UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
GRENOBLE 1
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Écologie, génétique et symbiose bactérienne chez le grand charançon du pin, *Hylobius abietis* : adaptation d'un insecte ravageur à son environnement forestier

---

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 12 mai 2006

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier

par

Cyrille CONORD

Composition du jury

Rapporteurs :	Mme M. Rahier
	M. P. Zagatti
Examinateurs :	Mme L. Després
	M. A. Heddi
	M. G. Lempérière
	M. D. Wainhouse

Laboratoire d'Écologie Alpine — UMR 5553

Mis en page avec la classe thloria.

Remerciements

Que vous soyiez en train de lire la version électronique de ce document ou que vous en ayiez entre les mains une bonne vieille version papier, vous devez savoir que « ceci n'est pas une thèse ». En effet, ceci n'est que l'un des « produits » de la thèse qui, à mon sens, tiendrait plutôt de l'aventure humaine. Puisque cette page est l'endroit consacré pour celà, je tiens à y remercier quelques uns de ces humains rencontrés au long de ce parcours...

Merci tout d'abord à Pierre Taberlet de m'avoir accueilli dans son laboratoire et dans son équipe. Merci aux deux initiateurs de ce travail, Laurence Després et Guy Lempérière pour m'avoir accordé leur confiance, leur soutien et leurs coups de pied « occultes ». Merci à Martine Rahier et à Pierre Zagatti d'avoir accepté la tâche d'être les rapporteurs de ce travail. Merci à Abdelaziz Heddi et David Wainhouse d'avoir accepté d'examiner ce travail. Merci à Didier Rochat de m'avoir accueilli dans son équipe.

Un merci tout particulier à Florence Lempérière pour son accueil et son aide précieuse ; je n'oublie pas non plus qu'elle a été la toute première instigatrice de la « piste de l'allié symbiotique » chez l'hylobe. Un grand merci à Michel Deschanel pour m'avoir consacré son temps, sa bonne humeur et sa tronçonneuse à chacune de mes escales ardèchoises !

Merci aux « acteurs du millieu forestier » qui m'ont consacré de leur temps et transmis un peu de leur expérience en la matière : Robert Nanot, Bertrand Chapelan, Jean-Yves Fraysse, François-Xavier Saintonge, Jean-François De Falvard et tous ceux que j'aurais pu oublier...

Merci aux stagiaires qui m'ont prêté main forte sur le terrain et au laboratoire : Raphaël, Adrien, Bénédicte et Cédric, Nabil, et Maximilien, bonne route à vous.

Une partie de ce travail n'aurait pas été possible sans Agnès Vallier qui m'a accueilli avec bienveillance et enthousiasme au BF2I. Un seul merci ne suffirait pas pour Christian Miquel, l'homme-ressource du LECA-GPB dont les qualités humaines et professionnelles sont indispensables à ce laboratoire. Merci à Stéphanie Zundel pour son aide précieuse. Merci à Aziz et à Guy pour leur optimisme et leur « force tranquille » qui resteront un exemple et un point de repère.

Merci aux potes footeux du LECA pour ces parties endiablées, salvatrices tant pour ma santé physique que morale : Antoine, Fred, Seb, Julien, Saeid, Abde, PF, Amandine... Je n'oublie pas Jean-Marie, mon prof de saxo deluxe à l'occasion.

Merci à Antoine Carlier, tout au début de ce parcours, pour son amitié et sa zénitude lors de notre initiation aux AFLPs et au ski ! Merci à Albano Beja-Pereira pour sa bonne humeur internationale et les discussions passionnantes aussi bien en science qu'en politique ou en gastronomie ! Merci à Olivier Lontin et à Aurélie Bonin pour leur amitié indéfectible. Merci à la famille Nicolè de m'avoir accueilli et soutenu. Merci à Danielle et Claude pour les gènes et l'environnement !

Enfin, merci à toi Florence de m'avoir poussé à persévérer et d'avoir toujours cru que je pouvais mener cette aventure à son terme. Je n'y serai pas arrivé sans toi : cette thèse est aussi la tienne.

Ce n'est pas le doute qui rend fou : c'est la certitude. – Nietzsche

Un enfant de six ans comprendrait ça !. . .Qu'on m'amène un enfant de six ans ! – Groucho Marx

Ceci n'est pas une thèse. – Magritte (Apocryphes)

Table des matières

Table des figures **xi**

Liste des tableaux **xiii**

Introduction générale

1 Diversité et adaptation des insectes phytophages 4
1.1 Diversité et plantes-hôtes 4
1.2 Généralistes, spécialistes et composantes de l'adaptation 5
1.3 Comprendre pour prédire, comprendre pour contrôler ? Ravageurs phytophages et aspects économiques 10
2 L'organisme d'étude : le grand charançon du Pin, *Hylobius abietis* 10
2.1 Position systématique 10
2.2 Répartition et habitat : de la forêt à l'agrosystème forestier, les différentes échelles d'étude 11
2.3 Caractéristiques générales de l'écologie d'*Hylobius abietis* 14
2.4 L'hylobe et ses plantes-hôtes 16
2.5 Importance économique : exploitation forestière et *Hylobius abietis* 22
3 Bases et objectifs de ce projet de recherche 24

Chapitre 1
Génétique des Populations d'*Hylobius abietis*

1.1 Introduction 28
1.2 Matériel et méthode 31
1.2.1 Sites d'étude et échantillonnage 31
1.2.2 La technique AFLP et le protocole utilisé 33
1.2.3 Méthodes d'analyse des données 35
1.3 Résultats 37
1.3.1 Polymorphisme AFLP 37

1.3.2 Une forte diversité génétique intra-groupe 37
1.3.3 Une faible différenciation inter-groupes 39
1.3.4 Structure génétique et structure géographique 41
1.3.5 Tests d'assignation 41
1.4 Discussion 41
1.4.1 L'échantillonnage 41
1.4.2 Diversité génétique intra-population 43
1.4.3 Dispersion chez *Hylobius abietis* 43
1.4.4 Le rôle de la plante-hôte 45
1.5 En résumé 48

Chapitre 2
Discrimination et choix de la plante-hôte chez *Hylobius abietis*

A. Olfactométrie 52
2.1 Introduction 52
2.1.1 Les relations sémiochimiques chez les insectes phytophages 52
2.1.2 Attraction allélochimique par la plante-hôte 52
2.1.3 Écologie olfactive chez le grand charançon du pin 54
2.1.4 Problématique et questions 57
2.2 Matériel et méthodes 59
2.2.1 Le dispositif olfactométrique 59
2.2.2 Matériel animal 59
2.2.3 Matériel végétal 59
2.2.4 Conditions expérimentales 59
2.2.5 Déroulement des expériences 60
2.2.6 Critères de réponse et méthodes d'analyse 61
2.3 Résultats 61
2.3.1 Expérience I 64
2.3.2 Expérience II 65
2.3.3 Expérience III 65
2.4 Discussion 72
2.4.1 Les insectes 72
2.4.2 Les végétaux 72
2.4.3 Conditions expérimentales et réponse des insectes dans le dispositif 73
2.4.4 Les insectes parviennent-ils à discriminer les essences selon les effluves émises par des plantules ? 74
2.4.5 Influence de l'origine géographique sur la réponse des insectes 76

2.4.6 Perspectives 76
B. Choix de ponte 77
2.5 Introduction 77
2.6 Matériel et méthode 78
2.6.1 Test n° 1 : évaluation de la survie des pontes sur les bûches au cours du temps 78
2.6.2 Test n° 2 : choix de ponte des hylobes landais 79
2.6.3 Test n° 3 : choix de ponte sur bûchettes : étude de l'influence de la nourriture 79
2.6.4 Test n° 4 : transplant des oeufs sur bûches 80
2.7 Résultats et discussion 80
2.7.1 Test n° 1 80
2.7.2 Test n° 2 : choix de ponte des insectes landais 81
2.7.3 Test n° 3 : ponte sur bûchettes 81
2.7.4 Test n° 4 : transplant des oeufs 84
2.7.5 Bilan 85
2.8 En résumé 86

Chapitre 3
La bactérie et le charançon : une vieille alliance ?

3.1 Introduction 90
3.1.1 Symbiose et endosymbiose 90
3.1.2 L'endosymbiose bactérienne *sensu stricto* chez les insectes 91
3.1.3 La symbiose chez *Hylobius abietis* 94
3.1.4 Problématique et questions 94
3.2 Matériel et méthodes 95
3.2.1 Matériel animal 95
3.2.2 Obtention des séquences des insectes-hôtes 95
3.2.3 Obtention des séquences bactériennes 95
3.2.4 Histologie 97
3.2.5 Analyses phylogénétiques 99
3.3 Résultats 101
3.3.1 Morphologie du bactériome larvaire et histologie 101
3.3.2 Analyses phylogénétiques 104
3.4 Discussion 109
3.5 En résumé 111

Conclusion générale et perspectives

1 Bilan 115
1.1 Degré de spécialisation d'*Hylobius abietis* : de l'état et du processus . . . 115
1.2 Intérêt pour les gestionnaires forestiers ? 118
2 Limites, écueils et propositions pour les contourner 118
2.1 Le biais entomocentriste 118
2.2 Atouts et limites de l'outil moléculaire pour l'étude d'une espèce non-modèle 119
3 Perspectives : idées et propositions 120
3.1 Interaction avec les micro-organismes symbiotiques 120
3.2 Vers une approche comparative 121
3.3 *Hylobius abietis* : Dr Sapro' et Mr Xylo', ou le conflit potentiel entre biodiversité et exploitation forestière 122

Annexe A Annexe de l'introduction générale **125**

Annexe B Annexe du Chapitre 1 **127**

Annexe C Annexe du Chapitre 2 **129**

Annexe D Annexe du Chapitre 3 **133**

Bibliographie **137**

Table des figures

1 Position systématique d'*Hylobius abietis* et de quelques congénériques d'importance économique 12
2 Cycle de vie d'*Hylobius abietis* et périodes de dégâts causés par les adultes . . . 16
3 Répartition naturelle de *Picea abies* et *Pinus sylvestris* 19
4 Répartition naturelle de *Picea abies* et *Pinus sylvestris* 21
5 Synopsis de l'exploitation d'une parcelle forestière et dynamique de pullulation d'*Hylobius abietis* 22

1.1 Comparaison de la résolution taxinomique des AFLP avec d'autres marqueurs moléculaires 30
1.2 Localisation géographique des 20 sites échantillonnés en Europe. 32
1.3 Test d'assignation 46
1.4 Critères de définition de la race-hôte selon Drès et Mallet 49

2.1 Petit lexique des écomones 53
2.2 Niveaux de sélection de la plante-hôte par *Hylobius abietis* 55
2.3 Schéma de l'olfactomètre à quatre voies 58
2.4 Expérience I - Durée relative moyenne de séjour dans les voies (%) 62
2.5 Expérience I - Graphique d'interaction entre les facteurs Voie et Nourriture . . . 63
2.6 Expérience I - Fréquentation privilégiée des individus nourris avec du pin sylvestre 67
2.7 Expérience I - Fréquentation privilégiée des individus nourris avec de l'épicéa de Norvège 67
2.8 Expérience II - Durée relative moyenne de séjour dans les voies 69
2.9 Expérience III - Durée relative moyenne de séjour dans les voies 71
2.10 Masse larvaire selon l'essence 82
2.11 Histogramme des masses larvaires 82
2.12 Densité de larves sur les deux essences 83
2.13 Test n° 1 : ANOVA hiérarchique 83

3.1 Topologie de référence d'après Lefèvre 2004 100
3.2 Morphologie du bactériome chez *Hylobius transversovittatus* 102

3.3 Histologie de l'endosymbiose bactérienne chez *Hylobius abietis* 102
3.4 Histologie de l'endosymbiose chez *Hylobius abietis* 103
3.7 Graphique de l'exploration des topologies 105
3.5 Estimation des relations phylogénétiques des insectes hôtes basé sur le COI . . . 106
3.6 Position des endocytobiotes d'*Hylobius* sur l'arbre phylogénétique des endocytobiotes des Dryophthorinae 107

B.1 Principe de la technique AFLP 128

C.1 Code de la procédure SAS utilisée pour traiter les données d'olfactométrie 130
C.2 Dispositif de choix de ponte sur bûchettes 131

D.1 Synopsis de la reconstruction phylogénétique de l'arbre des endocytobiotes 136

Liste des tableaux

1.1 Détail de l'échantillonnage 34
1.2 Corrélation des indices de diversité génétique intra-groupe 37
1.3 Indices de diversité intra-groupe 38
1.4 Distance de Nei et test exact de différenciation par paire de sites 40
1.5 AMOVA 42

2.1 Matériel végétal, animal et configuration des tests d'olfactométrie 58
2.2 Individus retenus pour les analyses 58
2.3 Expérience I - Résultat de l'analyse de variance en modèle mixte 62
2.4 Expérience I - Test des durées de séjour des insectes dans les voies de l'olfactomètre 63
2.5 Expérience I - Fréquentation des voies par les insectes 66
2.6 Expérience I - Test des durées de séjour des insectes dans les voies de l'olfactomètre selon le type de nourriture reçue 66
2.7 Expérience II - Résultat de l'analyse de variance en modèle mixte 68
2.8 Expérience II - Test des durées de séjour des insectes dans les voies de l'olfactomètre 68
2.9 Expérience II - Fréquentation des voies par les insectes 68
2.10 Expérience III - Résultat de l'analyse de variance en modèle mixte 70
2.11 Expérience III - Test des durées de séjour des insectes dans les voies de l'olfactomètre 70
2.12 Expérience III - Fréquentation des voies par les insectes 70
2.13 Résumé des expérimentation de choix de ponte chez *Hylobius abietis* 78
2.14 Dispositif et nature des insectes du test 1 78
2.15 Test n° 1 : dénombrement et stade de développement des insectes à l'écorçage des bûches 81
2.16 Test n° 2 : Dénombrement et stade de développement des insectes à l'écorçage des bûches. 84
2.17 Test n° 3 : Test binomial du choix de ponte selon la diète de la femelle 84
2.18 Test n° 4 : ANOVA sur les résultats de transplant des oeufs 85

3.1 Incidence d'endosymbiotes bactériens à travers certains *taxa* d'insectes 92
3.2 Évolution du génome des symbiotes 98
3.3 Modèle d'évolution des séquences de Galtier et Gouy 98

3.4 Taux de GC dans les séquences d'ADNr 16S des endocytobiotes 108
3.5 Résultat des tests des taux d'évolution de l'ADNr 16S des endocytobiotes d'Hylobius par rapport aux autres lignées bactériennes avec RRTree 108

B.1 Séquence des oligo-nucléotides utilisés pour l'AFLP 128

D.1 Séquence des amorces utilisées pour le séquençage de l'ADNr 16S bactérien . . . 134
D.2 Numéro d'accession des séquences de COI des insectes-hôtes 134
D.3 Séquence des amorces utilisées pour le séquençage de l'ADNmt d'*Hylobius abietis* 135
D.4 Séquence du COI de l'ADNmt d'*Hylobius abietis* 135

Cadre et motivation de la thèse

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du LECA, Laboratoire d'Écologie Alpine, de l'Université Joseph Fourier de Grenoble. Ce laboratoire s'est bâti autour du désir de comprendre le fonctionnement des populations, des communautés, et des écosystèmes, afin de fournir un cadre théorique et pratique pour la gestion de la biodiversité en interface avec les activités humaines. Plus précisément, j'ai intégré l'équipe « Génomique et Biodiversité des Populations », qui s'intéresse principalement à analyser les niveaux populationnel et génétique de la biodiversité, pour comprendre les mécanismes de l'adaptation locale et fournir une aide à la gestion des espèces.

Bien que le grand charançon du pin, *Hylobius abietis*, mobilise de nombreux acteurs du monde de la recherche ainsi que du secteur de l'exploitation forestière depuis le début du siècle dernier, il est apparu que certains points de la biologie de cet insecte restaient obscurs. La « thématique *Hylobius abietis* » est apparue au LECA sous la double impulsion de Laurence Després et Guy Lempérière et est née de la complémentarité de leurs compétences scientifiques et de leurs domaines d'intérêt. Cette précision n'est pas anecdotique car mon travail a évolué sous ces deux éclairages. Si il faut admettre que l'assimilation, la conciliation et la cohabitation des ces deux courants n'ont pas toujours été évidents, j'espère néanmoins que cette particularité constitue une des forces de ce travail.

Introduction générale

Ce travail se propose d'apporter des éléments de compréhension de l'adaptation d'un insecte phytophage, ravageur d'importance économique, à son environnement. La première partie de cette introduction abordera les concepts, enjeux et particularités de l'étude de l'adaptation chez les insectes herbivores. La partie suivante, présentera l'insecte étudié et les éléments connus de sa biologie au travers des spécificités de son milieu de vie et des problèmes qu'il pose pour l'exploitation des forêts de conifères. Cela permettra enfin de présenter plus précisément les questions ayant guidé cette étude et d'annoncer les développements obtenus.

1 Diversité et adaptation des insectes phytophages

La relation entre les insectes et les plantes a donné lieu a de très nombreux travaux. Une première explication à ce succès d'estime est vraisemblablement de nature quantitative. En effet, le règne végétal et la classe des insectes représentent deux groupes de poids dans la biosphère, aussi bien par l'abondance de leurs espèces que par leur biomasse. L'étude de leurs interactions a permis des avancées considérables sur des questions fondamentales en écologie évolutive mais l'intérêt qui leur est porté provient également du fait que les insectes phytophages sont les principaux compétiteurs de l'homme pour la ressource végétale. Ces avancées conceptuelles offrent désormais en retour des outils pour une compréhension plus fine des systèmes impliquant l'interaction des insectes et des plantes, systèmes sur lesquels l'homme influe, notamment à travers le développement de l'agriculture depuis le néolithique.

1.1 Diversité et plantes-hôtes

Les insectes phytophages constituent un groupe d'organismes vaste et très diversifié, représentant environ 25% des espèces décrites actuellement (Farrell, 1998). Cependant, cette situation est probablement sous-estimée puisqu'une grande partie des espèces d'insectes seraient encore à décrire, des estimations portant le nombre total à 30 millions d'espèces (Erwin, 1982), bien que d'autres, plus récentes, revoient ce chiffre à la baisse, entre 5 et 10 millions (Odegaard, 2000).

La compréhension de l'évolution et du maintien d'une telle diversité renvoie à celle du monde végétal, à la manière dont les insectes l'exploitent et aux interactions entre ces deux groupes. Cette compréhension a ainsi bénéficié de l'élaboration des concepts de niche écologique (Hutchinson, 1959) et de co-évolution entre plantes et insectes (Ehrlich et Raven, 1964; Thompson, 1994).

Les insectes phytophages montrent une grande diversité d'adaptations pour se nourrir de la ressource végétale. La gamme d'hôtes d'un insecte phytophage est donc un trait particulièrement important de sa biologie. Les insectes associés à une seule espèce végétale ou à un faible nombre, sont qualifiés de monophages tandis que les oligophages exploitent des espèces taxonomiquement proches et les polyphages ne montrent pas de choix privilégiés. Cependant, dans de nombreux cas, la plante ne se limite pas à une source de nourriture pour l'insecte : elle sert par exemple de protection physique contre les prédateurs et les contraintes environnementales en fournissant parfois des micro-habitats ou sert aussi de lieu de rencontre pour les partenaires sexuels. On comprend donc que l'association avec les plantes peut influencer de nombreux traits de la biologie de l'insecte phytophage, la dynamique de ses populations et, par voie de conséquence, ses interactions avec les autres espèces herbivores, les prédateurs et les parasites.

La majorité des insectes phytophages a tendance à se spécialiser sur un hôte végétal particulier (Schoonhoven *et al.*, 1998). Ils seraient donc plutôt des spécialistes que des généralistes (Futuyma et Moreno, 1988; Jaenike, 1990). En effet, même si les espèces généralistes sont loin d'être rares, Fox et Morrow (1981) ont montré que de nombreuses espèces généralistes sont spécialisées

localement sur certains hôtes. Outre une spécialisation adaptative spatiale, une spécialisation adaptative temporelle existe également. Un exemple récent a été montré chez une espèce d'Orthoptère, *Schistocerca emarginata* (Orthoptera : Acrididae), par ailleurs connue pour consommer de nombreuses plantes de familles très éloignées, mais dont les stades juvéniles se sont révélés être spécialisés à une plante particulière les rendant impropres à la consommation par leurs prédateurs (Dopman *et al.*, 2002). Cet exemple est d'autant plus marquant que la plupart des espèces du groupe des Orthoptères sont considérées comme des espèces généralistes en raison de leur mode de consommation des plantes par « broutage », souvent associé à la polyphagie.

En fait, un fort degré d'adaptation est souvent considéré comme une évidence de la spécialisation. Les individus d'une même espèce végétale peuvent constituer des ressources hétérogènes pour les insectes. Par exemple, les plantes-hôtes longévives constituent des ressources uniques auxquelles les insectes peuvent s'adapter et se spécialiser localement (van Zandt et Mopper, 1998). Cette « adaptation locale » serait fréquente chez les insectes peu mobiles et endophages qui sont plus soumis que les autres aux pressions de sélection liées à la plante (Mopper, 1996). L'adaptation à un hôte particulier est une étape clé dans la formation de « races-hôtes » dont de récentes études montrent l'importance dans la spéciation sympatrique (voir les revues de Drès et Mallet, 2002; Berlocher et Feder, 2002).

Si la diversité spécifique des insectes phytophages semble donc fortement liée à la spécialisation, les causes de la prévalence des spécialistes sur les généralistes restent en débat. La capacité des insectes phytophages à évoluer vers des adaptations permettant de se spécialiser ou au contraire d'être généraliste apparaît ainsi comme un critère crucial pour la compréhension de la création et du maintien de la biodiversité.

1.2 Généralistes, spécialistes et composantes de l'adaptation

Le concept de spécialisation n'a de sens que sous un aspect comparatif selon lequel les espèces d'insectes herbivores peuvent être placées le long d'un gradient spécialiste-généraliste. Les facteurs qui vont promouvoir l'évolution des adaptations de l'insecte vers un caractère généraliste ou spécialiste ont fait l'objet de plusieurs revues dans la littérature et sont parfois désignés comme les facteurs contraignant l'évolution de la niche vers un élargissement ou une restriction(Futuyma et Moreno, 1988; Jaenike, 1990; Nosil, 2002). Chez les insectes phytophages, ces facteurs potentiels sont bien cernés mais la vérification expérimentale des hypothèses associées n'est pas abondante pour chacun d'eux (Strauss et Zangerl, 2002). Une explication à ces disparités tient sans doute d'une part dans la difficulté à séparer les influences des différents facteurs, et d'autre par à ce que la spécialisation est à la fois un état et un processus.

Compétition Les contraintes biologiques imposées par les autres espèces ont également été envisagées et la modélisation mathématique a très tôt montré que la compétition pour les ressources tendait à favoriser la spécialisation (MacArthur et Levins, 1964). Cependant, la compétition interspécifique est rare chez les insectes phytophages (voir la section 9.4.1 dans Schoonhoven *et al.*,

1998) et n'est donc pas un facteur explicatif.

Prédation Les schéma d'association des insectes phytophages avec les plantes pourraient aussi être influencés par les interactions avec les niveaux trophiques supérieurs. Par exemple, l'étude de Dyer (1995) a montré que c'est la chimie de la plante et la manière dont les chenilles sont capables de l'utiliser pour se défendre contre leurs prédateurs qui jouerait un rôle prépondérant dans l'évolution de la gamme d'hôtes de certains papillons tropicaux. Plus récemment, l'étude de Lill *et al.* (2002) a montré que la spécialisation à des gammes d'hôtes particuliers chez les Lépidoptères des forêts tempérées constituerait un atout important pour échapper à leurs parasitoïdes. Dans ce cas, le principal mécanisme sous sélection serait l'émission de substances volatiles d'origine végétale lors du nourrissage des chenilles et utilisées par les parasitoïdes pour les repérer (ceci serait valable pour les prédateurs spécialisés plus précisément).

Gestion des substances alléochimiques La théorie de la défense chimique[1] propose que la spécialisation de l'insecte est requise afin de surmonter les défenses chimiques des plantes (Swain en 1977 dans Holmgren et Getz 2000). Les spécialistes physiologiquement adaptés pour détoxifier les substances spécifiques de leur plante-hôtes pourraient se nourrir plus effacement. Ainsi, la chimie de l'hôte explique-t-elle bien les motifs macro-évolutifs d'utilisation des plantes par les insectes (Becerra, 1997; Becerra et Venable, 1999).

Gestion de l'information L'hypothèse du « traitement de l'information[2] », qui motive de nombreuses études récentes (voir la revue de Bernays, 2001), postule que l'évaluation et la recherche d'un grand nombre de plantes-hôtes potentielles seraient accompagnées de coûts favorisant la spécialisation de l'insecte (Janz et Nylin, 1997; Holmgren et Getz, 2000). Contraints par les limitations inhérentes à leur système neurologique, les insectes ne pourraient pas réaliser efficacement à la fois une discrimination de plusieurs plantes-hôtes et se tenir vigilants face à leurs ennemis naturels : la pression de sélection des prédateurs agirait indirectement par ce levier en faveur d'une restriction de la gamme d'hôte selon Bernays (2001). Plus récemment, Janz (2003) a montré chez des souches plus ou moins spécialisées d'un papillon, *Polygonia c-album*, que le coût du traitement de l'information pourrait plus précisément peser sur les décisions de la femelle lors de l'oviposition : en effet, le manque de discrimination des femelles généralistes ne serait pas compensé par un gain de temps favorisant une plus grande fécondité réalisée. Au niveau interspécifique, une étude comparative menée sur une quinzaine d'arthropodes de la canopée (insectes et acariens) a montré que les espèces les plus spécialisées sont caractérisées par des traits biologiques et d'histoire de vie en accord avec un autre modèle d'optimisation du temps et de l'information[3](Prinzing, 2003).

[1] « Chemical defence theory » en anglais
[2] « Information processing hypothesis » en anglais.
[3] Le « Time-limited disperser model » (Jaenike, 1990)

Compromis de performance Cependant, le mécanisme le plus fréquemment invoqué pour expliquer la prévalence de la spécialisation est l'existence d'une base génétique pour des compromis[4] de performance entre différents habitats (Jaenike, 1990; Fry, 1996; Scheirs *et al.*, 2005). Selon ce mécanisme, l'adaptation à un habitat donné entraînerait une performance relative inférieure dans les habitats alternatifs en raison de l'action antagoniste pléiotropique d'un ou de plusieurs gènes (Fry, 1996). Ainsi, il serait impossible de trouver un génotype maximisant le succès de son porteur dans plusieurs habitats différents à la fois. La sélection naturelle favorisera alors la spécialisation. Deux types d'approches sont principalement employées pour vérifier ce mécanisme : la recherche d'une corrélation génétique à partir d'échantillonnage de populations naturelles (par exemple chez la Chrysomèle alpine *Oreina elongata* (Coleoptera: Chrysomelidae), Ballabeni *et al.*, 2003) et/ou des expériences de sélection (voir par exemple le cas de la coccinelle herbivore, *Epilachna vigintioctomaculata* (Coccinellidae : Epilachninae) (Ueno et Fujiyama, 1999)). Des expériences de sélection sur d'autres arthropodes herbivores que les insectes, telles que celle de Agrawal (2000) sur des acariens de l'espèce *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae), ont montré l'existence de « trade-offs » de performance entre plantes-hôtes. Cependant, les études supportant ce mécanisme restent rares chez les insectes phytophages (voir la revue de cas dans l'article de Scheirs *et al.*, 2005). En fait, la majorité des études s'intéressent à l'influence de la plante-hôte sur les performances des larves au détriment de l'influence sur celles des adultes, négligeant ainsi l'action éventuelle antagoniste pléiotropique de gènes liés aux performances des adultes (Scheirs *et al.*, 2005).

Un autre mécanisme génétique conduisant à la spécialisation implique l'accumulation de mutations qui sont neutres dans l'habitat ou sur la plante principale mais se révèlent délétères dans les habitat marginaux. Ceci a été montré à l'aide de modèles mathématiques (Kawecki *et al.*, 1997), mais un support empirique n'aurait pour l'instant été apporté que chez des bactéries (voir les citations dans Kassen, 2002).

La question de l'architecture génétique sous-tendant la spécialisation a ainsi été abordée par une cartographie des *loci* reliés à une variation de caractères quantitatifs (QTL pour « *Quantitative Trait Loci* »). Cependant, ces études restent rares en raison des contraintes expérimentales, notamment l'obtention de lignées statistiquement conséquentes pour les croisements. Il n'est donc pas surprenant que ce soit chez une espèce de puceron, *Acyrthosiphon pisum pisum* (Hemiptera : Aphididae), pour laquelle on connaît des sous-espèces associées à différents plantes-hôtes, que l'existence de groupes de liaison entre régions chromosomiques impliquées dans la performance et le choix du site d'accouplement, ait pu être mise en évidence (Hawthorne et Via, 2001). Il faut toutefois remarquer que ces approches restent du type « top-down », i.e. allant depuis le phénotype vers le gène et que les approches « bottom-up », encore désignées comme approches par « gène candidat », sont encore plus rares chez les insectes phytophages. Toutefois, les progrès en biologie structurale des protéines et en modélisation de leur fonction permettent désormais de poser la question de la spécialisation au niveau enzymatique. Ainsi, Li *et al.* (2004)

[4]Ici utilisé pour l'expression anglaise « trade-off ».

ont comparé chez deux espèces de papillons, l'une très spécialisée (*Papilio polyxenes*), et l'autre généraliste (*Helicoverpa zea*), les structures et fonctions des protéines du complexe cytochrome P450 impliqué dans la métabolisation des substances allélochimiques produites par les plantes pour leur défense : les protéines de l'espèce généraliste se sont révélées structurellement plus diverses et donc capables de défendre l'insecte contre une plus grande gamme de composés toxiques. Cette versatilité enzymatique favoriserait donc la polyphagie.

