photosynthétiques de la mine. J'ai pu observer que la proportion des patchs verts subsistant à la fin du développement de la larve est en moyenne de $47 \pm 8\%$ de la surface totale de la mine (Fig. 3). La mineuse doit conserver des tissus photosynthétiques dans la mine afin que l'environnement thermique continue d'être régulé au cours du développement de la nymphe. Bien que cette valeur doit dépendre largement de la qualité nutritionnelle de la feuille, le dessin géométrique conservé d'une mine à l'autre implique l'existence d'un système de régulation très fin permettant à la larve de savoir quand elle doit s'arrêter de prélever des tissus végétaux.

L'impact de la mineuse est physiquement très localisé, sur seulement 1 cm^2 de surface foliaire, et semble entraîner un 'moindre coût' pour la plante.

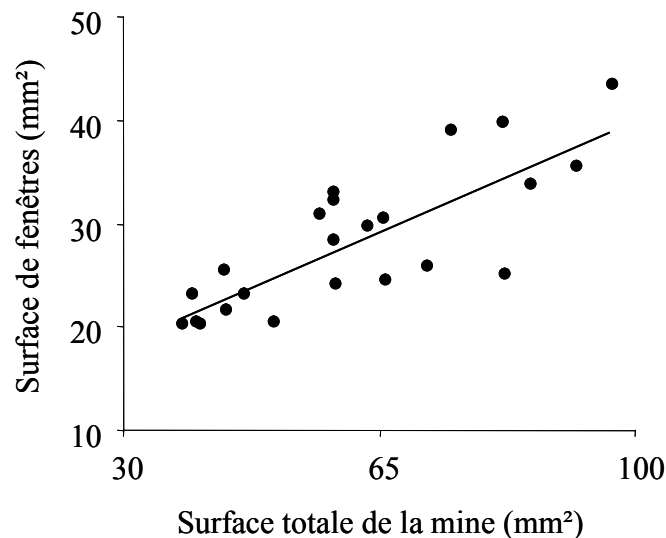


Figure 3. Surface occupée par les fenêtres de nourrissage en fonction de la surface totale de la mine à la fin du développement du dernier stade larvaire. Régression linéaire : $y = 0,3071 x + 9,3338$; $R^2 = 0,64$; $P < 0,001$. La relation linéaire implique que la mineuse ne mange pas plus de 47 % en moyenne de la surface totale de la mine. Méthode : un groupe de 23 mines a été suivi quotidiennement. Chaque matin, une image numérique de la surface supérieure de la mine était prise. Les images étaient traitées sous le logiciel Scion Image de sorte à obtenir la surface totale de la mine et la surface occupée par les fenêtres de nourrissage. La durée moyenne du développement des stades L4 et L5 était de 10 jours. Pendant cette période, les plantes étaient disposées sous serre, dans un climat tempéré, et le microclimat était le même pour toutes les mines.

La mine : phénotype étendu de la larve ?

Le concept de phénotype étendu a été introduit par R. Dawkins (1982). Dawkins définit le phénotype étendu comme étant l'ensemble des effets des gènes sur l'environnement de l'organisme. Ces effets doivent influencer positivement les chances de survie des gènes. Ce concept soutient l'idée qu'un gène puisse s'exprimer en dehors de l'organisme pour manipuler son environnement, offrant en retour des meilleures chances d'être transmis aux générations suivantes. D'après Turner (2004), 'the extended phenotype opened the possibility that interesting physiology could also be found « out there », beyond the organism's skin'. Ainsi, les constructions animales peuvent être perçues comme le phénotype étendu de leur constructeur (Turner 2000). Les méthodes de construction sont inscrites dans le génome de l'organisme.

La mine, en tant que microhabitat élaboré par la mineuse, rentre parfaitement dans cette définition du phénotype étendu. L'apparition des fenêtres, impliquant la modification de l'absorbance, est une conséquence du comportement de nourrissage. De même, la réaction des stomates au CO₂ expiré par la larve fait partie intégrante de la construction. La mine est le fruit d'un comportement de construction régulé de façon très fine. La mine est le phénotype étendu de la mineuse. Le phénotype étendu doit avoir des répercussions positives sur les chances de survie (ou transmission) du ou des gènes responsables de ce phénotype (Dawkins 1982). Ici, je démontre que la mine permet un environnement plus chaud et donc un développement plus rapide pour la larve. Un développement plus rapide implique d'arriver à l'état reproducteur plus tôt, et une transmission des gènes plus rapide. Une autre répercussion est qu'en se développant plus vite, la larve pourrait diminuer le risque d'être attaqué par un prédateur (hypothèse du slow-growth-high-mortality de Benrey & Denno 1997).

LA DYNAMIQUE TEMPORELLE DE L'ENVIRONNEMENT THERMIQUE D'UNE MINE

Le microclimat dépend du stade larvaire

Le fonctionnement physique et physiologique du microclimat de l'insecte mineur *P. blancardella* a été étudié chez le 5^{ème} et dernier stade larvaire (**chapitres 1, 2, et 3**). Le microclimat de ce stade larvaire est caractérisé par deux types de modifications, i.e. les propriétés optiques du végétal et le comportement des stomates. L'absorption importante des radiations du proche infrarouge et la fermeture des stomates aux niveaux modérés et élevés de radiations ont une participation équivalente à l'excès de température de la mine (**chapitre 3**). La modification des propriétés optiques a pour origine le comportement de nourrissage de la larve (**chapitre 1**), tandis que la fermeture des stomates est induite à la fois par le comportement de construction et l'activité respiratoire de la larve (**chapitre 2**). Cependant, le comportement de nourrissage, l'activité et le métabolisme de la larve évoluent en fonction de son âge, et plus particulièrement de son stade. Les propriétés optiques de la mine dépendent de la quantité de tissus mangés par la larve. Le rejet de CO₂ de la larve dépend de la présence de fenêtres de nourrissage et de la taille de la larve. L'environnement thermique de la mineuse doit donc avoir une dynamique temporelle tout au long du développement de la larve, en réponse à l'évolution temporelle des paramètres le caractérisant. Dans la discussion ci-dessous, je propose de mesurer la dynamique temporelle des paramètres clés et d'évaluer leur impact sur la dynamique temporelle de l'environnement thermique de la mineuse.

La dynamique d'apparition des fenêtres de nourrissage

Seuls les 4^{ème} et 5^{ème} stades larvaires se nourrissent en ingérant des tissus végétaux ('tissu feeders'), au contraire des trois premiers stades larvaires qui prélèvent uniquement les fluides de la plante. Par conséquent, les fenêtres de nourrissage apparaissent tard dans le développement de la larve, i.e. au début du 4^{ème} stade larvaire. Les dernières fenêtres sont élaborées à la fin du 5^{ème} stade larvaire, juste avant d'entrer en nymphose. Au court de ces deux derniers stades larvaires, la surface occupée par les fenêtres de nourrissage évolue de façon sigmoïdale (Fig. 4A).

Le patron d'évolution de la surface occupée par les fenêtres au cours du temps permet de déduire le patron de variation des absorbances de la mine tout au long du développement. Les modifications des propriétés optiques de la mine sont directement liées à la présence des fenêtres, l'absorbance des patches verts étant identique à celle des tissus intacts (**chapitre 1**). Les valeurs d'absorbance de la mine dans le visible et le proche infrarouge, avant l'apparition de la première fenêtre, sont donc égales à celles des feuilles intactes (Fig. 4B ; temps zéro de développement des stades L4-L5). Puis, les absorbances évoluent dans le temps de façon proportionnelle à la surface occupée par les fenêtres, jusqu'aux valeurs mesurées sur des mines âgées (**chapitre 3**). L'absorbance de la mine dans le proche infrarouge augmente donc de façon sigmoïdale au cours du temps, tandis que celle dans le visible diminue (Fig. 4B).

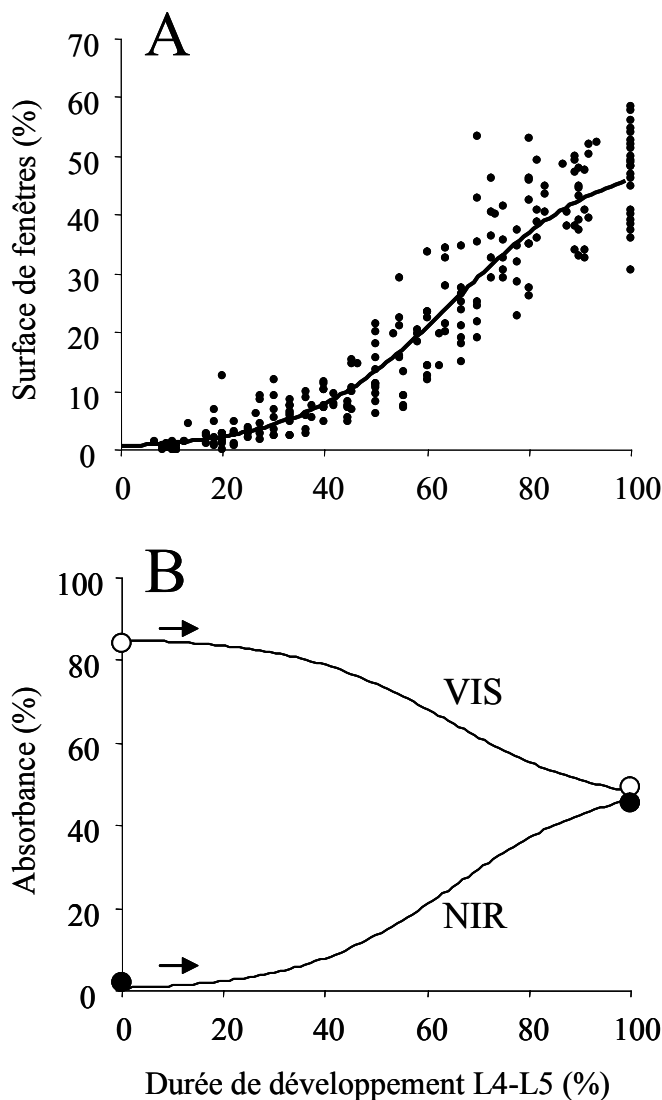


Figure 4. (A) Évolution de la surface occupée par les fenêtres de nourrissage au cours du développement des stades larvaires L4 et L5. La courbe sigmoïde a pour équation :

$$y = a / [1 + \exp(-(x-b)/c)]$$

Régression non linéaire (TableCurve 2D) : $a=50,72$; $b=65,16$; $c=14,93$; $R^2=0,89$; $F_{2,232}=959$; $P<0,0001$. Méthode : voir figure 3. (B) Évolution des absorbances de la mine dans le visible (VIS, ○) et le proche infrarouge (NIR, ●) au cours du développement des stades larvaires L4 et L5. Ces courbes ont été estimées à partir de la sigmoïde décrivant l'évolution de la surface occupée par les fenêtres. Les valeurs d'absorbance à l'instant zéro du développement du stade L4 correspondent à celles d'une feuille intacte, tandis que les valeurs d'absorbance à la fin du stade L5 sont celles mesurées sur des mines âgées (**chapitre 3**).

Les correspondances entre la surface occupée par les fenêtres, le stade de développement et les absorbances (Fig. 4) permettent de prédire, en utilisant le budget thermique de la mine (**chapitre 3**), l'excès de température de la mine en fonction de l'avancement du développement. Le modèle prédit que l'excès de température de la mine par rapport à la feuille augmente au cours du développement de façon sigmoïdale (Fig. 5). L'amplitude de la courbe dépend évidemment du niveau de radiation. L'augmentation de température la plus importante survient au-delà de 40 % du développement, c'est-à-dire principalement au cours du stade larvaire L5 (Fig. 5). Le taux d'augmentation d'excès de température de la mine et le taux de nourrissage (ou taux d'apparition des fenêtres) sont donc parfaitement corrélés.

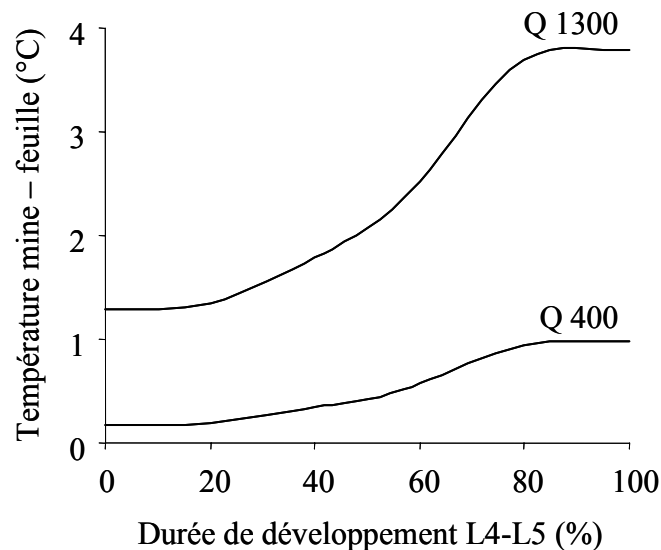


Figure 5. Évolution de l'excès de température de la mine (Δ = température de mine – température de feuille) au cours du développement des stades larvaires L4 et L5, pour deux niveaux de radiations $Q = 1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et $Q = 400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La durée totale du développement de ces deux stades est de 10 jours en moyenne.

A ma connaissance, un lien direct et bilatéral entre le taux de nourrissage d'un herbivore et l'altération de son microclimat n'a jamais été démontré. L'effet de la température du microclimat sur le taux de nourrissage est bien connu chez les ectothermes en général (e.g. Kingsolver 2000). Chez les insectes ectophages, la température du microclimat dépend avant tout du comportement de sélection du microhabitat (plante hôte) de la mère ou de la larve (Fig. 6). La relation est strictement unidirectionnelle. L'effet du microclimat sur le taux de nourrissage est souvent positif puisque les effets négatifs peuvent être évités en sélectionnant

un nouveau microhabitat. Dans le cas des insectes mineurs de feuilles, cette relation devient bilatérale avec une rétroaction du taux de nourrissage sur la température du microclimat (Fig. 6). Les effets positifs de cette boucle de rétroaction peuvent être plus importants que chez les ectophages car la mineuse obtient un microclimat plus chaud tout en se nourrissant, évitant ainsi les coûts associés à la sélection d'un nouveau microhabitat. En revanche, les modifications apportées par la mineuse sur son environnement thermique sont irréversibles et la larve ne peut pas échapper à son microhabitat. Cette rétroaction peut donc avoir des effets négatifs sur le métabolisme de la larve dans des conditions extrêmes de température. Ce système bilatéral peut entraîner des processus coévolutifs entre comportement de nourrissage et physiologie thermique chez les insectes mineurs de feuilles.

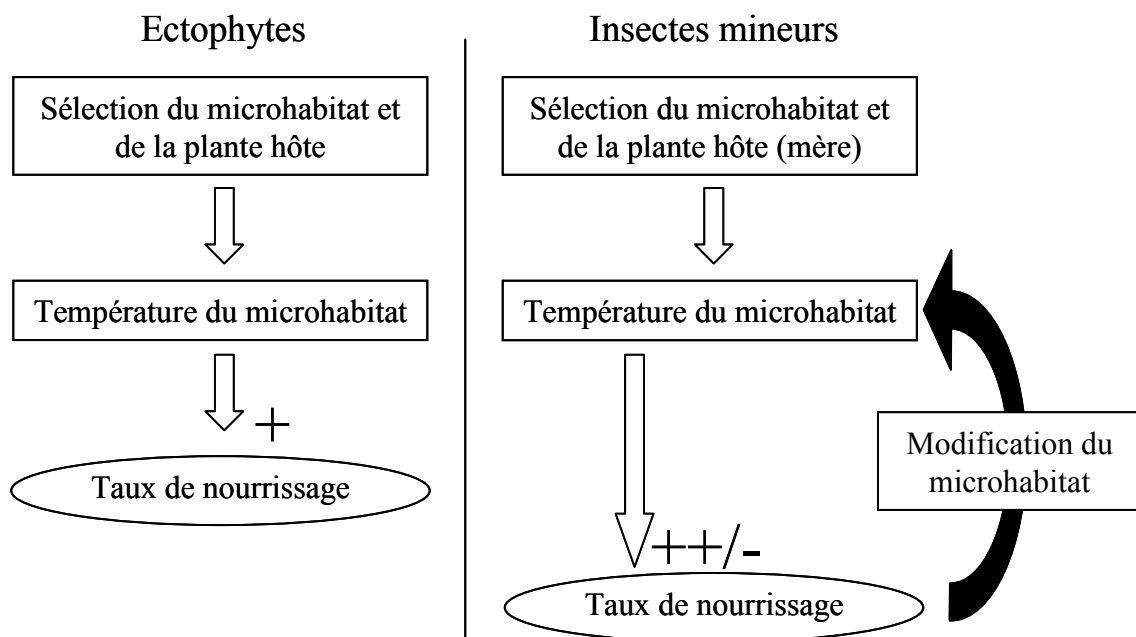


Figure 6. Relations entre sélection du microhabitat, température et taux de nourrissage chez les insectes herbivores ectophages et chez les insectes mineurs de feuilles. Cette relation, qui est unilatérale chez les ectophytes, devient bilatérale chez les mineurs. Le microclimat sélectionné par un ectophyte est en général relativement favorable à son taux de nourrissage. Chez les mineurs, l'environnement thermique résultant de l'activité de la larve est très favorable au nourrissage de la larve tant que des températures extrêmes ne sont pas atteintes.

La dynamique du comportement stomatique

Au cours du développement de la larve, qui dure environ 30 jours en moyenne, les différents facteurs affectant le comportement stomatique sont (i) l'effet lésion, (ii) l'effet CO₂ larvaire, et (iii) l'âge de la feuille hôte. D'autres facteurs environnementaux, non détaillés ici, peuvent aussi affecter la dynamique temporelle de la conductance stomatique sur une période de 30 jours, par exemple des accidents climatiques (fluctuations importantes de facteurs climatiques), des attaques de pathogènes ou une diminution importante de la disponibilité de l'eau dans le sol.

L'effet lésion correspond à la fermeture stomatique causée par une diminution de la résistance au CO₂ du mésophile. Cette diminution de la résistance du mésophile est induite par l'augmentation de l'espace aérien intercellulaire (**chapitre 2**). L'activité de la larve est la cause directe de l'augmentation de l'espace intercellulaire. Deux comportements de nutrition sont à distinguer : (i) le cisèlement horizontal, qui permet de séparer le tégument inférieur de la feuille et le mésophile, lorsque la larve se nourrit des fluides de la feuille, et (ii) le prélèvement des patches verts dans le mésophile. Le cisèlement horizontal est pratiqué par les trois premiers stades larvaires tandis que le prélèvement n'a lieu qu'aux stades L4 et L5 (Pottinger & LeRoux 1971). Les deux actions sont irréversibles et leurs effets sont additifs (**chapitre 2**). L'effet lésion peut donc devenir significatif dès le stade L3, au cours duquel la larve délimite sa mine, et s'intensifier jusqu'à la fin du stade L5.

L'effet CO₂ larvaire correspond à la fermeture stomatique induite par le CO₂ expiré par la larve à l'intérieur de la mine. Le rejet de CO₂ par la larve augmente lorsque celle-ci est positionnée sous les fenêtres de nourrissage (**chapitre 1**). La probabilité d'être dans cette posture augmente donc au fur et à mesure que la surface des fenêtres s'étend. De plus, le taux métabolique, incluant l'activité respiratoire, augmente avec la taille corporelle chez les organismes vivants (Gillooly *et al.* 2001). L'effet CO₂ larvaire devrait donc être significatif seulement à partir du stade L4, lorsque les fenêtres commencent à apparaître et que le rejet surfacique de CO₂ devient suffisant pour avoir un impact sur les stomates ($> 0,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, qui correspond à la valeur du rejet de CO₂ lorsque la conductance stomatique commence à chuter ; **chapitre 2**).

La physiologie et la structure de la feuille varient avec son âge. La conductance stomatique atteint des valeurs maximales très tôt, puis diminue régulièrement jusqu'à la sénescence de la feuille (Field 1987). Le patron d'évolution de la conductance maximale au cours du temps

chez la feuille du pommier correspond bien au patron général trouvé dans la littérature (Field 1987). En revanche, le patron mesuré au niveau du tégument de la mine de dernier stade larvaire est radicalement différent (Fig. 7). Tandis que la conductance stomatique de la mine sur une feuille jeune (30 jours) est très faible, celle-ci augmente de façon linéaire avec l'âge jusqu'à devenir plus élevée au niveau de la mine que dans les tissus intacts dans des feuilles très âgées (> 90 jours) (Fig. 7). Le patron n'a pas été mesuré pour les mines des stades larvaires précédents. La conductance stomatique maximale du tégument d'une mine située sur une feuille très âgée est multipliée par un facteur 4 par rapport à une mine sur une jeune feuille (Fig. 7). Ceci suggère que l'environnement thermique de la mine varie qualitativement avec l'âge de la feuille. L'âge de la feuille lors de la ponte de la femelle détermine en partie le fonctionnement stomatique de la mine environ 20 jours plus tard, ce qui correspond au délai de développement des trois ou quatre premiers stades larvaires. En modifiant le paramètre de conductance stomatique maximale dans le modèle de température de mine (**chapitre 3**), le modèle prédit que la température d'une mine de dernier stade située sur une feuille de 30 jours est plus élevée de 1 °C par rapport à une mine localisée sur une feuille de 100 jours (prédictions réalisées à irradiance $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, température de l'air 25 °C et humidité relative 70 %). Par conséquent, bien que cet effet âge ne soit pas le paramètre majeur du système, il souligne néanmoins l'aspect multidimensionnel et complexe de l'interaction. Par ailleurs, d'autres recherches sont nécessaires pour expliquer l'augmentation de la conductance stomatique maximale de la mine avec l'âge de la feuille.

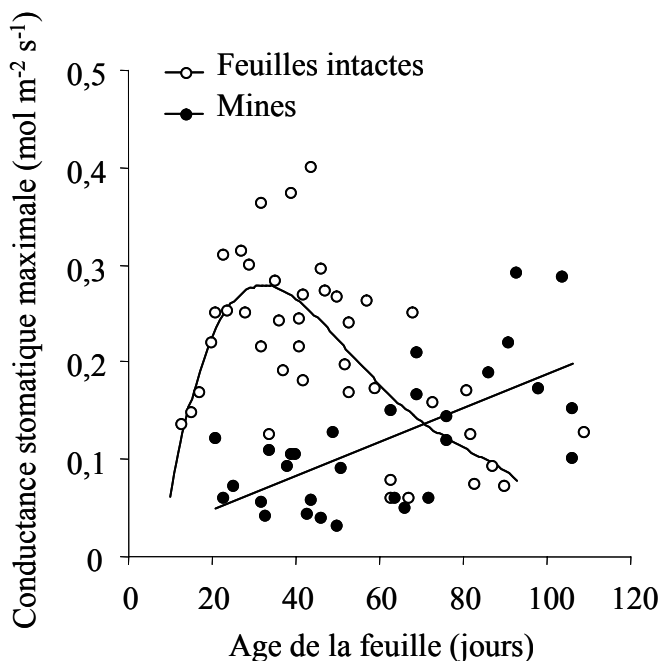


Figure 7. Évolution de la conductance stomatique maximale pour la vapeur d'eau en fonction de l'âge de la feuille, pour les tissus foliaires intacts et le tégument de la mine. Méthode : la conductance stomatique maximale a été mesurée avec l'analyseur de gaz infrarouge Li-Cor 6400, suivant la méthode détaillée dans le **chapitre 2**, sur 38 feuilles intacts ($Q=1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $C_a=35 \text{ Pa}$; $T_L=25 \text{ °C}$; $VPD=1 \text{ kPa}$) et 30 mines ($Q=600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $C_a=35 \text{ Pa}$; $T_L=25 \text{ °C}$; $VPD=1 \text{ kPa}$). Feuilles intacts, régression non linéaire : $R^2=0,43$; $F_{4,35}=8,78$; $P<0,001$. Mines, régression linéaire : $R^2=0,42$; $P<0,001$.

La durée du développement larvaire : les effets additifs

Il est délicat d'estimer précisément l'environnement thermique de la mine pour chaque stade larvaire. Des mesures de réponses stomatiques avec chaque stade larvaire sont nécessaires pour quantifier le microclimat de la mine. Néanmoins, il semble que les effets prépondérants – modifications des propriétés optiques, effets lésion et CO₂ larvaire – ne surviennent que tardivement au cours du développement, i.e. à partir du stade L4, et s'intensifient par la suite. Les différents effets sont clairement additifs (**chapitre 3**), si bien que ce sont les stades L5 et nymphal qui subissent l'environnement thermique le plus chaud.

ÉVOLUTION DES SENSIBILITÉS THERMIQUES DES ENDOPHYTES ET DE LEURS PARASITOÏDES

Généralités sur les sensibilités thermiques

La température corporelle est certainement la variable écophysiological qui a le plus de poids sur la performance des organismes ectothermes, que ce soit sur la locomotion, l'aptitude aux activités de fourragement et d'accouplement, le taux d'incorporation des nutriments et le taux de développement (Angilletta *et al.* 2002). La relation entre la température corporelle et une performance spécifique peut généralement être décrite par une fonction asymétrique, dans laquelle la performance est maximisée à une température intermédiaire (Taylor 1981 ; Huey & Kingsolver 1989 ; Gilchrist 1995 ; Angilletta *et al.* 2002) (Fig. 8). Cette fonction se caractérise typiquement par deux seuils de température corporelle (T_{\min} et T_{\max}) au-delà desquels la performance est nulle. Ces deux seuils définissent l'intervalle de tolérance thermique (ΔT). La température corporelle optimale pour la performance (T_{opt}) est en générale proche de T_{\max} . La forme de cette courbe de performance reflète en partie les contraintes fonctionnelles imposées par les effets de la température sur les réactions enzymatiques (Hoffmann 1984). Ce type de courbe a notamment permis de décrire la sensibilité thermique du taux de développement chez de nombreuses espèces d'insectes (e.g. Logan *et al.* 1976 ; Taylor 1981).

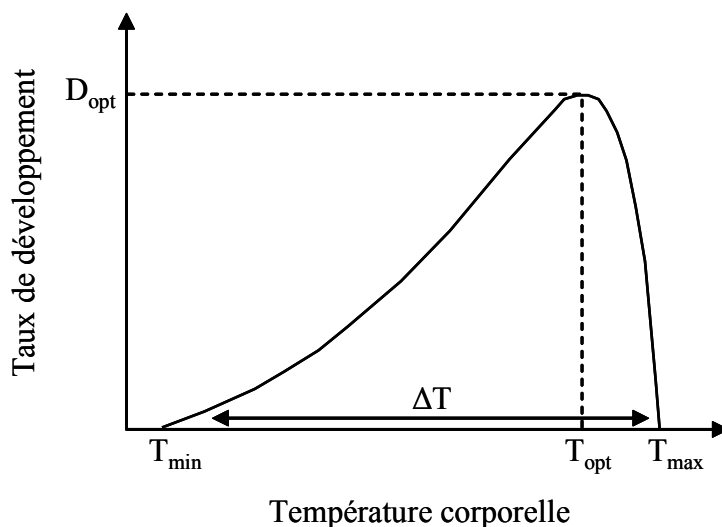


Figure 8. La forme commune de la relation entre la température corporelle et la performance d'un organisme ectotherme (par exemple le taux de développement, usuellement en jour^{-1}). La température optimale (T_{opt}) est la température corporelle qui maximise le développement (D_{opt}). Les seuils de température T_{\min} et T_{\max} définissent les limites du développement. L'écart $\Delta T = T_{\max} - T_{\min}$ est l'intervalle de température corporelle qui autorise la performance, nommé intervalle de tolérance. A partir de Huey & Kingsolver (1989) et Gilchrist (1995).

Les fonctions de performance peuvent évoluer au fil des générations en réponse à une modification de l'environnement thermique. La sélection naturelle peut altérer les paramètres clé de la sensibilité thermique (T_{\min} , T_{\max} , T_{opt} , ΔT et D_{opt}) (Angilletta *et al.* 2002). Idéalement, T_{opt} doit correspondre à la température corporelle moyenne de l'organisme et ΔT , à la variabilité de la température corporelle dans un milieu donné. Chez les lézards *Anolis* par exemple, la température optimale pour la course est corrélée positivement à la température corporelle moyenne journalière. L'intervalle de tolérance thermique (ΔT) de la fonction de locomotion est corrélé positivement à l'intervalle des températures corporelles chez d'autres groupes de lézards (van Berkum 1988). L'évolution des sensibilités thermiques reste toutefois particulièrement complexe due à l'intervention de facteurs génétiques et environnementaux. Plusieurs cas de figure sont envisageables en partant du postulat que la *fitness* est corrélée positivement à la performance. Par exemple, le modèle 'hotter is better' prédit que D_{opt} augmente avec T_{opt} , cette évolution s'accompagnant d'un glissement de la courbe vers la droite, i.e. T_{\min} et T_{\max} augmentent de la même manière que T_{opt} (Huey & Kingsolver 1989). Le modèle 'jack-of-all-temperatures is a master of none' considère l'existence de compromis entre D_{opt} et ΔT , l'augmentation de l'un entraînant la diminution de l'autre (Huey & Kingsolver 1989). L'intégration de corrélations génétiques entre la performance à haute et à basse température a apporté d'autres schémas évolutifs intermédiaires (Huey & Kingsolver 1993 ; Angilletta *et al.* 2002). Plusieurs études ont démontré que les sensibilités thermiques du taux de développement évoluent rapidement chez certains ectothermes (revue dans Angilletta *et al.* 2002).

Variabilité des sensibilités thermiques au niveau intraspécifique

L'environnement thermique de *P. blancardella* évolue selon le stade larvaire. Le patron général est que les températures de mine sont plus élevées dans une mine de stade L5 que dans une mine de stade L4 (la différence pouvant être de plus de 3 °C). De même, le microclimat du stade nymphal doit être légèrement plus chaud que celui du stade L5 car la surface de fenêtres est maximale. Les sensibilités thermiques de la mineuse, et plus particulièrement le seuil léthal de température, évoluent-elles aussi avec le stade larvaire de

sorte à être adaptées à la dynamique temporelle du microclimat ? J'ai mesuré le seuil létal de température des stades L4, L5 et nymphal. La température létale du stade L5 est 3,5 °C plus élevée que celle du stade L4 (Fig. 9). Les nymphes résistent jusqu'à 44 °C alors que les larves L5 ont une dose létale à 42 °C (Fig. 9). Chaque stade de développement est donc physiologiquement adapté au microclimat qui lui est propre.

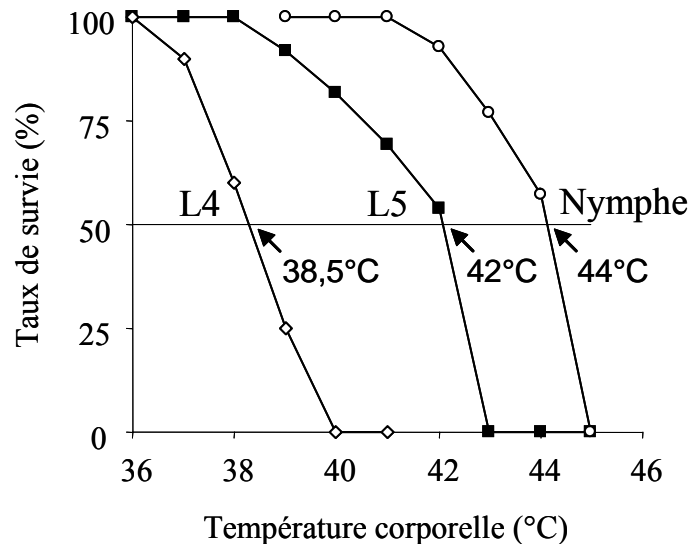


Figure 9. Variation du seuil létal de température, T_{max} , entre les stades larvaires L4 et L5, et le stade nymphal, chez *Phyllonorycter blancardella*. La DL50 (dose létale induisant 50 % de mortalité) est notée sur le graphique pour chaque stade. **Méthode** : pour chaque palier de température testé, un groupe de 12 individus fraîchement récoltés était déposé dans une petite boîte de Pétri équipée d'un thermocouple mesurant la température de l'air à l'intérieur. L'air de la boîte était maintenu saturé en vapeur d'eau en plaçant un coton imbibé d'eau. Le groupe de 12 individus était tout d'abord placé à 30 °C pendant 15 min dans une chambre climatique. Puis la température était élevée à un taux de 0,32 °C min⁻¹ jusqu'à atteindre le palier de température désiré. Le temps d'exposition à chaque palier était de 1 h. La viabilité des individus était vérifiée en les piquant légèrement avec une aiguille. Les individus vivants s'agitent violemment sous ce traitement (réponse comportementale aux tentatives d'oviposition du parasitoïde). Ce protocole a été appliqué sur des larves L4 (N = 72), L5 (N = 120) et des nymphes (N = 84).

Analyse comparative : endophytes versus ectophytes

L'objectif est de caractériser l'évolution générale des sensibilités thermiques chez les insectes endophytes. J'ai réalisé une analyse comparative des sensibilités thermiques du taux de développement des herbivores endophytes et ectophytes. L'environnement thermique de la mineuse *P. blancardella* montre une très large gamme de variation avec des températures maximales jusqu'à 10 °C au-dessus de la température de l'air (**chapitres 3**). Les galles offrent aussi à leur habitant un environnement thermique relativement chaud, avec une température

de plus de 5 °C au-dessus de l'air ambiant et une variabilité supérieure à celle de la température de l'air (Layne 1991 ; Turner 2000). Enfin, les insectes se développant à l'intérieur des fruits en cours de maturation doivent faire face à des températures qui peuvent dépasser la température de l'air de plus de 10 °C en plein soleil, tandis que la température du fruit est faiblement plus froide que l'air à l'ombre (revue par Woolf & Ferguson 2000). De façon générale les endophytes semblent donc vivre dans des environnements thermiques ayant des maxima plus chauds et une amplitude des températures plus importante par rapport aux ectophytes qui vivent dans des milieux dont la température est très proche de celle de l'air. On peut donc prédire que (i) le seuil léthal de température (T_{\max}) des endophytes doit être plus élevée que celle des ectophytes, (ii) la température permettant un développement optimal (T_{opt}) doit être plus chaude chez les endophytes, et (iii) l'intervalle de tolérance (ΔT) des endophytes doit être plus important que celui des ectophytes.

Méthode d'analyse comparative – L'analyse comparative est basée sur des données publiées concernant les valeurs de T_{\min} , T_{\max} , T_{opt} , et D_{opt} chez des insectes herbivores endophytes et ectophytes. Des règles strictes de choix des données ont été définies afin de réaliser le meilleur compromis entre (i) obtenir le plus grand nombre possible de données, et (ii) minimiser l'hétérogénéité dans les valeurs, qui peut être induite par exemple par de fortes différences écologiques entre les espèces. Les données retenues ont été acquises chez des espèces de milieu tempéré (basse altitude) ayant une taille corporelle inférieure à 1 cm. Dans toutes les publications sélectionnées, le taux de développement a été mesuré à des températures constantes et les paliers étaient fixés sur une période d'environ 1 heure. Dans le cas des endophytes inféodés aux feuilles, les données disponibles sont à ce jour encore très limitées, principalement due au fait que les expérimentateurs n'ont pas testé les températures au-delà de 30-33 °C ce qui ne permet pas de déterminer clairement T_{\max} , T_{opt} , et D_{opt} (e.g. Baumgärtner *et al.* 1981 ; Herbert & McRae 1983). La recherche a été étendue aux insectes foreurs des tiges et aux insectes se développant dans les fruits. Dans le cas des ectophytes, seules les données concernant des insectes vivant et se nourrissant sur les feuilles ont été prises en compte. La plupart du temps, j'ai obtenu D_{opt} en calculant l'inverse de la durée totale du développement. Les espèces ayant un développement larvaire de plus d'un an ont été écartées de l'étude. L'ensemble de ces règles a considérablement restreint l'échantillonnage. Néanmoins, les ordres majeurs des insectes sont représentés dans l'étude (Tableau 1).

Tableau 1. Résumé de l'échantillonnage utilisé dans l'analyse comparative des sensibilités thermiques du taux de développement chez les insectes endophytes versus ectophytes. Le nombre d'espèces (N) est indiqué pour chaque guildes et/ou ordre d'insecte.

Type	N	Sources
Endophytes		
Mineurs	4	
Lepidoptera	(3)	Baumgärtner <i>et al.</i> 1981 ; Klok <i>et al.</i> 2003 ; Sylvain Pincebourde (donnée non publiée, Fig. 9)
Diptera	(1)	Klok & Chown 1998
Foreurs	8	
Diptera	(3)	van der Have 2002
Lepidoptera	(5)	Taylor 1981 ; Kim <i>et al.</i> 2001 ; Lopez <i>et al.</i> 2001 ; Tobin <i>et al.</i> 2001 ; Liu <i>et al.</i> 2002
Total (sp)	12	
Ectophytes		
Coleoptera	4	Lactin <i>et al.</i> 1995 ; Klok & Chown 2003
Homoptera	3	Lactin <i>et al.</i> 1995 ; Wang & Tsai 2001 ; McCornack <i>et al.</i> 2004
Lepidoptera	7	Bursell 1964 ; Taylor 1981 ; Régnière & Turgeon 1989 ; Medeiros <i>et al.</i> 2003 ; Milonas & Savopoulou-Soultani 2000a
Total (sp)	14	

Résultats de l'analyse comparative – Les deux seuils de température pour le développement (T_{\min} et T_{\max}) sont environ 5 °C plus élevés chez les endophytes en comparaison des ectophytes (Tableau 2). La température optimale pour le développement (T_{opt}) est aussi plus élevée mais seulement de 3 °C (Tableau 2). En revanche, le taux de développement maximal (D_{opt}) n'est pas significativement différent entre les endophytes et les ectophytes (Tableau 2). L'intervalle de tolérance thermique (ΔT) des endophytes (32,8 °C) est similaire à celui des ectophytes (32,5 °C).

Tableau 2. Moyenne (\pm écart type) des paramètres décrivant la sensibilité thermique du taux de développement chez les insectes endophytes et ectophytes. Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre total d'espèces. Une différence positive indique que la valeur des endophytes est supérieure à celle des ectophytes. Les différences ont été testées en utilisant le test de Mann-Whitney, avec un seuil de confiance de 95 % ($\alpha = 0.05$). Les différences significatives sont notées en gras.

	Endophytes	Ectophytes	Différence	Valeur- <i>P</i>
T_{\min} (°C)	6,1 \pm 3,5 (8)	1,2 \pm 5,2 (10)	+ 4,9 °C	0,033
T_{opt} (°C)	31,9 \pm 1,5 (8)	28,8 \pm 2,6 (11)	+ 3,1 °C	0,014
T_{\max} (°C)	38,9 \pm 2,8 (9)	33,7 \pm 2,9 (11)	+ 5,2 °C	0,002
D_{opt} (jour ⁻¹)	0,057 \pm 0,025 (8)	0,049 \pm 0,033 (6)	+ 0,008 jour ⁻¹	0,438

Les données utilisées dans cette analyse ne permettent pas d'étudier les sensibilités thermiques spécifiques des insectes mineurs de feuille. Des quatre travaux relatifs aux mineurs, trois ne rapportent que la valeur de T_{\max} (Klok & Chown 1998 ; Klok *et al.* 2003 ; voir Fig. 9) et le quatrième uniquement la valeur de T_{\min} (Baumgärtner *et al.* 1981). Toutefois, la valeur de T_{\max} des insectes mineurs (41,2 \pm 1,3 °C) est supérieure à celle des autres endophytes pris en compte dans l'analyse (37,7 \pm 2,6 °C). L'intervalle de tolérance thermique (ΔT) chez *P. blancardella* est de 36,8 °C.

Les différences observées entre les endophytes et les ectophytes indiquent un glissement de la courbe de performance vers la droite, i.e. des températures plus élevées (Fig. 10). Toutefois, ce glissement n'est pas parfaitement symétrique. L'écart entre T_{opt} et T_{\max} est en effet plus important chez les endophytes (7 °C) que chez les ectophytes (4,9 °C).