Pourquoi des généralistes La compétition intraspécifique peut être un facteur de généralisation par exemple dans le cas de fortes populations larvaires (Jaenike, 1990). D'autres facteurs seraient à même de favoriser le caractère généraliste chez les insectes phytophages. Ainsi, un habitat rare ou imprévisible favoriserait la polyphagie (cependant voir Beccaloni et Symons, 2000). Par exemple, Cronin *et al.* (2001) ont montré que les variations environnementales stochastiques d'une année sur l'autre affectent le phénotype de clones de *Solidago altissima* (donc avec le même génome) d'une manière telle que la préférence et la performance des mouches cecidogènes, *Eurosta solidaginis*, fluctuent dans des proportions importantes ce qui ne leur permet pas de se spécialiser. Par ailleurs, des difficultés nutritionnelles pour obtenir un régime équilibré et une grande quantité de ressources disponibles favoriseraient également une stratégie généraliste (Jaenike, 1990).

Une vision plus nuancée pose le problème du degré de spécialisation des insectes, non pas comme le résultat d'une propriété intrinsèque de l'hôte ni de l'insecte mais plutôt comme le résultat de l'interaction des deux (Singer et Parmesan, 1993). Les différents travaux de Singer (1983, 2000) mettent en garde contre une vision entomo-centrée autant que phyto-centrée (quoique plus rare) pour envisager l'évolution de la diète chez les insectes phytophages. D'une manière similaire le concept de « compromis de performance » comme moteur la spécialisation reçoit de plus en plus de soutien empirique de la part d'études considérant les relations tritrophiques (voir la revue de Singer et Stireman, 2005). Ainsi par exemple, la situation paradoxale observée initialement chez certaines populations de la chrysomèle alpine qui montraient une corrélation négative entre préférence et performance sur deux hôtes s'explique par le fait que les larves trouvent sur une plante une meilleure nourriture et sur l'autre un meilleur abri contre les prédateurs ; un hôte unique ne fournissant pas toutes les conditions optimales pour les différents stades de vie de l'insecte (Gotthard *et al.*, 2005).

Il ressort de ce tour d'horizon que les facteurs influençant la gamme d'hôtes des insectes phytophages peuvent être différenciés selon qu'il s'inscrivent dans une dynamique écologique ou dans une dynamique évolutive. Cependant l'ordre dans lequel les différents aspects de l'adaptation à l'habitat évoluent n'est pas évident. En effet, les traits d'importance écologique peuvent être à la fois les causes et les cibles de la sélection naturelle. Par exemple, (Sandoval et Nosil, 2005) ont montré chez deux espèces de phasmes du genre *Timea* que la préférence d'hôte a évolué sous l'influence d'adaptations morphologiques avant l'existence de compromis physiologiques. C'est pourquoi une approche plus opérationnelle pour étudier la spécialisation chez les

insectes phytophages a été proposé récemment par plusieurs auteurs : Singer et Stireman (2005) proposent le cadre des relations tri-trophiques et Irschick *et al.* (2005) proposent de considérer trois composantes principales de la spécialisation : une composante écologique, fonctionnelle et comportementale.

Composante écologique Une simple liste des ressources ou des proies disponibles est insuffisante ; il est crucial d'intégrer la variation spatiale de leur disponibilité et leur prédictabilité pour interpréter leur impact. La capacité de l'insecte à se déplacer jusqu'à la ressource est également un critère important. S'il est vrai que peu de choses en écologie n'ont de sens en dehors d'un contexte spatial, c'est particulièrement vrai pour les insectes qui sont parfois considérés comme « esclaves de leur environnement » (Loxdale et Lushai, 1999). La structure géographique qui peut être définie comme la distribution et l'abondance de génotypes inter- et intra-population (Roderick, 1996), est la résultante de processus démographiques et génétiques. C'est pourquoi, l'examen de la structure géographique des populations d'insectes, notamment au moyen de marqueurs moléculaires appropriés, constitue une approche majeure pour l'étude de l'adaptation des insectes herbivores (Via, 1990).

Composante comportementale Prendre en compte cette composante c'est intégrer le fait que le comportement peut agir comme un filtre entre la morphologie (ou la physiologie) et la performance, résultant en de complexes interactions entre les deux. Le nombre d'habitats occupés ainsi que la présence d'autres espèces peut contraindre les comportements et leurs conséquences sur le degré d'adaptation de l'espèce (Irschick *et al.*, 2005). Les comportements des insectes sont loin d'être aussi simplistes que l'on a pu le croire. Par exemple, la capacité d'apprentissage qui peut changer les préférences d'oviposition d'une femelle envers différentes plantes-hôtes pourrait être adaptative et constituer une part importante de la stratégie d'exploitation des plantes par les insectes (Cunningham et West, 2001). Bon nombre de comportements chez les insectes phytophages étant médiés par les odeurs (Visser, 1986), la question de la perception olfactive est une approche fondamentale de l'adaptation des insectes à leur environnement, surtout quand ils évoluent dans un paysage olfactif complexe (voir le cas de certains insectes forestiers, Byers, 2004).

Composante fonctionnelle Selon la définition de Irschick *et al.* (2005) les spécialistes fonctionnels ne peuvent effectuer avec efficacité que quelques tâches (contraints par leur morphologie ou leur physiologie) alors que les généralistes peuvent en effectuer un plus grand nombre suffisamment bien pour se maintenir dans leur habitat. Ceci a jusqu'ici principalement été abordé sous l'angle de l'habitat thermique (voire du microhabitat) trouvé sur les plantes (Huey, 1991; Prinzing, 2003). Par ailleurs, comme on l'a vu plus haut, la nature chimique des plantes-hôtes joue un rôle prépondérant dans l'intérêt qu'elles représentent pour les insectes phytophages. L'apparente abondance de la biomasse végétale n'implique évidemment pas que celle-ci soit uniformément accessible et utilisable par les insectes. En effet les insectes doivent composer avec

la qualité nutritive des tissus disponibles sur la plante hôte et l'existence de métabolites secondaires que la plante élabore pour se défendre des agressions des herbivores (Strauss et Zangerl, 2002). Cette composante de l'adaptation des insectes phytophages est depuis peu réexaminée au travers des interactions interspécifiques qu'ils engagent avec des micro-organismes symbiotiques, comme par exemple chez les pucerons (Douglas, 1998) ou chez certains Scolytides (Klepzig et Six, 2004).

1.3 Comprendre pour prédire, comprendre pour contrôler ? Ravageurs phytophages et aspects économiques

Comme cela a été évoqué en introduction de ce chapitre, de nombreuses espèces d'insectes sont également des ravageurs des cultures économiquement importants. Parmi ces insectes phytophages, certains (par exemple *Ragholetis pomonella*) ont incorporé seulement récemment (durant les dernières centaines d'années) des espèces cultivées dans leur régime alimentaire, illustrant la capacité de leurs populations à réaliser une adaptation écologique à un nouvel hôte de manière très rapide. Certaines études récentes sur l'isolement reproductif associé à l'hôte végétal impliquent de tels insectes (Thomas *et al.*, 2003), ce qui montre le potentiel de ces espèces agricoles à évoluer sur des échelles de temps humaines.

Ainsi, les systèmes insectes-plantes constituent des modèles pour l'étude de nombreux aspects de l'écologie et de l'évolution : compétition, compromis évolutifs, risques d'extinction, radiation adaptative et co-évolution. En retour, la prédiction et la prévention de l'émergence de nouveaux ravageurs des cultures pourra bénéficier de la compréhension des mécanismes biologiques sous-tendant la divergence écologique et la spéciation.

La question du potentiel adaptatif et de l'évolution de la niche des espèces est cruciale dans un contexte de changement global et des changements rapides imposés par l'homme aux espèces : introduction d'espèces, restructuration du paysage, fragmentation, pressions de sélection par les pesticides. En ce sens, si les agro-écosystèmes sont des « arènes de l'évolution » selon Via (1990), ce sont également des terrains d'étude stratégiques des impacts des activités humaines.

2 L'organisme d'étude : le grand charançon du Pin, *Hylobius abietis*

La taxonomie et la position systématique d'*Hylobius abietis* et des autres charançons corticophages d'intérêt économique en Europe a fait l'objet d'un chapitre de livre qui est reproduit en annexe 1 (pp146 et suiv.) de ce document.

2.1 Position systématique

Le grand charançon du pin, *Hylobius abietis*, appartient à la vaste famille des Curculionidae (environ 60000 espèces). La famille des Curculionidae inclut la majorité des espèces des Curculio-

noidea et peut être considérée comme le groupe taxonomique le plus dérivé de cette super-famille qui est elle-même le groupe le plus dérivé parmi les Coléoptères. La plupart des travaux récents sur la phylogénie des Curculionoidea utilisant l'analyse de données moléculaires et de nouvelles données morphologiques (caractéristiques larvaires, morphologie interne) et incluant un grand nombre d'échantillons de Curculionidae, montrent une faible résolution des relations à l'intérieur de cette famille (Marvaldi, 1997; Marvaldi *et al.*, 2002). La figure 1 (page 12) présente la position systématique d'*Hylobius abietis* au sein de la famille des Curculionidae.

Il existerait une cinquantaine d'espèces à travers le monde appartenant au genre *Hylobius* (Hoffman, 1958). Plusieurs d'entre elles revêtent également une importance économique[5]. Ainsi, parmi les espèces remarquables de la zone paléarctique, on trouve *H. pinastri*, *H. piceus* et *H. transversovittatus*, dans une large partie de l'Europe et *H. xiaoi* en Chine. *H. transversovittatus* est la seule espèce du genre *Hylobius* à ne pas être associée à un conifère puisqu'elle vit dans les racines de l'herbacée pérenne *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae). Cette espèce n'est pas nuisible en Europe mais est utilisée comme agent de lutte biologique contre sa plante-hôte invasive en Amérique du Nord (Blossey, 2000 ; McAvoy et al, 2002). *H. pinastri* est moins abondant qu'*Hylobius abietis* et montre une distribution plus nordique (Eidmann, 1974 ; Lidelow et al, 1993 ; Langström, 1982). Sa biologie est similaire à celle de *H. abietis*, bien que *H. pinastri* semble préférer les pessières humides (Nordlander, 1990). *H. piceus* est observé sur mélèze et sur pin sylvestre, en Sibérie et en Europe du Nord principalement (Eidmann, 1974 ; Langström, 1982) bien que des occurrences soient signalées dans les Alpes françaises dans la région du Queyras (Lempérière, comm. pers.). La biologie de *H. xiaoi* vient d'être décrite en raison de son récent statut de ravageur lié à l'exploitation de *Pinus elliottii* en Chine (Xiaosui *et al.*, 2004).

En France, deux variétés locales sont notées par Hoffman (1950), *H. albonotatus* et *H. rugulosus* mais leur statut reste incertain.

Dans la zone néarctique, on trouve six espèces connues pour leur dégâts : *H. assimilis*, *H. congener*, *H. pales* (Cameron, 1988), *H. warreni* (Cerezke, 1994), *H. pinicola* (Grant, 1996).

Comme le soulignent Day et al (2004), il existe des différences claires entre les membres du genre *Hylobius* selon la niche exploitée pour le développement larvaire. En effet, les larves de *H. piceus*, *H. radicis*, *H. warreni* et *H. xiaoi* se développent sur le collet d'arbres sains et *H. assimilis* sur des racines encore en vie, alors que *H. pinastri*, *H. pales* et *H. congener* se développent sur les racines d'hôtes mourant ou récemment morts, comme *Hylobius abietis*.

2.2 Répartition et habitat : de la forêt à l'agrosystème forestier, les différentes échelles d'étude

Le genre *Hylobius* est présent aussi bien dans la zone paléarctique que dans la zone néarctique (cf *supra*). L'espèce *abietis* est largement répartie dans les forêts de conifères en Europe, y compris les îles britanniques, et en Asie, surtout de façon septentrionale. La taïga septentrionale

[5]Toutes ne sont pas « nuisibles » aux activités humaines : *Hylobius transversovittatus* est utilisé comme agent de lutte biologique en Amérique du Nord

Sous-famille : Molytinae Schoenherr, 1823
Tribu : Hylobiini Kirby, 1837
Sous-tribu : Hylobiina Kirby, 1837
Genre : *Hylobius* Germar, 1817 (espèce type : *Curculio piceus* De Geer, 1875)
Synonymies du Genre : *Hypomolyx* LeConte, 1876 ; *Hylobitelus* Reitter, 1923 ; *Polyaunbus* Kôno, 1934
Sous-genre : *Hylobius* Germar, 1817
Espèces :
- *H. abietis* Germar, 1817
- *H. pinastri* Gyllenhal, 1813
- *H. piceus* De Geer, 1775
- *H. transversovittatus* Goeze, 1777
- *H. assimilis* Boheman,
- *H. congener* Dalla Torre, 1932
- *H. pales* Herbst, 1797
- *H. pinicola* Couper, 1864
- *H. radicis* Buchanan,
- *H. warreni* Wood, 1957
- *H. xiaoi* Zhang,

FIG. 1 – Position systématique d'*Hylobius abietis* et de quelques congénériques d'importance économique. D'après Lempérière *et al.* (2004b)

est d'ailleurs supposée être l'habitat ancestral de cet insecte. Il serait cependant actuellement présent jusque dans les forêts de conifères du nord de l'Espagne. Sa diffusion a été vraisemblablement favorisée par l'aménagement des forêts de conifères pour leur exploitation. Ainsi l'habitat de l'hylobe a connu une évolution récente (moins de deux siècles) due aux activités humaines.

Pour comprendre la nature de cette évolution et les conséquences sur la biologie de l'hylobe, il est nécessaire faire un rapide tour d'horizon de l'évolution récente de cet habitat.

La forêt en Europe à travers les âges A la fin de la dernière glaciation, les steppes recouvrent majoritairement l'Europe occidentale. Le radoucissement du climat concourt à la reconquête des terres par les arbres qui profitent des périodes plus chaudes et humides. Aux espèces pionnières, saules, bouleaux, mélèzes et pins, succèdent progressivement des espèces plus exigeantes, chênes, ormes ou tilleul principalement, ayant profité de l'enrichissement du sol par leurs prédécesseurs. Les essences d'ombre telles que le hêtre ou le sapin se répandent alors à la faveur du couvert forestier. Le développement de l'agriculture au néolithique lance le début de l'élimination d'une partie de la forêt pour libérer des terres cultivables qui seront maintenues dégagées par le pâturage du bétail. Durant le XIX^{e} siècle, la transition d'un usage agricole des terres forestières vers un usage industriel a eu des retentissements majeurs sur l'écosystème forestier. En Europe, les efforts se concentrent sur la composition de peuplements forestiers

adaptés à la production et à l'abattage ainsi que sur le contrôle des eaux.

Le cas des conifères Les travaux de Agnoletti et Anderson (2000) rapportent que la phase la plus importante de l'expansion des conifères en Europe semble s'être déroulée au XIXème siècle. Cette expansion reposa sur le besoin croissant en bois d'ouvrage, sur le développement de théories sylviculturales favorisant les peuplements équiennes de conifères, mais aussi sur des successions secondaires voyant les conifères remplacer d'anciens pâturages et champs. Des conifères tels que l'épicéa, le sapin et les pins croissent bien plus vite qu'un chêne et produisent des grumes droites et régulières plus facilement exploitables par les scieries. L'industrie papetière apprécie particulièrement le bois des résineux, de qualité supérieure aux feuillus pour cet usage. L'accroissement des boisements de résineux est spectaculaire à l'échelle écologique dans certains pays. En France, par exemple, sous l'impulsion d'un organisme chargé du reboisement, le *Fond Forestier National*, près de 2 millions d'hectares (forêt équienne et pure) sont plantés entre 1946 et les années 90 (Decourt, 1999).

Forêts naturelles et forêts aménagées Il faut donc distinguer la forêt naturelle de la forêt dite aménagée. Les forêts d'Europe ont connu une perte de diversité biologique liée aux pratiques intensives de gestion des forêt pour favoriser la production de bois. En Europe, la forêt naturelle, primitive ou encore primaire n'existe plus que sous forme de vestiges de superficie réduite, notamment en Scandinavie et en Europe centrale (Dajoz, 1998). Partout ailleurs les méthodes de sylviculture ont conduit à un remodelage de la forêt afin d'optimiser leur exploitation. Cette optimisation affecte autant la nature du peuplement que sa structure. Ainsi, les parcelles monospécifiques sont préférées aux peuplements hétéroclites. Cette logique d'uniformisation vaut aussi pour l'âge des arbres (on parle de plantation équienne) pour une exploitation simultanée de tous les arbres d'une parcelle. La forêt aménagée ne présente plus ces caractéristiques de la forêt primaire : l'hétérogénéité horizontale, liée à la juxtaposition de parcelles d'âges et de structures différents et l'hétérogénéité verticale, due à la présence d'arbres d'âges, de hauteur et de diamètres différents. Dans la forêt cultivée, le forestier procède alors à une « coupe rase » encore appelée « coupe à blanc ». Tout ceci permet une exploitation mécanisée des parcelles forestière et garantit un rendement économique plus important. De plus, la perte de diversité a été accentuée par la pratique de la régénération artificielle avec sélection des individus replantés. A cela, il faut ajouter les effets de l'enlèvement systématique des arbres morts et de la coupe avant maturité sur la complexité biologique et la diversité des espèces présentes dans l'habitat forestier.

Cependant, le modèle de la « forêt normale », en imposant la régénération des zones déboisées a quand même permis de réduire en Europe la perte de couvert forestier et favorisé la tendance à l'accroissement des forêts, tendance qui s'est poursuivie jusqu'à nos jours (Source : FAO Unasylva 2002).

Il faut ajouter que cette logique agrosystémique influence également le peuplement forestier dans sa dynamique temporelle. Ainsi il faut distinguer le cycle sylvigénétique du cycle sylvicultural d'un peuplement forestier. La sylvigénèse désigne la succession de différentes phases

par lesquelles passe la forêt naturelle pour se régénérer. A l'opposé, le cycle sylvicultural d'un boisement est *a contrario* rythmé par l'intervention humaine. Il pourra donc y avoir autant de cycles que de méthodes de sylviculture. Il faut bien admettre que cette culture de la forêt (ligniculture) s'apparente de plus en plus aux pratiques agricoles intensives. Les insectes vivent donc en quelque sorte dans un « agrosystème forestier » même si, en raison de la longévité des arbres cultivés, cela n'est pas aussi perceptible que pour un champ de graminées.

2.3 Caractéristiques générales de l'écologie d'*Hylobius abietis*

Des articles de synthèse des connaissances sur la biologie et l'écologie d'*Hylobius abietis* ont été réalisées par Leather *et al.* (1999) et plus récemment par Day *et al.* (2004), Schlyter et par Wainhouse dans un ouvrage de synthèse paru il y a peu (2004, édité par Lieutier *et al.*), fruit de la collaboration des experts Européens sur les insectes corticophages et xylophages nuisibles aux arbres vivants (Bark and Wood Boring Insects in Living Trees).

Le cycle de vie de l'hylobe est illustré par la figure 2, page 16.

2.3.1 L'adulte

Morphologie et dimorphisme sexuel L'adulte possède un rostre, caractéristique des Curculionidés, allongé, légèrement arqué, à l'extrémité duquel se trouvent les pièces buccales. Les antennes insérées à l'extrémité de ce rostre, sont coudées, se terminent en massue et leur premier article peut se rétracter dans un sillon latéral du rostre (scape). De forme générale oblongue, l'imago mesure de 8 à 15 mmm, ses téguments sont noirs et ses élytres, striées et ponctuées portent des squamules jaunes. Les fémurs sont claviformes, dentés et les tibias sont équipés d'un éperon interne permettant à l'insecte de s'agripper fermement à la plante. Le sexe est reconnaissable à la présence d'une dépression sur le premier et le dernier segment de l'abdomen du mâle en face ventrale.

Longévité, comportement Les adultes qui ont déjà connu une saison de reproduction peuvent passer l'hiver dans la litière forestière et vivre jusqu'à quatre ans (Eidmann, 1979). Les femelles sont fertiles tout au long de leur vie et montrent un tropisme positif pour l'humidité. Les comportements de recherche de nourriture et d'oviposition ont leur optimum thermique autour de 20 à 25°(Nuorteva, 1972).

Sex-ratio L'examen de la littérature consacrée à *Hylobius abietis* révèle plusieurs inconsistances dans l'établissement du *sex-ratio* et un auteur a trouvé des indices d'une reproduction parthénogénétique (Szmidt, 1983), cette piste n'a cependant pas été exploitée plus avant. Plusieurs autres auteurs ont noté sur le terrain un sex-ratio biaisé en faveur des mâles au stade adulte. Christiansen (1971) a trouvé des sex-ratio constamment supérieurs à 1 sur quatre sites de reforestation au cours de l'été (1,76 $\pm$ 0,82). L'auteur avançait comme explication qu'à cette période les femelles étaient occupées à pondre et passaient une grande partie de leur temps

en dessous de la surface du sol. Par ailleurs des études antérieures menées sur le terrain par piégeage, que ce soit sur des sites de régénération ou sur des sites de coupe, montrent également des *sex-ratio* supérieurs à 1. Les piégeages dans les scieries pendant la période d'essaimage font également mention de *sex-ratio* très supérieurs à 1 en début de phase d'envol. Sur l'ensemble de la période d'essaimage les mâles seraient plus nombreux que les femelles.

2.3.2 Les stades préimaginaux

Le développement d'une génération exige un à deux ans en France et trois à cinq ans dans le Nord de l'Europe.

L'oeuf Dans les conditions naturelles, la femelle utilise son rostre pour forer une galerie et déposer un oeuf dans l'écorce d'un arbre dépérissant au-dessous de la surface du sol près des racines ou du collet. Cependant, la femelle peut également pondre son oeuf dans l'humus à proximité de la plante. La toute jeune larve doit alors traverser la couche de sol pour rejoindre son biotope. Dans les forêts exploitées, les pontes ont fréquemment lieu sur la face inférieure (la plus humide) des grumes abattues non écorcées.

La larve Pareillement aux larves endophages des coléoptères Cerambycidae, les larves des charançons ont perdu le développement d'appendices locomoteurs (Farrell, 1998). La larve d'*Hylobius abietis* est caractéristique des Curculionidae, courbée, de couleur crème, et sans appendices locomoteurs. Elle se déplace peu. Pour se nourrir elle creuse des galeries dans le liber et laisse derrière elle une traînée de sciure digérée : le « frass ». Son développement passe par 5 stades larvaires (Bejer-Petersen *et al.*, 1962). Elle atteint une longueur de 1 à 2 centimètres à la maturation. La vitesse de développement est fortement influencée par la température : un phénomène de quiescence, ou de diapause est susceptible de se produire en région nordique. Arrivée à la fin de son développement, la larve creuse une logette au niveau de l'aubier. Les parois de cette logette sont alors tapissées de déjections et constituent le berceau qui abritera la nymphe. La galerie qui mène à cette logette de nymphose est oblitérée par un bouchon de copeaux de bois non digérés.

La nymphe La nymphe, de couleur blanchâtre se développe dans cette logette. Lors de la mue imaginale, elle se fend dorsalement pour laisser l'adulte se dégager de l'enveloppe. L'imago est alors de couleur rougeâtre, tacheté de blanc, et ses téguments sont encore mous. Il se pigmentera et se durcira peu à peu avant de sortir du berceau par un orifice qu'il creusera dans l'écorce.

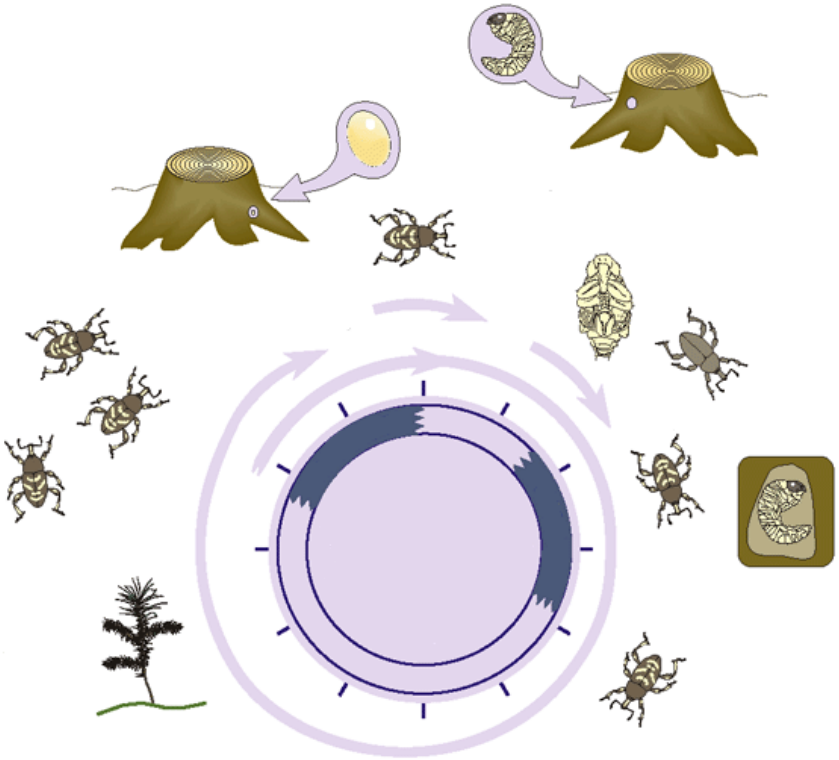


FIG. 2 – Cycle de vie d'*Hylobius abietis* et périodes de dégâts causés par les adultes
Source : Forestry Commission UK.

2.4 L'hylobe et ses plantes-hôtes

Se nourrir et se développer à l'intérieur des tissus de conifères (branches et/ou troncs) constitue très vraisemblablement le mode de vie initial des larves de Curculionoidea (Marvaldi *et al.*, 2002). En effet, l'association des charançons avec les conifères apparaît comme un caractère ancestral et remonte au moins au Jurassique (-203 à -135Ma) ou plus tôt (Marvaldi *et al.*, 2002). *Hylobius abietis* présente donc au moins deux caractéristiques primitives pour les Curculionides : l'association avec des conifères et le développement strictement endophage de sa larve.

Les adultes de *Hylobius abietis* sont capables de se nourrir des jeunes rameaux dans la couronne des arbres (Örlander *et al.*, 2000) mais on les retrouve aussi parfois au niveau des inflorescences qu'ils consommeraient également (J-Y Fraysse, communication personnelle). Ces organes étant particulièrement riches en nutriments, ils ont probablement constitué une des premières sources de nourriture pour les imagos au cours de l'évolution des charançons (Marvaldi *et al.*, 2002).

Le charançon du...? Le nom latin d'espèce de l'hylobe, *abietis*, peut conduire à une fausse piste concernant ses plantes-hôtes. En français *Hylobius abietis* est appelé le plus souvent « grand

Charançon du Pin » ou encore « Hylobe du pin », mais on le trouve parfois sous l'appellation de « Charançon du Sapin »(Zahradnik et M, 1991). Cependant, les sapins, genre *Abies*, ne font pas partie du régime alimentaire de l'hylobe : les morsures recensées sont très rares et semblent fortuites (Guy Lempérière, communication personnelle) et le développement des larves n'a jamais été relevé. L'hylobe devant son nom d'espèce à un certain Karl von Linnaeus, on peut douter qu'il y ait eu méprise sur la nature de sa plante-hôte... Au delà de l'anecdote, la disjonction entre l'appellation de l'insecte et ses préférences révèle une part d'ombre surprenante sur ce point crucial de sa biologie.

Un insecte polyphage ? En raison des dégâts que les adultes peuvent occasionner sur de nombreuses essences forestières, *Hylobius abietis* est présenté comme un insecte hautement polyphage par certains auteurs (Langstrom et Day, 2004). Cependant, d'autres auteurs décrivent *Hylobius abietis* comme une espèce oligophage dès lors qu'ils prennent en compte le critère de la préférence nutritive des adultes (Mansson et Schlyter, 2004). Au delà de la discussion sur la définition de l'oligophagie ou de la polyphagie, il apparaît que les caractéristiques du ravageur qui s'expriment dans un environnement modifié par l'homme, la forêt cultivée, sont parfois abusivement étendues aux caractéristiques de l'espèce. L'hylobe n'est pas un vrai phytophage généraliste au sens où il montrerait un usage non discriminant des végétaux. Selon cette définition, les vrai généralistes sont d'ailleurs rares parmi les insectes phytophages. L'exemple de certains Orthoptères est souvent donné en illustration de ce mode de vie caractérisé par un « broutage » des végétaux. Certes, l'hylobe est libre de consommer de nombreuses plantes au cours de sa vie mais sa larve effectuant tout son développement sur une seule plante, une partie de son cycle de vie au moins est strictement monophage.

Bien que les conifères aient la préférence des adultes de l'hylobe, ils sont capables de consommer l'écorce de feuillus tels que le frêne *Fraxinus excelsior* et le bouleau *Betula pendula* (Manlove *et al.*, 1997; Mansson et Schlyter, 2004).