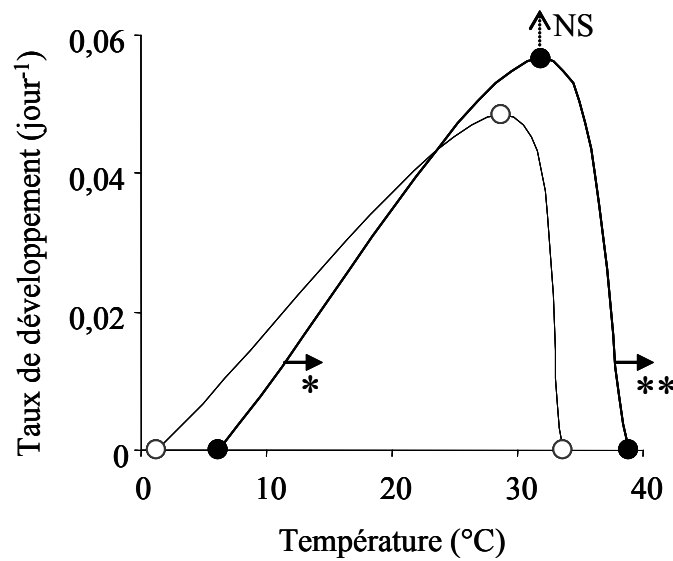


Figure 10. Courbes moyennes du taux de développement en fonction de la température pour les insectes endophytes (●) et ectophytes (○). Les courbes ont été construites en utilisant les valeurs moyennes T_{\min} , T_{\max} , T_{opt} , et D_{opt} données dans le tableau 2. Le tracé des courbes est uniquement une aide visuelle (tracé linéaire, avec lissage autour de l'optimum). Les flèches indiquent la tendance générale des endophytes, en comparaison des ectophytes. Statistiques : NS, non significatif ; une étoile, $P < 0,05$; deux étoiles, $P < 0,005$.

Les limites de l'analyse comparative – L'interprétation quantitative des résultats de l'analyse comparative est difficilement réalisable car les études visant à caractériser l'environnement thermique d'insectes endophytes restent encore à ce jour rares (**chapitre 3**). De plus, l'analyse est limitée aux insectes mineurs et foreurs. Bien qu'aucune donnée précise sur les sensibilités thermiques des insectes vivant dans les galles ne soit disponible, Layne (1991) apporte des éléments de comparaison. Des mesures de température dans les galles d'*Eurosta solidaginis* (Diptera : Tephritidae) dans l'état de New York (USA) ont montré que la température dans les galles peut atteindre 35 °C à 40 °C. De plus, le taux de survie des larves (les larves étant sorties des galles et placées dans des tubes) est de 100 % à 36 °C alors qu'il est de 0 % à 45 °C (Layne 1991). Le seuil léthal de température chez cette espèce galligène doit donc être aux alentours des 40 °C, ce qui est très proche du cas de figure observé pour les insectes mineurs.

Patron évolutif des endophytes – Des compromis évolutifs entre différents paramètres de sensibilité thermique de la performance peuvent apparaître si il existe des corrélations génétiques négatives entre les performances à différentes températures (Huey & Kingsolver 1993). En l'absence de compromis entre le taux de développement à basse et à haute température, le développement pourrait être optimisé à toute les températures, i.e. le développement deviendrait indépendant de la température (ou insensible). Le glissement de la courbe de réponse du taux de développement à la température chez les endophytes (Fig. 10) montre clairement que la sélection pour un plus fort taux de développement à haute température entraîne un taux de développement plus faible à basse température. Ceci démontre que la courbe de développement des insectes herbivores est contrainte par des fortes corrélations génétiques négatives entre le taux de développement à basse et à haute température.

L'intervalle de tolérance thermique est similaire chez les endophytes et les ectophytes, indiquant une absence de corrélation entre l'intervalle de tolérance thermique et l'intervalle des températures corporelles. La variabilité de la température corporelle chez la plupart des endophytes n'est peut être pas suffisamment plus importante que celle des ectophytes pour induire un changement évolutif de l'intervalle de tolérance thermique. Toutefois, l'intervalle de tolérance thermique de l'insecte mineur *P. blancardella* est plus large que la moyenne générale des endophytes de 4 °C. La prédiction d'une corrélation entre l'intervalle de tolérance et celle des températures corporelles pourrait donc se vérifier pour cette espèce mineuse.

D'après Huey et Kingsolver (1993) et Angilletta, Niewiarowski et Navas (2002), un glissement des deux seuils de température et de la température optimale pour la performance, avec une performance maximale inchangée, correspond à une réponse des sensibilités thermiques à un changement de la température corporelle moyenne de l'organisme. D'un point de vue évolutif, les sensibilités thermiques du taux de développement des insectes herbivores endophytes sont donc adaptées à un environnement dont la température moyenne est globalement plus élevée que celle du microclimat utilisé par les ectophytes. De plus, la comparaison endophytes versus ectophyte montre le couplage entre les deux seuils de température (i.e. l'intervalle de tolérance est similaire entre les deux guildes). L'augmentation des températures maximales du microclimat a un impact direct sur le seuil maximal, puis indirect sur le seuil minimal du fait de cette interdépendance. Ce résultat contraste avec les observations rapportées dans la revue de Chown (2001). En effet, les deux seuils de température évoluent généralement de façon indépendante d'un environnement thermique à

l'autre lorsque l'étude se focalise sur des échelles locales, régionales et globales, e.g. les deux seuils de température évoluent de façon découplée l'un de l'autre en fonction de la latitude (Addo-Bediako *et al.* 2000 ; Chown 2001).

L'hypothèse 'hotter-is-better' (Huey & Kingsolver 1989) ne semble pas s'appliquer sur le patron évolutif général des endophytes puisque leur taux de développement à température optimale est similaire à celui des ectophytes. Ce résultat surprenant suggère qu'un insecte endophyte ne se développe pas forcément plus vite qu'un insecte ectophyte bien que, dans des conditions climatiques similaires, le microclimat de endophytes soit plus chaud que celui de l'ectophyte.

Évolution des sensibilités thermiques des parasitoïdes d'endophytes

Un large cortège d'hyménoptères parasitoïdes est associé aux insectes mineurs de feuille (e.g. Casas & Baumgärtner 1990 ; Godfray 1994 ; McGregor 1996 ; Valladares & Salvo 2001). Les parasitoïdes exercent une forte pression de sélection sur les mineuses et sont à l'origine d'un taux de mortalité conséquent (e.g. Hawkins *et al.* 1997). Dès lors que la femelle parasitoïde a détecté la mine, localisé la larve et pondu son œuf sur ou à proximité du corps de la mineuse, la larve de parasitoïde est livrée à elle-même à l'intérieur de la mine. La larve des ectoparasitoïdes s'accroche au corps de la mineuse puis dévore entièrement les organes et les fluides corporels jusqu'à la fin de son développement. Chez *P. blancardella*, la plupart des ectoparasitoïdes s'attaquent aux stades L4, L5 et nymphal (Pottinger & LeRoux 1971), c'est-à-dire tout au long des stades qui forment les fenêtres de nourrissage. La larve du parasitoïde se développe donc dans le même environnement thermique que celui décrit pour la mineuse (**chapitre 3**). Cette constatation soulève l'hypothèse que la physiologie du parasitoïde, et plus particulièrement ses sensibilités thermiques, est adaptée à l'environnement thermique créé préalablement par l'hôte. En appliquant un raisonnement similaire à celui explicité dans la partie ci-dessus, on peut prédire que de façon générale les sensibilités thermiques du taux de développement (T_{\min} , T_{\max} , T_{opt} , ΔT et D_{opt}) des parasitoïdes d'endophytes sont différentes de celles des parasitoïdes d'ectophytes, et doivent être proches de celles de l'hôte endophytes.

L'analyse comparative – J'ai effectué une analyse comparative des sensibilité thermiques du taux de développement des parasitoïdes d'insectes herbivores endophytes versus parasitoïdes d'insectes herbivores ectophytes en me basant sur des données publiées et en

suivant les mêmes règles de sélection des données que précédemment (Tableau 3). Aucune discrimination n'a été faite entre les endoparasitoïdes et les ectoparasitoïdes. Chaque couple hôte – parasitoïde a été constitué en vérifiant que le parasitoïde attaque un endophytes ou bien ectophyte.

Tableau 3. Résumé de l'échantillonnage utilisé dans l'analyse comparative des sensibilités thermiques du taux de développement chez les parasitoïdes d'insectes herbivores endophytes versus parasitoïdes d'insectes ectophytes. Le nombre d'espèces (N) est indiqué pour chaque guildes et/ou ordre d'insecte. Les parasitoïdes sont tous des Hyménoptères.

Hôte	Type d'hôte	N	Sources
Endophytes	Mineurs	5	
	Diptera	(3)	Omer <i>et al.</i> 1996 ; Bazzocchi <i>et al.</i> 2003
	Lepidoptera	(2)	Urbaneja <i>et al.</i> 1999, 2002
	Foreurs	3	
	Coleoptera	(1)	Taylor 1981
	Lepidoptera	(2)	Lauzière <i>et al.</i> 2002 ; Mehrnejad 2003
	Total (sp)	8	
Ectophytes	Diptera	7	Hoddle <i>et al.</i> 1998 ; Lysyk 2001 ; De Vis <i>et al.</i> 2002 ; Ferreira de Almeida <i>et al.</i> 2002
	Homoptera	6	Sigsgaard 2000 ; Liu & Tsai 2002 ; Daane <i>et al.</i> 2004 ; Matadha <i>et al.</i> 2004
	Lepidoptera	6	Worner 1992 ; Milonas & Savopoulou-Soultani 2000b ; Dittrick & Chiang 2003 ; Saour 2004
	Total (sp)	19	

Les résultats de l'analyse comparative montrent que les T_{opt} et T_{max} des parasitoïdes d'endophytes sont environ 6 °C plus élevées que ceux des parasitoïdes d'ectophytes (Tableau 4). En revanche, aucune différence significative n'a été détectée sur T_{min} et D_{opt} entre les deux catégories de parasitoïdes (Tableau 4). Le croisement des deux analyses comparatives entre, d'une part, les insectes endophytes versus ectophytes, et, d'autre part, les parasitoïdes d'endophytes versus parasitoïdes d'ectophytes, montre que T_{opt} et T_{max} ne diffèrent pas entre les herbivores et leurs parasitoïdes pour les deux catégories (Tableau 5). Une légère différence, significative uniquement dans le cas des ectophytes, apparaît pour T_{min} , indiquant

que le seuil minimal de développement est situé à des températures plus élevées chez les parasitoïdes en comparaison de leurs hôtes (Tableau 5). Enfin, le D_{opt} des parasitoïdes est significativement plus élevé que celui des herbivores dans les deux catégories (Tableau 5).

Tableau 4. Moyenne (\pm écart type) des paramètres décrivant la sensibilité thermique du taux de développement chez les parasitoïdes d'insectes endophytes et ectophytes. Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre total d'espèces. Une différence positive indique que la valeur des parasitoïdes d'endophytes est supérieure à celle des parasitoïdes d'ectophytes. Les différences ont été testées en utilisant le test de Mann-Whitney, avec un seuil de confiance de 95 % ($\alpha = 0.05$). Les différences significatives sont notées en gras.

Parasitoïde :	Hôte endophytes	Hôte ectophyte	Différence	Valeur- <i>P</i>
T_{min} (°C)	10,0 \pm 2,3 (6)	6,8 \pm 3,7 (8)	+ 3,2 °C	0,245
T_{opt} (°C)	33,0 \pm 1,8 (8)	26,9 \pm 2,7 (15)	+ 6,1 °C	< 0,001
T_{max} (°C)	38,6 \pm 0,9 (4)	32,8 \pm 2,8 (15)	+ 5,8 °C	0,004
D_{opt} (jour ⁻¹)	0,122 \pm 0,030 (8)	0,100 \pm 0,044 (14)	+ 0,022 jour ⁻¹	0,313

Tableau 5. Différences des sensibilités thermiques du taux de développement entre, d'une part, les insectes endophytes et leurs parasitoïdes, et, d'autre part, les insectes herbivores ectophytes et leurs parasitoïdes. Une valeur négative indique que la valeur des herbivores est plus petite que celle des parasitoïdes. Les données brutes utilisées pour les calculs sont résumées dans les tableaux 2 et 4. Les différences ont été testées en utilisant un test de Mann-Whitney avec un seuil de confiance de 95 % ($\alpha = 0.05$). Les valeurs entre parenthèses correspondent aux valeurs-*P* du test. Les différences significatives sont montrées en gras.

	Différence [endophyte – parasitoïde]		Différence [ectophyte – parasitoïde]	
T_{min} (°C)	-3,9	(0,071)	-5,6	(0,037)
T_{opt} (°C)	-1,1	(0,735)	1,9	(0,316)
T_{max} (°C)	0,3	(0,548)	0,9	(0,532)
D_{opt} (jour ⁻¹)	-0,065	(0,005)	-0,051	(0,013)

Évolution des parasitoïdes d'endophytes – L'ensemble des paramètres des sensibilités thermiques des parasitoïdes permet d'évaluer le patron général des courbes de performance du taux de développement en fonction de la température (Fig. 11). Globalement, la courbe de performance des parasitoïdes d'endophytes montre un glissement vers les températures plus élevées en comparaison de la courbe des parasitoïdes d'ectophytes. Les sensibilités thermiques des parasitoïdes semblent donc avoir évolué de la même façon que celles de leur hôte. Toutefois, deux différences apparaissent. En effet, l'intervalle de tolérance (ΔT) des parasitoïdes d'endophytes et d'ectophytes est plus étroit que celui de leur hôte (28,6 °C et 26,0 °C, respectivement, contre 32,8 °C et 32,5 °C pour les hôtes endophytes et ectophytes respectivement). De plus, le taux de développement à température optimale est environ deux fois plus élevé chez les parasitoïdes en comparaison de leur hôte dans les deux catégories. Ceci montre que les pressions agissant sur le développement des parasitoïdes tendent à favoriser un taux de développement plus important à la température optimale. Les corrélations négatives entre l'intervalle de tolérance et le taux de développement optimal induisent une diminution de l'intervalle de tolérance des parasitoïdes. La larve de parasitoïde se nourrit uniquement de tissus vivants, et ne doit pas tuer la larve mineuse dès le début du nourrissage. Si la larve hôte meurt trop tôt dans le développement de la larve du parasitoïde, celle-ci mourra aussi. Un développement rapide devient donc un avantage sélectif certain.

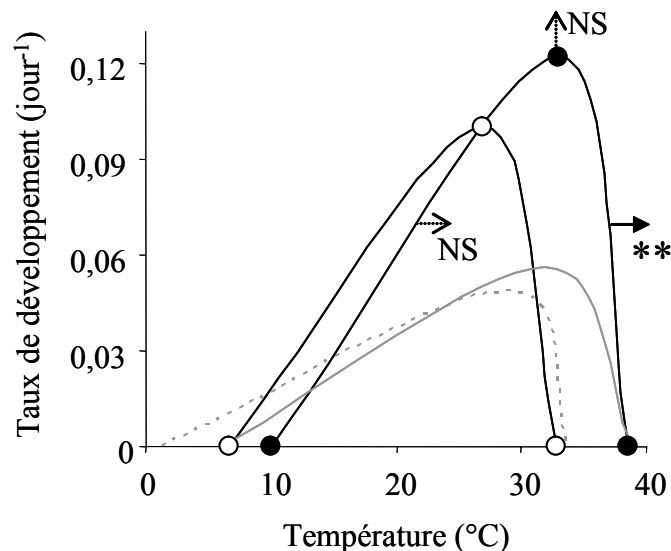


Figure 11. Courbes moyennes du taux de développement en fonction de la température pour les parasitoïdes d'insectes endophytes (●) et ectophytes (○). Les courbes en grisé représentent les patrons des insectes endophytes (trait continu) et ectophytes (trait pointillés) (voir Fig. 9). Les courbes ont été construites en utilisant les valeurs moyennes T_{\min} , T_{\max} , T_{opt} , et D_{opt} données dans le tableau 4. Le tracé des courbes est uniquement une aide visuelle (tracé linéaire, avec lissage autour de l'optimum). Statistiques : NS, non significatif; deux étoiles, $P < 0,005$.

Les sensibilités thermiques des parasitoïdes sont adaptées au microclimat dans lequel le développement a lieu. La particularité des parasitoïdes d'endophytes est que leurs sensibilités thermiques sont altérées en réponse au microclimat créé préalablement par leur hôte. A ma connaissance, aucune étude n'a démontré à ce jour l'impact des modifications microclimatiques apportées par une proie sur la physiologie thermique de ses prédateurs.

INGÉNIERIE DE L'ÉCOSYSTÈME : LA MINE À UN NIVEAU INTERSPÉCIFIQUE

Le concept d'ingénieur de l'écosystème

Le concept d'organisme ingénieur de l'écosystème a été formalisé par Jones, Lawton et Shachak (1994, 1997). Les organismes ingénieurs de l'écosystème contrôlent, directement ou indirectement, la disponibilité des ressources pour les autres organismes, en modifiant l'état physique des matériaux biotiques et abiotiques. Par cette action physique, ils modifient, maintiennent ou créent des habitats. Les ingénieurs allogéniques modifient leur environnement en transformant de la matière (organique ou minérale) d'un état physique à un autre via des procédés mécaniques ou autres, au contraire des organismes autogéniques qui altèrent leur environnement via leur propre structure physique (Lawton & Jones 1995). Dans tout les cas, l'impact de l'ingénieur sur l'écosystème est d'autant plus significatif que (i) l'organisme ingénieur est une structure persistante dans le temps, (ii) la taille de l'organisme (ou de la construction) en question est importante (e.g. les arbres dans une forêt, une récif corallien, un éléphant, une termitière africaine), et (iii) les modifications physiques perdurent dans le temps (Jones *et al.* 1997).

Mineurs, galligènes et rouleurs : ingénieurs cryptiques de l'écosystème ?

Les structures telles que les galles, les mines ou encore les rouleaux de feuilles sont construites la plupart du temps sur des feuilles dont la durée de vie est inférieure à la durée d'une saison (en climat tempéré). Ces constructions ne sont pas disponibles sur une longue période de temps. De plus, ces structures sont de petite taille. Par exemple, une mine n'offre qu'un espace limité ($\sim 95 \text{ mm}^3$ pour une surface de $\sim 1 \text{ cm}^2$). Les galles montrent une grande variabilité morphologique mais sont toujours de relativement petite taille (de l'ordre de quelques centimètres ; Stone & Schönrogge 2003). Enfin, après l'émergence de l'insecte 'ingénieur', la structure se dégrade généralement assez rapidement, suite à des processus de nécrose des tissus végétaux ou bien à la fragilisation de la construction par les éléments climatiques (vent, pluie) par exemple. Pour ces raisons, le rôle des insectes mineurs, galligènes et rouleurs en tant qu'ingénieur à l'échelle de l'écosystème semble à première vue relativement limité (Danks 2002).

Néanmoins, le rôle des insectes ‘modificateurs’ en tant qu’ingénieurs de l’écosystème est tout à fait justifié à petite échelle, ce qui leur vaut le terme d’ingénieur *cryptique* de l’écosystème (‘chiefly inconspicuous’, Danks 2002). En effet, les microhabitats construits par ces insectes abritent des communautés complexes et inter-dépendantes d’intérêt écologique notable, incluant des espèces usurpatrices, inquilines, prédatrices, commensales, symbiotes, et pathogènes (Danks 2002). Plusieurs études ont démontré que les abris, résultant de l’accolement ou de l’enroulement des feuilles, ont un impact positif sur la biodiversité d’herbivores locale et l’élimination expérimentale de ces structures peut faire chuter la biodiversité de 38 % (Martinsen *et al.* 2000 ; Lill & Marquis 2003, 2004). La présence de telles structures est donc positive globalement, mais l’effet peut devenir négatif pour certaines espèces en favorisant par exemple le taux de prédation sur celles-ci (Fukui 2001 ; Nakamura & Ohgushi 2003). L’augmentation de la biodiversité et des densités d’herbivores liées à la présence d’abris semble de plus provoquer une réaction en chaîne en attirant des espèces qui ne profitent pas directement des abris, comme par exemple les prédateurs (Fournier *et al.* 2003). Le cas des abris de feuille est certainement le plus étudié à ce jour. Une seule étude reporte avec évidence l’utilisation secondaire des mines vacantes par d’autres arthropodes, essentiellement des pucerons et des collemboles (Kagata & Ohgushi 2004).