Deux conifères privilégiés : *Pinus sylvestris* et *Picea abies* Si on restreint la définition de la plante-hôte à l'essence sur laquelle les femelles pondent et qui va par conséquent accueillir le développement larvaire et la métamorphose, alors il apparaît que deux espèces sont majoritairement utilisées par le charançon : le pin sylvestre, *Pinus sylvestris* L., et l'épicéa de Norvège, *Picea abies* Karst. Le pin sylvestre est l'essence de conifères européens la plus largement répandue, étant présente dans la presque totalité de l'Europe et dans une large partie nord de l'Asie (voir figure 3b, page 19). L'épicéa de Norvège possède également une vaste répartition naturelle en Europe (figure 3a, 19). Dans la région fennoscandinave, qui est la plus durement touchée par les dégâts de l'hylobe , les deux conifères indigènes dominants sont le pin sylvestre et l'épicéa. En plus de la dominance naturelle des ces essences, celles-ci constituent également des choix privilégiés pour les cultures de conifères. L'épicéa est largement utilisé dans les programmes de reforestation, aussi bien dans les montagnes que dans les plaines. Ainsi, en France, l'épicéa est présent bien en dehors de son aire naturelle, comme le montre la figure 4, page 21.

Outre que ces deux essences sont largement rencontrées par le charançon sur la majeure partie de son aire de répartition, elles semblent également offrir les meilleures performances aux charançons : par exemple, la fécondité de femelles nourries au laboratoire est trois à quatre fois plus importante avec du pin sylvestre et de l'épicéa de Norvège qu'avec de l'épicéa de Sitka (*Picea sitchensis*) ou du sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), deux autres essences prisées dans la culture des conifères (Wainhouse *et al.*, 2001). Cependant, les différences entre pin sylvestre et épicéa de Norvège ne sont pas claires ainsi que le montrent les résultats contradictoires de certaines expériences : les femelles nourries au pin sylvestre seraient deux fois plus fécondes d'après Guslits (1970) (publication en Russe) mais la tendance inverse est observée par Wainhouse *et al.* (2001).

Étant donné que le stade larvaire de l'insecte ne cause pas de dégâts économiquement significatifs, peu de travaux lui ont été consacrés en regard de ceux sur l'adulte. Cela est sans doute lié à la difficulté d'observer le développement pré-imaginal sur la plante-hôte. Cependant, quelques études ont utilisé des rondins enterrés pour comparer l'attractivité relative d'essences de conifères ainsi que leur « productivité » en insectes. L'étude de Langström (1982) a montré que le pin sylvestre accueillait significativement plus d'adultes que l'épicéa de Norvège. Cependant, dans cette étude les rondins, disposés sur des sites de coupe rase, étaient recouverts de branchages et il n'est pas possible de démêler l'attraction relative des deux types de matériel végétal qui correspondent chacun à une phase distincte de la vie de l'insecte (i.e., recherche de nourriture et oviposition). L'étude menée par Bejer-Petersen *et al.* (1962) en Norvège, Suède, Finlande et Danemark, sur un nombre considérable (n=2485) de rondins enterrés de pin sylvestre et d'épicéa ne permet de juger de leur attractivité respective qu'indirectement. En effet, les effectifs relevés sont ceux des différents stades larvaires et s'ils se révèlent similaires pour les deux essences cette méthode ne prend pas en compte le nombre d'oeufs déposés ainsi que le succès d'éclosion. Par exemple, Thorpe et Day (2002) trouvent que si le succès d'éclosion des oeufs au laboratoire sur bûches et significativement plus grand sur épicéa de Sitka que sur pin de Corse les chances de survie larvaire sont inversées par la suite. Il reste que le résultat principal de l'étude de Beje-Petersen *et al.* concerne la durée de développement larvaire qui serait globalement plus lente sur épicéa de Norvège que sur pin sylvestre, avec cependant une forte influence régionale. Ce résultat sera plus tard confirmé par Guslits (1970) qui ajoute que la durée de vie des adultes émergeant d'épicéa de Norvège serait plus courte que sur pin sylvestre. Dans une étude sur les populations larvaires des souches menée au moyen de tentes à émergence, von Sydow et Birgersson (1997) montrent que plus de charançons tendent à émerger des souches de pin sylvestre que de celles d'épicéa de Norvège mais admettent que cette différence pourrait reposer en partie sur la différence de date d'abattage. On voit la difficulté de tester de telles hypothèses en conditions « naturelles ». Ce résultat est contradictoire avec ceux de Saintonge et Malphettes (1996) qui trouvent une productivité en insectes par m^2 d'écorce très significativement supérieure sur rondins d'épicéa par rapport à celle de rondins de pin sylvestre, sur plusieurs sites. Ces résultats contradictoires sont peut être dus à difficultés expérimentales pour

désimbriquer tous les facteurs mais aussi peut être à des adaptations locales des populations d'insectes aux conditions environnementales ou à aux types d'arbres.

On le voit, si certains résultats sont concordants, il reste des incertitudes concernant la préférence et la performance des hylobes relativement à ses deux plantes-hôtes principales et aux régions où elles se trouvent.

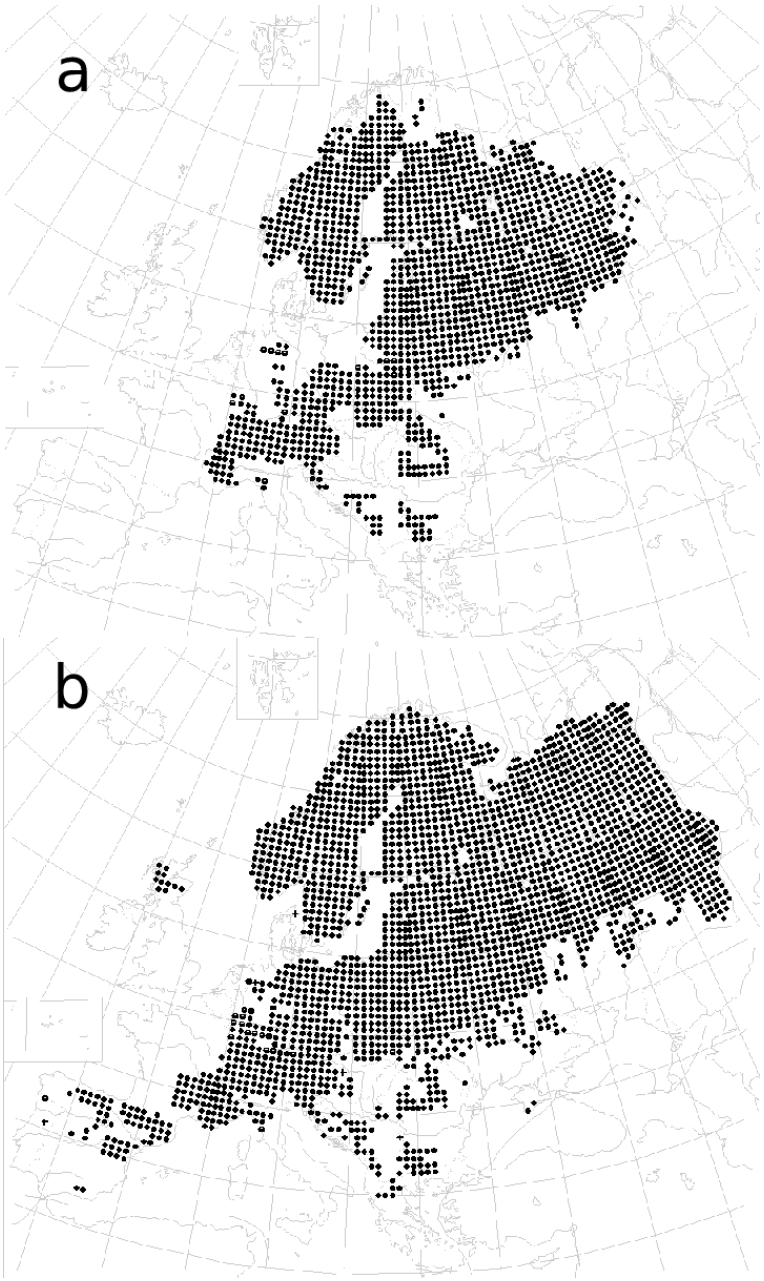


FIG. 3 – Cartes de répartition naturelle de *Pinus sylvestris* et *Picea abies*
a : *Picea abies*, **b** : *Pinus sylvestris*. Source : Flora Europea.

Un substrat de ponte et de développement particulier Le bois mort ou mourant constitue un substrat de développement particulier à plusieurs égards. Voyons rapidement quelques-unes de ces particularités qui vont contraindre l'écologie et l'évolution de *Hylobius abietis*.

Occurrence spatiale Dans un contexte de forêt exploitée, la rareté est le premier critère qui vient à l'esprit concernant le bois mort. Par exemple, Marage et Lempérière (2005) ont montré dans les Alpes du Sud françaises que le volume de bois mort sur pied n'est que de $15{,}8\pm6{,}0 m^3.ha^{-1}$ dans les hêtraies-sapinières exploitées alors qu'il est de $64{,}6\pm19{,}8 m^3.ha^{-1}$ dans des peuplements inexploités de même nature. Cette rareté spatiale et quantitative s'ajoute au caractère éphémère de cette ressource dû à la dégradation progressive de l'arbre. Ce substrat possède également d'autres caractéristiques contraignantes pour les organismes qui s'y développent, notamment liées à sa qualité chimique et à ses propriétés nutritives.

Qualité chimique Si on considère le substrat de développement de l'hylobe, il semble que cet insecte se situe en dehors de la course co-évolutive [6] aux armements avec sa plante-hôte. En effet, il est peu probable que les arbres élaborent des substances de défense ciblées spécifiquement contre les insectes les consommant après leur mort. L'évolution des substances chimiques appelées composés secondaires découle de la pression de sélection exercée par les organismes herbivores sur les sujets sains ou affaiblis. Les arbres consacrant une partie de leur métabolisme à la production de tels composés, non impliqués dans les fonctions primaires de leur biologie, sont mieux à même de survivre à des attaques d'herbivores. Leur capacité à produire une molécule protectrice sera transmise à leur descendance et les insectes devront en retour trouver des contre-mesures appropriées. Cependant, même si on peut penser que la dégradation des tissus de l'arbre est parallèle à la dégradation des composés secondaires, les insectes exploitant le bois mort sont vraisemblablement quand même en contact avec certaines de ces molécules, même si les concentrations sont moindres. Il est vraisemblable que ce soit particulièrement le cas des insectes des premiers stades de la mort de l'arbre. Par ailleurs l'évolution chimique du bois mort met les insectes face à une succession de produits de dégradation qui ne sont peut être pas neutres pour leur survie. Toutefois, à ma connaissance, peu ou pas d'études ont a l'heure actuelle exploré cette voie.

Qualité nutritive Le bois est composé en grande partie d'éléments qui sont inutilisables pour la plupart des animaux. En moyenne, la composition comprend 40 à 62% de cellulose (46,8% pour le pin sylvestre), 15 à 30% d'hémicellulose (25,3% PS) et de 18 à 38% de lignine

[6] Malgré tout, l'hypothèse d'une coévolution entre les conifères et des insectes tels que l'hylobe a été évoquée suite à des travaux récents en écologie chimique. Pettersson *et al.* (2005) suggèrent en effet que l'absence de composés volatiles terpéniques dans le spectre d'émission des très jeunes plantules pourrait être un trait évolué pour passer inaperçu (ou plutôt « insentit ») et ainsi échapper aux morsures avant que l'arbre ne soit suffisamment résistant pour y survivre. Seuls des « composés verts »sont émis, ce qui ne permettrait pas à l'insecte de différencier olfactivement les très jeunes plantules de conifères des végétaux environnants. Ce résultat confirme la situation des pépiniéristes dont les jeunes pousses en godets ne sont pas attaquées alors qu'elles sont cultivées sur des surfaces considérables en plein air (Comm. pers., Lempérière).

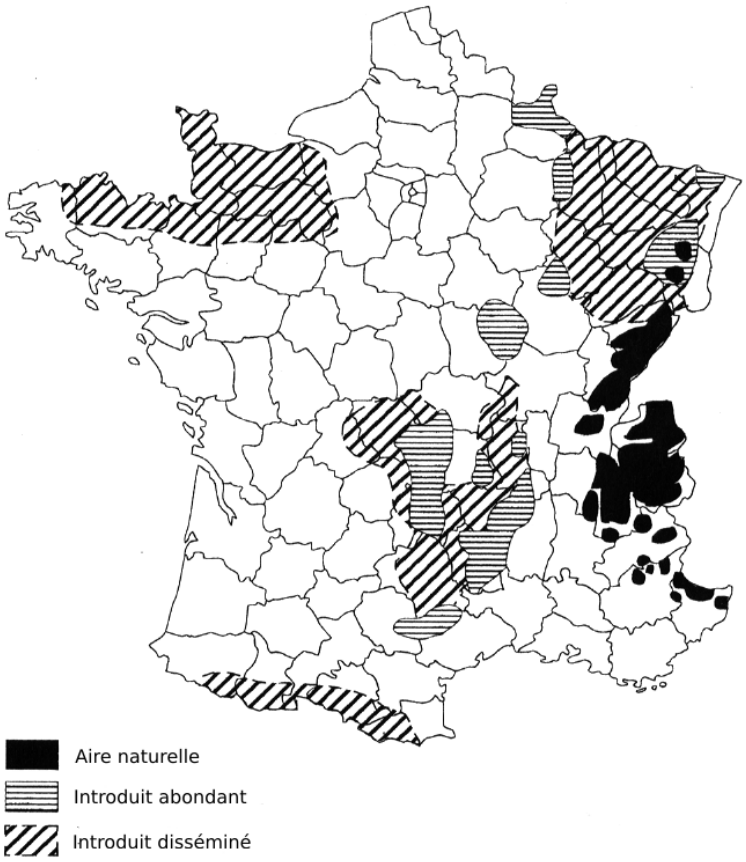


FIG. 4 – Aire de répartition de l'épicéa en France. D'après Jacamon dans Lempérière 1994.

(24,2% PS). La composition chimique du bois varie beaucoup au cours de sa décomposition : par exemple, le taux d'azote organique est faible dans le bois sain, augmente légèrement dans le bois carié et s'élève fortement dans le terreau de la cavité des arbres (Pesson, 1974). L'hylobe est considéré comme un coléoptère xylophage et on trouve ses larves sur les premiers stades de dégradation du bois. Les larves consomment de l'écorce qui est très pauvre en nutriments mais également les tissus sous-corticaux (zone cambiale) qui sont nettement plus riches mais aussi plus restreints, fragiles et éphémères et sont la cible de nombreux organismes (Hanks, 1999). Les micro-organismes et les champignons comprennent les seuls organismes, peu nombreux, à pouvoir métaboliser la lignine et la cellulose, c'est à dire à transformer ces molécules en énergie. Les larves de *Hylobius abietis* se trouvent donc face à un défi physiologique sur ce substrat de développement.

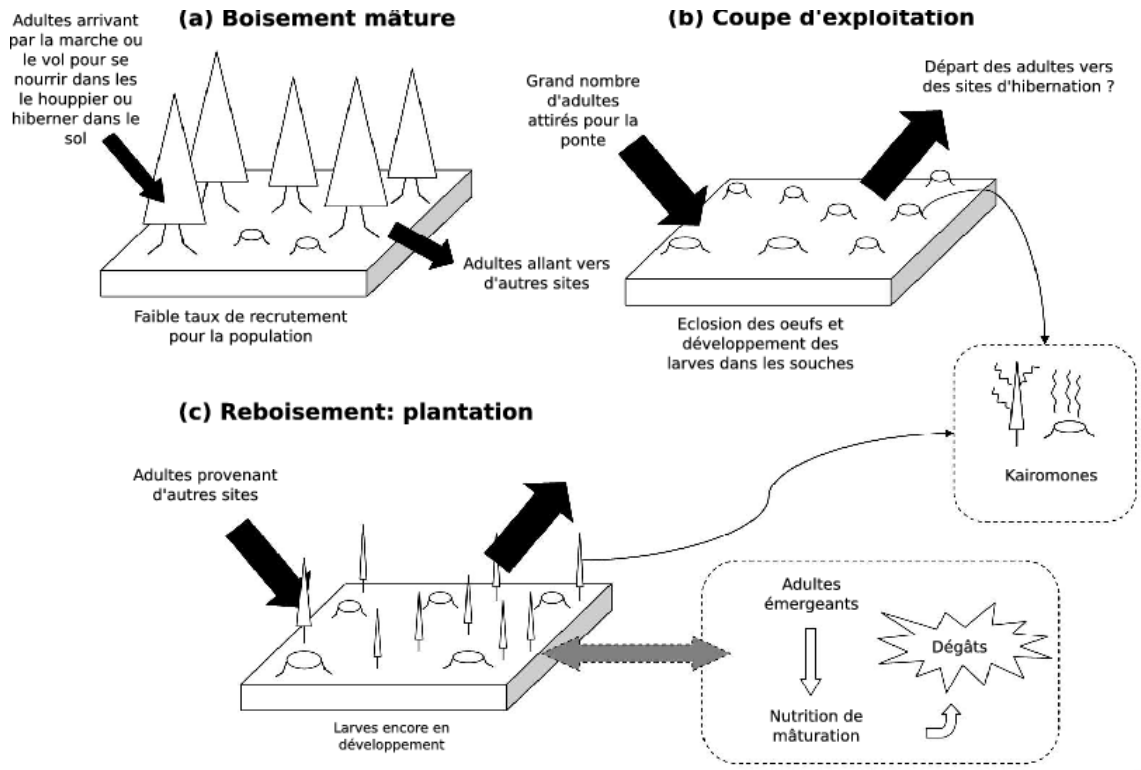


FIG. 5 – Synopsis de l'exploitation d'une parcelle forestière et dynamique de pullulation d'*Hylobius abietis*

Modifié d'après Leather (1999)

2.5 Importance économique : exploitation forestière et *Hylobius abietis*

2.5.1 La forêt cultivée : un réacteur à *Hylobius abietis*

Le cycle sylvicultural de la forêt exploitée est à l'origine du statut de ravageur d'*Hylobius abietis*. En effet, comme l'illustre la figure 5 page 22, ces pratiques favorisent les populations du charançon. Si les insectes sont naturellement attirés par les arbres mourant ou dépérissant à la suite d'une tempête (figure 5a), les sites de coupe-rase ou la concentration d'arbres abattus est encore plus importante, les attirent en masse (figure 5b). Les adultes se nourrissent habituellement sur les branchages grêles des arbres sains où leur dégâts sont sans danger pour la plante. Par contre, les jeunes arbres (entre 1 et 5 ans selon les essences) peuvent mourir si les morsures de nutrition sont nombreuses. La consommation de l'écorce et du phloème sur toute la circonférence de la tige ne permet plus à la sève de circuler et la plantule dépérit. Ainsi, les insectes attirés sur les sites de coupe-rase trouvent non seulement une grande quantité de sites de ponte et de développement, mais la re-forestation de ces sites garantit aussi une nourriture à proximité pour leur progéniture émergeant la saison d'après.

2.5.2 Stratégies de gestion du ravageur *Hylobius abietis*

Cette section ne prétend pas dresser un exposé exhaustif des techniques de contrôle et de lutte contre le grand charançon du pin mais souhaite donner des éléments de compréhension du « problème Hylobe » et des enjeux des recherches sur cet insecte. Au lecteur qui souhaiterait plus de précisions concernant ces questions je conseille la lecture du chapitre 19 de l'ouvrage consacré aux insectes du BAWBILT par Langstrom et Day (2004) qui présente une revue des dégâts et méthodes de contrôle d'*Hylobius abietis*.

La lutte contre *Hylobius abietis* : la course contre l'interdiction des insecticides Dans les pays qui pratiquent la coupe à blanc des parcelles forestières suivie d'une plantation de jeunes conifères, le traitement en pépinière des pousses au moyen d'insecticides est actuellement le seul moyen efficace de contrôle des dégâts du charançon. Le traitement direct lors d'une attaque sévère est également pratiqué mais ne constitue plus la principale méthode d'utilisation des insecticides. La législation européenne d'une manière générale se fait de plus en plus restrictive quant à l'usage des insecticides mais les substances homologuées varient selon les pays concernés. En France par exemple, deux types de pyrethroïdes de synthèse sont utilisés (la deltaméthrine et la perméthrine (Saintonge, 2005)) ainsi qu'une matière active de la famille des carbamates, le carbosulfan (Lempérière et Julien, 1989, 2003).

Protection des plants vs contrôle des populations du charançon Les divers dispositifs testés pour attirer et piéger les insectes (odeurs, rondins pièges) bien qu'utiles pour un suivi des infestations ne permettent pas de réduire significativement le nombre d'insectes lors d'infestations. Les efforts se sont donc portés sur les moyens de réduire les dégâts subis par les plants.

Contre-mesures sylviculturales Ces stratégies de contrôle agissent sur la méthode et le cycle d'exploitation ainsi que sur les caractéristiques physiques de la parcelle forestière. Les problèmes posés par *Hylobius abietis* sont liés au couple coupe à blanc / plantation et sont sensiblement réduits sur des parcelles de régénération naturelle. De même, la pratique dite de la « futaie jardinée » permet d'éviter la création de vastes zones d'abattage mais requiert un type de site particulier et ne permet pas une exploitation mécanisée facile. Par ailleurs, l'insertion de périodes de jachère de 2 à 4 années dans le cycle d'exploitation permet d'attendre l'épuisement de la population locale d'insectes, le substrat de ponte devenant progressivement impropre au développement. Une contre-partie à cette stratégie est la fermeture de la parcelle par d'autres végétaux dans l'intervalle.

Outre les stratégies d'exploitation, certaines méthodes de préparation de la parcelle comme la scarification du sol ou le dessouchage permettent également de réduire les dégâts occasionnés par les insectes bien que les causes ne soient pas encore clairement établies (Petersson *et al.*, 2005).

Résistance et protection des plantules Diverses techniques de protection mécanique des plants, en rajoutant une barrière physique anti-morsure autour de la tige, ont été envisagées mais la mise en place à une large échelle reste inappliquée car coûteuse. La sélection des plantules de conifères plus résistantes aux morsures est désormais explorée mais les connaissances pour développer cette approche restent à approfondir (Wainhouse, 2004). A l'heure actuelle la voie la plus prometteuse semble le développement de substances anti-appétantes qui pourraient être portées par des cires appliquées en pépinière à la base des pousses. Une exploration des substances présentes dans les espèces non-hôtes est actuellement en cours (Mansson et Schlyter, 2004). Cependant, l'existence d'effets phytotoxiques rend encore l'utilisation de la formulation délicate.

Ennemis naturels et contrôle biologique Le développement endophyte de la larve de l'hylobe la préserve de nombreux prédateurs potentiels. Néanmoins certaines guêpes parasitoïdes, comme *Bracon hylobii*, des nématodes et des champignons entomopathogènes nuisibles pour l'hylobe ont été recensés (voir la revue de Kenis *et al.* (2004)). Par ailleurs, des champignons saprophytes se développant sur le bois mort ont été identifiés comme compétiteurs des larves du charançons. Bien que l'utilisation de ces différents organismes comme agents de lutte biologique contre l'hylobe soit encore en cours d'exploration et que ces solutions n'aient pas été testées sur le terrain, il apparaît déjà que leurs caractéristiques ne permettent pas de réduire de manière suffisante les populations du charançon, du moins à l'échelle du paysage.

Vers un contrôle intégré ? Ce rapide tour d'horizon des solutions disponibles pour répondre au problème économique posé par *Hylobius abietis* montre qu'il n'en existe à l'heure actuelle aucune qui soit suffisamment efficace en elle-même hors l'usage d'insecticides. Cependant, l'arsenal des contre-mesures s'étend progressivement et des stratégies intégrant ces options voient le jour dans des pays comme la Pologne et la Suède. Le contrôle des populations du charançons sans avoir recours aux insecticides va nécessiter de développer des solutions spécifiques aux sites comme le soulignent Langstrom et Day (2004) mais le développement de ces solutions ne pourra pas faire l'économie d'une investigation plus précise de la biologie de l'insecte.

3 Bases et objectifs de ce projet de recherche

Une trompeuse richesse des connaissances Comme le soulignait déjà Julien (1995), « l'abondance de la littérature sur *Hylobius abietis* et l'ensemble des connaissances acquises ne doivent cependant pas masquer une certaine pauvreté ». Certes, depuis une dizaine d'années les connaissances sur *Hylobius abietis* ont progressé, mais souvent de manière indirecte comme par exemple l'étude des facteurs de risque des parcelles forestières exploitées face aux attaques de l'insecte (Heritage et Moore, 2001), ou encore l'influence de la date d'exploitation sur l'ampleur des pullulations (Moore *et al.*, 2004). Cependant, les lacunes dans la compréhension de la biologie de l'insecte se font sentir, surtout à cause de l'urgence de la situation créée par le déclassement de la plupart des insecticides jusqu'alors utilisés pour contrôler ses pullulations.

Par exemple, le déterminisme du choix de la plante-hôte et la dispersion des insectes entre les parcelles sont mal connus (Leather *et al.*, 1999).

Les raisons de cette pauvreté Il existe deux causes principales. Premièrement, la forte variation géographique de la biologie de l'insecte. Présent sur l'ensemble du continent Eurasiatique, l'hylobe expérimente de nombreuses conditions de vie, depuis un milieu presque méditerranéen dans le Sud de la France jusqu'à la Sibérie. Le second point découle de la complexité des relations entre l'insecte et les différents milieux de vie exploités au cours de son cycle de vie : l'adulte et la larve exploitent des ressources végétales différentes par leur nature, leurs caractéristiques chimiques et leur occurrence spatiale et temporelle.

Les défis de la recherche sur *Hylobius abietis* : Ainsi, le système *Hylobius abietis*-conifères pose d'emblée plusieurs défis :

- l'hylobe est un organisme non modèle, on ne dispose, par exemple, d'aucune connaissance sur son génome,
- la question du succès de cet insecte se pose à l'échelle d'un biome,
- la dynamique de population est perturbée par les épisodes de pullulation dans les forêts cultivées.

Les axes de recherche Clairement, l'adaptation et la spécialisation de cet insecte au milieu forestier, au bois dépérissant et à certaines essences de conifères en particulier pose nombre de questions complexes et ne peut pas être abordée par une seule approche comme cela a été montré en introduction. Les déplacements des insectes dans les formations forestières, leur capacité à localiser, à discriminer et à choisir les plantes-hôtes ainsi que les adaptations développées pour les exploiter seront les axes de ce travail. Afin d'apporter des éléments de compréhension au succès de l'hylobe comme ravageur forestier, ce travail se propose d'aborder :

1. la composante écologique sous l'angle de la structuration des populations dans l'environnement forestier selon différentes échelles géographiques et selon l'essence utilisée pour le développement larvaire, dans le chapitre 1,
2. la composante comportementale via l'étude du choix de ponte de la femelle et via la capacité de discrimination olfactive de ses plantes-hôtes, dans le chapitre 2, et finalement,
3. la composante physiologique de manière très indirecte par la recherche et la caractérisation d'alliés symbiotiques potentiellement impliqués dans l'adaptation au substrat de développement larvaire, dans le dernier chapitre.

Chapitre 1

Génétique des Populations d'*Hylobius abietis*

Sommaire

1.1 Introduction **28**
1.2 Matériel et méthode **31**
1.3 Résultats **37**
1.4 Discussion **41**
1.5 En résumé **48**

Les résultats de cette partie ont fait l'objet d'une publication acceptée dans la revue « Heredity » dont les épreuves, en cours de revue, sont données en annexe 2 (pp127 et suiv.).

1.1 Introduction

Dans le bilan qu'ils dressent des priorités de recherche sur les insectes du « BAWBILT », (Bark and Wood Boring Insects in Living Trees), Lieutier *et al.* (2004) soulignent qu'en dépit de l'importance des dégâts provoqués par les populations d'*Hylobius abietis* celles-ci restent néanmoins difficiles à traquer dans le temps comme dans l'espace. Dans le cas de cet insecte particulièrement, les auteurs insistent sur la nécessité d'approfondir la connaissance de la dynamique des populations et des forces biologiques et évolutives qui la contraignent et la façonnent. En effet, ces connaissances pourraient être cruciales pour la gestion de ce ravageur forestier.

Ces dernières années, l'utilisation des marqueurs moléculaires s'est accrue pour inférer des caractéristiques biologiques et écologiques d'insectes ravageurs, nécessaires pour établir des stratégies de gestion. Ainsi, il a été possible de mettre en évidence la dispersion à grande distance et la ré-infestation chronique des cultures par le charançon du coton (Kim et Sappington, 2004b) ou encore de clarifier le rôle de la plante-hôte comme barrière potentielle à la dispersion et à la colonisation d'une chrysomèle du saule, invasive en Grande Bretagne (Batley *et al.*, 2004). De plus, l'identification d'écotypes ou de races-hôte chez le ravageur étudié peut se révéler déterminant dans le succès des programmes de contrôle, notamment dans les systèmes où des végétaux OGM sont utilisés (Bourguet *et al.*, 2000). Concernant *Hylobius abietis*, l'occurrence de races-hôte pourrait être une information importante pour prédire la réponse de ce ravageur à des changements environnementaux tels que l'introduction de nouveaux cultivars de conifères, ou encore pour évaluer le succès d'agents de contrôle biologique tels que les nématodes entomopathogènes (Salinas, 2002).

En raison de la vaste aire de répartition d'*Hylobius abietis* à travers le continent Eurasiatique, il est probable que ses populations soient soumises à une gamme de pressions de sélection liées aux conditions climatiques et à la nature et la répartition de leur plante-hôte. Cette variation spatiale crée un potentiel pour une adaptation locale des populations. Cependant, la réalisation de ce potentiel dépend de la magnitude de la sélection au regard des effets antagonistes de la dérive génétique et du flux de gènes (Slatkin, 1973).