Les avantages pour les utilisateurs secondaires des mines

Après émergence de l’insecte mineur, la mine laissée vacante peut potentiellement apporter les mêmes avantages à un utilisateur secondaire qu’à l’ingénieur lui-même, en admettant que l’intégrité de la mine soit conservée. De façon générale, ces avantages sont de trois ordres : (i) protection contre les prédateurs, (ii) protection contre l’environnement physique (température, sécheresse, vent etc.), et (iii) efficacité de la nutrition accrue. Aucun élément publié ne permet de confirmer ou d’infirmer clairement ces trois hypothèses dans le cas des mines vacantes. Toutefois, des études portant sur des abris de feuilles ont montré que les utilisateurs secondaires sont moins attaqués par des prédateurs généralistes, sont protégés de la dessiccation, et enfin leur taux de développement est accéléré, suggérant un environnement thermique plus favorable (Larsson *et al.* 1997 ; Fukui 2001).

Cependant, la compréhension physiologique du microhabitat de la mine exposée dans cette thèse (**chapitres 1, 2 et 3**) permet de discuter sur la nature du microclimat disponible pour les utilisateurs secondaires des mines vacantes. L’environnement thermique de la mine résulte

d'une interaction très étroite entre les propriétés optiques du tégument de la mine, l'activité stomatique et le CO₂ émis par la larve à l'intérieur de la mine. Il est peu probable que ce système fonctionne normalement après le départ de l'adulte *P. blancardella*. En effet, la mineuse perce le tégument de la mine pour en sortir, en général le tégument inférieur contenant les stomates (Pottinger & LeRoux 1971 ; observation personnelle). Ce trou (de l'ordre du millimètre) doit modifier les flux de CO₂ et de vapeur d'eau entrant et sortant de la mine et faciliter l'équilibre thermique entre l'intérieur et l'extérieur. Une plus grande perte de vapeur d'eau entraîne un flux plus important de chaleur latente vers l'extérieur. L'utilisateur secondaire peut donc bénéficier d'une protection contre le vent ou la pluie, mais il semble que la température dans une mine vacante ne puisse pas croître autant que dans une mine intacte encore occupée par son constructeur.

D'un point de vue nutritionnel, l'avantage des utilisateurs secondaires des mines vacantes paraît moins évident. En général, lorsque la mineuse quitte sa mine, il ne reste qu'un îlot de patches verts représentant environ 20 à 50 % de la surface totale de la mine, et recouvert à l'intérieur de la mine par les excréments de la mineuse. La disponibilité en tissus nutritifs à l'intérieur de la mine est donc limitée pour des herbivores. De plus, alors que les excréments restent frais et intacts tout au long du développement de la mineuse, des champignons filamenteux colonisent ces excréments dès qu'une ouverture ou une déchirure apparaît dans le tégument de la mine (observation personnelle). Ces filaments fongiques doivent rendre difficile l'accès aux tissus végétaux et peuvent éventuellement s'attaquer à des herbivores affaiblis. Enfin, les tissus végétaux à l'intérieur de la mine se nécrosent ou sèchent assez rapidement après ouverture de la mine. Néanmoins, ce type de milieu est certainement intéressant d'un point de vue nutritionnel pour des organismes saprophytes qui profitent de la colonisation fongique de la mine.

Je suggère donc que l'utilisation secondaire des mines vacantes apporte un avantage limité dans le temps. Ce microhabitat ne permet pas aux herbivores de se nourrir, mais apporte un microclimat favorable, permettant de se protéger des éléments climatiques extrêmes. Les mines vacantes constituent un abri temporaire.

IMPACT DES CHANGEMENTS CLIMATIQUES SUR LE DÉVELOPPEMENT DES INSECTES MINEURS DE FEUILLE

Les rejets anthropiques de gaz à effet de serre modifient le climat planétaire. Dans le siècle à venir, la concentration atmosphérique en CO₂ devrait doubler, entraînant une augmentation de la température moyenne. Selon le modèle climatique utilisé, la température devrait augmenter de 1,9 à 11,5 °C dans les cas extrêmes, et la plupart des modèles prédisent un réchauffement moyen de 3,4 °C (Stainforth *et al.* 2005). De plus, l'inertie thermique des océans est telle que même si la composition de l'atmosphère se stabilisait aujourd'hui, le réchauffement planétaire continuerait et pourrait excéder 1 °C au cours des prochains siècles (Wigley 2005). Les deux types de changements climatiques – élévation de la concentration en CO₂ et de la température – peuvent altérer les interactions entre les insectes et les plantes.

Les effets de l'élévation de la concentration atmosphérique en CO₂

L'élévation de la teneur atmosphérique en CO₂ affecte le développement de l'insecte via ses effets sur la qualité nutritionnelle de la plante (Lincoln *et al.* 1993). Généralement, des plantes se développant dans une atmosphère enrichie en CO₂ présentent une teneur en sucres non structuraux accrue, ce qui potentiellement est positif pour les herbivores (Bezemer & Jones 1998). Cependant, une atmosphère enrichie en CO₂ a des conséquences dramatiques sur le ratio carbone : azote qui augmente suite à la dilution de la teneur en azote et donc en protéines dans les tissus foliaires (Lincoln *et al.* 1993 ; Whittaker 2001 ; Ehleringer *et al.* 2002). L'élévation de la concentration atmosphérique en CO₂ induit aussi une baisse dans la concentration de certains acides aminés (Docherty *et al.* 1997), et une augmentation des concentrations en composés secondaires toxiques pour les insectes phytophages (Cornelissen *et al.* 2003 ; Bidart-Bouzat *et al.* 2005). La qualité nutritionnelle des plantes dans une atmosphère enrichie en CO₂ semble donc globalement plus pauvre que celle de plantes se développant dans des conditions normales (i.e. actuelles). Cette qualité nutritionnelle amoindrie a généralement un impact négatif sur le développement et la survie des phytophages (Smith & Jones 1998 ; revue Whittaker 2001). Les phytophages peuvent toutefois développer des mécanismes compensatoires en augmentant la quantité de nutriments ingérés ou bien l'efficacité de la digestion (Salt *et al.* 1995 ; Barbehenn *et al.* 2004). Chez les

insectes mineurs de feuille, la larve peut compenser cette moins bonne qualité nutritionnelle en augmentant la quantité de tissus consommés, ce qui se traduit par une augmentation de la surface de la mine. Ceci a été démontré chez au moins quatre espèces mineuses (Salt *et al.* 1995 ; Cornelissen *et al.* 2003). Toutefois, les capacités compensatoires ne se retrouvent pas forcément chez toutes les espèces (Smith & Jones 1998), et, lorsqu'elles existent, ne permettent pas une compensation parfaite de la mauvaise qualité nutritionnelle de la plante (revue par Hunter 2001).

L'importance du rôle des stomates dans la régulation de l'environnement thermique de *P. blancardella* (**chapitre 3**) permet de prédire un effet indirect des changements climatiques sur le développement de l'insecte. Les stomates réagissent à la teneur en CO₂ dans l'espace intracellulaire (Assmann 1999). Les stomates adaptent leur degré d'ouverture de sorte à contrôler le gradient de diffusion du CO₂ entre l'air ambiant et l'espace intracellulaire (**chapitre 2**). L'augmentation de la concentration atmosphérique en CO₂ accroît ce gradient de diffusion, conduisant à une augmentation de la teneur intracellulaire si les stomates gardent la même ouverture. Toutefois, les stomates réagissent à une élévation du CO₂ atmosphérique en se refermant, i.e. la conductance stomatique diminue (Morison 1987 ; Jarvis *et al.* 1999). Par exemple, la conductance stomatique est diminuée d'un facteur 10 chez la feuille du pommier lorsque la concentration en CO₂ passe de 30 à 50 Pa (Warritt *et al.* 1980). Théoriquement, une diminution similaire de la conductance stomatique devrait se produire dans le tégument de la mine, conduisant à une augmentation supplémentaire de l'excès de température de la mine. Le taux de développement de la larve peut être accéléré par ces changements. Toutefois, les effets peuvent devenir dramatiques si la température de la mine dépasse la température optimale de développement ou bien le seuil léthal.

Les effets de l'élévation de la température

Un effet direct de l'augmentation de la température est évident, le taux de développement des ectothermes étant température - dépendant (voir partie 3 de cette discussion). Tant que les températures ne dépassent pas le seuil de température optimale pour le développement, le taux de développement est accéléré. Dans le cas du système mineur de feuille, un effet indirect peut être également supposé. L'augmentation de la température participe à la fermeture stomatique, conduisant à une rétention plus importante de chaleur latente dans la mine et donc à une augmentation sensible de l'excès de température (**chapitre 3**).

Toutefois, un réchauffement atmosphérique peut aussi avoir des répercussions sur la qualité nutritionnelle de la plante, bien que les effets dépendent fortement de la plante étudiée. Par exemple, l'augmentation de la température sur le long terme induit une diminution de la teneur en eau des tissus foliaires (Williams *et al.* 2000). Chez les plantes herbacées, la teneur en azote est augmentée (Bezemer & Jones 1998). Au contraire, chez les plantes ligneuses, l'élévation de la température a un effet négatif sur la teneur en azote et augmente la concentration en tanins (Dury *et al.* 1998). Le réchauffement global peut aussi avoir un impact négatif sur l'accumulation des sucres dans les tissus (Morison & Lawlor 1999).

Effets interactifs de l'élévation de la teneur en CO₂ et de la température

Les effets du réchauffement global et de l'enrichissement en CO₂ sur la performance des phytophages ont souvent été mesurés séparément (revue par Whittaker 2001). Pourtant, les effets du CO₂ et de la température peuvent agir de manière non additive lorsque les deux facteurs sont combinés. Trois cas ont été démontrés : (i) seul l'un des deux facteurs a un impact, (ii) l'un des deux facteurs compense les effets de l'autre, et (iii) les effets s'inversent ou sont décuplés lorsque les deux facteurs interagissent. Ces différents cas de figure sont illustrés ci-dessous.

Peu d'études publiées portent sur les interactions du CO₂ et de la température. Buse & Good (1996) ont détecté un effet positif de la température sur le taux de développement de la larve d'un lépidoptère ectophage, tandis que le CO₂ n'a aucun effet. A l'inverse, Williams *et al.* (2000) ont découvert que le CO₂ ralentit la croissance, alors que la température n'a aucun effet, chez *Lymantria dispar* (Lepidoptera : Lymantriidae). Ces deux études illustrent le cas (i) ci-dessus. Les résultats donnés par Fajer *et al.* (1991) démontrent que l'impact négatif de l'élévation de la teneur en CO₂ sur le taux de développement du lépidoptère *Junonia coenia* est supprimé par une augmentation concomitante de la température, illustrant ainsi le cas (ii). Une très belle illustration de la compensation des effets d'un des deux facteurs par l'autre facteur (cas (ii)) est donnée par Johns *et al.* (2003). Dans des conditions de température élevée (+ 3 °C), les feuilles fanent et tombent prématurément, réduisant le taux d'émergence des deux coléoptères mineurs de feuilles (Chrysomelidae). En revanche, une élévation de la température couplée à une augmentation de la teneur en CO₂ (le double de la teneur ambiante actuelle) n'induit pas la chute prématurée des feuilles et accélère le taux de développement des larves (Johns *et al.* 2003). L'impact négatif de l'élévation de la température est donc non

seulement compensé par l'augmentation de la teneur en CO₂, mais l'interaction des deux facteurs devient positive pour les phytophages.

Johns & Hughes (2002) ont démontré l'existence du cas (iii) en étudiant l'interaction des deux facteurs chez un lépidoptère mineur de feuille de la même famille que *P. blancardella* (Gracillariidae). Dans des conditions de teneur en CO₂ normales, une élévation de la température de 3 °C provoque une légère baisse de la teneur en azote des feuilles, mais favorise néanmoins largement le taux de survie et le taux de développement des larves. Dans des conditions d'enrichissement en CO₂ de l'atmosphère, le taux de développement est toujours favorisé par l'élévation de la température (la durée de développement est diminuée de 14 jours en comparaison de conditions normales de CO₂ et température) mais le taux de survie chute de façon dramatique (Johns & Hughes 2002). L'effet de la température s'inverse donc lorsque ce facteur interagit avec l'élévation de la teneur en CO₂. Les auteurs expliquent que la température pourrait augmenter le taux de développement tel que la larve n'a pas le temps de compenser la pauvre qualité nutritionnelle des tissus induite par la hausse de la concentration atmosphérique en CO₂. Ces auteurs ont réalisé leurs expériences dans des conditions de température entre 10 °C et 20 °C. A ce jour, aucune étude n'a considéré l'effet de l'augmentation de la température dans des plages de microclimat risquées, i.e. dont la température serait souvent proche du seuil léthal, comme c'est le cas chez *P. blancardella* (**chapitre 3**).

Dans le cas de *P. blancardella*, la température de la mine peut atteindre des valeurs proches du seuil léthal de température au cours d'une journée estivale typique. L'interaction CO₂ – température peut avoir pour conséquence une augmentation de la température de la mine. Le modèle biophysique (**chapitre 3**) peut être utilisé pour quantifier cette augmentation de température induite par ces deux facteurs. En considérant que l'élévation du CO₂ atmosphérique provoque une fermeture stomatique telle que la valeur maximale (g_{smax}) est divisée par deux (valeur arbitraire) pour la feuille et la mine, le modèle prédit un réchauffement d'environ 1 °C dans la mine. Une élévation de 3 °C de la température de l'air induit une augmentation d'environ 3 °C de la température de la mine. L'interaction des deux facteurs conduit à une augmentation d'environ 4 °C de l'excès de température de la mine. Un tel réchauffement serait léthal dans les conditions extrêmes pour la mineuse si ses sensibilités thermiques restent inchangées. Ceci pourrait amener la mineuse à développer des préférences pour les sites de ponte, par exemple en sélectionnant les régions ombragées des canopées. Des observations réalisées sur le terrain au cours de l'été caniculaire en 2003 vont dans ce sens. En effet, durant juillet - août 2003, un pommier présentant un faible gradient thermique (i.e. la

totalité du feuillage était exposé à un moment ou l'autre de la journée) a été infecté artificiellement dans la région de Montpellier. Aucune larve n'a pu compléter son développement. Dans le même temps, les pommiers des vergers de Marsillargues, également près de Montpellier, qui eux présentaient un gradient thermique important, étaient attaqués par la mineuse. Seules les larves situées dans les feuilles d'ombre complétèrent leur développement. Ceci implique que des prédictions concernant l'effet des changements climatiques sur les insectes doivent être tirées avec précaution, l'hétérogénéité thermique de l'habitat permettant à ces organismes de compenser les changements intervenus.

Les effets des changements climatiques sont complexes, principalement à cause de la multitude des interactions entre chaque facteur (CO_2 et température), des différents éléments du système pouvant influencer la performance de l'insecte (nutrition, microclimat), et du sens possible des différents effets (négatif, positif). La figure 12 résume la complexité de ces interactions dans le cas des insectes mineurs de feuille. Au final, l'impact net des changements climatique résulte d'une balance de l'ensemble des effets. Le patron général qui émerge est une balance entre un impact négatif des changements climatiques sur la qualité nutritionnelle de la feuille et l'impact positif sur le microclimat de l'insecte. Ce diagramme d'interactions se place une l'échelle du microhabitat. Prédire les effets des changements climatiques globaux devient une tâche encore plus complexe si on intègre la notion de cascade d'échelles. A l'échelle locale ou régionale, les organismes peuvent subir différemment les changements climatiques selon le type de microhabitat choisi. Cette difficulté liée à la cascade d'échelles a été illustrée chez des organismes marins vivant sur le littoral rocheux tels que les moules (e.g. Helmuth *et al.* 2002). Dans le cas des relations entre les insectes et les plantes, les changements climatiques ont un impact à la fois sur le phytophage et la plante, mais le résultat final n'égale probablement pas la somme des deux effets individuels. Une difficulté expérimentale intervient aussi : en général, les plantes ont la capacité de s'acclimater à leur climat changeant. Les réponses de la plante, après avoir vécu un nouveau climat pendant plusieurs années peuvent être très différentes de celles mesurées instantanément en milieu contrôlé. Évaluer l'impact des changements globaux sur les interactions insecte – plante reste donc encore un grand challenge !

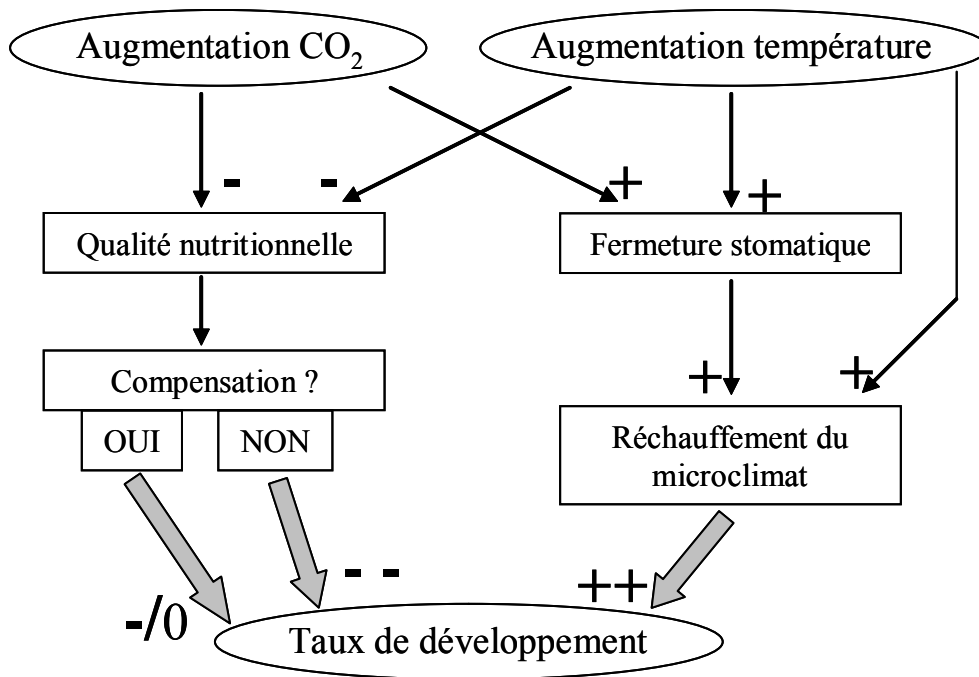


Figure 12. Les effets possibles des changements climatiques – élévation de la teneur atmosphérique en CO₂ et de la température de l’air – sur le taux de développement des insectes mineurs de feuilles. Les signes indiquent le type d’effet (-, 0, + pour un effet négatif, nul ou positif respectivement). Alors que les changements climatiques ont un impact positif sur le taux de développement en induisant un réchauffement du microclimat, l’impact est négatif via l’appauvrissement de la qualité nutritionnelle des tissus foliaires. L’amplitude de cet impact négatif dépend de la capacité du phytophage à compenser cette faible qualité nutritionnelle par une plus forte consommation.

CONCLUSIONS

En dépit de sa petite taille, la mine est un véritable carrefour biologique. Premièrement, la mine est un lieu d'échange d'énergie important entre les deux niveaux trophiques – la plante et son phytophage – à la fois sous forme de chaleur mais aussi de flux de matière comme le CO₂. La mine est aussi une interface primordiale pour les parasitoïdes, une arène décisive à la fois pour la proie et le parasitoïde. Finalement, les mineuses sont des ingénieurs de l'écosystème, une cohorte d'espèces s'appropriant cette structure une fois laissée vacante. L'impact de la structure mine n'est pas seulement écologique mais aussi évolutif, en causant des modifications importantes des sensibilités thermiques chez la mineuse et ses parasitoïdes.

La larve de l'insecte mineur *P. blancardella* modifie profondément la structure physique de son microenvironnement. Cette constatation permet une comparaison intéressante entre les insectes mineurs et les insectes galligènes. En effet, les insectes galligènes exercent un contrôle chimique marqué sur les tissus végétaux de façon à induire la formation de la galle, véritable forteresse protectrice de haute qualité nutritionnelle (Stone & Schönrogge 2003). Jusqu'à présent, les insectes mineurs étaient perçus comme moins évolués dans le contrôle de l'hôte que les galligènes, bien qu'une interaction chimique complexe entre la mineuse et sa plante hôte soit soupçonnée depuis l'étude d'Engelbrecht (1969). Cette thèse donne un tout autre éclairage. Les insectes mineurs ont préféré la voie physique à la voie chimique. Dans cette nouvelle optique, l'interaction hôte – parasite semble en fait tout aussi complexe dans le système mineur de feuille que dans le système galle.

Nous évoquons ici le terme de *contrôle* physique du fonctionnement de l'hôte par la larve mineuse car elle tire avantage de l'interaction. Mais jusqu'à quel point peut-on parler de contrôle ? En d'autres termes, la larve est-elle capable de réguler son comportement de construction lorsque les conditions environnementales (e.g. climat, physiologie de la plante) sont modifiées de façon dramatique ? Une telle régulation comportementale pourrait permettre la survie de l'organisme dans son nouvel environnement. Les données présentées dans cette thèse ne permettent pas de démontrer clairement que la mineuse est capable de modifier son comportement de construction pour s'adapter à un nouvel environnement. Toutefois, au cours des mesures effectuées à la fois en laboratoire et sur le terrain, j'ai pu observer à plusieurs reprises un changement dans la structure de la mine lorsque celle-ci se trouvait dans des conditions extrêmes de température au début du développement de la larve. Les fenêtres de nourrissage ne paraissaient pas blanches mais verdâtres. Ceci indiquerait que

la larve peut prendre soin de ne pas manger toute l'épaisseur des patches verts, ce qui en retour diminuerait l'absorbance du tégument de la mine, contribuant ainsi à diminuer l'excès de température dans la mine. L'avantage d'un tel comportement est certain lorsque les conditions sont proches du seuil léthal de température. De plus, le processus serait modulable dans une certaine mesure puisque ce qui n'a pas été mangé reste disponible pour plus tard, lorsque les conditions thermiques redeviennent plus favorables. Des expériences supplémentaires, en conditions contrôlées, sont nécessaires pour confirmer une potentielle capacité d'adaptation dans ce contexte.

Le modèle de budget thermique se révèle être un outil puissant pour analyser en détail les relations thermiques et physiologiques entre les insectes herbivores et leur plante hôte. Les budgets thermiques font preuve d'une réalité physiologique exemplaire avec un niveau de complexité relativement important, certes, mais uniquement lié au grand nombre de paramètres (Gates 1980). L'adaptation du modèle à un nouveau système biologique demande un travail de paramétrage important. Ce modèle reste toutefois accessible conceptuellement puisque les paramètres correspondent à des processus physiques et physiologiques bien connus et mesurables *in situ*. De plus, notre modèle de budget thermique s'avère d'une grande utilité pour étudier l'impact des changements climatiques sur les interactions insecte - plante. Récemment, l'application de cette approche mécanistique pour déterminer les effets des changements climatiques sur des organismes vivant sur le littoral océanique a montré que les modèles mécanistiques étaient fiables et que cette approche est novatrice, révélant des effets contre intuitifs (Helmuth *et al.* 2002, 2005). Dans le cas des relations entre les insectes et les plantes, la principale difficulté provient du fait que le système est multifactoriel, avec de nombreuses boucles de rétroactions entre le climat changeant, la plante et l'insecte. Les études récentes portant sur l'impact des changements climatiques sur les interactions insecte - plante démontrent que nous sommes encore au stade du 'cas par cas' et qu'aucun patron général n'émerge pour l'instant. Une approche intégrative est nécessaire, utilisant des méthodes et des concepts physiques, physiologiques, écologiques et génétiques, appliqués à la fois sur l'animal et sur le végétal. L'évaluation de l'impact des changements climatiques sur les relations entre insectes et plantes nécessite donc au final une intégration de différentes disciplines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Addo-Bediako A., Chown S.L. & Gaston K.J. (2000) Thermal tolerance, climatic variability and latitude. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **267**, 739-745.
- Aldea M., Hamilton J.G., Resti J.P., Zangerl A.R., Berenbaum M.R. & DeLucia E.H. (2005) Indirect effects of insect herbivory on leaf gas exchange in soybean. *Plant, Cell and Environment*, **28**, 402-411.
- Angilletta M.J., Niewiarowski P.H. & Navas C.A. (2002) The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*, **27**, 249-268.
- Assmann S.M. (1999) The cellular basis of guard cell sensing of rising CO₂. *Plant, Cell and Environment*, **22**, 629-637.
- Ball B.C. (1981) Modelling soil pores as tubes using gas permeabilities, gas diffusivities and water release. *Journal of Soil Science*, **32**, 465-481.
- Barbehenn R.V., Karowe D.N. & Chen Z. (2004) Performance of a generalist grasshopper on a C3 and a C4 grass: compensation for the effects of elevated CO₂ on plant nutritional quality. *Oecologia*, **140**, 96-103.
- Bartholomew G.A. & Heinrich B. (1978) Endothermy in African dung beetles during flight, ball making, and ball rolling. *Journal of Experimental Biology*, **73**, 65-83.
- Baumgärtner J., Delucchi V. & Genini M. (1981) Taxonomic characters and physiological responses to temperature and photoperiod of two *Lithocolletis* species mining apple leaves. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse*, **54**, 245-255.
- Baumgärtner J. & Severini M. (1987) Microclimate and arthropod phenologies: the leaf miner *Phyllonorycter blancardella* F. (Lep) as an example. Paper presented at the International Conference on Agrometeorology, Cesena.
- Bazzocchi G.G., Lanzoni A., Burgio G. & Fiacconi M.R. (2003) Effects of temperature and host on the pre-imaginal development of the parasitoid *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae). *Biological Control*, **26**, 74-82.
- Beninger C.W. & Abou-Zaid M.M. (1997) Flavonol glycosides from four spine species that inhibit early instar gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) development. *Biochemical Systematics and Ecology*, **25**, 505-512.
- Benrey B. & Denno R.F. (1997) The slow-growth-high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. *Ecology*, **78**, 987-999.
- Berenbaum M.R. (1978) Toxicity of a furanocoumarin to armyworms: a case of biosynthetic escape from insect herbivores. *Science*, **201**, 532-534.
- Bezemer T.M. & Jones T.H. (1998) Plant-insect herbivore interactions in elevated atmospheric CO₂: quantitative analyses and guild effects. *Oikos*, **82**, 212-222.

- Bidart-Bouzat M.G., Mithen R. & Berenbaum M.R. (2005) Elevated CO₂ influences herbivory-induced defense responses of *Arabidopsis thaliana*. *Oecologia*, **145**, 415-424.
- Breece H.T. & Holmes R.A. (1971) Bidirectional scattering characteristics of healthy green soybean and corn leaves *in vivo*. *Applied Optics*, **10**, 119-127.
- Bursell E. (1964) Environmental aspects: temperature. In: *The physiology of insecta I*. (ed M. Rockstein). Academic Press, New York.
- Buse A. & Good J.E.G. (1996) Synchronisation of larval emergence in winter moth (*Operophtera brumata* L.) and budburst in pedunculate oak (*Quercus robur* L.) under simulated climate change. *Ecological Entomology*, **21**, 335-343.
- Campbell G.S. & Norman J.M. (1998) *An Introduction to Environmental Biophysics*. (2nd ed.). Springer Verlag, New York, Inc.
- Casas J. & Baumgärtner J. (1990) Liste des parasitoïdes de *Phyllonorycter blancardella* (F.) (Lepidoptera: Gracillariidae) en Suisse. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse*, **63**, 299-302.
- Casas J., Pincebourde S., Mandon N., Vannier F., Poujol R. & Giron D. (2005) Lifetime nutrient dynamics reveal simultaneous capital and income breeding in a parasitoid. *Ecology*, **86**, 545-554.
- Casey T.M. (1992) Biophysical ecology and heat exchange in insects. *The American Zoologist*, **32**, 225-237.
- Chapman R.F. (1998) *The insect: structure and function 4th edition*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Chown S.L. & Nicolson S. (2004) *Insect physiological ecology: mechanisms and patterns*. Oxford University Press, Oxford.
- Chown S.L. (2001) Physiological variation in insects: hierarchical levels and implications. *Journal of Insect Physiology*, **47**, 649-660.
- Combes D., Sinoquet H. & Varlet-Grancher C. (2000) Preliminary measurement and simulation of the spatial distribution of the morphogenetically active radiation (MAR) within an isolated tree canopy. *Annals of Forest Science*, **57**, 497-511.
- Connor E.E. & Taverner M.P. (1997) The evolution and adaptive significance of the leaf-mining habit. *Oikos*, **79**, 6-25.
- Cornelissen T., Stiling P. & Drake B. (2003) Elevated CO₂ decreases leaf fluctuating asymmetry and herbivory by leaf miners on two oak species. *Global Change Biology*, **10**, 27-36.

- Daane K.M., Malakar-Kuenen R.D. & Walton V.M. (2004) Temperature-dependent development of *Anagyrus pseudococci* (Hymenoptera: Encyrtidae) as a parasitoid of the vine mealbug, *Planococcus ficus* (Homoptera: Pseudococcidae). *Biological Control*, **31**, 123-132.
- Dahlhoff E.P. & Rank N.E. (2000) Functional and physiological consequences of genetic variation at phosphoglucose isomerase: Heat shock protein expression is related to enzyme genotype in a montane beetle. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 10056-10061.
- Dang Q.L., Margolis H.A., Coyea M.R., Sy M. & Collatz G.J. (1997) Regulation of branch-level gas exchange of boreal trees: roles of shoot water potential and vapor pressure difference. *Tree Physiology*, **17**, 521-535.
- Danks H.V. (2002) Modification of adverse conditions by insects. *Oikos*, **99**, 10-24.
- Dawkins R. (1982) *The extended phenotype: The long reach of the gene*. Oxford University Press, Oxford.
- De Vis R.M.J., Fuentes L.E. & van Lenteren J.C. (2002) Life history of *Amitus fuscipennis* (Hym., Platygasteridae) as parasitoid of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hom., Aleyrodidae) on tomato as function of temperature. *Journal of Applied Entomology*, **126**, 24-33.
- Dittrick L.E. & Chiang H.C. (1982) Developmental characteristics of *Macrocentrus grandii* as influenced by temperature and instar of its host, the European corn borer. *Journal of Insect Physiology*, **28**, 47-52.
- Djemai I., Meyhöfer R. & Casas J. (2000) Geometrical games between a host and a parasitoid. *The American Naturalist*, **156**, 257-265.
- Docherty M., Wade F.A., Hurst D.K., Whittaker J.B. & Lea P.J. (1997) Responses of tree sap-feeding herbivores to elevated CO₂. *Global Change Biology*, **3**, 51-59.
- Dury S.J., Good J.E.G., Perrins C.M., Buse A. & Kaye T. (1998) The effects of increasing CO₂ and temperature on oak leaf palatability and the implications for herbivorous insects. *Global Change Biology*, **4**, 55-61.
- Edgecomb R.S., Harth C.E. & Schneiderman A.M. (1994) Regulation of feeding behavior in adult *Drosophila melanogaster* varies with feeding regime and nutritional state. *Journal of Experimental Biology*, **197**, 215-235.
- Edwards M. & Richardson A.J. (2004) Impact of climate change on marine pelagic phenology and trophic mismatch. *Nature*, **430**, 881-884.

- Ehleringer J.R., Cerling T.E. & Dearing M.D. (2002) Atmospheric CO₂ as a global change driver influencing plant-animal interactions. *Integrative and Comparative Biology*, **42**, 424-430.
- Engelbrecht L. & Orban U. (1969) Leaf-miner caterpillars and cytokinins in the 'green islands' of autumn leaves. *Nature*, **223**, 319-321.
- Evans J.R. & von Caemmerer S. (1996) Carbon dioxide diffusion inside leaves. *Plant Physiology*, **110**, 339-346.
- Fajer E.D., Bowers M.D. & Bazzaz F.A. (1991) The effects of enriched CO₂ atmospheres on the buckeye butterfly, *Junonia coenia*. *Ecology*, **72**, 751-754.
- Ferreira de Almeida M.A., Pires do Prado A. & Geden C.J. (2002) Influence of temperature on development time and longevity of *Tachinaephagus zealandicus* (Hymenoptera: Encyrtidae), and effects of nutrition and emergence order on longevity. *Environmental Entomology*, **31**, 375-380.
- Ferro D.N. & Southwick E.E. (1984) Microclimates of small arthropods: estimating humidity within the leaf boundary layer. *Environmental Entomology*, **13**, 926-929.
- Field C.B. (1987) Leaf-age effects on stomatal conductance. In: *Stomatal Function* (eds E. Zeiger, G.D. Farquhar, & I.R. Cowan). Stanford University Press, Stanford.
- Fitzgerald T.D. & Clark K.L. (1994) Analysis of leaf-rolling behaviour of *Caloptilia serotinella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Journal of Insect Behaviour*, **7**, 859-872.
- Fitzgerald T.D., Clark K.L., Vanderpool R. & Phillips C. (1991) Leaf shelter-building caterpillars harness forces generated by axial retraction of stretched and wetted silk. *Journal of Insect Behaviour*, **4**, 21-32.
- Fournier V., Rosenheim J.A., Brodeur J., Laney L.O. & Johnson M.W. (2003) Herbivorous mites as ecological engineers: indirect effects on arthropods inhabiting papaya foliage. *Oecologia*, **135**, 442-450.
- Fukui A. (2001) Indirect interactions mediated by leaf shelters in animal-plant communities. *Population Ecology*, **43**, 31-40.
- Gates D.M. (1980) *Biophysical ecology*. Springer-Verlag, New York.
- Gilbert N. & Raworth D.A. (1996) Insects and temperature - a general theory. *The Canadian Entomologist*, **128**, 1-13.
- Gilchrist G.W. (1995) Specialists and generalists in changing environments. I. Fitness landscapes of thermal sensitivity. *The American Naturalist*, **146**, 252-270.
- Gillooly J.F., Brown J.H., West G.B., Savage V.M. & Charnov E.L. (2001) Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science*, **293**, 2248-2251.

- Godfray H.C.J. (1994) *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology*. Princeton University Press, Princeton.
- Goldsbrough C.L., Hochuli D.F. & Shine R. (2004) Fitness benefits of retreat-site selection: spiders, rocks, and thermal cues. *Ecology*, **85**, 1635-1641.
- Grant B.W. & Porter W.P. (1992) Modelling global macroclimatic constraints on ectotherm energy budgets. *The American Zoologist*, **32**, 154-178.
- Grantz D.A. (1990) Plant response to humidity. *Plant, Cell and Environment*, **13**, 667-679.
- Hansell M. (2005) *Animal architecture*. Oxford University Press, New York.
- Harrington R., Woiwod I. & Sparks T. (1999) Climate change and trophic interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, **14**, 146-150.
- Hassel M.P., Godfray H.C.J. & Comins H.N. (1993) Effects of global change on the dynamics of insect host-parasitoid interactions. In: *Biotic interactions and global change* (eds P.M. Kareiva, J.G. Kingsolver, & R.B. Huey), pp. 402-423. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland.
- Haupt-Herting S., Klug K. & Fock H.P. (2001) A new approach to measure gross CO₂ fluxes in leaves: Gross CO₂ assimilation, photorespiration, and mitochondrial respiration in the light in tomato under drought stress. *Plant Physiology*, **126**, 388-396.
- Hawkins B.A., Cornell H.V. & Hochberg M.E. (1997) Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology*, **78**, 2145-2152.
- Heinrich B. (1999) *The thermal warriors - Strategies of insect survival*. Harvard University Press, Cambridge.
- Helmuth B. (2002) How do we measure the environment? Linking intertidal thermal physiology and ecology through biophysics. *Integrative and Comparative Biology*, **42**, 837-845.
- Helmuth B., Kingsolver J.G. & Carrington E. (2005) Biophysics, physiological ecology, and climate change: Does mechanism matter? *Annual Review of Physiology*, **67**, 177-201.
- Helmuth B.S.T. (1998) Intertidal mussel microclimates: predicting the body temperature of a sessile invertebrate. *Ecological Monographs*, **68**, 51-74.
- Herbert H.J. & McRae K.B. (1983) Effect of temperature on the emergence of overwintering *Phyllonorycter blancardella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and its parasite *Apanteles ornigis* (Hymenoptera: Braconidae) in Nova Scotia. *The Canadian Entomologist*, **115**, 1203-1208.
- Herrera C.M. (1995) Floral biology, microclimate, and pollination by ectothermic bees in an early-blooming herb. *Ecology*, **76**, 218-228.

- Hoddle M.S., Van Driesche R.G. & Sanderson J.P. (1998) Biology and use of the whitefly parasitoid *Encarsia formosa*. *Annual Review of Entomology*, **43**, 645-669.
- Hoffmann K.H. (1984) Metabolic and enzyme adaptation to temperature. In: *Environmental Physiology and Biochemistry of Insects* (ed K.H. Hoffmann). Springer Verlag, Berlin.
- Huey R.B. (1991) Physiological consequences of habitat selection. *The American Naturalist*, **137**, S91-S115.
- Huey R.B. & Kingsolver J.G. (1989) Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. *Trends in Ecology and Evolution*, **4**, 131-135.
- Huey R.B. & Kingsolver J.G. (1993) Evolution of resistance to high temperature in ectotherms. *The American Naturalist*, **142**, S21-S46.
- Hunter M.D. (2001) Effects of elevated atmospheric carbon dioxide on insect-plant interactions. *Agricultural and Forest Entomology*, **3**, 153-159.
- Huxman T.E. & Monson R.K. (2003) Stomatal responses of C₃, C₃-C₄ and C₄ *Flaveria* species to light and intercellular CO₂ concentration: implications for the evolution of stomatal behaviour. *Plant, Cell and Environment*, **26**, 313-322.
- Ives A.R. & Gilchrist G. (1993) Climate change and ecological interactions. In: *Biotic interactions and global change* (eds P.M. Kareiva, J.G. Kingsolver, & R.B. Huey), pp. 121-146. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland.
- Jarvis A.J. & Davies W.J. (1998) The coupled response of stomatal conductance to photosynthesis and transpiration. *Journal of Experimental Botany*, **49**, 399-406.
- Jarvis A.J., Mansfield T.A. & Davies W.J. (1999) Stomatal behaviour, photosynthesis and transpiration under rising CO₂. *Plant, Cell and Environment*, **22**, 639-648.
- Jarvis P.G. (1976) The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*, **273**, 593-610.
- Johns C.V., Beaumont L.J. & Hughes L. (2003) Effects of elevated CO₂ and temperature on development and consumption rates of *Octotoma championi* and *O. scabripennis* feeding on *Lantana camara*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **108**, 169-178.
- Johns C.V. & Hughes L. (2002) Interactive effects of elevated CO₂ and temperature on the leaf-miner *Dialectica scalariella* Zeller (Lepidoptera: Gracillariidae) in Paterson's Curse, *Echium plantagineum* (Boraginaceae). *Global Change Biology*, **8**, 142-152.
- Johnson J.B. & Omland K.S. (2004) Model selection in ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**, 101-108.