Ces forces évolutives n'agissent pas de manière similaire sur la totalité du génome. Ainsi, la dérive génétique affecte tous les *loci* de la même manière, alors que la sélection naturelle ne va s'exercer que sur certains gènes impliqués dans l'adaptation (Campbell et Bernatchez, 2004). L'adaptation locale tend à accroître la différenciation des populations aux *loci* où la sélection agit et de hautes valeurs de F_{ST} peuvent alors être observées à des *loci* neutres liés. L'analyse simultanée de multiples *loci* répartis dans le génome permet désormais de dissocier ces effets. C'est pourquoi nous avons choisi pour cette étude d'utiliser la technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) développée par Vos *et al.* (1995). En effet, cette technique

génère un grand nombre de marqueurs répartis à travers le génome. De plus, elle ne nécessite pas de connaissance a priori du génome et s'applique ainsi à des espèces non modèles.

Une analyse génomique de la différenciation des populations permet non seulement des inférences sur l'importance relative de la dérive génétique par rapport à la migration entre populations, mais permet aussi d'identifier la part adaptative de la différenciation entre populations expérimentant des environnements contrastés par la recherche de *loci* atypiques ou « outliers ». Des *loci* « outliers » montrent des valeurs de F_{ST} exceptionnellement hautes ou basses entre les groupes ou les individus selon les différents environnements (Beaumont et Nichols, 1996; Luikart *et al.*, 2003).

Notre étude aborde les points suivants de la biologie d'*Hylobius abietis* au moyen de l'analyse des patrons de diversité génétique de ses populations :

1) La structure génétique des populations est elle façonnée par une dynamique éruptive ?

Étant donnée la nature éphémère de son matériel de ponte (les souches ou arbres dépérissant), *Hylobius abietis* est présenté comme une espèce modérément éruptive (Speight et Wainhouse, 1989). Cela signifie que les populations connaissent des évènements périodiques de croissance explosive suivis par des chutes plus ou moins brutales des effectifs dès lors que les conditions redeviennent moins favorables. Selon la taille finale des effectifs, ces crashs populationnels peuvent générer des goulots d'étranglement conduisant à une diminution de la diversité génétique intra-population et une augmentation de la diversité inter-populations. La composition génétique peut également être fortement influencée par des effets fondateurs consécutifs à l'établissement de nouvelles populations à partir d'un faible nombre de migrants ou par des résidents présents en « bruit de fond ». Dans ce contexte, il apparaît que la dérive génétique peut jouer un rôle important dans la composition génétique d'une population donnée. Ainsi, la dérive génétique peut être responsable d'une diminution de la variation génétique à l'intérieur de groupes d'individus isolés géographiquement et accroître la différenciation génétique entre des populations isolées géographiquement sans qu'elles présentent la signature d'une isolation génétique par la distance (IBD : isolation by distance).

2) Alternativement, la structure génétique est elle façonnée par un fort mélange des populations ?

Le statut de ravageur d'*Hylobius abietis* est une conséquence directe des activités humaines dans les forêts cultivées, telles que la coupe à blanc qui fournit des conditions de vie favorables à l'insecte puisque les sites de ponte ne constituent plus une ressource limitée (Örlander *et al.*, 1997; Leather *et al.*, 1999). Par conséquent, il est possible que les populations d'*Hylobius abietis* se maintiennent un niveau constant dans les régions forestières fortement exploitées, où les sites de ponte sont par conséquent toujours disponibles. Ainsi, selon les capacités de dispersion de l'insecte, cette situation pourrait favoriser un fort mélange des gènes, reflété par une forte variabilité génétique intra-groupe et une différentiation génétique réduite entre groupes.

3) La plante-hôte de la larve agit elle comme un facteur sélectif ?

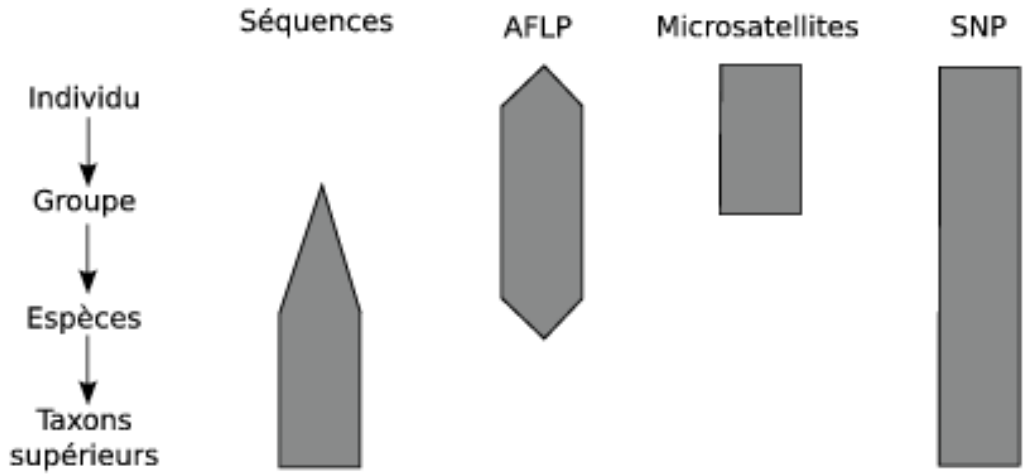


Fig. 1.1 – Comparaison de la résolution taxinomique des AFLP avec d'autres marqueurs moléculaires

(SNP : single nucleotid polymorphism)

La technique AFLP permet d'identifier des marqueurs ségrégeant avec des caractéristiques d'intérêt chez l'organisme étudié, par exemple, la résistance à un insecticide. Cette technique fournit ainsi un outil pour découvrir les gènes impliqués dans la caractéristique biologique d'intérêt. En effet, les bandes d'ADN identifiées peuvent être récupérées depuis un gel d'électrophorèse, clonées dans un vecteur, puis séquencées.

Chez les insectes phytophages, la répartition, la disponibilité et la longévité ou encore la chimie de la plante-hôte sont des facteurs majeurs responsables de la différenciation génétique des populations (Mopper, 1996; Zangerl et Berenbaum, 2003). Chez *Hylobius abietis*, des études récentes ont souligné l'influence de l'espèce de la plante-hôte sur le succès de développement larvaire (von Sydow et Birgersson, 1997; Thorpe et Day, 2002). Il existe en effet une considérable variation pour la mortalité larvaire, la durée de développement et le poids des adultes à l'émergence selon l'espèce-hôte (Thorpe et Day, 2002). Ceci peut affecter en retour le potentiel de dégâts de l'insecte mais peut aussi avoir pour effet d'atténuer le flux de gènes, même localement, si la sélection sur les hôtes alternatifs est assez forte pour promouvoir la formation et la divergence de groupes de charançons associés à la plante. Parmi les essences de conifères cultivées à travers le continent eurasiatique, l'épicéa de Norvège (*Picea abies* L. Karst) et le pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) ont une importance économique considérable et constituent les deux principales plantes-hôte pour *Hylobius abietis*. Leur distribution actuelle en Europe est principalement le résultat des plantations relativement récentes pour l'exploitation forestière et elles se superposent dans de nombreuses régions forestières telles que le Limousin et le Massif Central en France. En contraste, les populations d'*Hylobius abietis* connaissent un cas extrême de plantation monospécifique dans la forêt des Landes (sud-ouest de la France), qui est constituée depuis le XIX^{e} siècle de *Pinus pinaster* (Ait.) sur une superficie de 1 million d'hectares. Si la plante-hôte de la larve est effectivement une source de sélection diversifiante, on peut alors s'attendre à trouver une plus grande diversité génétique chez les populations établies dans des forêts mixtes que chez celles des forêts monospécifiques.

1.2 Matériel et méthode

1.2.1 Sites d'étude et échantillonnage

Les 367 charançons ont été collectés dans 20 sites à travers l'Europe : en Estonie, Finlande, France, Irlande et Pologne. En France, trois régions forestières ont été prospectées : Ardèche, Landes et Limousin. Les caractéristiques des sites d'échantillonnages sont résumées dans la table 1.1 (page 34) et leur localisation est pointée sur la figure 1.2 (page 32). Une vue plus détaillée de l'échantillonnage réalisé en France est donnée sur la figure 1.3, page 46. Parmi les 367 insectes génotypés, on compte 305 larves et 62 adultes.

Les sites d'échantillonnage consistaient principalement en parcelles forestières récemment exploitées caractérisées par les souches laissées en terre sur lesquelles les larves d'*Hylobius abietis* ont été collectées. Afin d'éviter de récolter des larves d'autres espèces de Curculionides, seules les larves des derniers stades d'*Hylobius abietis*ont été collectées, celles-ci étant identifiables sans ambiguïté en raison de leur grande taille sans équivalent parmi les autres espèces. Des larves ont également été collectées sur des arbres tombés après des tempêtes (Site des Quatre Vios en Ardèche et de Royère en Limousin, en France). Les parcelles forestières sur lesquelles les larves ont pu être collectées à la fois sur des souches de pin sylvestre et d'épicéa de Norvège, ont été

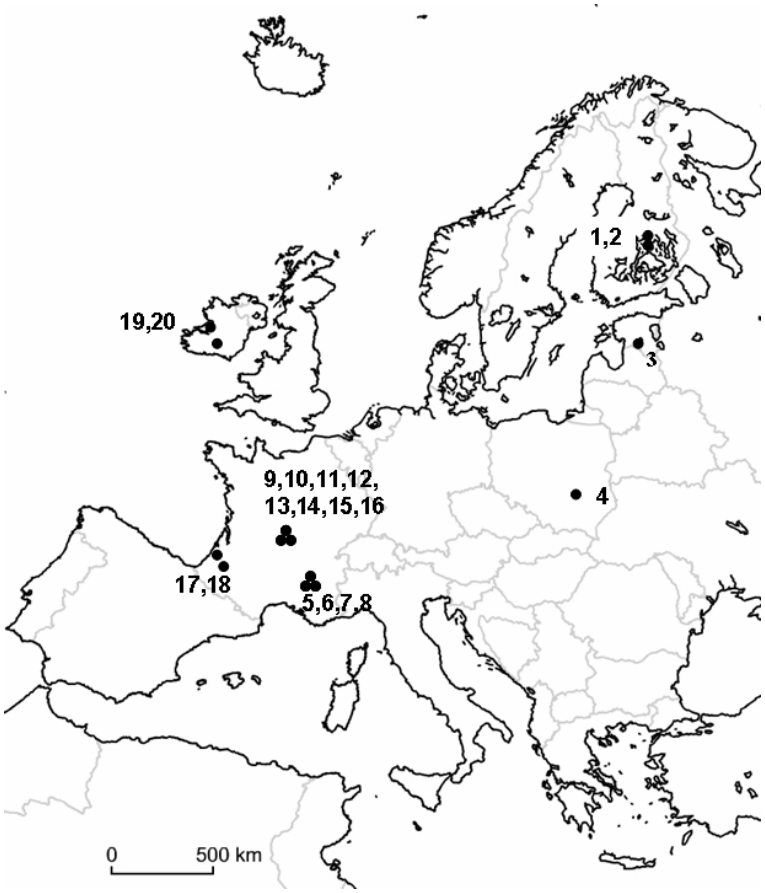


FIG. 1.2 – Localisation géographique des 20 sites échantillonnés en Europe.

désignées comme des localités mixtes du point de vue de l'essence-hôte car les deux espèces étaient disponibles simultanément pour la ponte des femelles. Ainsi, nous avons disposé de trois régions forestières où comparer l'influence de la plante-hôte sur la diversité génétique : deux en France (Ardèche et Limousin) et une en Finlande. Lors du test de l'effet de la plante-hôte, les adultes échantillonnés ont été exclus des analyses car il n'était pas possible de connaître l'espèce végétale sur laquelle ils ont effectué leur développement larvaire. Les insectes ont été immédiatement tués lors de la collecte en les plaçant dans l'éthanol pour leur conservation.

1.2.2 La technique AFLP et le protocole utilisé

La technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), développée par Vos *et al.* (1995), est une méthode réalisant une « empreinte » du génome[7]. Elle consiste en une amplification PCR sélective de fragments de restriction obtenus par digestion totale de l'ADN génomique. L'ADN total est tout d'abord digéré par deux enzymes de restriction (EcoRI et MseI dans le protocole d'origine), puis des oligo-nucléotides double brin, les adaptateurs, sont ajoutés aux deux extrémités des fragments de restriction. Un diagramme schématique des étapes à suivre est donné en annexe B, figure B.1, page 128.

1.2.2.1 Extraction de l'ADN

Le protocole AFLP est connu pour être assez sensible aux contaminations d'ADN externes, particulièrement des bactéries et des champignons (Savelkoul *et al.*, 1999). Comme ces contaminants peuvent être abondants dans l'appareil digestif du charançon, aussi bien au stade adulte que larvaire, seuls les tissus musculaires ont été disséqués et isolés pour l'extraction de l'ADN. L'ADN total a été obtenu par extraction avec le kit Dneasy pour tissus de la firme Qiagen en suivant les recommandations du manufacturier.

1.2.2.2 Digestion de l'ADN extrait et ligation des adaptateurs

L'ADN génomique a ensuite été digéré avec 2 unités de *Taq*I à 65° pendant 1 heure puis avec 6 unités d'*Eco*RI à 37°C pendant 1 heure. Des adaptateurs double-brins *Taq*I et *Eco*RI ont ensuite été liés aux fragments de restrictions obtenus lors de l'étape précédente durant 3 heures à 37°C. Les séquences des adaptateurs *Eco*RI sont données en annexe B, table B.1, page 128.

1.2.2.3 Phases d'amplification pré-sélective et sélective de l'ADN

L'amplification PCR pré-sélective a été réalisée avec les paramètres suivants : 2 minutes à 72°C, 30 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'annélation à 56°C et 2 minutes d'extension à 72°C, se terminant par 10 minutes à 72°C pour compléter l'élongation. Les séquences des amorces sont données en annexe B, table B.1, page 128.

L'amplification sélective a été réalisée avec les paramètres suivants : 10 minutes à 95°C suivies

[7] En anglais on parle de « *fingerprinting* »

n°	Site	Pays et Région	Longitude / latitude	Taille d'échantillon	Plante-hôte	Collecteur
1	Jalkala	Finlande	27°15'E/62°33'N	10 L	épicéa	H. Viiri
2	Kalakukkokangas	Finlande	27°15'E/62°43'N	73 L	mixte (35e, 38p)	H. Viiri
3	Mooste	Estonie	27°08'E/58°10'N	15 A	-	K. Voolma
4	Celestynow	Pologne	21°14'E/51°18'N	25 A	-	I. Skrzecz
5	Les Quatre Vios	France - Ardèche	04°13'E/44°28'N	56 L	mixte (38e, 18p)	C. Conord
6	Lachamp Raphaël	France - Ardèche	04°18'E/44°49'N	8 L	épicéa	C. Conord
7	Mézilhac	France - Ardèche	04°21'E/44°48'N	10 L	pin	C. Conord
8	S^{t} Etienne de Lugdares	France - Ardèche	03°57'E/44°39'N	4 L	épicéa	C. Conord
9	Annouillards	France - Limousin	02°12'E/45°40'N	28 L	mixte (23e, 5p)	C. Conord
10	Basville	France - Limousin	02°24'E/45°52'N	10 L	pin	C. Conord
11	Bellechassagne	France - Limousin	02°13'E/45°39'N	7 L	pin	C. Conord
12	Ebraly	France - Limousin	02°22'E/45°34'N	29 L	pin	C. Conord
13	Maussac	France - Limousin	02°09'E/45°28'N	19 L	pin	C. Conord
14	Pontgibaud	France - Limousin	02°52'E/45°49'N	10 L	pin	C. Conord
15	Puits de la Blanche	France - Limousin	02°01'E/45°17'N	7 L	épicéa	C. Conord
16	Royère	France - Limousin	01°54'E/45°49'N	5 L	pin	C. Conord
17	Le Sen	France - Landes	01°30'E/44°07'N	6 L	pin	C. Conord
18	Pontenx	France - Landes	02°52'E/44°15'N	14 L	pin	C. Conord
19	Callan	Irlande	07°37'E/52°42'N	9 L	pin	D. Ward
20	Galway	Irlande	09°03'E/53°16'N	22 A	-	G. Lempérière

Tab. 1.1 – Localisation géographique, nom du collecteur et caractéristiques des sites d'échantillonnage d'*Hylobius abietis*
La lettre à côté des effectifs des échantillons désigne le stade des insectes : *L* pour larve, *A* pour adulte. Le détail des effectifs selon la plante-hôte est donné entre parenthèses pour les sites mixtes : *e* pour épicéa de Norvège, *p* pour pin sylvestre.

de 36 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'annélation et 1 minute d'extension à 72°C, se terminant par 10 minutes à 72°C pour une extension complète. L'annélation a été initiée à 65°C puis réduite de 0,7°C pour 12 cycles et maintenue à 56°C pour les 23 cycles suivants.

Trois paires d'amorces sélectives ont été sélectionnées parmi les 17 qui ont été testées pour la qualité des bandes produites (distribution et intensité relativement homogènes).

Les produits de l'amplification sélective ont été analysés sur séquenceur automatique ABI Prism 3100 et les profils AFLP ont été visualisés avec le logiciel Genescan Analysis 3.7 (Applied Biosystem).

1.2.3 Méthodes d'analyse des données

1.2.3.1 Indépendance des marqueurs

L'indépendance des marqueurs a été testée en calculant pour chaque paire de marqueurs leur indice de liaison selon la formule :

$$D_{A,B} = \frac{1}{n} \sum |V(A,i) - V(B,i)| \tag{1.1}$$

Dans la formule 1.1 : A et B désignent les deux marqueurs ; $V(A,i)$ désigne la valeur allélique de l'individu i pour le marqueur A.

Les indices D ont été calculés en utilisant le programme DDM version 0.1 (DDM pour « Disequilibrium Between Dominant Markers ») implémenté pour les marqueurs dominants tels que ceux générés par la technique AFLP (Berthier, non publié).

1.2.3.2 Diversité intra-groupe

La diversité génétique à l'intérieur des groupes d'insectes échantillonnés a été quantifiée en utilisant le logiciel POPGENE version 1.32 (Yeh *et al.*, 1997) par le calcul de trois indices :

- le pourcentage de *loci* polymorphes, noté $\boldsymbol{P_{\%}}$,
- la mesure non biaisée de l'hétérozygotie attendue de Nei (1978), noté $\boldsymbol{H_E}$,
- L'indice de Shannon de diversité phénotypique (Lewontin, 1972), noté $\boldsymbol{I}$,

Les valeurs de H_E et I ont été obtenues en calculant la moyenne sur tous les *loci*.

1.2.3.3 Diversité inter-groupes

La différenciation génétique entre groupes d'insectes échantillonnés a été évaluée en calculant un estimateur non biaisé du F_{ST}, le θ de Weir et Cockerham (1984), ainsi que son intervalle de confiance à 95%. Le calcul a été effectué par bootstrap de 1000 réplications sur tous les *loci* grâce au logiciel TFPGA version 1.3 (Miller, 1997).

Afin d'évaluer la significativité de la différenciation des groupes d'insectes, la procédure du test exact de Raymond & Rousset (1995) a été réalisée avec le logiciel TFPGA. Ce test utilise

une approche par tables de contingences (Test RxC de Fisher) et une procédure Monte Carlo en chaîne de Markov pour déterminer si des différences significatives de fréquences alléliques existent entre groupes d'individus.

1.2.3.4 Niveaux de structuration génétique

La structuration génétique a été examinée en pratiquant une analyse de variance moléculaire (AMOVA) (Schneider *et al.*, 2000) en utilisant le logiciel ARLEQUIN version 2.011 (Excoffier *et al.*, 1992). L'utilisation de l'AMOVA est possible à la condition de faire l'hypothèse d'un même mode d'appariement des individus dans toutes les populations échantillons. Cette méthode a été utilisée pour tester comment se répartit la variance génotypique entre groupes, entre sites à l'intérieur des groupes et à l'intérieur des sites. Les individus ont été groupés soit par localisation géographique soit par plante-hôte (pour les larves uniquement). Les niveaux de significativité des différentes structures testées ont été déterminés par calcul de 1000 réplications de permutations effectuées au hasard. Pour évaluer l'effet structurant de la plante-hôte, nous avons également considéré les valeurs de F_{ST} pour chaque *locus* individuellement, fournies par ARLEQUIN. Les *loci* montrant une valeur P inférieure au seuil de 5% ont été considérés comme significativement structurants pour la plante-hôte (Emelianov *et al.*, 2004).

1.2.3.5 Distance génétique et distance géographique

Afin de tester l'existence d'une éventuelle corrélation entre les distances génétiques calculées entre groupes et les distances géographiques entre eux, des tests de Mantel ont été effectués après 1000 permutations en utilisant le logiciel GenAlEx version 5 (Peakall et Smouse, 2001).

1.2.3.6 Tests d'assignation

Les tests d'assignation ont été effectués au moyen du logiciel AFLPOP version 1.1 développé par Duchesne et Bernatchez (2002). Ce logiciel a été développé spécifiquement pour les marqueurs AFLP. La procédure de « ré-allocation » a été utilisée pour estimer le taux de succès des groupes échantillonnés à se voir assigner les individus qui en sont issus. Cette méthode permet de juger de la significativité de la structuration testée en se basant sur la proximité génétique des individus. En d'autres termes, un groupe montrant un taux élevé de ré-allocation pourra être considéré comme une unité génétique pertinente, tandis qu'un faible taux sera au contraire révélateur d'un groupe hétéroclite constitué d'individus de diverses provenances, comme par exemple un site colonisé par des individus provenant de plusieurs populations différenciées entre elles.

La principe de cette procédure est le suivant : chaque individu est retiré de son groupe puis les fréquences alléliques pour ce groupe sont recalculées (méthode « leave one out »). La mesure de la vraisemblance de trouver le génotype de l'individu dans chacun des groupes définis est calculée. Chaque individu est ensuite assigné à la population montrant l'indice de vraisemblance le plus haut pour son génotype.

1.3 Résultats

1.3.1 Polymorphisme AFLP

L'utilisation des trois paires d'amorces a permis sans ambiguïté de définir 83 marqueurs polymorphes puis de les coder pour chaque individu. Le génotypage des 367 insectes a donné 367 haplotypes différents. L'indice moyen de liaison des marqueurs était de 0,45. Aucune paire de marqueurs n'a montré de valeur de D inférieure à 0,01 ou supérieure à 0,99, ce qui signifiait que les 83 marqueurs étaient non liés entre eux. Par conséquent, ils ont tous été retenus pour la suite des analyses.

1.3.2 Une forte diversité génétique intra-groupe

Le calcul des différents indices (pourcentage de *loci* polymorphes $P_{\%}$, hétérozygotie de Nei H_E, et l'indice de Shannon I) a montré une forte diversité pour tous les sites (Table 1.3, page 38). La diversité la plus basse a été relevée pour le site irlandais de Galway. En outre, ces indices étaient fortement corrélés pour chacun des 20 sites échantillonnés (Table 1.2, page 37).

	r_s	P	
$P_{\%}$ vs H_E	0,650	0,002	**
$P_{\%}$ vs I	0,813	<0,001	***
I vs H_E	0,959	<0,001	***

TAB. 1.2 – test de la corrélation entre les différents indices de diversité génétique intra-groupe r_s : coefficient de corrélation des rangs de Spearman ; *** : $P < 0{,}001$; ** : $P < 0{,}01$; * : $P < 0{,}05$

Le pourcentage de *loci* polymorphes, $P_{\%}$, était le seul indice positivement corrélé à la taille des échantillons (Coefficient de corrélation des rangs de Spearman : $r_s = 0{,}672$, $P = 0{,}001$). Les trois indices de diversité intra-groupe n'étaient pas significativement différents entre les régions françaises ni entre les différents pays échantillonnés ($P = 0{,}136$, Test global de Kruskall-Wallis). Plus précisément, la diversité génétique dans les sites supposément isolés comme l'Irlande, par sa situation géographique, et les Landes en France, n'était pas significativement inférieure à celle des autres sites. Des tests similaires n'ont pas montré de différences significatives pour les trois indices, ni entre les individus groupés selon leur plante-hôte, ni entre les sites monospécifiques et les sites mixtes, ou encore entre les adultes et les larves.

1.3.3 Une faible différenciation inter-groupes

La distance génétique non-biaisée de Nei variait de 0,0039 entre les populations 11 et 12, à 0,0935 entre les populations 1 et 14 (Table 1.4, page 40). Les tests exacts de différenciation des

Pays	**Région**	**Site**	**Nombre de *loci* polymorphes**	**Pourcentage de *loci* polymorphes $P_{\%}$**	**Hétérozygotie de Nei H_E**	**Indice de Shannon I**
Finlande	**-**	Jalakala	62	74,70	0,201 (0,170)	0,318 (0,240)
	-	Kalakukkokangas	81	95,59	0,278 (0,147)	0,434 (0,186)
			T : 82	**M : 86,14 (11,44)**	**M : 0,239 (0,038)**	**M : 0,376 (0,058)**
Estonie	**-**	Mooste	**T : 74**	**89,16**	**0,289**	**0,439**
Pologne	**-**	Celestynow	**T : 83**	**100**	**0,288 (0,133)**	**0,450 (0,166)**
France	**Ardèche**	Les Quatre Vios	83	100	0,285 (0,142)	0,445 (0,178)
		Lachamp Raphaël	77	92,77	0,293 (0,157)	0,448 (0,206)
		Mézilhac	62	86,75	0,266 (0,168)	0,409 (0,226)
		St Etienne de Lugdares	65	79,31	0,288 (0,182)	0,429 (0,253)
			t : 83	**m : 91,32 (8,0)**	**m : 0,283 (0,010)**	**m : 0,432 (0,015)**
	Landes	Le Sen	66	79,52	0,268 (0,177)	0,406 (0,246)
		Pontenx	72	86,75	0,274 (0,171)	0,418 (0,231)
			t : 69	**m : 83,13 (3,61)**	**m : 0,271 (0,003)**	**m : 0,412 (0,006)**
	Limousin	Annouillards	80	96,39	0,280 (0,145)	0,436 (0,184)
		Basville	69	83,13	0,261 (0,170)	0,401 (0,233)
		Bellechassagne	70	84,34	0,261 (0,159)	0,404 (0,220)
		Ebraly	82	98,80	0,268 (0,140)	0,423 (0,179)
		Maussac	80	96,39	0,290 (0,148)	0,448 (0,190)
		Pontgibaud	65	78,31	0,272 (0,190)	0,407 (0,262)
		Puits de la Blanche	67	80,72	0,256 (0,177)	0,392 (0,243)
		Royère	63	75,90	0,260 (0,182)	0,393 (0,254)
			t : 83	**m : 86,75 (8,48)**	**m : 0,268 (0,011)**	**m : 0,413 (0,019)**
			T : 83	**M : 87,00 (8,06)**	**M : 0,273 (0,012)**	**M : 0,418 (0,019)**
Irlande	**-**	Callan	69	83,13	0,254 (0,183)	0,388 (0,252)
	-	Galway	51	61,45	0,196 (0,194)	0,298 (0,275)
			T : 76	**M : 72,29 (10,84)**	**M : 0,225 (0,029)**	**0,343 (0,045)**

TAB. 1.3 – Distance non biaisée de Nei et test exact de différenciation entre les paires de sites européens où a été échantillonné *Hylobius abietis*

populations indiquaient qu'il n'y a pas de différence significative entre les sites français. Les sites finnois et irlandais se différenciaient de presque tous les autres sites, alors que le site estonien ne se différenciait pas significativement du site polonais et de plusieurs sites français.

La valeur globale de θ calculée était de 0,03 entre les pays (Intervalle de confiance à 95% (IC) : 0,023-0,049) et de 0,07 entre les 20 sites (95% IC : 0,057-0,085). Ceci indique une faible différenciation inter-sites. En France, la valeur globle de θ entre sites et entre régions était respectivement de 0,05 (95% IC : 0,042-0,070) et de 0,03 (95% IC : 0,016-0,053).

A l'échelle de l'Europe La majeure partie de la variation génétique a été trouvée à l'intérieur des pays (94,46%), alors que 5,54% seulement différenciaient les pays (Table 1.5, page 42). Les tests exacts ont montré une forte différenciation génétique pour toutes les comparaisons deux-à-deux entre les cinq pays ($P < 0{,}0001$), à l'exception de celui entre l'Estonie et la Pologne qui n'apparaissaient pas significativement différents ($P < 0{,}1030$).

A l'échelle régionale en France La variation génétique a principalement été trouvée intra-sites dans les régions soit 93,12%, contre 2,93% entre les régions (Table 1.5, a2, page 42). L'analyse séparée des régions ardèchoise et limousine a montré que la majorité de la variation génétique se trouvait intra-sites plutôt qu'entre les sites et que la différenciation entre les sites était inférieure en Ardèche (Table 1.5, a2.1 et a2.2, page 42). Le test exact a indiqué une différenciation génétique significative entre les trois régions françaises ($P < 0{,}0001$).