- Jones C.G., Lawton J.H. & Shachak M. (1994) Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, **69**, 373-386.
- Jones C.G., Lawton J.H. & Shachak M. (1997) Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology*, **78**, 1946-1957.
- Jones H.G. (1992) Stomata. In: *Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology* (ed H.G. Jones), pp. 131-162. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jones H.G. (1998) Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *Journal of Experimental Botany*, **49**, 387-398.
- Jones H.G. (1999) Use of thermography for quantitative studies of spatial and temporal variation of stomatal conductance over leaf surfaces. *Plant, Cell and Environment*, **22**, 1043-1055.
- Kagata H. & Ohgushi T. (2004) Leaf miner as physical ecosystem engineer: secondary use of vacant leaf mines by other arthropods. *Annals of the Entomological Society of America*, **97**, 923-927.
- Kim D.S., Lee J.H. & Yiem M.S. (2001) Temperature-dependent development of *Carposina sasakii* (Lepidoptera: Carposinidae) and its stage emergence models. *Environmental Entomology*, **30**, 298-305.
- Kingsolver J.G. (1979) Thermal and hydric aspects of environmental heterogeneity in the pitcher plant mosquito. *Ecological Monographs*, **49**, 357-376.
- Kingsolver J.G. (2000) Feeding, Growth, and thermal environment of cabbage white caterpillars, *Pieris rapae* L. *Physiological and Biochemical Zoology*, **73**, 621-628.
- Kingsolver J.G. & Moffat R.J. (1982) Thermoregulation and the determinants of heat transfer in *Colias* butterflies. *Oecologia*, **53**, 27-33.
- Klok C.J. & Chown S.L. (1998) Interactions between desiccation resistance, host-plant contact and the thermal biology of a leaf-dwelling sub-antarctic caterpillar, *Embryonopsis halticella* (Lepidoptera, Yponomeutidae). *Journal of Insect Physiology*, **44**, 615-628.
- Klok C.J. & Chown S.L. (2003) Resistance to temperature extremes in sub-Antarctic weevils: interspecific variation, population differentiation and acclimation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **78**, 401-414.
- Klok C.J., Chown S.L. & Gaston K.J. (2003) The geographical range structure of the holly leaf-miner III. Cold hardiness physiology. *Functional Ecology*, **17**, 858-868.
- Korb J. (2003) Thermoregulation and ventilation of termite mounds. *Naturewissenschaften*, **90**, 212-219.

- Korb J. & Linsenmair K.E. (1999) The architecture of termite mounds: a result of a trade-off between thermoregulation and gas exchange? *Behavioral Ecology*, **10**, 312-316.
- Korb J. & Linsenmair K.E. (2000) Ventilation of termite mounds: new results require a new model. *Behavioral Ecology*, **11**, 486-494.
- Kukal O. & Dawson T.E. (1989) Temperature and food quality influences feeding behavior, assimilation efficiency and growth rate of arctic woolly-bear caterpillars. *Oecologia*, **79**, 526-532.
- Labandeira C.C., Dilcher D.L., Davis D.R. & Wagner D.L. (1994) Ninety-seven million years of angiosperm-insect association: paleobiological insights into the meaning of coevolution. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **91**, 12278-12282.
- Lactin D.J., Holliday N.J., Johnson D.L. & Craigen R. (1995) Improved rate model of temperature-dependent development in Arthropods. *Environmental Entomology*, **24**, 68-75.
- Lactin D.J. & Johnson D.L. (1998) Environmental, physical, and behavioural determinants of body temperature in grasshopper nymphs (Orthoptera: Acrididae). *The Canadian Entomologist*, **130**, 551-577.
- Larsson S., Häggström H.E. & Denno R.F. (1997) Preference for protected feeding sites by larvae of the willow-feeding leaf beetle *Galerucella lineola*. *Ecological Entomology*, **22**, 445-452.
- Lauzière I., Setamou M., Legaspi J. & Jones W. (2002) Effect of temperature on the life cycle of *Lydella jalisco* (Diptera: Tachinidae), a parasitoid of *Eoreuma loftini* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology*, **31**, 432-437.
- Lawton J.H. & Jones C.G. (1995) Linking species and ecosystems: organisms as ecosystem engineers. In: *Linking species and ecosystems* (eds C.G. Jones & J.H. Lawton). Chapman and Hall, New York.
- Layne J.R. (1991) Microclimate variability and the eurythermic nature of goldenrod gall fly (*Eurosta solidaginis*) larvae (Diptera: Tephritidae). *Canadian Journal of Zoology*, **69**, 614-617.
- Layne J.R.J. (1993) Winter microclimate of goldenrod spherical galls and its effects on the gall inhabitant *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Thermal Biology*, **18**, 125-130.
- Le Roux X., Grand S., Dreyer E. & Daudet F.-A. (1999) Parameterization and testing of a biochemically based photosynthesis model for walnut (*Juglans regia*) trees and seedlings. *Tree Physiology*, **19**, 481-492.

- Levesque K.R., Fortin M. & Mauffette Y. (2002) Temperature and food quality effects on growth, consumption and post-ingestive utilization efficiencies of the forest tent caterpillar *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Bulletin of Entomological Research*, **92**, 127-136.
- Lighton J.R.B. (1996) Discontinuous gas exchange in insects. *Annual Review of Entomology*, **41**, 309-324.
- Lill J.T. & Marquis R.J. (2003) Ecosystem engineering by caterpillars increases insect herbivore diversity on white oak. *Ecology*, **84**, 682-690.
- Lill J.T. & Marquis R.J. (2004) Leaf ties as colonization sites for forest arthropods: an experimental study. *Ecological Entomology*, **29**, 300-308.
- Lincoln D.E., Fajer E.D. & Johnson R.H. (1993) Plant-insect herbivore interactions in elevated CO₂ environments. *Trends in Ecology and Evolution*, **8**, 64-68.
- Liu S.S., Chen F.Z. & Zalucki M.P. (2002) Development and survival of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) at constant and alternating temperatures. *Environmental Entomology*, **31**, 221-231.
- Liu Y.H. & Tsai J.H. (2002) Effects of temperature on development, survivorship, and fecundity of *Lysiphlebia mirzai* (Hymenoptera: Aphidiidae), a parasitoid of *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, **31**, 418-424.
- Logan J.A., Wollkind D.J., Hoyt S.C. & Tanigoshi L.K. (1976) An analytic model for description of temperature dependent rate phenomena in arthropods. *Environmental Entomology*, **5**, 1133-1140.
- Loon J.J.A.v., Casas J. & Pincebourde S. (2005) Nutritional ecology of insect plant-interactions: persistent handicaps and the need for innovative approaches. *Oikos*, **108**, 194-201.
- Lopez C., Sans A., Asin L. & Eizaguirre M. (2001) Phenological model for *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, **30**, 23-30.
- Lopez-Vaamonde C., Godfray H.C.J. & Cook J.M. (2003) Evolutionary dynamics of host-plant use in a genus of leaf-mining moths. *Evolution*, **57**, 1804-1821.
- Lysyk T.J. (2001) Relationships between temperature and life history parameters of *Muscidifurax raptorellus* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Environmental Entomology*, **30**, 982-992.
- Maccioni A., Agati G. & Mazzinghi P. (2001) New vegetation indices for remote measurements of chlorophylls based on leaf directional reflectance spectra. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **61**, 52-61.

- Manetas Y. (2004) Photosynthesizing in the rain: beneficial effects of twig wetting on cortical photosynthesis through changes in the periderm optical properties. *Flora*, **199**, 334-341.
- Martinsen G.D., Floate K.D., Waltz A.M., Wimp G.M. & Whitham T.G. (2000) Positive interactions between leaf rollers and other arthropods enhance biodiversity on hybrid cottonwoods. *Oecologia*, **123**, 82-89.
- Matadha D., Hamilton G.C. & Lashomb J.H. (2004) Effect of temperature on development, fecundity, and life table parameters of *Encarcia citrina* Craw (Hymenoptera: Aphelinidae), a parasitoid of euonymus scale, *Unaspis euonymi* (Comstock), and *Quadraspidotus perniciosus* (Comstock) (Homoptera: Diaspididae). *Environmental Entomology*, **33**, 1185-1191.
- May M.L. (1979) Insect thermoregulation. *Annual Review of Entomology*, **24**, 313-349.
- McCornack B.P., Ragsdale D.W. & Venette R.C. (2004) Demography of soybean aphid (Homoptera: Aphididae) at summer temperatures. *Journal of Economical Entomology*, **97**, 854-861.
- McDonald K.L. & Cahill D.M. (1999) Evidence for a transmissible factor that causes rapid stomatal closure in soybean at sites adjacent to and remote from hypersensitive cell death induced by *Phytophthora sojae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**, 197-203.
- McEvoy P.B. (1984) Increase in respiratory rate during feeding in larvae of the cinnabar moth *Tyria jacobaeae*. *Physiological Entomology*, **9**, 191-195.
- McGregor R. (1996) Phenotypic selection by parasitoids on the timing of life history in a leafmining moth. *Evolution*, **50**, 1579-1584.
- Medeiros R.S., Ramalho F.S., Zanuncio J.C. & Serrao J.E. (2003) Estimate of *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) development with nonlinear models. *Brazilian Journal of Biology*, **63**, 589-598.
- Mehrnejad M.R. (2003) The influence of host species on some biological and behavioural aspects of *Dibrachys boarmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae), parasitoid of *Kermania pistaciella* (Lepidoptera: Tineidae). *Biocontrol Science and Technology*, **13**, 219-229.
- Milonas P.G. & Savopoulou-Soultani M. (2000) Development, survivorship, and reproduction of *Adoxophyes orana* (Lepidoptera: Tortricidae) at constant temperatures. *Annals of the Entomological Society of America*, **93**, 96-102.

- Milonas P.G. & Savopoulou-Soultani M. (2000) Temperature dependent development of the parasitoid *Colpoclypeus florus* (Hymenoptera: Eulophidae) in the laboratory. *Journal of Economical Entomology*, **93**, 1627-1632.
- Monteith J.L. (1995) A reinterpretation of stomatal responses to humidity. *Plant, Cell and Environment*, **18**, 357-364.
- Morison J.I.L. (1987) Intercellular CO₂ concentration and stomatal response to CO₂. In: *Stomatal Function* (eds E. Ziegler, G.D. Farquhar, & I.R. Cowan). Stanford University Press, Stanford.
- Morison J.I.L. & Lawlor D.W. (1999) Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant, Cell and Environment*, **22**, 659-682.
- Mott K.A. & Buckley T.N. (2000) Patchy stomatal conductance: emergent collective behaviour of stomata. *Trends in Plant Science*, **5**, 258-262.
- Nakamura M. & Ohgushi T. (2003) Positive and negative effects of leaf shelters on herbivorous insects: linking multiple herbivore species on a willow. *Oecologia*, **136**, 445-449.
- Neven L.G. (2000) Physiological responses of insects to heat. *Postharvest Biology and Technology*, **21**, 103-111.
- Nobel P.S. (1988) *Environmental biology of agaves and cacti*. Cambridge University Press, New York.
- Nobel P.S. (1999) *Physicochemical & Environmental Plant Physiology*. (Second ed.). Academic Press, New York.
- O'Connor M.P. (1999) Physiological and ecological implications of a simple model of heating and cooling in reptiles. *Journal of Thermal Biology*, **24**, 113-136.
- O'Connor M.P. & Spotila J.R. (1992) Consider a spherical lizard: animals, models, and approximations. *The American Zoologist*, **32**, 179-193.
- Omer A.D., Johnson M.W. & Tabashnik B.E. (1996) Demography of the leafminer parasitoid *Ganaspidium utilis* Beardsley (Hymenoptera: Eucoilidae) at different temperatures. *Biological Control*, **6**, 29-34.
- Orueta D. (2002) Thermal relationships between *Calendula arvensis* inflorescences and *Usia aurata* bombyliid flies. *Ecology*, **83**, 3073-3085.
- Patiño S., Herre E.A. & Tyree M.T. (1994) Physiological determinants of *Ficus* fruit temperature and implications for survival of pollinator wasp species: comparative physiology through an energy budget approach. *Oecologia*, **100**, 13-20.

- Piel C., Frak E., Le Roux X. & Genty B. (2002) Effect of local irradiance on CO₂ transfer conductance of mesophyll in walnut. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 2423-2430.
- Pinelli P. & Loreto F. (2003) ¹²CO₂ emission from different metabolic pathways measured in illuminated and darkened C3 and C4 leaves at low, atmospheric and elevated CO₂ concentration. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 1761-1769.
- Pottinger R.P. & LeRoux E.J. (1971) The biology and the dynamics of *Lithocolletis blancardella* (Lepidoptera: Gracillariidae) on apple in Quebec. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 77, Ottawa.
- Prange H.D. (1996) Evaporative cooling in insects. *Journal of Insect Physiology*, **42**, 493-499.
- Pringle R.M., Webb J.K. & Shine R. (2003) Canopy structure, microclimate, and habitat selection by a nocturnal snake, *Hoplocephalus bungaroides*. *Ecology*, **84**, 2668-2679.
- Proctor J.T.A., Bodnar J.M., Blackburn W.J. & Watson R.L. (1982) Analysis of the effects of the spotted tentiform leafminer (*Phyllonorycter blancardella*) on the photosynthetic characteristics of apple leaves. *Canadian Journal of Botany*, **60**, 2734-2740.
- Raimondo F., Ghirardelli L.A., Nardini A. & Salleo S. (2003) Impact of the leaf miner *Cameraria ohridella* on photosynthesis, water relations and hydraulics of *Aesculus hippocastanum*. *Trees: Structure and Function*, **17**, 376-382.
- Regniere J. & Turgeon J.J. (1989) Temperature-dependent development of *Zeiraphera canadensis* and simulation of its phenology. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **50**, 185-193.
- Rombough P. (2003) Modelling developmental time and temperature. *Nature*, **424**, 268-269.
- Roth-Nebelsick A. (2001) Computer-based analysis of steady-state and transient heat transfer of small-sized leaves by free and mixed convection. *Plant, Cell and Environment*, **24**, 631-640.
- Ruf C. & Fiedler K. (2000) Thermal gains through collective metabolic heat production in social caterpillars of *Eriogaster lanestris*. *Naturwissenschaften*, **87**, 193-196.
- Ruf C. & Fiedler K. (2002) Tent-based thermoregulation in social caterpillars of *Eriogaster lanestris* (Lepidoptera: Lasiocampidae): behavioral mechanisms and physical features of the tent. *Journal of Thermal Biology*, **27**, 493-501.
- Salt D.T., Brooks G.L. & Whittaker J.B. (1995) Elevated carbon dioxide affects leaf-miner performance and plant growth in docks (*Rumex* spp.). *Global Change Biology*, **1**, 153-156.

- Salvucci M.E. & Crafts-Brandner S.J. (2000) Effects of temperature and dietary sucrose concentration on respiration in the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Journal of Insect Physiology*, **46**, 1461-1467.
- Saour G. (2004) Efficacy assessment of some *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in controlling the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Pest Science*, **77**, 229-234.
- Scheirs J., De Bruyn L. & Verhagen R. (2001) Nutritional benefits of the leaf-mining behaviour of two grass miners: a test of the selective feeding hypothesis. *Ecological Entomology*, **26**, 509-516.
- Seymour R.S., White C.R. & Gibernau M. (2003) Heat rewarding for insect pollinators. *Nature*, **426**, 243-244.
- Sharkey T.D. & Ogawa T. (1987) Stomatal responses to light. In: *Stomatal Function* (eds E. Ziegler, G.D. Farquhar, & I.R. Cowan). Stanford University Press, Stanford.
- Sigsgaard L. (2000) The temperature-dependent duration of development and parasitism of three cereal aphid parasitoids, *Aphidius ervi*, *A. rhopalosiphi*, and *Praon volucre*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **95**, 173-184.
- Sinoquet H., Le Roux X., Adam B., Amaglio T. & Daudet F.A. (2001) RATP: a model for simulating the spatial distribution of radiation absorption, transpiration and photosynthesis within canopies: application to an isolated tree crown. *Plant, Cell and Environment*, **24**, 395-406.
- Smith P.H.D. & Jones T.H. (1998) Effects of elevated CO₂ on the chrysanthemum leaf-miner, *Chromatomyia syngenesiae*: a greenhouse study. *Global Change Biology*, **4**, 287-291.
- Spotila J.R., Soule O.H. & Gates D.M. (1972) The biophysical ecology of the alligator: heat energy budgets and climate spaces. *Ecology*, **53**, 1094-1102.
- Stainforth D.A., Aina T., Christensen C., Collins M., Faull N., Frame D.J. & al. (2005) Uncertainty in predictions of the climate response to rising levels of greenhouse gases. *Nature*, **433**, 403-406.
- Stone G.N. & Schönrogge K. (2003) The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**, 512-522.
- Syvertsen J.P., Lloyd J., McConchie C., Kriedmann P.E. & Farquhar G.D. (1995) On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant, Cell and Environment*, **18**, 149-157.
- Tardieu F. & Davies W.J. (1992) Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. *Plant Physiology*, **98**, 540-545.

- Taylor F. (1981) Ecology and evolution of physiological time in insect. *The American Naturalist*, **117**, 1-23.
- Tenhunen J.D., Pearcy R.W. & Lange O.L. (1987) Diurnal variations in leaf conductance and gas exchange in natural environments. In: *Stomatal function* (eds E. Ziegler, G.D. Farquhar, & I.R. Cowan). Stanford University Press, Stanford.
- Tobin P.C., Nagarkatti S. & Saunders M.C. (2001) Modeling development in grape berry moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*, **30**, 692-699.
- Turner J.S. (2000) Manipulative midges and mites. In: *The extended organism: the physiology of animal-built structures* (ed J.S. Turner), pp. 142-158. Harvard University Press, Cambridge.
- Turner J.S. (2004) Extended phenotypes and extended organisms. *Biology and Philosophy*, **19**, 327-352.
- Tuzet A., Perrier A. & Leuning R. (2003) A coupled model of stomatal conductance, photosynthesis and transpiration. *Plant, Cell and Environment*, **26**, 1097-1116.
- Urbaneja A., Hinarejos R., Llacer E., Garrido A. & Jacas J.A. (2002) Effect of temperature on life history of *Cirrospilus vittatus* (Hymenoptera: Eulophidae), an ectoparasitoid of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae).
- Urbaneja A., Llacer E., Tomas O. & Jacas J.A. (1999) Effect of temperature on development and survival of *Cirrospilus* sp. near *lyncus* (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoid of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Environmental Entomology*, **28**, 339-344.
- Valladares G. & Salvo A. (2001) Community dynamics of leafminers (Diptera: Agromyzidae) and their parasitoids (Hymenoptera) in a natural habitat from Central Argentina. *Acta Oecologia*, **22**, 301-309.
- van Berkum F.H. (1988) Latitudinal patterns of the thermal sensitivity of sprint speed in lizards. *The American Naturalist*, **132**, 327-343.
- van der Have T.M. (2002) A proximate model for thermal tolerance in ectotherms. *Oikos*, **98**, 141-155.
- Van Dyck H. & Matthysen E. (1998) Thermoregulatory differences between phenotypes in the speckled wood butterfly: hot perchers and cold patrollers? *Oecologia*, **114**, 326-334.
- Van Dyck H., Matthysen E. & Dhondt A.A. (1997) The effect of wing colour on male behavioural strategies in the speckled wood butterfly. *Animal Behaviour*, **53**, 39-51.
- von Caemmerer S. & Farquhar G.D. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, **153**, 376-387.

- Wang J.J. & Tsai J.H. (2001) Development, survival and reproduction of black citrus aphid, *Toxoptera aurantii* (Hemiptera: Aphididae), as a function of temperature. *Bulletin of Entomological Research*, **91**, 477-489.
- Warrit B., Landsberg J.J. & Thorpe M.R. (1980) Responses of apple leaf stomata to environmental factors. *Plant, Cell and Environment*, **3**, 13-22.
- Whittaker J.B. (1994) Physiological responses of leaves of *Rumex obtusifolius* to damage by a leaf miner. *Functional Ecology*, **8**, 627-630.
- Whittaker J.B. (2001) Insects and plants in a changing atmosphere. *Journal of Ecology*, **89**, 507-518.
- Wigley T.M.L. (2005) The climate change commitment. *Science*, **307**, 1766-1769.
- Williams R.S., Norby R.J. & Lincoln D.E. (2000) Effects of elevated CO₂ and temperature-grown red and sugar maple on gypsy moth performance. *Global Change Biology*, **6**, 685-695.
- Willmer C. & Fricker M. (1996) Stomatal responses to environmental factors. In: *Stomata* (eds C. Willmer & M. Fricker), pp. 126-177. Chapman & Hall, London.
- Willmer P. (1986) Microclimatic effects on insects at the plant surface. In: *Insects at the plant surface* (eds B.E. Juniper & T.R.E. Southwood). Hodder Arnold, London.
- Woods H.A. & Kingsolver J.G. (1999) Feeding rate and the structure of protein digestion and absorption in lepidopteran midguts. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **42**, 74-87.
- Woolf A.B. & Ferguson I.B. (2000) Postharvest responses to high fruit temperatures in the field. *Postharvest Biology and Technology*, **21**, 7-20.
- Worner S.P. (1992) Performance of phenological models under variable temperature regimes: consequences of the Kaufmann or rate summation effect. *Environmental Entomology*, **21**, 689-699.
- Zangerl A.R., Hamilton J.G., Miller T.J., Crofts A.R., Oxborough K., Berenbaum M.R. & de Lucia E.H. (2002) Impact of folivory on photosynthesis is greater than the sum of its holes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **99**, 1088-1091.
- Zar J.H. (1998) *Biostatistical analysis*. (4th ed.). Prentice-Hall, New Jersey.
- Ziegler H. (1987) The evolution of stomata. In: *Stomatal Function* (eds E. Ziegler, G.D. Farquhar, & I.R. Cowan). Stanford University Press, Stanford.