Part structurante de la géographie et part de la plante-hôte La réalisation d'une AMOVA hiérarchisée a permis de tester simultanément les parts de la variation génétique attribuables à la géographie et à la plante-hôte. Trois groupes géographiques contenant des sites non-significativement différenciés selon le test exact ont été constitués. Tous les sites en Ardèche ont été retenus tandis que le site 14 était exclu dans le Limousin ainsi que le site 1 en Finlande. Chaque groupe a ensuite été divisé en deux sous-groupes correspondant aux larves collectées sur pin sylvestre et sur épicéa de Norvège. Les tailles d'échantillons étaient respectivement de 28, 75 et 38 sur pin et de 50, 30 et 35 sur épicéa. La plupart de la variation génétique (après correction pour la taille d'échantillon) a été trouvée à l'intérieur des groupes créés selon la plante-hôte (94,34%). La variation génétique entre groupes géographiques était faible (4,53%), alors que celle entre plantes-hôtes à l'intérieur des groupes géographiques s'est révélée significative mais faible (1,13%) (Table 1.5, 4b, page 42). Quand chaque région a été considérée séparément, l'AMOVA a révélé une part faible mais significative de variation génétique entre les larves collectées sur le pin et celles collectées sur l'épicéa : 1,16% et 1,75% ($P < 0{,}01$) pour l'Ardèche et le Limousin respectivement. Cependant la plante-hôte ne s'est pas révélée significativement structurante pour le site finlandais. Le test hiérarchique réciproque a été réalisé : il s'agissait de tester deux groupes définis selon la plante-hôte contenant chacun trois sous-groupes définis selon la proximité géographique. Ceci a révélé une part de la variation génétique expliquée par la structure géographique similaire à celle du test précédent (6,2% $P < 0{,}0001$). Cette fois cependant, le

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2	*0,0239* ***	-																		
3	0,0465 ***	0,0083 *	-																	
4	0,0324 ***	0,0063 ***	0,0113	-																
5	0,0299 ***	0,0104 ***	0,0143 ***	0,0057 ***	-															
6	0,0609 **	0,0238	0,0171	0,0088	*0,0080*	-														
7	0,0424 *	0,0150 **	0,0108	0,0080	*0,0078*	*0,0139*	-													
8	0,0514 ***	0,0195 ***	0,0145	0,0077	*0,0094*	*0,0084*	*0,0103*	-												
9	0,0377 ***	0,0202 ***	0,0192 ***	0,0136 ***	0,0076 ***	0,0113	0,0100	0,0118	-											
10	0,0538 **	0,0301 ***	0,0246 **	0,0240 ***	0,0241 ***	0,0258	0,0226	0,0262	*0,0173*	-										
11	0,0216	0,0092	0,0226	0,0050	0,0070	0,0218	0,0139	0,0204	*0,0107*	*0,0222*	-									
12	0,0257 ***	0,0155 ***	0,0200 ***	0,0101 ***	0,0085 ***	0,0148	0,0124	0,0214 ***	*0,0058* **	*0,0154*	*0,0039*	-								
13	0,0378 ***	0,0160 ***	0,0159 **	0,0116 ***	0,0089 ***	0,0104	0,0078	0,0152	*0,0050*	*0,0137*	*0,0061*	*0,0067*	-							
14	0,0935 ***	0,0574 ***	0,0426 ***	0,0504 ***	0,0475 ***	0,0434	0,0365	0,0410 **	*0,0344* ***	*0,0499*	*0,0417* *	*0,0413* ***	*0,0363* ***	-						
15	0,0496 **	0,0267 **	0,0263	0,0199	0,0130	0,0182	0,0132	0,0308	*0,0134*	*0,0208*	*0,0219*	*0,00119*	*0,0119*	*0,0485* *	-					
16	0,0501	0,0212	0,0153	0,0220	0,0198	0,0192	0,0141	0,0275	*0,0156*	*0,0194*	*0,0139*	*0,0175*	*0,0161*	*0,0257*	*0,0286*	-				
17	0,0541 **	0,0361 ***	0,0277	0,0342	0,0273	0,0348	0,0322	0,0258	0,0292	0,0402	0,0342	0,0351	0,0303	0,0542	0,0406	0,0267	-			
18	0,0571 ***	0,0284 ***	0,0162 **	0,0276 ***	0,0205 ***	0,0328	0,0189	0,0224 **	0,0224 ***	0,0332 ***	0,0296 *	0,0257 ***	0,0206 ***	0,0368 ***	0,0239	0,0213	*0,0128*	-		
19	0,0297	0,0231 ***	0,0381 ***	0,0190 ***	0,0180 ***	0,0457	0,0376 ***	0,0380 ***	0,0339 ***	0,0418 ***	0,0126	0,0217 ***	0,0308 ***	0,0857 ***	0,0357 ***	0,0466 **	0,0555 ***	0,0441 ***	-	
20	0,0530 ***	0,0195 ***	0,0178 ***	0,0136 ***	0,0192 ***	0,0265	0,0190 ***	0,0175 ***	0,0244 ***	0,0437 ***	0,0210 ***	0,0251 ***	0,0243 ***	0,0426 ***	0,0348 ***	0,0224 *	0,0371 ***	0,0259 ***	*0,0319* ***	-

TAB. 1.4 – Distance non biaisée de Nei et test exact de différenciation entre les paires de sites européens où a été échantillonné *Hylobius abietis*

regroupement selon la plante-hôte ne structurait pas significativement la variation génétique (-1,49% $P = 0{,}68$).

Analyse *locus* par *locus* Une divergence significative entre les pools de larves sur pin et sur épicéa a été trouvée pour cinq *loci* (sur les 83) en Ardèche et pour neuf *loci* dans le Limousin. Le F_{ST} moyen pour ces *loci* atypiques était comparable pour les deux régions : 0,15 et 0,13 respectivement. Un de ces *loci* s'est révélé commun aux deux régions et était responsable respectivement de 13 et 12,5% de la variation génétique entre les plantes-hôtes.

1.3.4 Structure génétique et structure géographique

Le test de Mantel global basé sur les 20 sites a montré une corrélation positive marginalement significative entre distance génétique et distance géographique ($r = 0{,}390$ $P = 0{,}016$). Par contre, en France, l'analyse sur les 14 sites n'a pas révélé de corrélation ($r = 0{,}251$ $P = 0{,}125$). Cependant, une corrélation positive a été trouvée à l'échelle du Limousin ($r = 0{,}642$ $P = 0{,}013$).

1.3.5 Tests d'assignation

Les résultats des tests d'assignation sont présentés par la figure 1.3 (page 46). Pour l'Estonie, la Finlande et la Pologne, le motif à points indique la proportion d'individus qui n'ont pas été assignés correctement à leur pays d'origine mais qui l'ont été à l'un des deux autres : ils ont été groupés dans une « supra-région » du Nord-Est. En France, le pourcentage moyen d'assignations correctes aux sites est relativement bas (21%), mais celle des assignations hors de France l'est aussi (16%). La plupart des individus ont en fait été correctement assignés à l'un des autres sites de leur région d'origine (en gris, 43%). Trois des quatre sites d'Ardèche (n° 5,6,7) montrent au moins un quart d'individus assignés hors de France. Il est possible que ces sites reçoivent un flux d'insectes venant des régions de l'Est où l'échantillonnage manque.

En Irlande, les individus ont été assez bien assignés à leur site d'origine et il faut remarquer qu'aucun d'entre eux n'a été assigné d'un site irlandais à l'autre.

1.4 Discussion

1.4.1 L'échantillonnage

Bien évidemment, l'échantillonnage disponible pour cette étude ne couvre pas la totalité de l'aire de distribution de *Hylobius abietis* qui s'étend jusqu'en Sibérie. L'effort d'échantillonnage plus important en France reflète la difficulté d'obtenir des larves en conditions naturelles, ce qui nécessite de déterrer et d'écorcer les souches infestées. Néanmoins, cette étude constitue une des rares (aux côtés, peut être, de celle de Bejer-Petersen *et al.* (1962)) à intégrer des données sur la biologie de cet insecte à une telle échelle.

Source de Variation	***ddl***	**Somme des carrés**	**Variance**	**% total**	**statistique Φ**	***P***
(a) Groupes géographiques						
(a1) Échelle européenne						
Inter - Pays	4	261,747	0,909	5,54		
Intra - Pays	362	5615,038	15,511	94,46		
Total	366	5876,785	16,420		$\Phi_{ST} = 0{,}0554$	<0,0001
(a2) Échelle régionale en France						
Inter - Régions	2	117,805	0,477	2,93	$\Phi_{CT} = 0{,}0293$	0,0009
Inter - Sites / Intra - Régions	11	255,791	0,641	3,94	$\Phi_{SC} = 0{,}0406$	< 0,0001
Intra - Sites	199	3015,681	15,154	93,13		
Total	212	3389,277	16,298		$\Phi_{ST} = 0{,}0687$	< 0,0001
(a2.1) Ardèche						
Inter - Sites	3	57,003	0,301	1,91		
Intra - Sites	74	1142,343	15,437	98,09		
Total	77	1199,346	15,738		$\Phi_{ST} = 0{,}0191$	0,0117
(a2.2) Limousin						
Inter - Sites	7	185,431	0,843	5,30		
Intra - Sites	107	1611,195	15,057	94,70		
Total	114	1796,626	15,900		$\Phi_{ST} = 0{,}0530$	< 0,0001
(b) Groupement hiérarchique : plante-hôte par géographie						
Inter - groupes géographiques*	2	171,028	0,734	4,53	$\Phi_{CT} = 0{,}0453$	< 0,0001
Inter - plante-hôte / intra groupe géographique	3	67,029	0,183	1,13	$\Phi_{SC} = 0{,}0118$	< 0,0001
Intra - plante-hôte	270	3824,416	15,298	94,34		
Total	275	4062,473	16,215		$\Phi_{ST} = 0{,}0566$	< 0,0001

*Ardèche, Limousin, Finlande

Tab. 1.5 – Analyse de variance moléculaire (AMOVA) des populations d'*Hylobius abietis*basée sur 83 *loci* AFLP
La source de variation a été testée selon trois échelles géographiques (Européenne, regionale et locale) et selon la plante-hôte de la larve. ddl, degrés de liberté ; valeur P obtenue après 1000 permutations.

1.4.2 Diversité génétique intra-population

Quelle que soit l'échelle géographique considérée, la plupart de la diversité génétique a été trouvée à l'intérieur des groupes d'*Hylobius abietis*. Parmi les insectes ravageurs des forêts, une répartition similaire a été trouvée chez le scolyte *Tomicus piniperda* L. comme l'a montré une étude des séquences d'ADN mitochondrial (Kerdelhué *et al.*, 2002). De même, une analyse par des marqueurs RAPD chez la mouche à scie du pin *Diprion pini* L., a révélé que 84% de la diversité génétique était trouvée à l'intérieur des populations (Baumann *et al.*, 2003). Une telle diversité génétique intra-population a été trouvée chez des espèces d'insectes ayant connu une expansion récente de leur aire de répartition à la faveur de l'extension de la culture de leur plante-hôte. C'est le cas du charançon du coton, *Antonomus grandis* Boheman, qui a profité de la culture extensive du coton en Amérique du Nord (Kim et Sappington, 2004a,b).

Bien que connu auparavant, *Hylobius abietis* n'a été signalé comme ravageur forestier qu'au début du XIX^{e} siècle (Leather *et al.*, 1999). Ce statut de ravageur est à rapprocher des plantations importantes de conifères en Europe qui datent de cette époque (Agnoletti et Anderson, 2000). Cette expansion de l'aire de ces plantes-hôtes couplée à la mécanisation de l'exploitation des forêts a favorisé la croissance démographique des populations d'*Hylobius abietis*. D'ailleurs de récentes études basées sur la taille de la population larvaire du charançon ont estimé une émergence potentielle d'adultes à la hauteur de 46 400 à 170 825 ind.ha^{-1} sur des sites de coupe-rase en Écosse (Moore *et al.*, 2004). Des populations ayant de tels effectifs sont moins exposées à la perte d'allèles par dérive génétique. Nos résultats soutiennent l'idée que les populations d'*Hylobius abietis* étudiées ne subissent pas des réductions drastiques d'effectifs susceptibles d'entraîner des pertes de diversité génétique. Même les sites les plus isolés en apparence (les deux sites irlandais et les deux sites landais en France) ne montrent pas une diversité plus faible, attendue si la dérive génétique agissait fortement. A l'examen de tous ces critères, notre étude n'a pas mis en évidence d'effet de la dérive génétique pour les populations européennes d'*Hylobius abietis* étudiées.

1.4.3 Dispersion chez *Hylobius abietis*

La région forestière comme niveau structurant Les tests d'assignation n'ont généralement pas assigné les individus génotypés à leur site d'origine mais les ont majoritairement assignés correctement à leur région forestière d'origine. En accord avec cela, la proportion de variation génétique révélée par l'AMOVA entre région était supérieure à celle trouvée entre sites et la plupart des comparaisons deux-à-deux des sites n'étaient pas significatives à l'intérieur de ces régions. L'échelle régionale apparaît donc être le niveau géographique minimal pour définir des unités génétiques relativement homogènes chez *Hylobius abietis*. De plus, le groupe Estonie-Finlande-Pologne démontre qu'il existe une cohérence génétique à une assez grande échelle dans cette zone, puisque la majorité des assignations hors-pays dans ces pays se faisaient dans l'un des deux autres.

Les caractéristiques d'un insecte hautement mobile Conformément au fort degré de variation génétique observé à l'intérieur plutôt qu'entre les échantillons, le F_{ST} global estimé s'est révélé faible (θ = 0,03). Cette faible structuration génétique spatiale peut être reliée à l'existence de taux de migration élevés entre les populations. Cependant, aucune estimation des ces taux de migration n'a été effectuée à partir des F_{ST} calculés puisqu'il est peu probable que les populations du charançon soient à l'équilibre démographique, particulièrement dans les forêts exploitées. Une telle valeur, dénotant un très faible niveau de structuration génétique, a été rapporté pour des insectes fortement mobiles comme le puceron *Sitobion avenae* (Llewellyn *et al.*, 2003), parfois qualifié de « plancton aérien » pour illustrer à la fois une dispersion forte et plus ou moins aléatoire des individus. Quand les populations sont grandes et/ou les migrants sont nombreux, la migration va conduire à une homogénéisation des fréquences alléliques entre les populations, ce qui conduit le F_{ST} à tendre vers zéro.

Des études comparatives de la structure des populations d'insectes phytophages ont montré que c'est principalement la vagilité des espèces qui détermine l'ampleur de la structuration génétique populationelle (Peterson et Denno, 1998a,b). La très faible variation génétique observée entre les groupes d'*Hylobius abietis* reflète vraisemblablement sa grande capacité de dispersion. Cette caractéristique a déjà été suggérée par des études non-génétiques antérieures (Nilssen, 1984; Solbreck, 1980). A l'aide d'une méthode indirecte (expérience en manège de vol), Solbreck (1980) a estimé que des femelles d'*Hylobius abietis* pouvaient théoriquement parcourir jusqu'à 80km durant la saison de vol. Ce résultat fut soutenu par l'étude de Nilssen (1984) qui trouva des larves d'*Hylobius abietis* se développant dans des troncs-piège disposés à plus de 80km de la plus proche forêt de conifères susceptible d'abriter une population du charançon en Finlande. Cependant, ce résultat était sujet à caution car il n'était pas possible d'écarter une dispersion favorisée par les activités humaines, par exemple via le bois de chauffage. Notre étude tend à confirmer ces résultats précédents et fournit les premiers indices d'une dispersion à plus grande échelle, étant donnée l'échelle géographique considérée (la distance entre les sites d'étude allant de 3 à 2735 km).

Le signal d'isolement par la distance géographique à l'échelle de l'Europe, quoique faible, indique cependant que la totalité de l'aire n'est pas couverte par un individu ! Dans la région du Limousin, le signal d'isolement par la distance observé indique que les adultes tendent à se déplacer vers les sites avoisinants, ce qui permet d'écarter une dispersion entièrement aléatoire, à la faveur du vent par exemple, et indique plutôt une orientation comportementale. Cependant, les faibles valeurs de F_{ST} observées entre les régions françaises et l'absence d'isolement par la distance à l'échelle de la France tendent à indiquer que les adultes sont occasionnellement capables de disperser jusqu'à 300 km, étant donné la faible connectivité existant entre les sites du Limousin et des Landes. La fragmentation des paysages forestiers et leur hétérogénéité assurent néanmoins une certaine connectivité et une probabilité pour un insecte de rencontrer un site favorable.

Le potentiel de dispersion chez *Hylobius abietis*, une pré-adaptation « ravageuse » ? Cette grande capacité de dispersion chez *Hylobius abietis* pourrait résulter d'une adaptation au fait que la ressource de ponte soit rare et éphémère dans les forêts naturelles. En effet, bien que *Hylobius abietis* se développe sur des végétaux ligneux et pérennes, les souches et arbres dépérissant ne sont favorables à la ponte que durant une fenêtre temporelle restreinte dépendant de l'espèce (von Sydow et Birgersson, 1997). Des études théoriques ont montré que l'évolution peut conduire à l'accroissement de la capacité de dispersion des insectes pour lesquels la disponibilité d'un habitat favorable est imprévisible dans l'espace ou dans le temps (Roff, 1994; Gandon *et al.*, 1998). Ces études théoriques sont soutenues par de nombreuses observations chez les insectes forestiers (Eidmann, 1985). Par exemple, certains coléoptères longicornes se développant sur des plantes-hôte mourantes montrent une plus grande aptitude à la dispersion que les espèces taxonomiquement proches se développant sur des hôtes sains (voir la revue sur les coléoptères Cerambycides de Hanks, 1999). Une forte propension à la dispersion a également été mise en évidence par des analyses génétiques chez *Ips typographus*, un scolyte s'attaquant à des arbres affaiblis (Stauffer *et al.*, 1999). De même, l'absence de structuration génétique à une vaste échelle révélée par une étude avec des allozymes chez le charançon *Larinus cynarae* s'explique vraisemblablement par l'extinction locale des populations de son hôte végétal (Michalakis *et al.*, 1993). Ainsi, la persistance de l'habitat peut influencer le flux de gènes par son effet sur l'évolution du comportement de dispersion (Roderick, 1996). Notre étude soutient également ce scénario chez *Hylobius abietis*.

A cela s'ajoute la longévité des individus d'*Hylobius abietis* qui peuvent vivre jusqu'à quatre ans (Day *et al.*, 2004). Cette caractéristique accroît la distance potentielle que les charançons peuvent couvrir durant leur vie. De plus, la relative polyphagie des adultes leur permet de subsister en l'absence de leur hôte optimal et ils sont également capables de se nourrir dans le houppier d'arbres mâtures (Örlander *et al.*, 2000). Tous ces facteurs contribuent à réduire les barrières potentielles à la dispersion de l'insecte. Néanmoins, pour les adultes, le « grain » du paysage forestier apparaît certainement plus fin pour y trouver leur nourriture que pour y pondre.

1.4.4 Le rôle de la plante-hôte

Cette étude a mis en évidence que la plante-hôte ne constitue par un facteur fortement structurant de la diversité génétique et qu'elle n'apparaît pas offrir de barrière au flux de gènes. Bien qu'un effet significatif de la plante-hôte ait été décelé dans chacun des trois groupes testés, les résultats de l'AMOVA hiérarchique réciproque ont montré que la géographie joue un rôle plus important dans la différenciation des populations sur cette distance. La quantité de variation génétique due à la plante-hôte est très faible et ne suggère pas de sélection associée à la plante-hôte.

Par ailleurs, l'étude a montré que les larves échantillonnées sur les deux plantes-hôtes se différencient génétiquement pour 5 à 9 *loci*. Le peu de différences génétiques observées entre les pools larvaires peut être donc plus probablement être dû à une sélection intra-génération

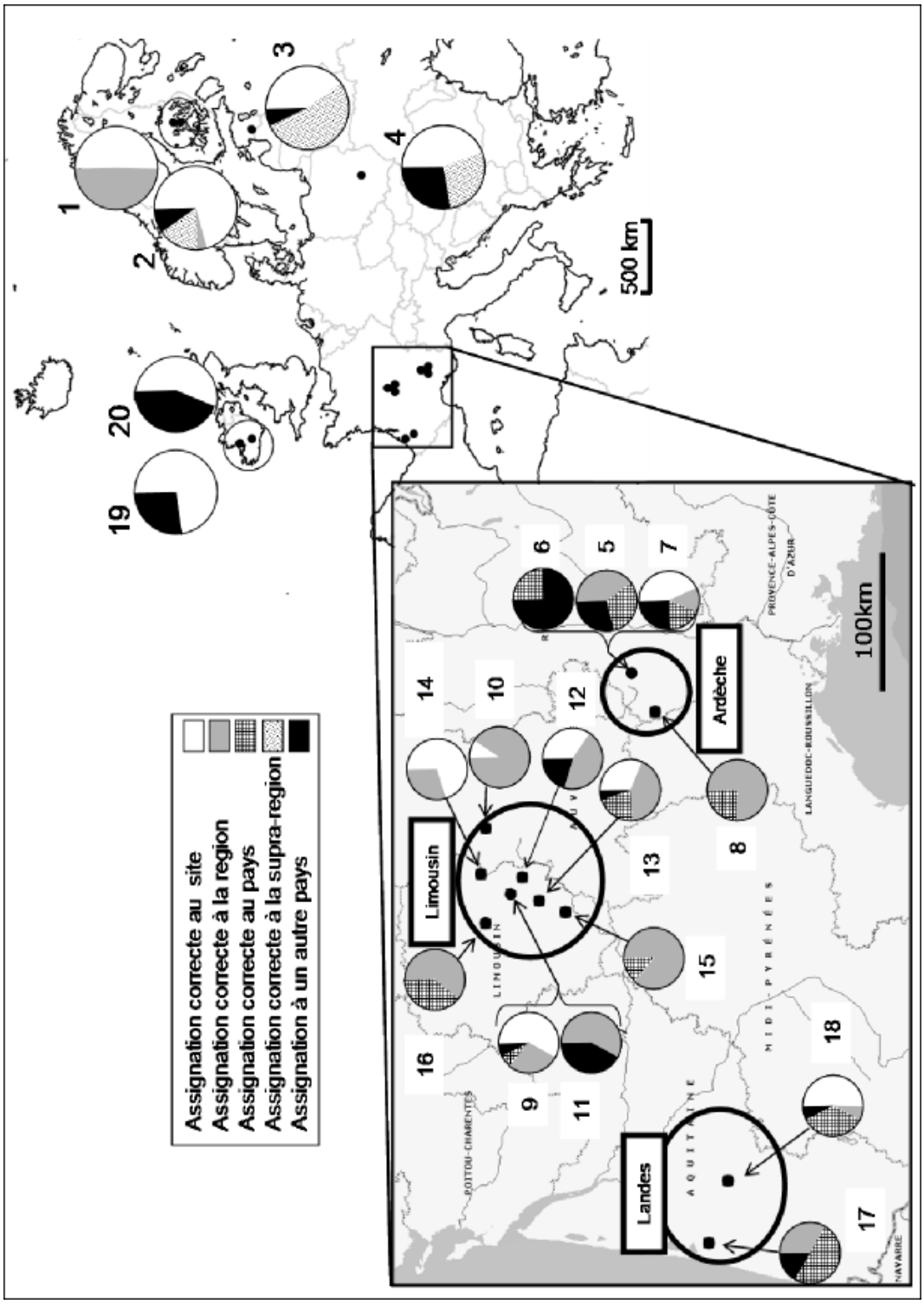


FIG. 1.3 – Résultat des tests d'assignation réalisés avec AFLPOP pour les 20 sites échantillonnés.

Pour chaque site, le diagramme montre la proportion d'individus selon leur niveau géographique d'assignation.

plutôt qu'à des différences stables entre populations associées à leur plante-hôte : à chaque génération, un fort degré de mélange entre les adultes ré-homogénéise les groupes divergents. S'il y a adaptation des insectes, ce ne serait pas à l'essence mais plutôt à la région forestière.

Alternativement, ces différences pourraient refléter les stades précoces d'un processus de spécialisation à l'hôte ayant cours dans certaines zones géographiques (en France) mais pas dans d'autres (Finlande). Une telle variation géographique dans les patrons d'adaptation à la plante-hôte est prédite par la théorie de la coévolution en mosaïque géographique. Cette théorie postule que la force de la sélection entre espèces interagissant varie à travers le paysage en étant intense par endroits, les « points chauds coévolutifs »[8], et faible dans d'autres, les « points froids coévolutionaires » (Thompson, 2005).

Très peu d'études employant les marqueurs AFLP ont jusqu'à maintenant été conduites pour détecter des *loci* impliqués dans l'adaptation des populations dans la nature. Dans leur étude de 306 marqueurs AFLP chez des escargots intertidaux, Wilding *et al.* (2001) ont identifié 15 *loci outliers*, soit 4,9% des marqueurs, liés à différentes morphologies de la coquille. Campbell et Bernatchez (2004) ont, quant à eux, trouvé 14 *loci outliers* parmi 440 marqueurs AFLP, soit 3,2%, associés à des spécialisations trophiques chez le poisson *Coregonus clupeaformis*. Dans notre étude, nous identifions 5 à 9 *loci atypiques* parmi les 83 marqueurs, soit 6,0 à 10,8%. Sous l'hypothèse que ces *loci* indiquent les prémisses d'une spécialisation, notre étude pourrait suggèrer qu'un faible nombre de gènes sous-tend un processus d'adaptation locale. Cependant, accroître le nombre de marqueurs pourrait aussi révéler plus de *loci* atypiques liés à l'utilisation de la plante-hôte.

Vers l'évolution de races-hôtes ? Bien que la recherche de races-hôtes ait été menée chez de nombreuses espèces d'insectes phytophages, il n'y a que quatre cas chez lesquels l'ensemble des critères caractéristiques de races-hôtes (voir Drès et Mallet, 2002) ont été réunis. Il s'agit de deux mouches, la mouche du pommier *Rhagoletis pomonella* et la mouche de la verge-d'or *Eurosta solidaginis*, et deux papillons, la mite du mélèze *Zeiraphera diniana* et la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis*. Chez la pyrale du maïs, le seul argument en faveur de l'hypothèse de l'existence de deux races-hôtes était la différenciation génétique entre les larves récoltées sur maïs d'une part et sur armoise ou houblon d'autre part (Bourguet *et al.*, 2000; Martel *et al.*, 2003). Afin d'évaluer cette possibilité d'évolution chez *Hylobius abietis*, il convient d'examiner les critères favorisant une telle évolution tels qu'ils ont été définis par Drès et Mallet (2002) (Figure 1.4, page 49). Jusqu'à présent, aucune étude n'a détecté une fidélité à l'hôte chez *Hylobius abietis*. Des études ont montré que l'existence d'un décalage phénologique dans la disponibilité de la plante-hôte peut promouvoir la divergence de groupes d'insectes comme chez la mouche du pommier, *Rhagoletis pomonella* (Feder *et al.*, 1993), ou chez la teigne du maïs, *Ostrinia nubilalis* Thomas *et al.* (2003). Pour *Hylobius abietis*, l'examen des propriétés chimiques et physiologiques de souches d'épicéa de Norvège et de pin sylvestre a montré que le pin devient propice à la ponte plus tôt

[8] En anglais, « coevolutionary hotspots and coldspots »

(von Sydow et Birgersson, 1997), mais il ne s'agit évidemment pas de saisonnalité. Par contre la longueur de la période de pré-oviposition s'est révélée plus courte pour des femelles s'étant nourries d'épicéa de Norvège que pour celles ayant consommé du pin sylvestre (Wainhouse *et al.*, 2001). Par conséquent, le décalage temporel existant pour le substrat de ponte (pin d'abord puis épicéa) serait contre-balancé par un décalage inverse dans la maturation des femelles (épicéa d'abord puis pin), empêchant une divergence basée sur un décalage phénologique. Si les mâles et les femelles sont souvent trouvés autour des souches durant la période de reproduction, les accouplements ont aussi lieu durant le repas des charançons sur les plantules de conifères qui peuvent être d'une essence différente. En effet, les adultes sont moins spécialisés que les larves pour se nourrir et par conséquent une corrélation entre le choix de la plante-hôte et le partenaire sexuel est peu probable.

Critères obligatoires
1. (a) Utilisation d'hôtes différents dans la nature
(b) Fidélité à l'hôte dont le déterminisme est génétique ou phénomène de conditionnement fortement associé à des différences génétiques.
2. Sympatrie des populations sur au moins une partie de leur aire de répartition
3. (a) Différenciation génétique à plus d'un *locus*
(b) Différenciation sur l'ensemble de l'aire de répartition et constante dans le temps
4. (a) Corrélation entre le choix du partenaire et le choix de la plante (e.g. homogamie)
(b) Existence d'un flux de gène entre les deux populations (au moins 1% par génération). L'absence de flux de gène caractérise alors des espèces-soeurs.
Critères facultatifs
5. (a) La fitness d'une race-hôte doit être plus importante sur son hôte naturel que sur les hôtes alternatifs
(b) Les hybrides entre les races ont sur chaque plante-hôte une fitness inférieure à celle de la race correspondant à l'hôte.

Fig. 1.4 – Critères de définition de la race-hôte selon Drès et Mallet (2002).

1.5 En résumé

La distribution de la variation génétique à l'intérieur et entre 20 sites d'infestation européens du grand charançon du pin, *Hylobius abietis*, a été analysée au moyen de marqueurs moléculaires dominants AFLP. Une analyse de variance moléculaire a été conduite à échelle européenne, régionale et locale. La plupart de la variation génétique a été trouvée intra- plutôt que inter-populations et l'indice global de fixation pour tous les *loci* est faible. Aucun indice de dérive génétique n'a été trouvé, y compris pour les sites relativement isolés. Ce motif génétique tend à confirmer la forte capacité de dispersion du charançon ainsi que l'influence de l'expansion de son aire de répartition à la faveur des plantations de conifères en Europe occidentale depuis le XIX^e siècle. Les tests d'assignation des individus ont démontré que la région forestière constitue une échelle géographique pertinente pour définir une population chez le grand charançon du pin. Le test de l'influence potentielle de la plante-hôte de la larve (Pin sylvestre ou épicéa de Norvège) sur la structure génétique a révélé un signal faible mais significatif dans deux des trois régions testées (en Ardèche et dans le Limousin mais pas en Finlande). Un *locus* variant avec la nature de la plante-hôte larvaire était partagé par les individus des deux régions françaises indiquant une participation potentielle dans l'adaptation à la plante-hôte. Cependant, à la lumière des connaissances actuelles de la biologie de *Hylobius abietis*, la formation de races-hôte est peu probable. Finalement, cette étude montre que l'utilisation de différentes plantes-hôtes pour le développement des larves ne constitue pas une forte barrière au flux de gènes et confirme la forte capacité à la dispersion de ce ravageur forestier.

Chapitre 2

Discrimination et choix de la plante-hôte chez *Hylobius abietis*

Sommaire

A. Olfactométrie 52
2.1 Introduction 52
2.2 Matériel et méthodes 59
2.3 Résultats 61
2.4 Discussion 72
B. Choix de ponte 77
2.5 Introduction 77
2.6 Matériel et méthode 78
2.7 Résultats et discussion 80
2.8 En résumé 86

Le convoyage de l'insecte depuis les sites d'échantillonnage, la nature du substrat de ponte et les difficultés rencontrées pour son élevage ont été des contraintes permanentes pour la réalisation des tests comportementaux au laboratoire. Le contenu de ce mémoire et le développement relatif des différents aspects abordés reflètent ces difficultés.

A. Olfactométrie

2.1 Introduction

Cette partie introductive consistera tout d'abord en un rappel de quelques notions-clé pour l'écologie chimique des insectes phytophages. Fort de ces notions de bases, un second point présentera les connaissances actuelles sur l'écologie chimique olfactive chez le grand charançon du pin en insistant sur les travaux ayant abordé directement ou non sa capacité de discrimination des essences. Enfin, le dernier point posera plus précisément les questions et hypothèses de travail ayant guidé l'expérimentation d'olfactométrie.

2.1.1 Les relations sémiochimiques chez les insectes phytophages

La recherche de nourriture, de site de ponte et/ou de partenaires sexuels repose très largement sur la réception par l'insecte de signaux chimiques. Cette chémoréception concerne aussi bien le sens de l'odorat que celui du goût. Les relations sémiochimiques désignent donc le type de relations qui s'établissent entre insectes et entre plantes et insectes, sur la base de ces messages chimiques. Selon la nature de l'émetteur et du récepteur, on distingue différents types de substances sémiochimiques (figure 2.1, page 53).

Un aspect important de la dynamique d'infestation des insectes ravageurs des forêts en général et des coléoptères corticophages en particulier (« bark beetles » et « bark weevils ») concerne le choix de la plante-hôte et/ou la colonisation du groupe de plantes-hôtes. Deux grands types de mécanismes de sélection existent. L'un implique que la sélection de l'hôte soit induite par des signaux chimiques et/ou visuels : il s'agit de l'*attraction primaire* qui suggère que les insectes sont capables de reconnaître les signaux durant leur dispersion. L'autre implique une arrivée aléatoire sur l'hôte ou la parcelle et l'acceptation n'intervient qu'après la prise de nourriture : il s'agit d'une *attaque aléatoire*. Par ailleurs, des phéromones d'agrégation peuvent intervenir et prédominer dans le choix de l'hôte : il s'agit alors d'une *attraction secondaire*.

2.1.2 Attraction allélochimique par la plante-hôte

Alors que la question de la reconnaissance de leurs plantes-hôtes par les espèces polyphages ne se pose pas *a priori*, elle est capitale chez les insectes oligophages.

Importance adaptative de la reconnaissance de la plante hôte La discrimination de la plante-hôte, basée sur des indices olfactifs peut avoir une importance évolutive. C'est par exemple

Définitions

Écomones Ce terme générique regroupe toutes les substances chimiques utilisées par les animaux qui médient leurs processus vitaux. Les principales sous catégories sont données ci-après.

Phéromones Ces substances sont sécrétées et émises dans le milieu par un individu et induisent une réaction spécifique chez d'autres individus de la même espèce comme un processus de développement ou une réaction comportementale. Il existe des phéromones sexuelles, de marquage des pistes, d'agrégation ou encore d'alarme.

Substances allélochimiques Elles provoquent une réaction chez les individus d'une autre espèce que celle de l'émetteur.

Allomones Ce sont des substances allélochimiques aux effets bénéfiques pour l'émetteur.

Kairomones Ces écomones sont bénéfiques pour l'organisme récepteur au détriment de l'organisme émetteur.

Synomones Ces substances sont bénéfiques à la fois pour l'émetteur et pour le récepteur.

Certaines substances peuvent appartenir à plusieurs catégories : la phéromone d'une espèce peut servir de kairomone à ses prédateurs.

FIG. 2.1 – Rapide lexique des substances responsables des relations sémiochimiques entre organismes

D'après Dajoz, 1998.

le cas chez la mouche du pommier, *Rhagoletis pomonella*, qui utilise les composés volatiles émis par les fruits pourrissant pour reconnaître et distinguer ses plantes-hôtes. Comme les adultes mâtures de cette espèce se reproduisent sur, ou à proximité de leur plante-hôte, des différences dans le choix de la plante-hôte, basées sur la discrimination des odeurs de fruits, conditionnent le choix du partenaire sexuel et peuvent ainsi promouvoir un isolement reproductif prézygotique. L'évolution d'une spéciation sympatrique peut ainsi être basée sur les capacités de discrimination olfactive de l'insecte. Dambroski *et al.* (2005) ont montré récemment chez cette mouche que le choix de la plante-hôte au moyen d'indices olfactifs avait une base génétique héritable.

Le choix d'une plante implique une série d'étapes comportementales de la part de l'insecte :

- localisation de l'habitat d'accueil,
- localisation et reconnaissance des individus-hôtes potentiels dans l'habitat, et
- acceptation d'une plante-hôte spécifique.

L'étude de l'écologie chimique chez les insectes a non seulement contribué à la compréhension de la perception de leur habitat et des conséquences sur l'évolution de ces espèces mais a aussi ouvert la voie à de nouvelles méthodes de contrôle biologique reposant sur la manipulation de cette perception.

Chez les insectes phytophages, la sélection de la plante-hôte consiste en une séquence de réponses comportementales à une série de *stimuli* associés aux plantes-hôtes et aux plantes non hôtes. Les insectes sont équipés de récepteurs sensoriels leur pemettant de percevoir ces *stimuli*.

Les végétaux émettent des centaines de composés volatiles qui sont importants dans les interactions avec les animaux phytophages (Schoonhoven *et al.*, 1998). Une grande partie du système olfactif des insectes phytophages a évolué pour la détection et le traitement des informations odorantes de la plante. Ceci est bien sûr à mettre en relation avec l'importance des indices olfactifs dans les processus de localisation de l'hôte végétal pour la prise de nourriture et/ou pour l'oviposition.

Les substances chimiques des plantes-hôtes ou non hôtes peuvent être attractives, répulsives, toxiques ou nutritives. Chez l'insecte, ces substances peuvent affecter :

- la recherche et l'acceptation de la plante-hôte,
- la stimulation ou l'inhibition de la prise de nourriture,
- la résistance de la plante,
- la biosynthèse des phéromones/allomones (cas des Scolytes) et la communication et
- l'attraction des prédateurs, parasites et compétiteurs

Les études de la perception des odeurs par les insectes abordent la question sous différents angles.

2.1.3 Écologie olfactive chez le grand charançon du pin

Chez *Hylobius abietis*, les étapes comportementales conduisant à la sélection de la plante-hôte s'échelonnent à plusieurs échelles spatiales, du paysage à l'organe de la plante, selon les besoins spécifiques au cours de son cycle de vie, ainsi que l'a souligné Schlyter (2004) (voir figure 2.2). Dans son habitat originel, la forêt naturelle, la ressource étant éparse et relativement éphémère, il est vraisemblable que l'hylobe a développé un système performant de localisation des végétaux. *Hylobius abietis* n'utilise pas un matériel végétal vivant comme substrat de ponte. Par conséquent, une agrégation d'un grand nombre d'individus pour submerger les défenses de l'arbre n'est pas vitale, comme c'est le cas chez certains Scolytides (Wood, 1982). De plus, des expériences de piégeage sur le terrain ont montré que les deux sexes étaient attirés en quantités égales par des bûches-piège (Tunset *et al.*, 1993), il est peu probable qu'une phéromone agissant à longue distance intervienne. Au laboratoire, Zagatti *et al.* (1997) ont apporté des éléments supplémentaires allant dans ce sens en montrant que l'attractivité du matériel végétal ne dépendait pas de la présence d'insectes se nourrissant ; ils concluent que l'attraction par la plante hôte repose sans doute principalement sur des kairomones végétales.

Les études sur les réponses d'*Hylobius abietis* à des stimulations olfactives ont été particulièrement intensives dès les années 1970. Dans le groupe économiquement important des charançons déprédateurs d'arbres forestiers (« bark feeding weevils »), l'hylobe est l'un de ceux dont la perception olfactive a été la plus étudiée. En effet, le piégeage massif des insectes grâce à des leurres olfactifs était alors considéré comme une stratégie potentielle de contrôle des populations. De plus, l'hylobe étant un insecte de taille conséquente (1 à 1,5 cm) la taille de ces antennes faci-

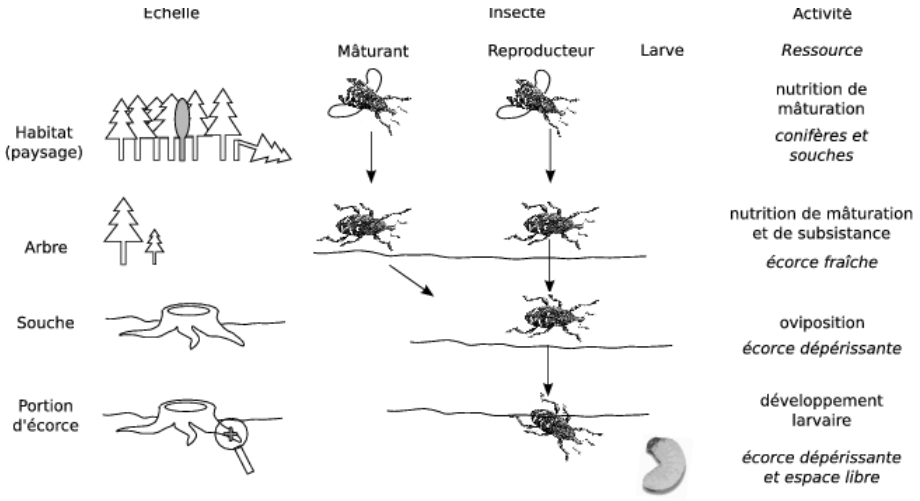


FIG. 2.2 – Niveaux de sélection de la plante-hôte par *Hylobius abietis* selon le stade de l'insecte Modifié d'après Schlyter (2004).

lite la réalisation des expériences d'électro-antennographie. Cependant, alors que cette stratégie de piégeage peut se révéler efficace pour des insectes ravageurs montrant une faible démographie, les grandes populations d'*Hylobius abietis* ne sont pas suffisamment affectées pour réduire leurs dégâts. Les recherches s'orientent désormais vers le test de substances anti-appétantes (Mansson et Schlyter, 2004).

Trois constats ressortent d'un tour d'horizon des études menées chez *Hylobius abietis* :

1) Les réponses comportementales ont été peu étudiées L'approche de l'électro-physiologie a été la plus employée et développée (identification de structure sensillaires spécifiques de composés terpéniques, voir notamment les travaux de Mustaparta *et al.* cités dans la revue de Schlyter, 2004).

2) Les attractivités des différentes plantes-hôtes n'ont pas été directement comparées Les expériences sont guidées par l'idée de trouver une substance chimique très attractive pour piégeage ou, maintenant, très répulsive pour l'anti-appétance.

3) Les premières étapes de la séquence d'acceptation ont été peu étudiées Quand le matériel végétal est employé, c'est pour des tests de préférences nutritives de l'adulte.

L'étude des effets individuels de substances volatiles potentiellement impliquées dans la reconnaissance et le choix de l'hôte a parfois conduit à des résultats surprenants. Ainsi, certains composants des tissus de conifères hôtes peuvent avoir un effet répulsif sur les hylobes (Klepzic et Schlyter, 1999). Les auteurs expliquent ces résultats surprenants par l'utilisation de doses non naturelles mais aussi par l'absence des autres composants du mélange d'odeurs émis par l'hôte. En utilisant les végétaux, notre démarche espère minimiser ces inconvénients.

Seules quelques travaux ont entrepris d'étudier au laboratoire les comportements olfactifs des individus.

Étude en « chambre de choix » (Selander *et al.*, 1974) Le travail de Selander *et al.* (1974) constituerait la première publication sur l'utilisation d'une arène olfactomètrique pour l'étude du comportement olfactif d'*Hylobius abietis*. Cette étude proposait d'observer les réponses comportementales de charançons à une stimulation olfactive par des fractions terpéniques extraites du phloème de pin sylvestre. Les insectes avaient été capturés sur le terrain durant la phase de dispersion[9]. Les insectes ont été testés par groupe de huit, durant trois heures, dans l'obscurité. L'enceinte olfactométrique était circulaire et les sources olfactives étaient constituées de morceaux de papier filtre imbibés placés dans chaque hémisphère de l'arène sous le sol en papier perforé. Ce travail a souligné l'importance de la concentration des composés sur la réponse des insectes. Les composés majoritaires ne provoquent pas de réaction comportementale de la part des insectes qui se baseraient plutôt sur des composés présents en de petites quantités. Un effet de synergie entre les composés n'a cependant pas pu être écarté. Bien que l'expérience eut intégré le temps de présence des insectes dans les deux zones de l'arène durant trois heures, les enregistrements des déplacements fournis dans l'article ont montré que la discrimination des insectes entre la source olfactive et le témoin était effective dès les dix premières minutes de l'expérience. Cela a conforté notre choix pour la durée de nos expériences.

Étude en « arène à tubes » (Mustaparta, 1975) Dans cette étude la réponse comportementale des insectes à des *stimuli* olfactifs a été mesurée par des tests à choix multiples en arène. Les composés odorants testés (Trans-verbenol, α-pinene, 5-hexen-2-one) avaient été précédemment identifiés comme excitant fortement différents groupes de cellules sensitives chez *Hylobius abietis*. Les tests ont été menés sur 30 à 100 insectes à la fois, et dans l'obscurité pendant huit heures comme chez (Selander *et al.*, 1974). L'intensité de la réponse comportementale a été mesurée par le nombre d'insectes agrégés autour des tubes odorants à la fin de l'expérience. Une première expérience de choix multiple a servi a déterminer la concentration la plus attractive pour chaque composé séparément. Dans un deuxième temps, la différence d'attractivité entre trans-verbenol et α-pinene a été comparée par des tests à choix multiple avec contrôle sans source odorante. Cependant, les auteurs soulignent qu'une limite de leur étude réside dans le fait que les insectes ne sont pas soumis à un gradient d'odeurs constant : la première odeur détectée par les charançons peut être responsable de l'effet observé alors que les autres n'ont pas été détectées. La conception et la réalisation d'arènes olfactométriques à flux laminaire telle que celle que nous avons choisi d'utiliser répond précisément à ce genre de limites.

Étude en « olfactomètre à quatre voies » (Skrzecz et Moore, 1996) L'étude de Skrzecz & Moore (1997) s'est intéressée à l'attractivité de branches de pin sylvestre colonisées

[9]En anglais dans l'article « *swarming period* »

par différents champignons sur des femelles d'*Hylobius abietis*. Leur objectif était d'expliquer la différence de colonisation sur le terrain des souches de pin (matériel de ponte) selon leur infestation par *Phlebia gigantea* ou *Trochoderma harzianum*, deux moisissures impliquées dans la dégradation du bois. Un olfactomètre à quatre voies a été choisi pour confronter les insectes à des situations de choix multiple. Des branches infectées par chacun des deux champignons ont été disposées des containers branchés à deux des quatre bras de l'olfactomètre. Des branches non infectées ont été utilisées pour le troisième bras et le dernier, laissé vide, faisait office de contrôle. La réponse des insectes aux substances volatiles a été considérée positive et la procédure stoppée dès que l'insecte restait dans une minute au moins dans un des containers. Bien que les auteurs évoquent que le temps écoulé avant d'observer cet évènement ait été très variable, ils ne font pas mention du détail du temps passé par les insectes auprès des différents *stimuli*. Il nous apparaît que ce critère ne semble pas suffisamment précis pour juger des capacités de discrimination individuelle des insectes.

Étude en « olfactomètre à quatre voies » (Watson, 1999) L'objectif de ce travail était de tester l'influence de substances phytosanitaires sur l'attractivité olfactive de divers matériaux végétaux sur les charançons. Cette étude serait la seule à avoir utilisé des plantules entières pour disposer de la totalités des substances volatiles émises. Ce serait également la seule à aborder la différence d'attractivité olfactive entre pin et épicéa au laboratoire mais de manière indirecte puisque ce n'était pas l'objectif principal.

2.1.4 Problématique et questions

Bien que la partie physiologique du processus d'intégration du message olfactif par *Hylobius abietis* soit assez bien documentée pour ses premières étapes, des études sur les réponses comportementales aux composés attractifs et sur l'efficacité de l'hylobe à décrypter le message dans un paysage olfactif complexe manquent encore.

En fait, il apparaît que l'interaction plante-insecte entre le charançon et les conifères (ou autres essences) a principalement été étudiée sous l'angle de l'acceptabilité de ceux-ci, ce qui suppose un choix effectué au contact de l'hôte. Nous proposons ici de tester l'attractivité olfactive pouvant être à la base d'un comportement de dispersion active de l'insecte à grande distance.

- Dans un paysage forestier olfactif complexe, les adultes de *Hylobius abietis* sont ils capables de discriminer l'espèce de jeunes plants de conifères sur la base de tels indices olfactifs ?
- Cette discrimination induit-t-elle une réponse comportementale nette assimilable à une préférence ou éventuellement à une répulsion ?
- Des insectes s'étant développés dans un massif forestier mono-spécifique montreront ils le même comportement que des insectes issus de populations établies dans des massifs mixtes vis à vis d'essence potentiellement hôtes mais dont ils n'ont jamais fait l'expérience ?
- Enfin, la préférence olfactive dépend-elle de l'essence dont l'adulte vient de se nourrir ?

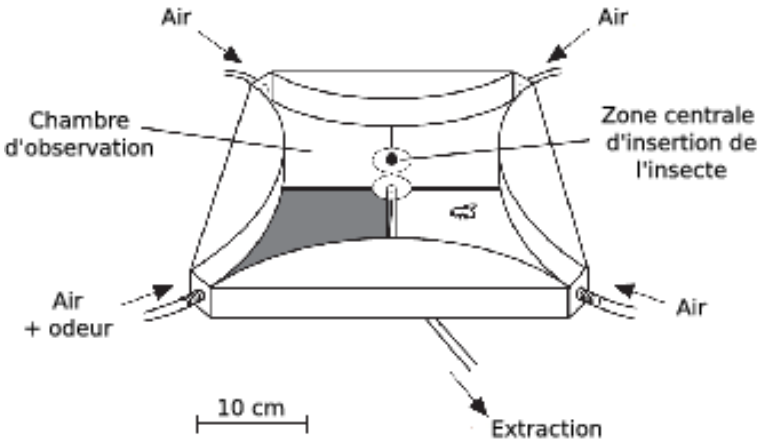


FIG. 2.3 – Schéma de l'olfactomètre à quatre voies utilisé pour étudier le comportement d'orientation des adultes d'*Hylobius abietis*

(Schéma tiré de Sandoz *et al.*, 2000)

Expérience	Configuration	Origine des insectes	Nourriture
I.1	pin sylvestre vs épicéa vs air	Estonie	pin sylvestre ou épicéa
I.2	pin sylvestre vs épicéa vs air	Ardèche	pin sylvestre ou épicéa
II	pin maritime vs épicéa vs air	Landes	pin maritime
III	pin maritime vs pin sylvestre vs épicéa vs air	Landes	pin maritime

TAB. 2.1 – Récapitulatif des expériences d'olfactométrie

Expérience	Nombre d'insectes testés	Nombre d'insectes écartés (%)	Nombre d'individus retenus (♂/♀)
I.1	24	5 (20,84 %)	19 (15/4)
I.2	177	69 (38,98 %)	108 (54/54)
II	40	14 (35,00 %)	26 (9/17)
III	60	23 (38,34 %)	37 (21/16)

TAB. 2.2 – Nombre d'individus testés et écartés

Les réponses des individus stressés ont été écartées de l'analyse des résultats (voir critères dans la partie matériel et méthodes)

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Le dispositif olfactométrique

Afin de tester les réponses olfactives des insectes, nous avons utilisé un olfactomètre à flux d'air du type de celui décrit par Vet *et al.* (1983). La taille importante des hylobes nécessitait cependant un matériel aux dimensions adaptées. Le dispositif consiste en une chambre d'exposition dotée de quatre bras dans chacun desquels quatre flux distincts peuvent être générés (Figure 2.3, page 58). Les insectes sont introduits au centre de la chambre dans une zone circulaire où les flux d'air provenant des différents champs odorants se mélangent. L'air est insufflé à une vitesse de 400 ml/min conformément aux indications de Skrzecz et Moore (1996) pour *Hylobius abietis*. Ce dispositif ne permet pas aux insectes de disposer d'indices visuels sur la nature de la source odorante. Les plants de conifères sont disposés dans des fioles de verre de forme cylindrique, d'une longueur de 15cm. Ces fioles sont connectées à une extrémité au dispositif de pulsage d'air, et à l'autre à chacun des bras de la chambre.

2.2.2 Matériel animal

Les insectes utilisés dans les expériences ont été collectés sur le terrain dans trois sites d'exploitation forestière distincts : dans les Landes et en Ardèche pour la France et en Estonie.

Les individus landais ont été récoltés sur des grumes de pin maritime ; les hylobes d'Ardèche ont été récoltés dans une forêt mixte de pin sylvestre et d'épicéa ; les individus d'Estonie ont également été récoltés dans une forêt mixte pour ces essences.

2.2.3 Matériel végétal

Les plants de pin sylvestre, de pin maritime et de épicéa utilisés dans les expériences ont été obtenus auprès d'un pépiniériste (Pépinières Robin). Tous ces plants étaient âgés d'1 an et étaient conditionnés en godets individuels. Le choix s'est porté sur des plants de cet âge car c'est à ce stade que les jeunes conifères sont les plus attaqués par les charançons. Pettersson *et al.* (2005) ont montré récemment que les plants plus jeunes émettent principalement des composés volatiles dits « verts » tandis que les plants d'1 an émettent en plus des sesquiterpènes et des monoterpènes qui les distinguent des herbes environnantes.

2.2.4 Conditions expérimentales

Dans la nature, la période optimale d'activité d'*Hylobius abietis* se situe au déclin du jour (Merivee *et al.*, 1998). Ainsi, les insectes ont été conditionnés en photo-période inversée (15 heures de jour / 9 heures de nuit) pour mener les expériences en scotophase. Les expériences ont été conduites en lumière rouge.

Les individus landais ont été nourris exclusivement avec des branchettes de pin maritime. Les individus ardèchois et estoniens ont été divisés en deux lots. Les individus d'un lot ont été

nourris avec des branchettes de pin sylvestre et ceux de l'autre lot avec des branchettes d'épicéa (Table 2.1, page 58) pendant au moins une semaines avant le début des tests. Tous les animaux blessés (pattes ou tarses manquants, antennes manquantes) ont été écartés des expérimentations. Toutes les expériences ont été conduites à la température de la pièce (23-26°C).

Préalablement aux tests, les insectes ont été laissés à jeun pendant au moins 12 heures afin de se trouver dans un environnement olfactif neutre.

2.2.5 Déroulement des expériences

Les insectes ont été introduits individuellement dans la partie centrale de l'olfactomètre. La durée du test était de dix minutes. Les déplacements de l'insecte dans le dispositif ont été enregistrés grâce à un logiciel de saisie adapté (EVEN v1.0, INRA, France). En plus des quatres zones (ou bras) définies par les flux d'air, une cinquième zone a été définie : HZ, correspondant à la zone circulaire centrale de Xcm de diamètre où les effluves en provenance des quatre bras se mélangent.

Les déplacements dans les différentes zones ont été suivis visuellement et enregistrés au clavier de l'ordinateur. Le logiciel EVEN a calculé le temps passé dans chacune des voies. Le test était lancé dès que l'insecte sortait de la zone centrale. Le passage dans une zone était validé quand l'insecte y avait passé entièrement son thorax, ce qui garantit que ses antennes baigaient bien dans la zone visitée. Les individus sortant de la zone centrale moins de cinq secondes ou plus de cinq minutes après leur introduction dans le dispositif ont été écartés des analyses (Table 2.2, 58). Ce critère vise à écarter les réponses des individus stressés par l'expérience, ou apathiques, dont le comportement vis à vis des stimuli olfactifs risquerait d'être parasité.

Bien que les voies où l'air est insufflé sont considérées comme des voies de contrôle par rapport à celles où sont insufflées les effluves des plants, il est possible que les insectes ne les visitent pas seulement par hasard. En effet, si, dans ce contexte expérimental, les substances volatiles des plants avaient un effet répulsif sur les insectes, on pourrait s'attendre à ce que le séjour dans la voie opposée soit plus long en raison d'un comportement de fuite. Ainsi, afin de tester cet éventuel effet, les voies de contrôle ont été distinguées selon la nature du plant dans la voie opposée et testées séparément lors de l'analyse des résultats : la notation « AirOppEp » désigne par exemple la voie de contrôle diamétralement opposée à celle où est disposé le plant d'épicéa. Le matériel végétal a été changé après le passage de 10 insectes (en moyenne) dans le dispositif. Par conséquent, il a été tenu compte des recommandations de Ramirez *et al.* (2000) concernant un éventuel effet de pseudo-réplication dû à ces groupes dans le modèle d'analyse de variance (cf section 2.2.6).

La totalité des pièces de l'olfactomètre a été lavé avec une solution détergente (5% TFD4, Franklab, France, cf Saïd *et al.* 2006) durant la nuit entière après chaque session de test.

2.2.6 Critères de réponse et méthodes d'analyse

Afin d'évaluer le comportement des insectes, deux types de critères ont été retenus : la durée de séjour dans les voies **(i)** et le nombre d'insectes ayant choisi telle voie (**ii** à **iv**) :

i. les durées relatives de séjour dans chacune des voies sont comparées par la méthode des contrastes utilisant les carrés-moyens résiduels de l'ANOVA (SAS : PROC MIXED) (voir Shaffer (1981) et Dagnelie (1998) pour les méthodes statistiques et Francis, 2004, pour une application à une expérience d'olfactométrie). Le programme SAS/STAT utilisé est donné en annexe C.Les valeurs de P sont également données après ajustement de Tukey-Kramer pour les comparaisons multiples. L'expérience III présentant trois voies sur quatre garnies de plants, la durée de séjour des insectes dans chacune d'entre elle est testée par rapport à celle dans la voie de contrôle (air) au moyen d'un test de Dunnett. Les données ont été transformées pour satisfaire aux conditions d'application du test d'analyse de variance ($\log(\sqrt{x+10})$). Les insectes ont été traités comme un facteur répété et l'effet éventuel du groupe d'insectes testés avec un même végétal a été pris en compte dans le modèle (effet aléatoire).

ii. la nature de la première voie choisie (premier choix) : test avec un χ^2 de conformité par rapport à la distribution attendue par chance (25% pour chaque voie d'être visitée en premier par l'insecte),

iii. la position finale de l'insecte à la fin du test : test avec un χ^2 de conformité par rapport à la distribution attendue par chance (25% pour chaque voie d'être visitée en dernier par l'insecte),

iv. la voie fréquentée de manière privilégiée : la voie dans laquelle l'insecte a passé le plus de temps reçoit le rang 1 et ainsi de suite jusqu'à la voie la moins fréquentée recevant le rang 4 : test de la distribution observée avec un χ^2 de conformité par rapport à la distribution attendue par chance (25% pour chaque voie d'être visitée majoritairement par l'insecte) et test de la probabilité de la voie la plus fréquentée par un test binomial bilatéral avec p = 0,25.

2.3 Résultats

Des tests préliminaires ont montré que les insectes restaient peu de temps en zone centrale de mélange et pouvaient rester bloqués dans la partie de jonction entre la chambre de l'olfactomètre et l'ampoule contenant les plants. Ces extrémités ont donc été grillagées pour éviter que l'insecte ne s'y coince.

Dans chaque expérience, une proportion non négligeable d'insectes s'est montrée visiblement stressés par l'introduction dans l'arène olfactométrique et ont par conséquent été écartés pour la suite des analyses (Table 2.2, page 58). Pour chaque expérience, une analyse préliminaire a été menée afin de tester un effet du sexe des individus. Dans le cas de l'expérience I l'ana-

lyse préliminaire prenait également en compte l'origine géographique des insectes (c-à-d, site ardèchois ou site estonien). Dans chacune des trois expériences, le sexe des insectes n'était un facteur influençant leur réponse ($F = 0{,}57$ $P = 0{,}4527$; $F < 0{,}01$ $P = 0{,}9565$; $F = 0{,}02$ $P = 0{,}8836$, respectivement). De même, l'origine des insectes n'influençait pas leur réponse dans l'expérience I ($F = 1{,}23$ $P = 0{,}2563$). Les données des insectes de ces catégories ont par conséquent été regroupées pour la suite de l'analyse et ces facteurs ont été exclus du modèle.