ANNEXE I.

Mesure ciblée des échanges gazeux avec la Li-Cor
6400: utilisation de l'huile végétale

La chambre foliaire de l'analyseur de gaz infrarouge Li-Cor 6400 permet de mesurer les échanges gazeux sur une surface de 6 cm² (2x3 cm). De l'huile végétale (Végétaline®) a été utilisée pour mesurer les échanges gazeux sur une surface plus petite (par exemple une mine, ~ 1 cm²). L'huile végétale se présente sous forme solide à température ambiante inférieure à 15 °C, puis devient visqueuse (mais pas liquide) entre 20 et 30 °C. Deux contrôles ont été réalisés afin de répondre aux questions suivantes : (i) vérifier que tout échange gazeux au niveau des parties recouvertes avec de l'huile végétale est inhibé, et (ii) vérifier que la taille de la surface recouverte d'huile végétale n'affecte pas les échanges gazeux des parties non recouvertes. Enfin, l'huile végétale a aussi été utilisée pour mesurer la conductance de la vapeur d'eau au travers du tégument supérieur des feuilles intactes et des mines.

INHIBITION DES ÉCHANGES GAZEUX

L'application d'huile végétale sur une feuille permet-elle d'inhiber totalement les échanges gazeux ? Un groupe de 10 feuilles a été utilisé. Chaque feuille a été recouverte d'huile végétale sur ses deux faces, puis placée dans la chambre foliaire de la Li-Cor 6400. Après un délai d'équilibrage (20 à 30 minutes), la conductance de la vapeur d'eau, le taux d'assimilation et le taux de transpiration ont été mesurés. Les valeurs moyennes (\pm écart type) pour chaque paramètre étaient proches de zéro : conductance pour la vapeur d'eau = $-0,002 \pm 0,003 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; taux d'assimilation de CO₂ = $-0,08 \pm 0,08 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; taux de transpiration = $-0,018 \pm 0,034 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Ces valeurs représentent le bruit de fond de l'appareil. Par conséquent, l'huile végétale est un puissant inhibiteur des échanges gazeux. De plus, l'huile végétale n'endommage pas les tissus végétaux à court terme.

ÉCHANGES GAZEUX NON AFFECTÉS DANS LA ZONE NON RECOUVERTE

L'application d'huile végétale affecte-elle la conductance stomatique et le taux d'assimilation dans les zones non recouvertes autour du patch d'huile végétale ? Y a-t-il un effet de la taille de la surface non recouverte ? La conductance stomatique maximale et le taux d'assimilation maximal ont été mesurés dans la chambre de la Li-Cor 6400 sur quatre groupes de 10 feuilles chacun. Chaque groupe se différencie par la taille de la surface non recouverte d'huile végétale (patches) : 0 (témoin), 1, 2 et 4 cm². Les mesures ont été réalisées dans des

conditions standards (concentration en CO_2 : 35 Pa, température de feuille: 25 °C et déficit de vapeur d'eau de la feuille: 1 kPa) et à un niveau d'irradiance de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Un délai d'équilibration (20 à 30 minutes) a été respecté pour chaque mesure.

La conductance stomatique maximale pour la vapeur d'eau des patches ne diffère pas significativement de celle du témoin (Mann Whitney test: témoin vs. 1 cm^2 , $U = 27$, $P = 0,08$; témoin vs. 2 cm^2 , $U = 38$, $P = 0,36$; témoin vs. 4 cm^2 , $U = 50,5$, $P = 0,97$) (Fig. 1A). Le taux d'assimilation de CO_2 maximal de chaque patch n'est pas significativement différent de celui du témoin (Mann Whitney test: témoin vs. 1 cm^2 , $U = 53,5$, $P = 0,79$; témoin vs. 2 cm^2 , $U = 40,5$, $P = 0,47$; témoin vs. 4 cm^2 , $U = 50$, $P = 1$) (Fig. 1B). Par conséquent, ni la présence d'huile végétale à proximité, ni la taille de la surface non recouverte d'huile n'altèrent les échanges gazeux dans cette zone.

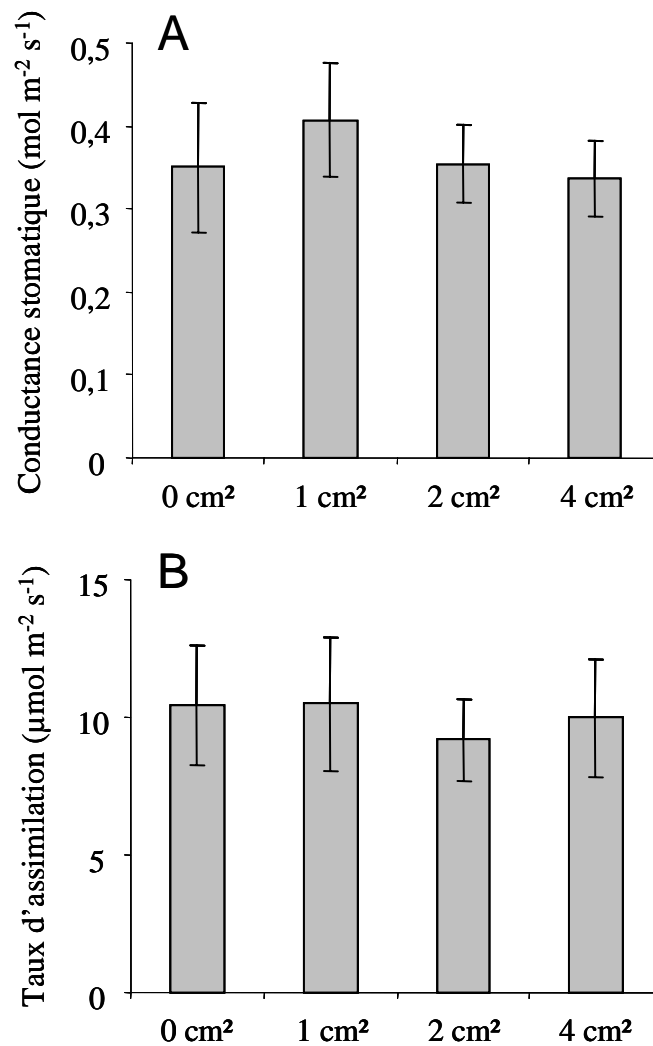


Figure 1. Conductance stomatique maximale moyenne (A) et taux d'assimilation maximal moyen (B) du témoin (0 cm^2) et des patches non recouverts d'huile (1 cm^2 , 2 cm^2 , 4 cm^2). Les barres représentent les écarts type. $N = 10$, pour chaque catégorie.

CONDUCTANCE DES TÉGUMENTS SUPÉRIEURS

J'ai quantifié la conductance du tégument supérieur des feuilles intactes et des mines occupées et vides. La formation des fenêtres de nourrissage peut avoir une incidence sur la conductance pour la vapeur d'eau du tégument. Les mines vides ont été obtenues après parasitisme par un hyménoptère parasitoïde (voir **chapitre 2**).

Le tégument inférieur a été totalement recouvert d'une fine couche d'huile végétale de sorte que l'analyseur de gaz infrarouge ne mesure que les échanges gazeux du tégument supérieur. La conductance pour la vapeur d'eau a été mesurée avec la Li-Cor 6400 sur 10 feuilles intactes, 10 mines occupées et 10 mines vides, dans des conditions standards et à un niveau d'irradiance de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Un délai de 20 à 30 minutes a été respecté avant chaque mesure. Les valeurs de conductance des feuilles intactes recouvertes d'huile végétale sur les deux faces ($\pm 0,002 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, voir ci-dessus) ont été utilisées comme seuil du bruit de fond de l'analyseur de gaz infrarouge.

La conductance moyenne pour la vapeur d'eau du tégument supérieur des feuilles intactes est négligeable car elle est en dessous du seuil du bruit de fond de l'analyseur de gaz infrarouge (Fig. 2). La différence entre les mines vides et les feuilles intactes n'est pas significative (Mann Whitney test: $U = 32$, $P = 0,17$) (Fig. 2). La conductance du tégument supérieur des mines vides est donc aussi négligeable. En revanche, la conductance moyenne du tégument des mines occupées est significativement supérieure à celle des feuilles intactes (Mann Whitney test: $U = 19$, $P = 0,02$) (Fig. 2). La conductance pour la vapeur d'eau du tégument supérieur des mines occupées représente 6,8 % de la conductance stomatique maximale des mines et 13,7 % de la conductance stomatique à irradiance $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (voir **chapitre 2**). Par conséquent, la conductance des mines occupées reste faible. La différence obtenue entre les mines vides et les mines occupées est attribuée à une différence des surfaces occupées par les fenêtres de nourrissage, qui est plus faible dans les mines vides (voir **chapitre 2**).

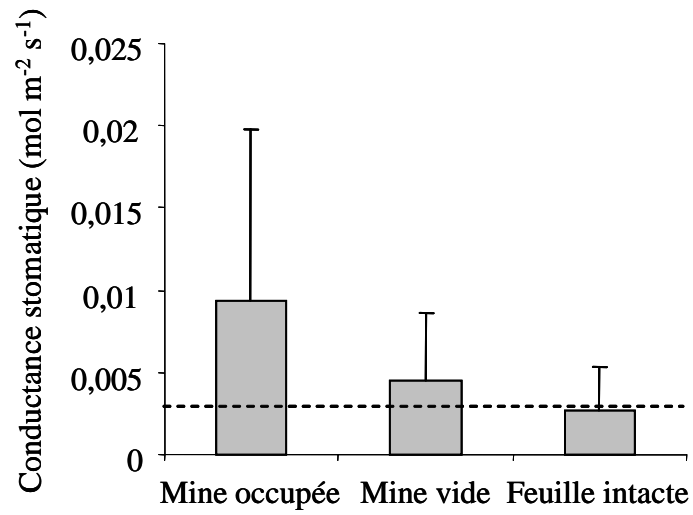


Figure 2. Conductance moyenne pour la vapeur d'eau du tégument supérieur des mines occupées, des mines vides et des feuilles intactes. Les barres représentent les écarts types. Le seuil du bruit de fond de la Li-Cor 6400 est montré (trait en pointillés).

ANNEXE II.

Caractérisation, calibration et contrôle du
microclimat de l'enceinte climatique

Les budgets thermiques d'une feuille et d'une mine ont été validés en comparant les prédictions et des mesures expérimentales réalisées dans des conditions climatiques parfaitement contrôlées (voir **chapitre 3**). Les températures de feuille et de mine ont été mesurées dans différentes conditions climatiques en utilisant une chambre climatique de type CONVIRON ('CONtrolled enVIRONnment'). La caractérisation et la calibration du microclimat de la chambre climatique étaient nécessaires. La chambre climatique était équipée de deux lampes métal haline de forte puissance. La présence de ces lampes modifie le microclimat de la chambre suivant deux principaux aspects : (i) la distribution spatiale des radiations au sein de la chambre est très hétérogène, permettant l'utilisation d'une large gamme de niveaux de radiations, et (ii) les capacités de régulation de l'appareil sont biaisées par la production de chaleur des lampes, induisant un biais entre les valeurs de température et d'humidité relative renvoyées par le système de mesure de la chambre et les valeurs réelles. L'objectif principal de cette étape de calibration était donc (i) de décrire l'environnement radiatif de la chambre de sorte que, par la suite, la quantité de radiation reçue par un échantillon puisse être déterminée en mesurant uniquement les coordonnées spatiales de l'échantillon dans la chambre, et (ii) de quantifier les biais dans les valeurs de température et d'humidité relative pour pouvoir les ajuster dans les protocoles expérimentaux.

DESCRIPTIF DE LA CHAMBRE CLIMATIQUE

La chambre climatique (VB 1014-A, Vötsch, Balingen Frommern, Allemagne) a un volume de 1,33 m³ (hauteur x largeur x profondeur ~ 124 x 149 x 72 cm). Les parois internes de la chambre sont recouvertes d'un matériau synthétique PVDF Polyvinylidènefluorure ayant une couleur de type RAL 9010 ('pure white'). L'émissivité thermique des parois est 0,9. La précision de la régulation du microclimat de la chambre est de $\pm 0,1$ °C pour la température de l'air (T_a), et $\pm 0,10$ unité de pourcentage pour l'humidité relative (HR) (caractéristiques données par Vötsch). Les deux lampes métal haline de 250 W chacune (Sylvania Britelux HSI-T SX clear) sont suspendues dans la chambre (le câblage étant inséré au travers de l'orifice permettant l'équilibrage des pressions entre la chambre et le milieu ambiant). Un repère 3D orthonormé (X, Y, Z) a été virtuellement fixé au sein de la chambre (Fig. 1).

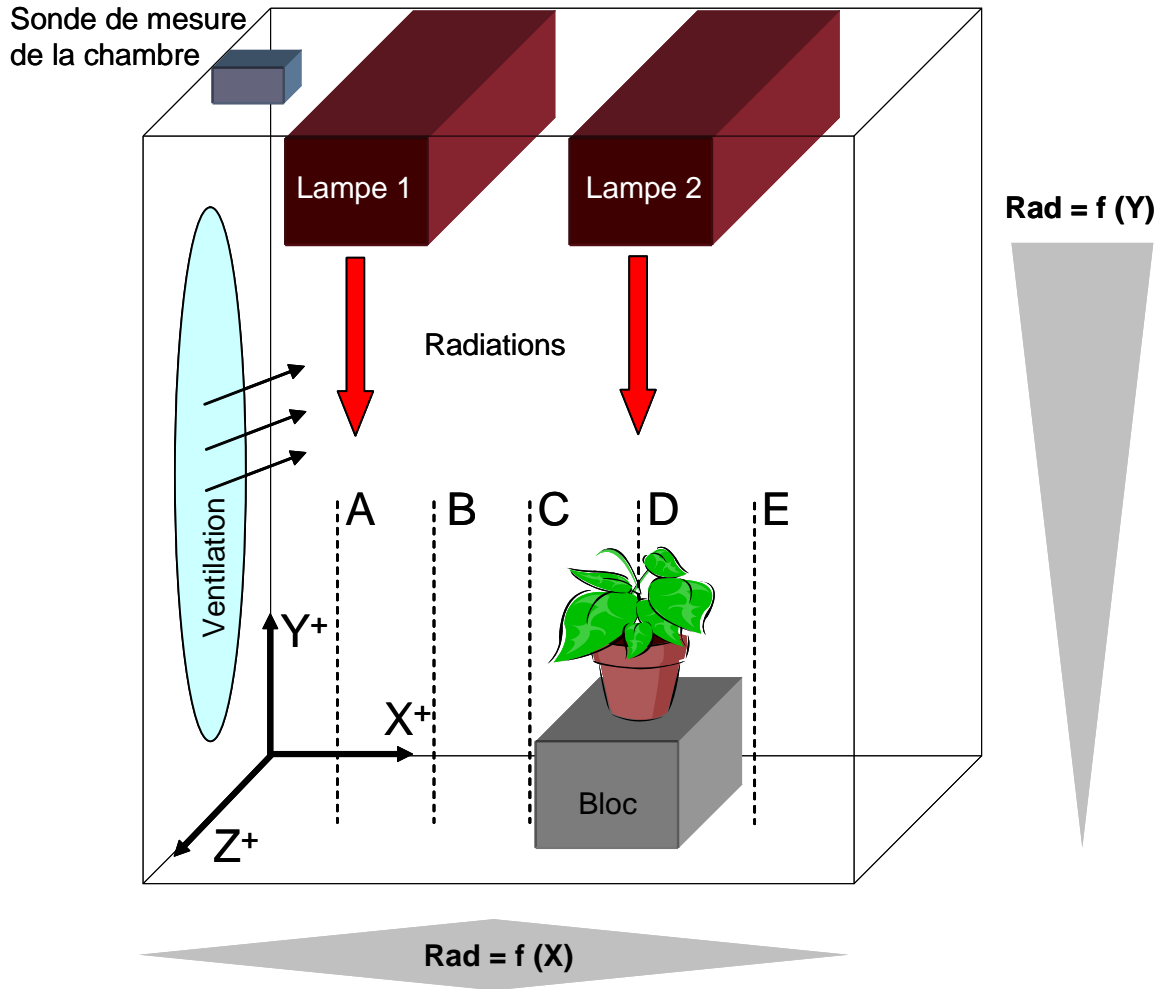


Figure 1. Représentation schématique de la chambre climatique. Les trajectoires virtuelles A, B, C, D et E sont décrites dans un repère orthonormé (X, Y, Z). L'origine de ce repère correspond au coin du fond de la chambre à gauche. Le niveau de radiation reçu par un échantillon varie le long des axes X et Y. Les échantillons (plants de pommier) étaient surélevés à l'aide de blocs de polystyrène afin de faire varier le niveau de radiation à la surface de la feuille. La sonde du conviron, positionnée au-dessus des lampes, mesure à la fois la température de l'air et l'humidité relative.

L'ENVIRONNEMENT RADIATIF DE LA CHAMBRE

Le problème des unités de mesure des radiations

L'unité des radiations généralement utilisée pour les problèmes liés aux budgets thermiques est le nombre de watts par unité de surface (W m^{-2}), qui est une mesure de l'énergie totale contenue dans le rayonnement, i.e. en considérant les radiations ultraviolet (300 à 400 nm), visible (400 à 700 nm), proche infrarouge (700 à 2500 nm) et les radiations thermiques (au-delà de 2500 nm). Dans le cas des végétaux, l'activité stomatique a un rôle important dans la régulation du budget thermique de la feuille. Le degré d'ouverture des stomates répond à plusieurs mécanismes dont l'un d'entre eux fait intervenir des photorécepteurs présents dans les cellules de garde qui absorbent dans les longueurs d'onde du bleu (entre 400 et 500 nm) et du rouge (entre 600 et 700 nm). Il en découle que l'activité stomatique dépend du taux d'absorption des photons et non pas du taux d'absorption d'énergie. L'unité de mesure des radiations utilisée en physiologie végétale est le nombre de moles de photons dans le PAR ('Photosynthetically Active Radiations', 400 à 700 nm) par unité de surface et de temps ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Cette unité est appelée aussi le flux de photons photosynthétiques (PPF).

La conversion d'une unité à une autre (W m^{-2} et $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) est nécessaire dans les problèmes de budget thermique d'une feuille. Cette conversion peut se faire mathématiquement mais impose de connaître la distribution spectrale de la lumière. Dans le cas de la chambre climatique, une relation empirique permettant cette conversion a été établie en mesurant l'irradiance dans les deux unités. Deux senseurs différents ont été utilisés : (i) un pyranomètre CM3 (Campbell Scientific Ltd., Leicestershire, UK) mesurant les radiations globales dans l'intervalle 305 à 2800 nm (W m^{-2}), et (ii) un senseur LI-190SA (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) mesurant les radiations dans le PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Le CM3 était connecté à une station CR10X (Campbell Scientific Ltd.) et le LI-190SA était relié à une console LI-1400 (Li-Cor Inc.). Le niveau de radiation a été mesuré successivement en utilisant ces deux senseurs en 91 points de mesures répartis dans tout l'espace utile de la chambre ($X = 12$ à 108 cm, $Y = 27$ à 114 cm et $Z = 39$ à 53 cm). Les mesures ont été effectuées à $T_{\text{air}} = 25$ °C et HR = 70 %. Un délai de 30 min permettant l'équilibrage thermique des senseurs a été imposé avant chaque séance de mesures. Une relation linéaire a été obtenue (Fig. 2 ; régression linéaire : $[\text{W m}^{-2}] = 0,4889 [\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}]$, $R^2 = 0,99$, $P < 0,001$, $N = 91$). Ce coefficient de conversion (0,4889) est proche de celui obtenu sur le terrain

en utilisant la même méthode et le même matériel (régression linéaire : $[W\ m^{-2}] = 0,5399$ $[\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}]$, $R^2 = 0,95$, $P < 0,001$, $N = 182$).