Source de variation	$n - ddl$	$d - ddl$	F	$Pr > F$
Attractivité des voies	3	482	19,18	<0,0001
Nourriture	1	482	0,2	0,6045
Interaction Attractivité*Nourriture	3	482	2,55	0,0366

TAB. 2.3 – Résultat de l'analyse de variance en modèle mixte - Expérience I

Test (type III) des effets sur la durée moyenne passée dans les voies par les insectes (N = 127). n-ddl et d-ddl : respectivement le nombre de degrés de libertés du numérateur et du dénominateur de l'expression calculée pour obtenir la valeur F.

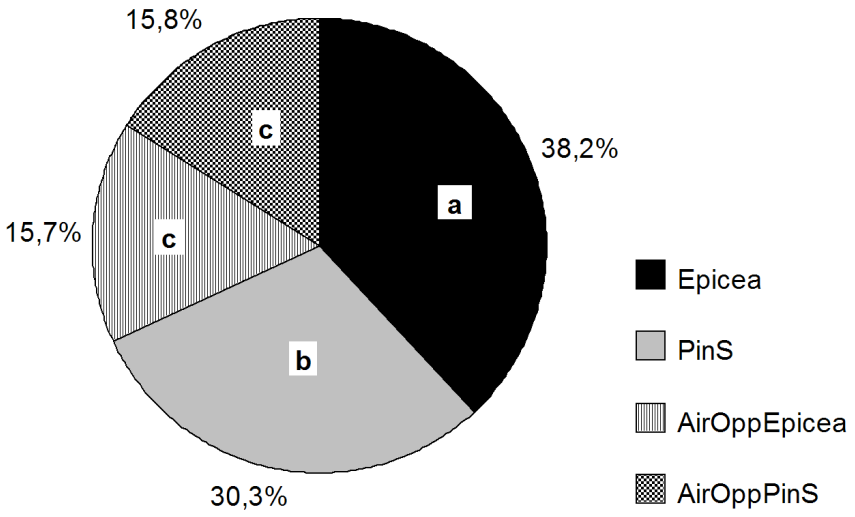


FIG. 2.4 – Durée relative moyenne de séjour dans les voies (%) - Expérience I

Comparaison	Durées relatives de séjour dans les voies comparées (%)	Contrastes			Tukey-Kramer	
		F	P		P	
(Épicéa+PinS) vs (AirOppEp+AirOppPs)	68,5 ± 24,4 vs 31,4 ± 24,4	52,9	$<1.10^{-4}$	***	-	-
Épicéa vs PinS	38,2 ± 27,4 vs 30,3 ± 26,2	4,59	0,03	*	$<1.10^{-2}$	**
AirOppEp vs AirOppPs	15,7 ± 17,0 vs 15,8 ± 18,4	0,05	0,81	NS	0,96	NS
Épicéa vs AirOppEp	38,2 ± 27,4 vs 15,7 ± 17,0	33,17	$<1.10^{-4}$	***	$<1.10^{-4}$	***
Épicéa vs AirOppPs	38,2 ± 27,4 vs 15,8 ± 18,4	40,08	$<1.10^{-4}$	***	$<1.10^{-4}$	***
PinS vs AirOppEp	30,3 ± 26,2 vs 15,7 ± 17,0	15,64	$<1.10^{-4}$	***	$<1.10^{-4}$	***
PinS vs AirOppPs	30,3 ± 26,2 vs 15,8 ± 18,4	17,54	$<1.10^{-4}$	***	$<1.10^{-4}$	***

TAB. 2.4 – Durées relatives de séjour des adultes d'*Hylobius abietis* dans les voies de l'olfactomètre - Expérience I

Les durées relatives de séjour des insectes (N = 127) dans les différentes voies de l'olfactomètre ont été comparées par la méthode des contrastes. ***, ** et * indiquent respectivement une différence significative de séjour à P < 0,0001, P < 0,01 et P < 0,05. NS indique une différence non significative.

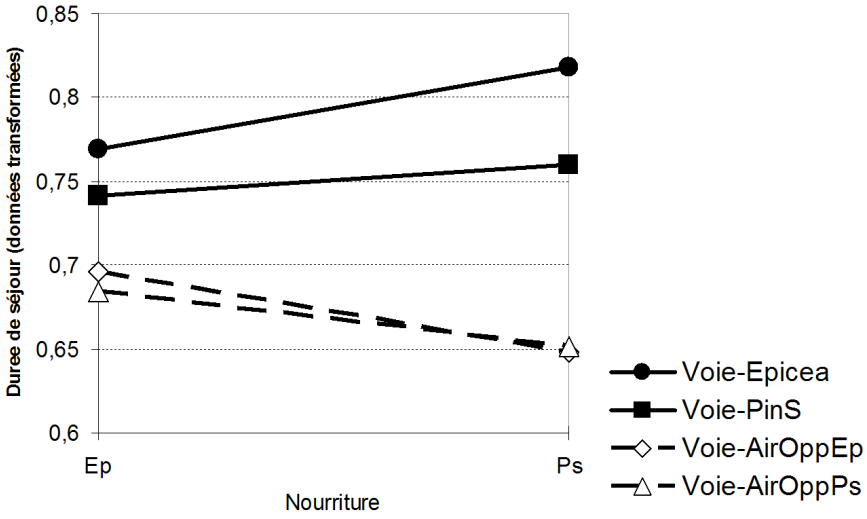


FIG. 2.5 – Graphique d'interaction entre les facteurs Voie et Nourriture - Expérience I

2.3.1 Expérience I

L'examen du premier critère de réponse, la durée relative de séjour, révèle que celle-ci diffère significativement entre les voies ($P < 0{,}0001$, Table 2.3 page 62). Les deux voies avec les végétaux sont plus longuement visitées que les voies témoins où seul l'air humide est insufflé et la voie de l'épicéa est en moyenne plus longuement visitée par les insectes que la voie garnie du pin sylvestre (Figure 2.4 page 62 et table 2.4 page 63, contrastes et test de Tukey-Kramer).

La nourriture est un facteur qui n'influence globalement pas significativement la durée de séjour des insectes dans les voies (Table 2.3). Cependant, l'analyse du modèle révèle un effet marginalement significatif d'interaction sur la durée de séjour entre le type de nourriture reçue par les insectes et la nature de la voie de l'olfactomètre (Table 2.3). Le graphique d'interaction (Figure 2.5, page 63) illustre cette tendance. Tout d'abord, il apparaît que les insectes nourris au pin sylvestre passent en moyenne plus de temps dans les voies odorantes que dans les voies de contrôle. L'analyse des contrastes révèle au premier abord que le temps moyen passé par les individus dans la voie du pin sylvestre ne diffère pas selon leur nourriture, alors que ceux nourris au pin sylvestre passent plus de temps dans la voie épicéa que ceux nourris à l'épicéa (Table 2.6, page 66). Ensuite, il apparaît que, si le temps moyen passé dans les deux voies avec les plants diffère pour les individus nourris au pin sylvestre, ce n'est pas le cas pour les individus nourris à l'épicéa. Cependant, cette tendance n'est pas soutenue par le test ajusté de Tukey-kramer prenant en compte les comparaisons multiples.

L'examen des critères de réponse relatifs au nombre d'insectes visitant les voies permet de préciser les résultats issus de l'analyse de la durée de séjour. La table 2.5 i (page 66) montre en effet que la visite par les insectes de la première voie, dès leur sortie de la zone centrale de mélange des effluves, ne semble pas résulter d'un choix mais se fait plutôt au hasard. Par contre, en fin de test, la répartition des insectes est significativement différente de ce qu'on aurait pu obtenir par hasard (Table 2.5 ii). C'est dans la voie de l'épicéa que l'on dénombre le plus d'insectes en fin d'expérience. De même, un nombre d'insectes très significatif a visité préférentiellement la voie de l'épicéa (Table 2.5 iii).

De même que pour la durée de séjour dans les voies de l'olfactomètre, l'influence de la nourriture sur la fréquentation des voies par les insectes a été examinée (Table 2.5 iv et v). La distribution de fréquentation privilégiée des 48 insectes nourris à l'épicéa ne diffère pas significativement de celle attendue au hasard (Table 2.5 iv, test de χ^2). Cependant, un nombre significatif d'individus a fréquenté de manière privilégiée la voie de l'épicéa (Test binomial). Les résultats diffèrent pour le groupe de charançons nourris avec du pin sylvestre (Table 2.5 v). En effet, la distribution de fréquentation privilégiée est cette fois significativement différente de celle attendue au hasard d'après le test de χ^2. De plus, si un nombre significatif d'individus a, à nouveau, fréquenté de manière privilégiée la voie de l'épicéa, il en va cette fois de même pour le nombre d'individus ayant choisi la voie du pin sylvestre (Table 2.5 v, test binomial).

2.3.2 Expérience II

Lors de cette expérience, comme lors de la précédente, on a proposé aux insectes les effluves de deux essences de conifères, mais cette fois le pin maritime a été substitué au pin sylvestre.

La durée relative de séjour dans les différentes voies n'est pas homogène (Table 2.7, page 68). La durée moyenne de séjour dans la voie du pin maritime est significativement plus grande que dans les autres voies alors que les temps moyens de visite des trois autres voies ne diffèrent pas significativement entre eux (Figure 2.8, page 69 et Table 2.8, page 68). Sur la base de la durée de séjour, l'épicéa ne semble donc pas avoir été discriminé des voies de contrôle.

Comme pour les insectes de l'expérience I, la visite de la première voie se fait au hasard (Table 2.9 i, page 68). Par contre, en fin d'expérience, la répartition des insectes est significativement différente de celle attendue par hasard (Table 2.9 ii). C'est dans la voie du pin maritime que l'on dénombre le plus d'insectes en fin de test : cet indicateur révèle un comportement significatif des insectes (Table 2.9 iii).

2.3.3 Expérience III

L'expérience III soumet les insectes à une situation plus complexe que les deux précédentes puisque trois sources olfactives sont proposées simultanément.

La durée relative de séjour n'apparaît pas homogène entre les voies (Table 2.10, page 70). En moyenne les insectes ont passé autant de temps dans les voies du pin sylvestre, du pin maritime et de l'air alors que la voie de l'épicéa est la moins fréquentée des quatre (Figure 2.9, page 71). L'étude des contrastes et le test de Dunnett confirment ce résultat. Cependant, le test de Tukey ne révèle pas de différence significative entre la durée de séjour dans la voie de l'épicéa et la voie de contrôle, bien que de peu (Table 2.11, page 70). La voie du pin maritime est en moyenne aussi longuement visitée que les voies du pin sylvestre et de l'air (Table 2.11, contrastes et test de Tukey).

Bien que la voie du pin maritime ait été choisie en première intention par un plus grand nombre d'insectes que les autres voies ne l'ont été, la distribution globale ne diffère pas significativement de celle attendue par hasard (Table 2.12 i, page 70). En fin d'expérience, le plus grand nombre d'insectes se trouvait dans les voies des deux essences de pin, à égalité. Cependant, cette distribution ne diffère pas significativement de celle attendue par hasard (Table 2.12 ii).

En concordance avec le test sur la durée de séjour, la fréquentation privilégiée des voies par les insectes diffère significativement d'une répartition au hasard (Table 2.12 ii). La voie du pin maritime, bien qu'ayant été fréquentée de façon privilégiée par un plus grand nombre d'insectes que chacune des autres voies ne l'a été que d'une manière marginalement significative (test binômial, Table 2.12) ; par contre un nombre significativement faible d'insectes a fréquenté de façon privilégiée la voie de l'épicéa ($P = 0{,}0020$, test binomial), ce qui peut indiquer un effet répulsif.

	Critère	n	Voie de l'épicéa	Voie du pin sylvestre	Voies de contrôle (air humide)	P
i	Premier choix	127	38	38	51 (34+17)	0,18[d]
ii	Position finale	122[a]	49	35	38 (24+14)	$< 1.10^{-4}$ [d]
iii	Fréquentation privilégiée	127	59 ($P < 1.10^{-4}$ [b])	39 (NS[b])	29 (14+15) (NS[c])	$< 1.10^{-4}$ [d]
iv	Fréquentation privilégiée des individus nourris à l'épicéa	48	19 ($P < 1.10^{-2}$ [b])	13 (NS[b])	16 (9+7) (NS[c])	0,57[d]
v	Fréquentation privilégiée des individus nourris au pin sylvestre	79	40 ($P < 1.10^{-4}$ [b])	26 ($P < 1.10^{-4}$ [b])	13 (6+7) (NS[c])	$< 1.10^{-4}$ [d]

TAB. 2.5 – Fréquentation des voies par les insectes - Expérience I

[a]certains individus se trouvaient dans la zone centrale à la fin du test. [b]test binômial bilatéral avec une probabilité de visite de 0,25 pour la voie considérée et de 0,75 pour l'ensemble des autres voies. [c]test avec une probabilité de 0,5 pour les 2 voies de contrôle ensemble. [d]test de χ^2 de conformité.

Comparaison	Contrastes			Tukey-Kramer	
	F	P		P	
Nourr.(Ep) x Attr.(Ep) vs Nourr.(Ps) x Attr.(Ep)	52,90	$<1.10^{-4}$	***	-	-
Nourr.(Ep) x Attr.(Ps) vs Nourr.(Ps) x Attr.(Ps)	4,59	0,03	*	$<1.10^{-2}$	**
AirOppEp vs AirOppPs	0,05	0,81	NS	0,96	NS
Nourr.(Ps) x Attr.(Ep) vs Nourr.(Ps) x Attr.(Ps)	33,17	$<1.10^{-4}$	***	$<1.10^{-4}$	***
Nourr.(Ep) x Attr.(Ep) vs Nourr.(Ep) x Attr.(Ps)	40,08	$<1.10^{-4}$	***	$<1.10^{-4}$	***

TAB. 2.6 – Test des durées relatives de séjour des adultes d'*Hylobius abietis* dans les voies de l'olfactomètre détaillées selon le type de nourriture reçue - Expérience I.

Les durées relatives de séjour des insectes (N = 127) dans les différentes voies de l'olfactomètre ont été comparées par la méthode des contrastes. ***, ** et * indiquent respectivement une différence significative de séjour à $P <$ 0,0001, $P <$ 0,01 et $P <$ 0,05. NS indique une différence non significative. Nourr. pour nourriture, Attr. pour attractivité, Ep pour épicéa et Ps pour pin sylvestre.

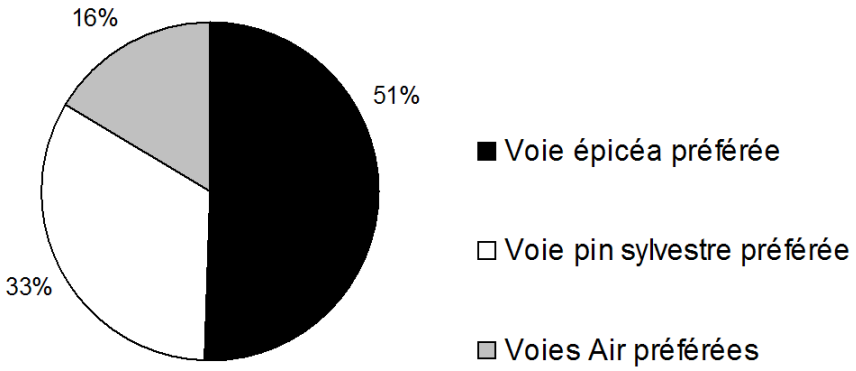


FIG. 2.6 – Fréquentation privilégiée des individus nourris avec du pin sylvestre Expérience I

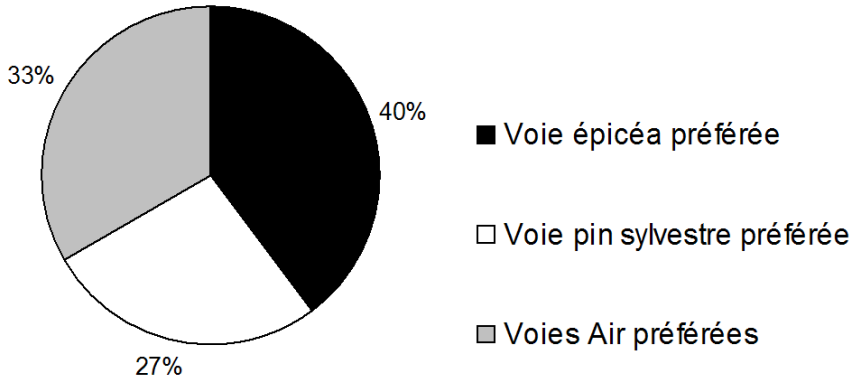


FIG. 2.7 – Fréquentation privilégiée des individus nourris avec de l'épicéa de Norvège Expérience I

Source de variation	$n-ddl$	$d-ddl$	F	$Pr > F$
Attractivité des voies	3	97	3,54	0,02

TAB. 2.7 – Résultat de l'analyse de variance en modèle mixte - Expérience II
Test (type III) des effets sur la durée moyenne passée dans les voies par les insectes (N = 26)

Comparaison	Durées relatives de séjour dans les voies comparées (%)	Contrastes F	Contrastes P		Tukey kramer P ajusté	
(Épicea+PinM) vs (AirOppEp+AirOppPM)	62,3 ± 25,0 vs 37,7 ± 25,0	5,97	0,02	*	-	-
Épicea vs PinM	23,7 ± 23,7 vs 38,6 ± 31,4	4,34	0,04	*	0,17	NS
AirOppEp vs AirOppPM	17,1 ± 15,8 vs 20,6 ± 18,1	0,30	0,59	NS	0,95	NS
Épicea vs AirOppEp	23,7 ± 23,7 vs 17,1 ± 15,8	0,92	0,34	NS	0,77	NS
Épicea vs AirOppPM	23,7 ± 23,7 vs 20,6 ± 18,1	0,17	0,68	NS	0,98	NS
PinM vs AirOppEp	38,6 ± 31,4 vs 17,1 ± 15,8	9,25	$<1.10^{-2}$	**	0,02	*
PinM vs AirOppPM	38,6 ± 31,4 vs 20,6 ± 18,1	6,24	0,01	*	0,07	NS

TAB. 2.8 – Test des durées relatives de séjour des adultes d'*Hylobius abietis* dans les voies de l'olfactomètre - Expérience II
Les durées relatives de séjour des insectes (N = 26) dans les différentes voies de l'olfactomètre ont été comparées par la méthode des contrastes. ***, ** et * indiquent respectivement une différence significative de séjour à $P < 0{,}0001$, $P < 0{,}01$ et $P < 0{,}05$. NS indique une différence non significative.

	Critère	n	Voie de l'épicéa	Voie du pin maritime	Voies de contrôle (air humide)	P
i	Premier choix	26	7	11	8	$0{,}079^d$
ii	Position finale	26	5	13	8	$< 0{,}005^d$
iii	Fréquentation privilégiée	26	5	11 $P = 0,0154^a$	10	$< 0{,}0677^d$

TAB. 2.9 – Fréquentation des voies par les insectes - Expérience II
[a]test binomial bilatéral avec une probabilité de visite de 0,25 pour la voie considérée et de 0,75 pour l'ensemble des autres voies. [b]test de χ^2 de conformité.

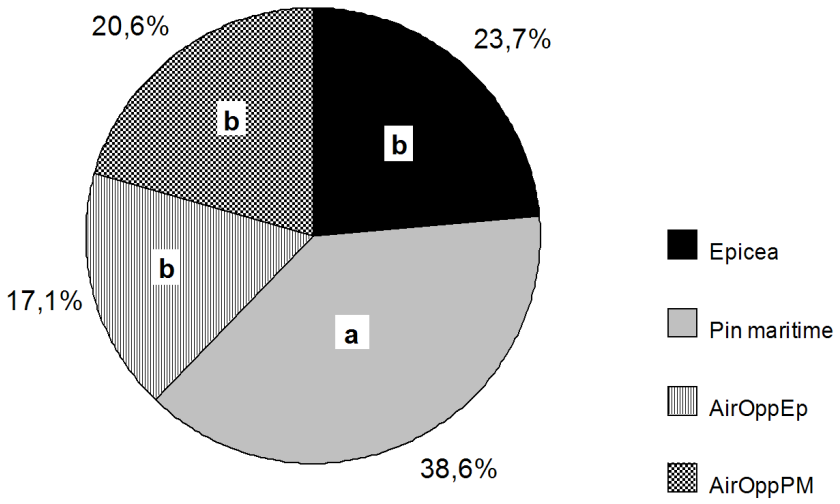


FIG. 2.8 – Durée relative moyenne de séjour dans les voies (%)
Expérience II

Source de variation	$n-ddl$	$d-ddl$	F	$Pr > F$
Attractivité des voies	3	108	5,69	<0,0012

Tab. 2.10 – Résultat de l'analyse de variance en modèle mixte - Expérience III
Test (type III) des effets sur la durée moyenne passée dans les voies par les insectes (N = 37)

Comparaison	Durées relatives de séjour dans les voies comparées (%)	Contrastes F	Contrastes P		HSU de Dunnett P		Tukey-kramer P ajusté	
PinM vs PinS	62,3 ± 25,0 vs 37,7 ± 25,0	5,97	0,55	NS	-	-	0,93	NS
PinM vs Epicea	23,7 ± 23,7 vs 38,6 ± 31,4	4,34	$<1.10^{-3}$	***	-	-	$<1.10^{-2}$	**
PinS vs Epicea	17,1 ± 15,8 vs 20,6 ± 18,1	0,30	$<1.10^{-2}$	**	-	-	$<1.10^{-2}$	**
PinM vs Air	23,7 ± 23,7 vs 17,1 ± 15,8	0,92	0,21	NS	0,44	NS	0,58	NS
PinS vs Air	23,7 ± 23,7 vs 20,6 ± 18,1	0,17	0,50	NS	0,84	NS	0,91	NS
Epicea vs Air	38,6 ± 31,4 vs 17,1 ± 15,8	9,25	0,01	*	0,03	*	0,05	NS

Tab. 2.11 – Test des durées relatives de séjour des adultes d'*Hylobius abietis* dans les voies de l'olfactomètre lors de l'expérience III
Les durées relatives de séjour des insectes (N = 37) dans les différentes voies de l'olfactomètre ont été comparées par la méthode des contrastes. ***, ** et * indiquent respectivement une différence significative de séjour à P < 0,0001, P < 0,01 et P < 0,05. NS indique une différence non significative.

	Critère	n	Épicéa	Pin maritime	Pin sylvestre	Air	P
i	Premier choix	37	9	14	7	7	0,32[c]
ii	Position finale	34[a]	4	11	11	8	0,27[c]
iii	Fréquentation privilégiée	37	2	13 $P = 0,01$[b]	11	11	0,02[c]

Tab. 2.12 – Fréquentation des voies par les insectes - Expérience III
[a]certains individus se trouvaient dans la zone centrale à la fin du test. [b]test binômial bilatéral avec une probabilité de visite de 0,25 pour la voie considérée et de 0,75 pour l'ensemble des autres voies. [c]test de χ^2 de conformité.

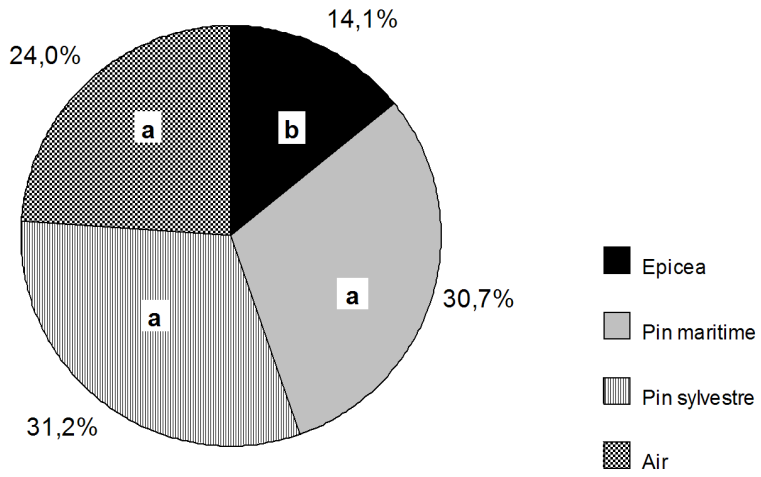


FIG. 2.9 – Durée relative moyenne de séjour dans les voies (%)
Expérience III

2.4 Discussion

2.4.1 Les insectes

Variabilité inter-individuelle Cette étude a été réalisée avec des insectes collectés sur le terrain qui représentent donc des échantillons de populations naturelles. Ceci a été le cas de la majorité des études précédentes sur le comportement de discrimination de l'hôte végétal chez *Hylobius abietis* (Leather *et al.*, 1994 ; Manlove *et al.*, 1997 ; Skrzecz, 1996 ; Watson, 1999). Il n'existait pas à notre connaissance de moyen non destructeur de connaître *a priori* les facteurs tels que l'âge ou l'état physiologique des insectes et il est vraisemblable que les résultats aient pu être influencés par cette variabilité ainsi que le mentionne Watson (1999). C'est pourquoi cette variabilité inter-individus a été prise en compte dans l'analyse de la durée moyenne de séjour (cf matériel et méthode) bien que Björklund (2004) n'ait pas noté d'effet de l'âge ou du statut reproductif lors d'expériences d'attraction par des plantules de pin sylvestre avec des insectes d'élevage. L'absence de réplications pour chaque individu empêche cependant l'accès à une éventuelle variabilité intra-individuelle de la réponse.

Sexe des individus Il n'est pas étonnant de ne pas observer de différence de réponse entre mâles et femelles, quel que soit le critère comportemental considéré, ce qui concorde avec des observations précédentes (Selander, 1979). En effet, le matériel végétal testé est utilisé dans la nature de manière équivalente par les insectes des deux sexes leur nutrition de maturation et de sustentation.

2.4.2 Les végétaux

La verrerie disponible ne permettait pas d'inclure la totalité des plantules, à savoir les parties aériennes et les parties souterraines contenues dans la motte de terre. Bien que tout ait été fait pour minimiser le stress subi par les plantules il est évident que le fait de les sectionner au niveau du collet n'est pas neutre. Les parties lésées n'ont certes pas été exposées à l'air pulsé, la section étant immergée dans le tube eppendorf, mais il n'est pas possible d'exclure un effet de ce traumatisme sur le spectre des substances volatiles émises.

Par ailleurs, il est évident que le faible nombre d'arbres utilisés ne permet pas de juger de la totale variabilité en composés volatiles qui existe chez ces trois essences de conifères. Nous n'avions pas les moyens de caractériser le chémotype des plants utilisés dans cette étude afin de détecter d'éventuelles disparités. Certaines études ont en effet montré l'existence de grandes variations individuelles de composés volatiles émis selon le génotype chez *Picea abies* comme chez *Pinus sylvestris* (Yazdani *et al.*, 1985; Schönwitz *et al.*, 1989). Cependant, (Wibe *et al.*, 1998) ont montré que les compositions relatives des principaux énantiomères des monoterpènes sont constantes chez ces deux essences, en dépit des variations individuelles (voir discussion plus bas page 75). Ceci vaut pour les principaux composés élicitant des réponses comportementales chez *Hylobius abietis* (Mustaparta, 1975). Par conséquent, on peut espérer que les réponses

des insectes lors de notre étude soient représentatives des différences entre les deux essences, du moins pour les lots de plants utilisés et compte tenu du conditionnement similaire pour les utiliser dans le dispositif.

2.4.3 Conditions expérimentales et réponse des insectes dans le dispositif

Durée des expériences et critères de réponse Malgré les précautions prises pour minimiser l'effet du stress de l'expérience sur la réponse des insectes, il semble que le départ de l'insecte ne soit pas toujours motivé par une attraction olfactive. En effet, dans aucune des trois expériences, le critère du premier choix n'a révélé de réponse significative des insectes au seuil de 5%, même si l'expérience II semble montrer un telle tendance. Ainsi, même si de nombreux comportements d'antennation ont été observés dans la zone centrale de départ avant que les insectes ne pénètrent dans les voies de l'olfactomètre il semble que le choix de l'insecte s'effectue plutôt par un comportement de type prospectif. En effet, les insectes se sont montrés très mobiles dans l'arène de l'olfactomètre et ils sont connus pour être de bons marcheurs dans la nature. Néanmoins, quelques insectes ont tenté de prendre leur envol dans l'olfactomètre après être entrés dans les voies.

Contrairement au critère du premier choix, l'analyse de la position finale des insectes dans le dispositif révèle une réponse significative dans les expériences I et II. Ceci tend à indiquer que les insectes intègrent progressivement la nature des effluves au cours de leurs visites des différentes voies de l'olfactomètre pour finir, préférentiellement, dans une voie en fin d'expérience. Cependant, dans l'expérience III, la diffusion de trois sources odorantes pour quatre voies ne permet pas d'observer ce schéma de réponse.

Finalement, les déplacements assez rapides des insectes observés dans l'arène de l'olfactomètre correspondent vraisemblablement à des cinèses qui sont des réponses non orientées au *stimulus* odorant. Il n'a cependant pas été noté si les mouvements s'accéléraient dans une voie par rapport à une autre ou au contraire si les insectes marquaient des arrêts dans le sens de provenance des effluves. Une analyse de ce type aurait requis un dispositif d'enregistrement des images.