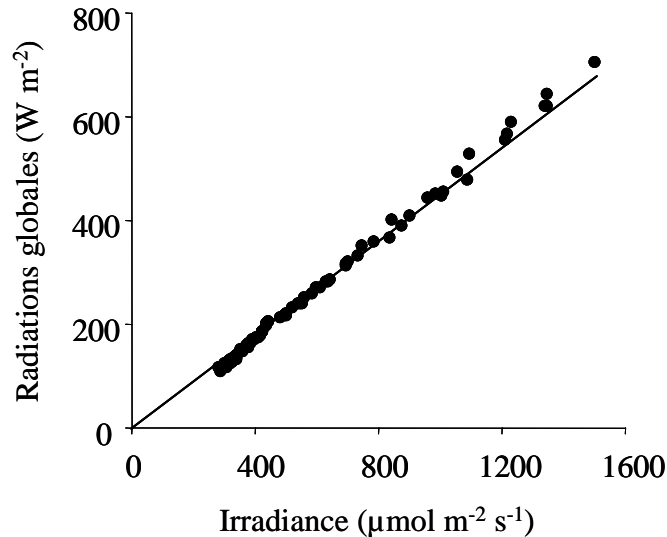


Figure 2. Relation entre le niveau de radiation globale ($W\ m^{-2}$) et le niveau d'irradiance ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) en un point donné de l'espace utile de la chambre climatique ($N = 91$ points de mesures). Le dispositif permet d'atteindre des niveaux de radiations comparables à ceux obtenues dans la nature en climat tempéré.

Le ratio radiation visible / radiation proche infrarouge

La proportion des radiations du visible et du proche infrarouge dans le rayonnement incident total a été déterminée en utilisant un pyranomètre couplé à un filtre RG 695 (Melles Griot, Rochester, New York, USA) transmettant les radiations comprises entre 695 et 1000 nm et bloquant les radiations du visible. Un pyranomètre SEL 033 (International Light, Newburyport, Massachusetts, USA), mesurant dans l'intervalle 305 à 1000 nm et relié à une console IL 1400A (International Light), a également été utilisé. La surface du pyranomètre était plate, grâce au montage d'un diffuseur W8218 (International Light), ce qui facilitait la fixation du filtre. Ce pyranomètre ne mesure pas les radiations au-delà de 1000 nm. Cependant, les valeurs renvoyées par les pyranomètres CM3 (305-2800 nm) et SEL 033 (305-1000 nm) étaient très similaires, indiquant que les lampes n'émettent pas ou peu de radiations dans la gamme 1000-2800 nm.

Le ratio visible/proche infrarouge a été mesuré en 11 points dans l'espace de la chambre climatique. Pour chaque point, le niveau de radiation a été mesuré une première fois sans le

filtre (radiation global, R_{total}), puis une seconde fois avec le filtre (radiation du proche infrarouge, R_{NIR}). La proportion des radiations du proche infrarouge (I^{NIR}) a été obtenue en calculant le ratio

$$I^{NIR} = \frac{R_{NIR}}{R_{total}} \quad (1)$$

Par la suite, la proportion des radiations du visible et de l'ultraviolet (I^{VIS}) a été calculée selon

$$I^{VIS} = 1 - I^{NIR} \quad (2)$$

Les résultats obtenus montrent que les lampes émettent plus de radiations dans le proche infrarouge que dans le visible (Table 1).

Tableau 1. Proportions (moyenne \pm écart type) des radiations du visible (comprenant l'ultraviolet) et du proche infrarouge dans le spectre des lampes utilisées dans la chambre climatique (N = 11 points de mesures).

	Visible I^{VIS}	Proche infrarouge I^{NIR}
Proportion	0,37 \pm 0,02	0,63 \pm 0,02

Hétérogénéité spatiale des niveaux de radiations

L'environnement radiatif à l'intérieur de la chambre est complexe car les niveaux de radiations incidentes varient dans les trois dimensions de l'espace. Cinq trajectoires ont été choisies selon les critères suivants : (i) l'aspect pratique, sachant que des plantes seront positionnés le long de ces trajectoires, (ii) ces trajectoires doivent permettre d'utiliser au mieux l'intervalle des radiations disponibles (minimum et maximum). Pour chacune des trajectoires, les coordonnées sur X et Z étaient fixées, et le niveau de radiations incidentes à l'échantillon (une feuille) était modifié en faisant varier la coordonnée Y (i.e. la distance entre les lampes et l'échantillon) (Trajectoires A, B, C, D, E, Fig. 1). L'échantillon était surélevé de façon à obtenir la hauteur désirée, en utilisant des blocs de polystyrène de différente taille.

L'évolution des niveaux de radiations en fonction de la coordonnée sur Y le long des cinq trajectoires a été déterminée en utilisant le senseur LI-190SA (Li-Cor Inc.). Pour l'ensemble des trajectoires, une petite variation de la distance Y induit une forte variation du niveau de radiation lorsque l'échantillon est proche des lampes. A l'inverse, un faible changement de Y lorsque l'échantillon est loin des lampes n'induit qu'une faible variation du niveau de

radiation (Fig. 3). Les équations mathématiques décrivant le niveau de radiation le long des trajectoires sont données dans le tableau 2.

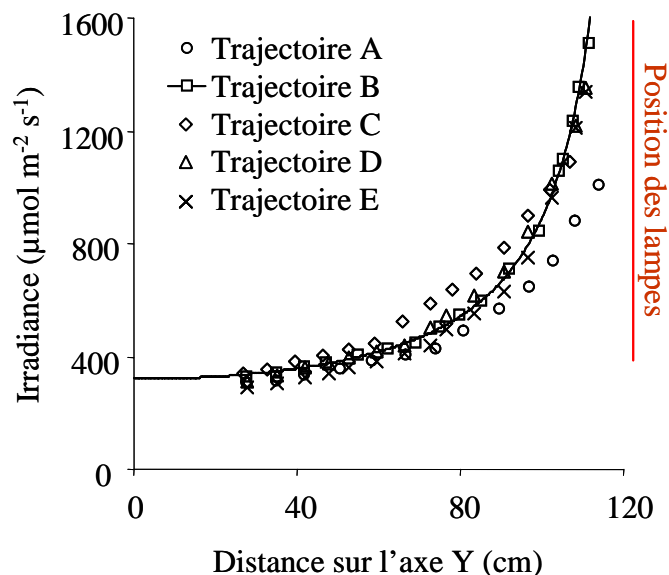


Figure 3. Niveaux de radiations en fonction de la distance Y (distance entre le sol et l'échantillon) pour les trajectoires virtuelles A, B, C, D et E. Seule la régression non linéaire pour la trajectoire B est montrée pour des raisons de clarté.

Tableau 2. Description et statistiques des 5 trajectoires virtuelles (A, B, C, D et E). Pour chaque trajectoire, les coordonnées le long des axes X et Z étaient fixées (coordonnées exprimées en cm). Le modèle non linéaire utilisé est : $\text{irradiance} = (a + b Y + c Y^2 + d Y^3)^2$, avec Y, la coordonnée sur l'axe Y (en cm) et a, b, c et d les paramètres de l'équation. Toutes les régressions étaient significatives ($R^2 = 0,99$ et $P < 0,0001$ pour les 5 trajectoires). Le Test de Fischer (F) est donné. Enfin, le niveau maximal d'irradiance (à $Y = 110$ cm) est indiqué.

	Fixées		Paramètres des régressions non linéaires				F	Maximum ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
	X	Z	a	b	c	d		
A	26	39	12,487685	0,26937	-0,004401	$3,0913 \cdot 10^{-5}$	3296 ^a	901
B	46	39	3,521875	0,824542	-0,014202	$8,6138 \cdot 10^{-5}$	1213 ^b	1371
C	66	39	18,613481	-0,04641	0,0016	$8,6527 \cdot 10^{-5}$	2242 ^c	1159
D	86	39	10,928681	0,383433	-0,006508	$4,6429 \cdot 10^{-5}$	2852 ^d	1307
E	106	39	6,015574	0,62075	-0,010665	$6,8196 \cdot 10^{-5}$	2019 ^e	1297

Les degrés de liberté : ^a 3, 9 ; ^b 3, 13 ; ^c 3, 10 ; ^d 3, 11 ; ^e 3, 11.

HÉTÉROGÉNÉITÉ SPATIALE DE LA TEMPÉRATURE ET DE L'HUMIDITÉ RELATIVE

La température de l'air et l'humidité relative à l'intérieur de la chambre climatique ont été mesurées simultanément avec une sonde MP100A (Campbell Scientific Ltd.) équipée du bouclier de protection contre les radiations (modèle 41004-5, Campbell Scientific Ltd.). L'homogénéité de la température de l'air et de l'humidité relative (HR) dans la chambre a été vérifiée. En revanche, un biais a été décelé entre la valeur réelle de l'humidité relative et celle renvoyée par la console du conviron (i.e. valeur de consigne). La valeur de consigne correspond bien à la valeur réelle de HR à faible HR, mais un biais apparaît lorsque la valeur de HR est élevée (Fig. 4 A). Ce biais devient significatif à forte humidité relative puisque la valeur de consigne HR 90 % correspond en réalité à HR 77 % (Fig. 4 A). L'amplitude du biais dans la valeur de HR s'accroît de façon linéaire lorsque la valeur de consigne est augmentée. Le biais de HR est similaire pour chaque température de l'air testée (Fig. 4 A). Ce biais dans la valeur de HR est corrélé au biais observé entre la valeur de consigne de la température de l'air et la température réelle à l'intérieur de la chambre. En effet, alors que la valeur de consigne de HR augmente, la température réelle de l'air devient toujours plus chaude que la valeur de consigne de température (Fig. 4 B). Ce biais de température est inexistant à une valeur de consigne HR 30 %, mais la température de l'air est en réalité jusqu'à 1,4 °C plus élevée que la valeur de consigne de température à la valeur de consigne HR 90 % (Fig. 4 B). Ce biais entre température réelle et température de consigne est similaire pour chaque valeur de température de consigne testée (Fig. 4 B). Le biais de HR est une conséquence du biais de température. En effet, la sonde du conviron mesure l'humidité relative et la température au dessus des lampes. Ces lampes émettent de la chaleur de façon homogène vers le bas. Lorsque le biais de température est important au dessous des lampes, un biais de HR apparaît entre le haut et le bas des lampes. Ceci 'trompe' la sonde de HR du conviron. Cette explication se base sur le principe biophysique suivant. Lorsqu'un volume d'air est chauffé, sa capacité d'accueil de vapeur d'eau augmente si bien que la valeur relative de la quantité initiale de vapeur d'eau par rapport au volume total diminue, même si la quantité absolue de vapeur d'eau dans l'air n'est pas modifiée.

Ce résultat implique qu'une correction doit être appliquée pour travailler en condition à haute valeur de HR, tandis qu'aucune correction particulière n'est vraiment nécessaire à faible valeur de HR. La manière la plus simple d'apporter cette correction est de prendre en compte le biais en entrant la valeur de consigne dans l'appareil. Par exemple, pour travailler dans des conditions de RH 75 % et température de l'air 25 °C, les valeurs de consigne doivent être RH

88 % (d'après Fig. 4 A) et température de l'air 23,6 °C (d'après Fig. 4 B ; si la valeur de consigne de HR est 88 %, alors la température de l'air sera 1,4 °C au dessus de la température de consigne).

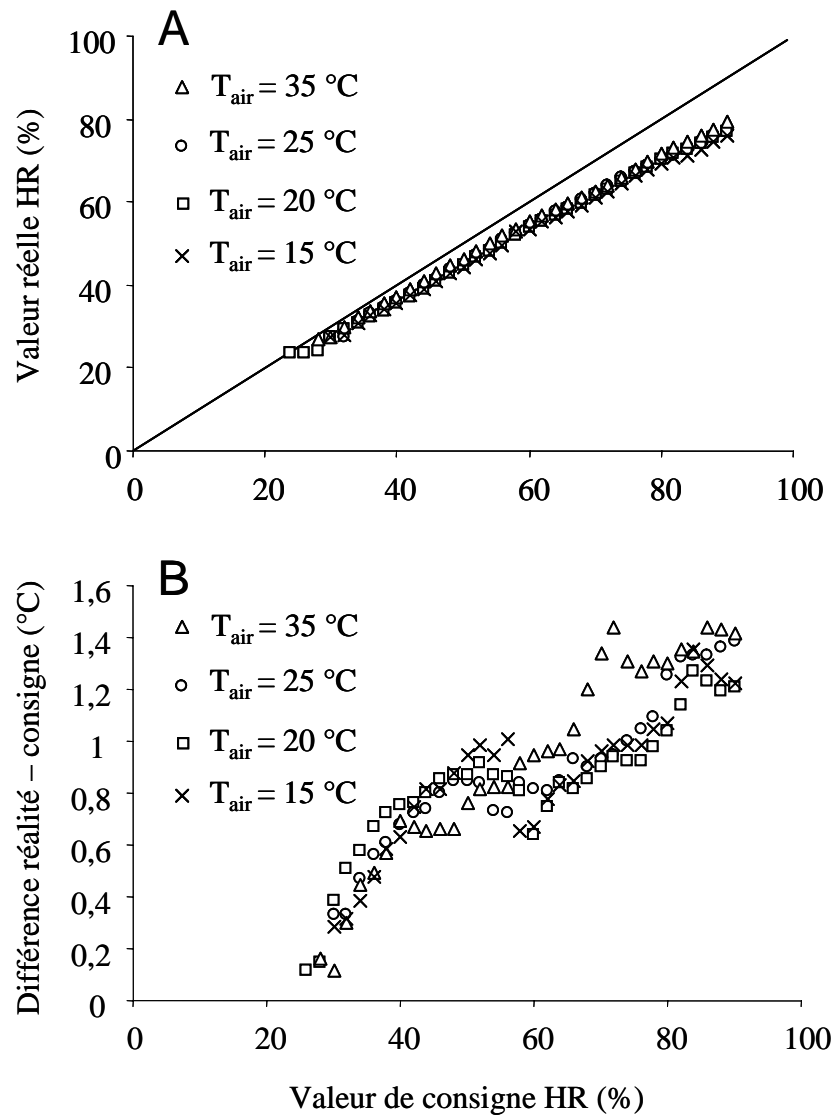


Figure 4. (A) Biais entre la valeur réelle de HR et sa valeur de consigne pour différentes valeurs de température de l'air réelles. Le tracé représente la droite $x = y$. Régression linéaire sur les données groupées ($N = 128$) : $y = 0,8421 x + 2,7158$; $R^2 = 0,99$; $P < 0,0001$. (B) Différence entre la température réelle et la température de consigne en fonction de la valeur de consigne de HR, pour différentes températures de l'air réelles.

RÉSUMÉ

BIOPHYSIQUE ENVIRONNEMENTALE DES INSECTES ENDOPHYTES

La physiologie et les traits d'histoire de vie des organismes ectothermes dépendent largement de la température de leur microclimat. Dans certaines relations insecte – plante, le phytophage manipule physiquement et/ou chimiquement son environnement végétal. Cependant, les effets de ces transformations sur le microclimat de l'herbivore sont encore inconnus. Nous avons détaillé précisément les modifications physiques induites par un lépidoptère mineur de feuille (*Phyllonorycter blancardella*, Gracillariidae) sur son environnement végétal (le pommier). Les impacts sur l'écologie thermique de la larve ont été quantifiés. La larve se nourrit et se développe au sein même des tissus de la feuille, dans une structure appelée mine.

Des mesures de spectrométrie optique ont démontré que la larve modifie profondément les propriétés optiques de la surface de la feuille au cours de son nourrissage. La structure mine absorbe bien plus de radiations dans le proche infrarouge que les tissus foliaires intacts. De plus, une quantité importante de radiations est transmise à l'intérieur de la mine par le tégument supérieur dans les zones prélevées par la larve. Ces radiations induisent une élévation importante de son activité respiratoire (rejet de CO₂). En utilisant un analyseur de gaz par infrarouge, nous avons pu montrer par ailleurs que les stomates localisés dans le tégument inférieur de la mine réagissent à la présence de la larve en se fermant. Un modèle de diffusion de CO₂ a révélé que les stomates réagissent directement aux variations d'émission de CO₂ par la larve. Le budget thermique de la mine a ensuite été modélisé. Le modèle permet de prédire la température à l'intérieur de la mine à partir des modifications des propriétés optiques et de la physiologie des stomates, et à partir des variables climatiques. Ce modèle biophysique a été validé en comparant ses prédictions avec des mesures expérimentales de température de mines réalisées en environnement contrôlé. Le modèle a une précision de 0,8 °C dans l'intervalle de 12 °C à 42 °C. Le modèle prédit un important excès de température dans la mine, atteignant 10 °C au dessus de la température de l'air et 5 °C au dessus de la température des tissus foliaires intacts. Les deux types de modifications – propriétés optiques et comportement stomatiques – ont un impact équivalent sur l'excès de température. Cette approche démontre clairement que la larve contrôle son environnement physique en modifiant son environnement. Nos résultats sont finalement discutés dans une perspective d'écologie évolutive. Plus particulièrement, le rôle du microclimat des insectes endophages dans l'évolution de leurs sensibilités thermiques et de celles de leurs parasitoïdes est détaillé.

Mots clés : absorbance ; comportement alimentaire ; conductance stomatique ; dioxyde de carbone ; environnement thermique ; herbivorie ; insecte mineur ; interactions insecte – plante ; microclimat ; photosynthèse ; *Phyllonorycter blancardella* ; pommier ; radiations ; respiration ; sensibilité thermique ; taux de développement ; température corporelle ; température de feuille ; transfert de chaleur.

SUMMARY

ENVIRONMENTAL BIOPHYSICS OF ENDOPHYTIC INSECTS

Physiology and life history traits of ectothermic organisms depend on microclimate temperature. In some insect - plant relationships, the herbivore manipulates physically and /or chemically its proximate environment, i.e. plant tissues. The effects of such modifications on the phytophage's microclimate are however still poorly understood. We investigated the physical modifications of apple leaf tissues made by the leaf mining moth *Phyllonorycter blancardella* (Lepidoptera: Gracillariidae), and their impact on the thermal ecology of larvae. The larva lives inside a mine, a gallery it builds throughout its development.

Spectrometric measurements showed that larvae greatly modify the optical properties of their mines when feeding on leaf tissues. The mine structure absorbs more infrared radiation than intact leaf tissues do. Moreover, the fed areas in the mine integument transmit a large amount of incoming radiation. An increase in the amount of transmitted radiation induces body temperature of larvae located below the fed areas to warm, leading to an increase in their respiration rate. Measurements of mine gas exchange and a model of CO₂ diffusion within leaves were developed to show that stomata in the mine integument react by closing due to both (i) the increase in larval CO₂ release as incoming radiation increases, and (ii) the effect of feeding activity on CO₂ resistance pathways through the mesophyll. The two effects – larval CO₂ and lesion effects – have similar quantitative impacts. A biophysical model of heat transfer was built to predict the temperature within a mine from climatic parameters, physical factors (modifications of optical properties) and the physiology of stomata. Model temperature predictions and experimental measurements were confronted to test for the validity of the model. The model predicted leaf and mine temperatures with a precision of 0.9 °C in the temperature range of 12 °C – 42 °C. The model predicted a large temperature excess within a mine: mine temperature can be up to 10 °C warmer than ambient air and up to 5 °C above leaf temperature. Temperature excess was closely related to radiation level due to the impact of this abiotic factor on both radiation absorption and stomatal closure. The modifications of plant tissues – optical properties and stomatal physiology – accounted almost equally for the temperature excess. Our approach clearly demonstrates that leaf miners control the impact of their physical and biotic environments.

Our results are discussed in an evolutionary ecology point of view. The warm microclimate of endophagous insects is shown to drive the evolution of their own thermal sensitivities and also those of their parasitoids, when compared to ectophagous herbivores.

Key words: absorbance; apple tree; body temperature; carbon dioxide; development rate; feeding behavior; heat transfer; herbivory; insect – plant relationships; leaf miner; leaf temperature; microclimate; photosynthesis; *Phyllonorycter blancardella*; radiation; respiration; stomatal conductance; thermal environment; thermal sensitivity.