Influence de l'absence des indices visuels Björklund (2004) a montré que l'attirance des adultes d'*Hylobius abietis* envers des plantules de pins était déterminée, à courte distance, à la fois par des *stimuli* olfactifs et visuels dont les effets étaient additifs. Ces critères de choix influencent la décision de l'insecte qui se déplace au sol sur les parcelles replantées. Néanmoins, il n'est pas fait mention d'une éventuelle discrimination des essences sur la base de ces indices visuels. Ainsi, on peut penser que la réponse des insectes dans l'olfactomètre n'est pas minorée par l'absence d'indices visuels et peut être représentative de la prise de décision après intégration du signal olfactif porté par le vent depuis les diverses parcelles forestières avoisinantes ; les indices visuels entrant plus probablement en jeu après la séquence comportementale de sélection du site.

2.4.4 Les insectes parviennent-ils à discriminer les essences selon les effluves émises par des plantules ?

Dans chacune des trois expériences présentées, l'analyse des différents critères choisis pour évaluer le comportement des insectes montre que ceux-ci répondent positivement aux *stimuli* olfactifs qui leur étaient soumis. Cette réponse positive s'est manifestée par une durée et un nombre de visites significativement plus important que dans les voies de contrôle. La capacité des adultes d'*Hylobius abietis* à différencier les plantules sur la base de leurs effluves olfactives est cependant à nuancer.

En première analyse, les insectes des deux premières expériences ont montré une préférence significative pour l'une des deux essences proposées. La réponse des insectes de la première expérience doit cependant être détaillée.

Expérience I Certains indices tendent à montrer que la réponse des insectes se sous-structure selon la nourriture qu'ils ont reçue. Il apparaît qu'un nombre significatif d'insectes a montré une préférence pour le pin sylvestre et ce, seulement parmi les insectes qui avaient été nourris au pin sylvestre. Il semble que les insectes nourris à l'épicéa n'aient préféré que l'épicéa (critère de la fréquentation privilégiée) voire même qu'ils n'aient pas discriminé les odeurs de l'épicéa de celles du pin sylvestre (critère de la durée de séjour). Au contraire, les insectes nourris au pin sylvestre se divisent en deux lots, l'un attiré préférentiellement par l'épicéa et l'autre par le pin sylvestre (critère de la fréquentation privilégiée).

Deux hypothèses pourraient expliquer la différence de temps passé dans les voies odorantes selon le type de nourriture reçue par les insectes :

- La première invoque une différence de tonus des insectes : la qualité nutritive de l'épicéa a pu être inférieure à celle du pin sylvestre au point de rendre les insectes plus apathiques et moins réactifs dans le dispositif olfactométrique. Cependant, le nombre d'insectes écartés pour cause de non réactivité de plus de cinq minutes dans la zone centrale est très faible (1 sur les 201 insectes testés dans l'expérience I) et ne permet pas de conforter cette hypothèse.
- La seconde hypothèse repose sur une « imprégnation » des individus par la nourriture. Récemment, Mustaparta (2005) évoquait un possible conditionnement par la nourriture de la réponse des insectes à des *stimuli* olfactifs. Dans cette communication Mustaparta rapporte les travaux de Müller *et al.* (2002) qui ont montré l'existence d'une possible connexion neuronale entre les fonctions de l'olfaction et du goût chez des papillons de la sous-famille des *Heliotinae*. L'auteur suggère finalement qu'un système similaire pourrait être responsable d'une corrélation entre le contenu terpénique de la nourriture de l'hylobe et ses préférences olfactives.

Ainsi, sous cette dernière hypothèse, si les effluves émises par les plants d'épicéa étaient intrinsèquement plus attractives pour les insectes que celles émises par les plants de pin sylvestre, une alimentation à base de pin a pu atténuer la différence d'attractivité entre les deux essences.

Néanmoins, la préférence de l'épicéa par rapport au pin sylvestre d'un des lots d'insectes peut sembler contredire les études antérieures de préférence nutritive qui classaient les essences dans l'ordre inverse (Leather *et al.*, 1994; Manlove *et al.*, 1997). Cependant, ces expériences se sont basées sur la quantité d'écorce consommée par les insectes pour hiérarchiser leurs préférences. Cela constitue un test d'acceptabilité au cours duquel les insectes ont pu librement « ajuster » leur consommation d'écorce après des morsures d'essai. Localisation de l'hôte ne signifie pas toujours acceptation de l'hôte, une essence peut être plus attractive d'un point de vue olfactif mais moins d'un point de vue gustatif. Cependant elles contredisent également les expériences de piégeage sur rondin qui comptabilisent les insectes arrivés en « première intention » sur le matériel végétal, comme celle de Langström (1982).

Expérience II La réponse des insectes semble plus tranchée dans cette expérience qui affichent une préférence pour le pin maritime. Contrairement à l'expérience précédente, l'épicéa n'est pas la voie préférée, n'est même pas différencié des voies de contrôle. Contrairement aux individus ardèchois et estoniens qui provenaient de forêts mixtes avec des parcelles plantées en pin sylvestre et d'autres en épicéa de Norvège, les individus landais n'ont, *a priori*, été en contact au cours de leur vie qu'avec une seule essence : le pin maritime. S'il existe des différences importantes de signatures volatiles des essences à ce stade, il est possible que des insectes adaptés depuis des générations à une seule essence-hôte ne reconnaissent pas un hôte potentiel comme tel lors d'un premier contact olfactif. Les résultats de cette expérience fournissent donc des indices en faveur d'une adaptation locale des hylobes landais au pin maritime.

Expérience III Cette expérience a tout d'abord confirmé que l'épicéa n'est pas attractif pour les insectes landais, il est même moins visité que la voie de contrôle sans qu'un effet de répulsion ait pu cependant être identifié. Ceci est peut être l'indice d'une mobilisation des ressources perceptuelles de l'insecte pour le déchiffrage des signaux les plus stimulants. Par contre, les deux essences de pins ne semblent pas différenciées par les insectes dans le dispositif. Les différences de composés volatiles émis entre les plantules des deux essences de pin trouvées dans la littérature (cf section suivante) ne sont peut être pas de nature à induire une réponse comportementale spécifique chez les insectes étudiés. Il faut néanmoins ajouter que la sélectivité de l'insecte semble diminuer quand le mélange d'odeurs est important (3 sources olfactives) puisque la voie de contrôle est a peine moins visitée que les voies des *Pinus*. Cependant une autre explication repose sur la nature même du dispositif expérimental qui montre ses limites dans une telle expérience de discrimination. Des olfactomètres à six voies ont été récemment développés (Turlings *et al.*, 2004) et permettraient peut être d'obtenir des résultats plus contrastés grâce aux voies témoins supplémentaires.

Composés chimiques potentiellement impliqués dans la discrimination des essences Le pin sylvestre et l'épicéa de Norvège ont de nombreux composés en commun mais dans des

quantités souvent largement variables, et chaque essence possède des composés spécifiques (Mustaparta, 1975; Nordlander, 1990). L'analyse des volatiles mono-terpèniques des plantules, par Wibe *et al.* (1998), a montré que *P. sylvestris*, en dépit de variations individuelles, émet plus de (−)-α-pinène que de (+)-α-pinène et inversement pour *P. abies*. Plus récemment, dans une étude des composés volatiles émis par différentes espèces du genre *Pinus*, Fäldt (2000) a montré dans son étude que *P. pinaster maritima* était caractérisé par une plus grande quantité de (−)-α-pinène et de (−)-β-pinène que *P. sylvestris* qui présentait plus de (+)-α-pinène et (+)-3-carène. Ces différences de signature chimique sont potentiellement la base d'une discrimination olfactive spécifique par les insectes. Cependant, on ne sait actuellement pas si ce sont plutôt les composés majoritaires communs ou les composés spécifiques qui seraient impliqués. Le processus est probablement plus complexe et peut impliquer tout ces composés, des effets de synergie et peut évoluer en fonction du stade physiologique de la plante ou du stade de dégradation pour le substrat de ponte.

2.4.5 Influence de l'origine géographique sur la réponse des insectes

Malgré l'absence de certains tests complémentaires avec les autres combinaisons d'essences (par ex. : pin maritime vs pin sylvestre soumis aux ardèchois et estoniens) les expériences menées lors de cette étude permettent néanmoins de mettre en lumière certains comportements. L'expérience I montre tout d'abord que des individus collectés dans des points assez éloignées de l'aire de répartition de *Hylobius abietis* (France et Estonie) montrent le même type de réponse dans le dispositif expérimental : c'est à dire la même variabilité et la même structuration selon le type de nourriture. Les expériences II et III, d'autre part, montrent qu'il existe des indices d'un effet de l'habitat d'origine sur les préférences des charançons. La forêt des Landes étant géographiquement beaucoup plus proche de celle du site ardèchois que du site estonien, il semble bien que la différence de réponse des insectes dans l'olfactomètre repose sur l'hôte végétal. Il n'est cependant pas possible d'affirmer l'existence de capacités d'apprentissage olfactif chez *Hylobius abietis* liées à l'expérience sur l'habitat exploité avant la dispersion.

2.4.6 Perspectives

Afin de trancher entre effet de l'expérience passée par rapport à l'expérience récente, il faudrait par exemple comparer la réponse d'insectes landais conditionnés avec une nourriture à base d'épicéa avec celle obtenue ici.

Par ailleurs, il manque des tests de nourrissage avec les mêmes individus et le même matériel végétal pour vérifier si la réponse des insectes est cohérente avec la tendance observée dans la phase de localisation de l'hôte simulée par nos tests ou si elle correspond à celle observée dans les études de nourrissage antérieures.

Il serait intéressant de réaliser des tests comparables avec du matériel de ponte (souche en décomposition) en contrôlant l'état physiologique insectes (femelles à la recherche d'un substrat de ponte). Le comportement d'adultes de *Hylobius abietis* vis à vis de matériel de ponte a déjà

été testé dans un olfactomètre (Watson, 1999), mais les insectes utilisés ayant été récoltés sur le terrain leur état physiologique et la phase de leur cycle étaient inconnus. De plus, les deux essences n'avaient pas été opposées directement.

B. Choix de ponte

2.5 Introduction

L'idée que les traits qui adaptent une population à un habitat ou à un hôte puissent être délétères dans d'autres habitats ou sur d'autres hôtes est au centre de la plupart des théories sur l'évolution de la spécialisation (Jaenike, 1990; Via, 1990; Fry, 1996).

Chez les espèces dont les juvéniles sont relativement immobiles, la sélection d'un site d'oviposition approprié par les femelles adultes est très important. En effet, les juvéniles qui ne peuvent pas quitter le site d'oviposition qui a été choisi, n'ont à priori que très peu de marge de manoeuvre pour optimiser eux-mêmes leur développement et leur survie. Ainsi, un corollaire souvent associé au « compromis de performance » entre habitats ou plantes-hôtes est que la performance de la progéniture est positivement corrélée à la préférence des femelles pour le site de ponte. Dans de pareils cas, l'idée que « la mère sait ce qui est le mieux[10] » prévaut.

Chez *Hylobius abietis*, le succès d'éclosion puis de développement ont été étudiés expérimentalement (Thorpe et Day, 2002; Wainhouse *et al.*, 2001). Cependant, l'étape comportementale précédent la ponte n'a pas encore été étudiée dans le cas où la femelle est confrontée à plusieurs plantes-hôtes. En fait, peu de données comparant les performances relatives des insectes selon l'essence de développement sont disponibles. Il faut néanmoins mentionner les travaux de Bejer-Petersen *et al.* (1962) qui, au travers de leur étude de terrain menée dans plusieurs pays nordiques (Norvège, Suède, Finlande et Danemark), ont mis en évidence une plus longue durée de développement des larves sur Épicéa de Norvège que sur Pin sylvestre. Plus tard, Guslits (1970) a confirmé ces résultats en laboratoire : non seulement le développement est plus lent sur épicéa mais en plus les charançons émergeant des bûches d'épicéa sont plus petits, pondent moins d'oeufs et vivent moins longtemps que ceux ayant émergé de bûches de pin sylvestre.

De plus, le choix du site de ponte peut être influencé par les conditions du développement larvaire (nature de l'essence) expérimentées par la mère et par la nature de l'alimentation de la mère précédant la ponte (influence sur l'état physiologique et imprégnation possible). Afin de répondre à ces questions, nous avons mené 4 expérimentations :

1. Test du choix de plusieurs femelles d'essence d'origine inconnue et du succès de développement larvaire.
2. Test du choix d'une femelle d'origine connue (Landes, Pin maritime).
3. Test de l'influence de la nourriture sur le choix de ponte d'une femelle d'origine contrôlée.
4. Test des effets sur les oeufs de leur transplantation sur l'essence alternative.

[10]Sous-entendu, ce qui est le mieux pour sa progéniture (« mother knows best » en anglais).

2.6 Matériel et méthode

Il est évident que ces tests de ponte souffrent de défauts de conception en partie à dus la difficulté de faire coïncider la disponibilité en matériel végétal et en matériel animal.

Les différents test de ponte et de développement au laboratoire et leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 2.13 page 78.

n° du test	**Provenance des insectes**	**Matériel Végétal**	**Question**
1	terrain sur Ps et Ep	B ; Ps, Ep	Choix de plusieurs femelles d'origine inconnue (site mixte)
2	terrain sur Pm	B ; Ps, PM, Ep	Choix d'une femelle d'origine connue (site monospécifique)
3	élevage	b ; Ps, Ep	Choix d'une femelle
4	élevage	B ; Ps, Ep	Transplant d'oeufs

Tab. 2.13 – Résumé des expérimentation de choix de ponte chez *Hylobius abietis*
Légende : Ps pour pin sylvestre ; Pm pour pin maritime ; Ep pour épicéa de Norvège ; B pour bûche ; b pour bûchette (voir la distinction dans le matériel et méthodes).

Cages	Nombre d'insectes		Provenance des insectes
	Femelles	Mâles	
A et B	9	2	Mazan, (Ardèche - France)
C et D	16	4	Lanarce, (Ardèche - France)
E	4	8	Lac Ferrand, (Ardèche - France)
Total	58	28	

Tab. 2.14 – Dispositif et nature des insectes du test 1
Les insectes proviennent de sites mixtes à pin sylvestre et épicéa de Norvège

2.6.1 Test n° 1 : évaluation de la survie des pontes sur les bûches au cours du temps

Comme les individus utilisés pour ces expériences préliminaires provenaient du terrain et que nous ne disposions pas de moyen d'évaluer leur état physiologique - particulièrement la capacité à pondre des femelles - plusieurs individus ont été placés en même temps dans les cages.

Le matériel de ponte consistait en des bûches coupées dans le tronc de deux arbres. Les bûches ont été enduites de paraffine à leurs extrémités afin de prévenir leur dessèchement puis enterrées horizontalement dans du terreau horticole non traité ; seule une faible surface affleurait. Chaque cage contenait deux bûches, une de pin sylvestre et une d'épicéa de Norvège. Quatre cages ont ainsi été préparées et placées au laboratoire à température ambiante. Dans deux d'entre elles, 11 individus ont été introduits, 9 femelles et 2 mâles ; tandis que les deux autres recevaient 20 individus, à chaque fois 16 femelles et 4 mâles (soit un total de 86 adultes, 28♂et 58♀). Les

insectes ont été laissés pendant 1 mois dans les cages pour la ponte avec des branchages des deux essences pour se nourrir. Au bout de cette période, les insectes ont été retirés et les bûches ont été séparées et placées chacune dans une cage dans du terreau selon la même procédure que précédemment.

Un mois plus tard, les bûches des cages A, C et E ont été écorcées pour rechercher des pontes. Les autres bûches (B et D) ont été écorcées un mois après.

2.6.2 Test n° 2 : choix de ponte des hylobes landais

Les imagos ont été récoltés sur le terrain en forêt landaise en septembre 2002, leur essence de développement est donc très probablement le pin maritime. Onze cages ont été préparées avec dans chacune deux bûches, chacune d'une essence de conifère : 4 cages ont été garnies avec du pin maritime et de l'épicéa, 5 avec du pin sylvestre et de l'épicéa, 2 avec du pin maritime et du pin sylvestre. Dans chaque cage un couple d'insectes a été introduit et ils y ont été laissés durant 15 jours. Au bout de cette période les bûches ont été séparées dans des cages individuelles. Les bûches ont été écorcées 4 mois plus tard, un des objectifs étant d'obtenir des adultes, une durée suffisamment longue a été laissée pour le développement complet.

2.6.3 Test n° 3 : choix de ponte sur bûchettes : étude de l'influence de la nourriture

Les insectes utilisés dans cette expérience ont été récoltés à l'état de larves sur des souches de pin sylvestre dans la région du Limousin (France). Dans cette expérience, l'essence d'origine des insectes était donc contrôlée. Des fragments d'écorce ont été recueillis et gardés au laboratoire jusqu'à émergence des adultes. Les insectes obtenus ont été séparés au fur et à mesure de leur émergence selon leur sexe. Les femelles comme les mâles ont été séparés en deux lots : l'un nourri avec des branchettes de pin sylvestre et l'autre avec des branchettes d'épicéa. Après une période de 15 jours, les individus des deux sexes sont mis en contact pour accouplement en respectant leur essence de nourrissage.

Vingt-trois couples d'insectes sont introduits chacun dans un dispositif constitué de deux boites reliées un tube en plastique (voir caractéristiques sur la figure **??**, page **??**). Une boîte reçoit des bûchettes de pin sylvestre et l'autre des bûchettes d'épicéa. Les bûchettes étaient longues de 8 cm pour un diamètre de 3 cm. Un test préliminaire a montré que les insectes pouvaient se déplacer d'un compartiment à l'autre facilement. Trois fois par jour, la position des femelles dans le dispositif est relevée afin de vérifier si les insectes se déplacent librement d'un compartiment à l'autre. Les couples sont laissés 10 jours dans le dispositif. Au bout de cette période les bûchettes sont écorcées pour compter les oeufs. Les oeufs sont immédiatement stockés sur papier humide à 4°C.

2.6.4 Test n° 4 : transplant des oeufs sur bûches

Les oeufs récoltés sur les bûchettes ont été implantés sur des bûches de taille suffisante pour permettre le développement des larves, analogues à celles utilisées dans les tests de ponte précédents et dont les extrémités ont également été paraffinées. Deux types de transplants ont été réalisés :

- des transplants « réciproques » : les oeufs provenant d'une essence sont implantés sur l'autre
- des transplants « natifs », ou témoins : les oeufs sont implantés sur la même essence

Six bûches de chaque essence ont été utilisées pour recevoir les oeufs. Sur chaque bûche 15 oeufs ont été implantés dans des trous forés avec une mèche fine d'un diamètre légèrement supérieur à celui des oeufs. Les trous d'implantation ont été forés dans l'écorce à espacement régulier sur la moitié supérieure de la bûche afin d'éviter que les galeries d'éclosion ne soient en contact. Les trous ont été rebouchés avec de la sciure d'écorce et occultés avec une pastille adhésive.

2.7 Résultats et discussion

Objectivement, étant données les difficultés expérimentales rencontrées et l'incomplétude des plan expérimentaux, il serait malvenu de tirer des conclusion péremptoires à partir de ces données. Néanmoins, quelques points peuvent être discutés compte tenu des connaissances déjà disponibles sur cette partie de la biologie de *Hylobius abietis*.

2.7.1 Test n° 1

Le nombre d'insectes et leur stade de développement est donné dans le tableau 2.15, page 81. Si l'on se base sur les effectifs relevés sur les bûches écorcées à 1 mois et que l'on admet que tous les oeufs pondu ont éclos, alors la ponte des femelles a été plus importante sur épicéa que sur pin dans les trois cages. Par contre, si on se base sur les effectifs à 2 mois, on fait le constat inverse. Alors qu'à 1 mois, les larves sont plus nombreuses sur épicéa, leur masse est significativement plus faible que celle des larves sur pin sylvestre (ANOVA : $F = 265,04, P < 1.10^4$; et figure 2.10, page 82).

L'histogramme de distribution des masses larvaires sur les deux essences à 1 mois montre une sur-représentation de la classe de masses les plus faibles sur épicéa (Figure 2.11 page 82). La densité larvaire à 1 mois est plus importante sur épicéa que sur pin sylvestre tandis que la tendance inverse est observée sur les bûches écorcées à deux mois (Figure 2.12, page 83).

	Écorçage à 1 mois						Écorçage à 2 mois			
Cage	A		C		E		B		D	
Essence	Pin	Épicéa	Pin	Épicéa	Pin	Épicéa	Pin	Épicéa	Pin	Épicéa
larves	58	109	57	86	36	55	0	17	5	22
nymphes	0	0	0	0	8	0	0	2	5	0
adultes	0	0	0	0	1	0	38	0	25	0
total	58	109	57	86	45	55	38	19	35	22
ind/cm^2	0,046	0,104	0,039	0,079	0,035	0,050	0,030	0,018	0,024	0,021

TAB. 2.15 – Test n° 1 : dénombrement et stade de développement des insectes à l'écorçage des bûches

2.7.2 Test n° 2 : choix de ponte des insectes landais

Les résultats du dénombrement des insectes à l'écorçage des bûches est donné dans le tableau 2.16, page 84. Compte tenu des faibles effectifs obtenus, nous n'avons pas réalisé de tests statistiques mais lorsqu'ils ont le choix, les hylobes landais préfèrent le pin maritime au pin sylvestre et à l'épicéa de Norvège. Quand on ne leur donne que du pin sylvestre et de l'épicéa de Norvège, ils préfèrent l'épicéa. Cependant, les bûches de pin sylvestre se sont révélées particulièrement sèches et donc probablement impropres à la ponte car non attractives. Sous cette hypothèse, les cages « pin sylvestre vs épicéa » constituent involontairement des cages témoins de la capacité des insectes des Landes à pondre sur l'épicéa : sans autre alternative, la ponte peut se faire mais elle n'est pas forte en raison d'une faible attractivité (alternativement la ponte se fait mais la survie est très mauvaise). Cela signifierait que les résultats observés dans les cages 1 à 5 sont très significatifs de la préférence marquée des insectes pour le pin maritime.

2.7.3 Test n° 3 : ponte sur bûchettes

Le suivi de la position des insectes dans le dispositif a montré que les femelles se sont librement déplacées d'une boîte à l'autre durant tout la durée du test. Toutes essences confondues, les femelles ont pondu en moyenne 12,9 ± 9,4 oeufs. Globalement, plus d'oeufs ont été pondus sur épicéa (150) que sur pin (146) (Table 2.17, page 84). Cependant, ni le nombre moyen d'oeufs pondus par femelle ni leur nombre total ne diffèrent statistiquement entre pin sylvestre et épicéa (Respectivement : test t, $P = 0,942$ et test binomial). La ponte sur pin sylvestre représente 70% de la ponte totale des femelles nourries au pin sylvestre, alors qu'elle ne représente que 35% pour les femelles nourries à l'épicéa. Au total, les bûchettes de pin ont reçu significativement plus d'oeufs que les bûchettes d'épicéa de la part des femelles nourries au pin (Test binomial, $P = 3,4.10^{-6}$). Réciproquement, un plus grand nombre d'oeufs a significativement été pondu

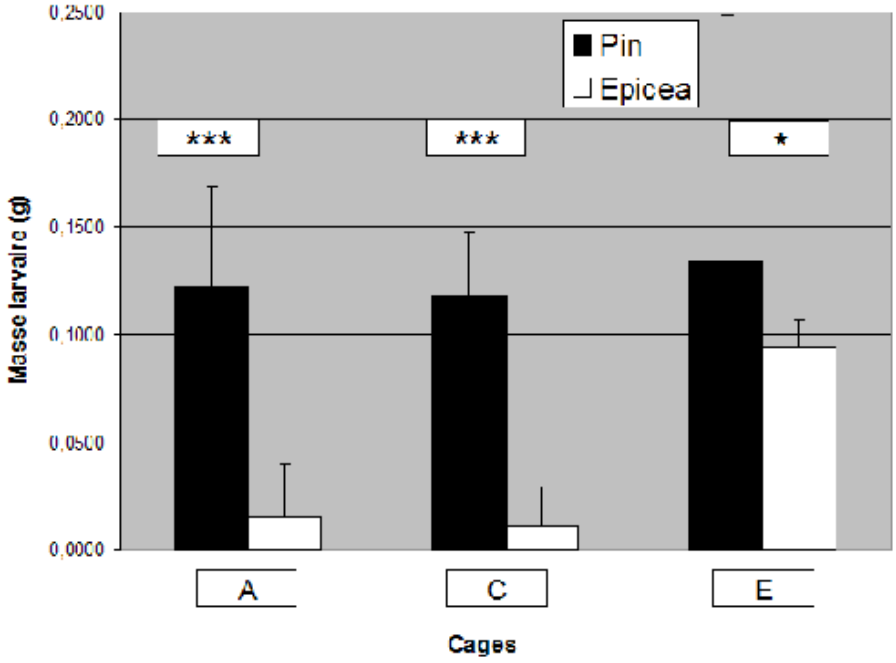


FIG. 2.10 – Masse larvaire (en g) 1 mois après la ponte sur bûches de pin sylvestre et d'épicéa de Norvège

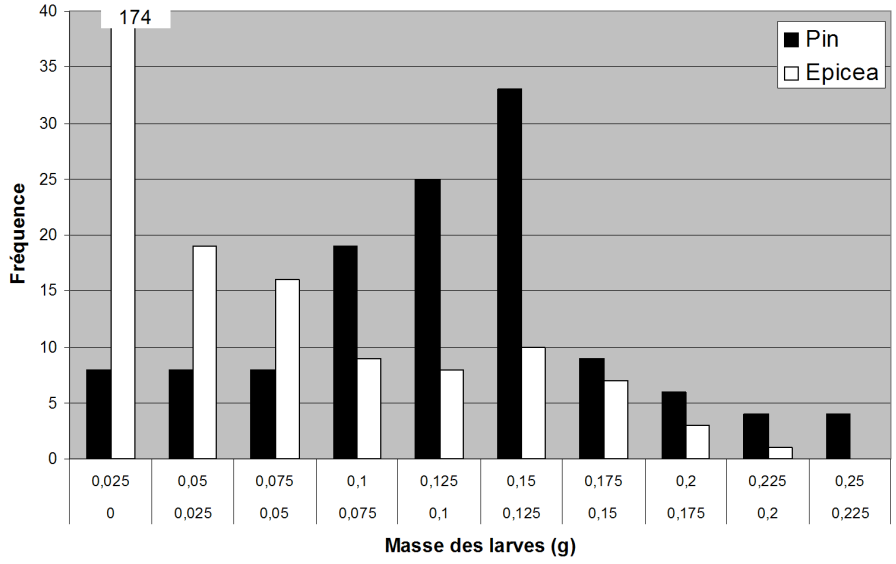


FIG. 2.11 – Histogramme de distribution des masses larvaires sur pin sylvestre et épicéa de Norvège 1 mois après la ponte

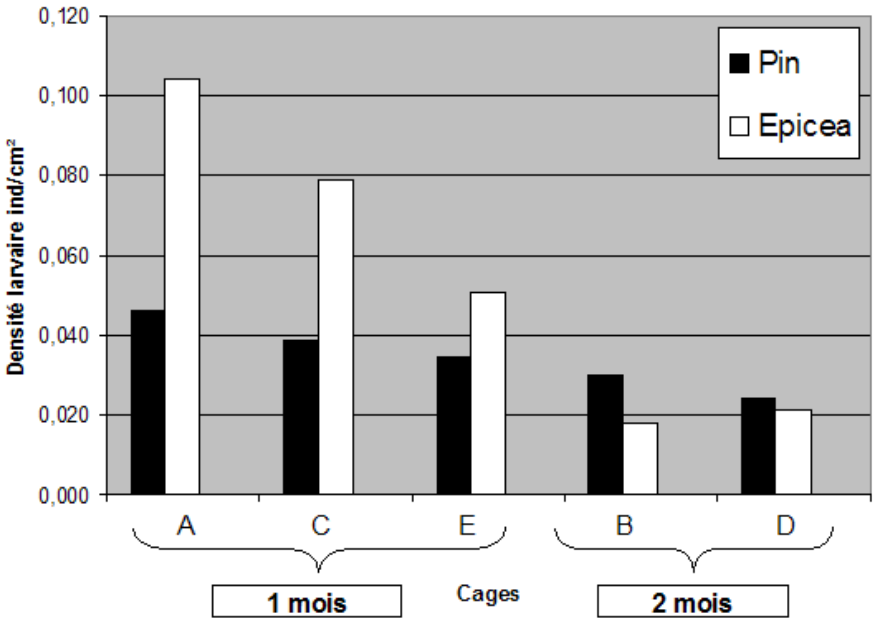


FIG. 2.12 – Densité de larves sur les bûches 1 mois et 2 mois après la ponte

n°	Données	Source	ddl	Sc	Cm	F	Pr>F	Sign.
1	Nb L+N 1 mois	Cage	2	248,17	124,08	1,03	0,57	NS
		Essence	1	1600,00	1600,00	13,22	0,17	NS
		Cage*Essence	1	300,00	300,00	2,48	0,36	NS
2	Nb L+N+A 2 mois	Cage	1	$-2{,}1.10^{-15}$	$-2{,}1.10^{-15}$	$-1{,}6.10^{-17}$	1,00	NS
		Essence	1	256,00	256,00	56,89	0,02	*
3	Nb Total L	Essence	1	1633,50	1633,50	5,44	0,06	ns
		Temps	1	2745,63	2745,63	9,14	0,02	*
		Essence*Temps	1	153,60	153,60	0,51	0,50	NS
4	Densité	Essence	1	$2{,}17.10^{-3}$	$2{,}17.10^{-3}$	8,52	0,03	*
		Temps	1	$1{,}88.10^{-4}$	$1{,}88.10^{-4}$	0,74	0,42	NS
		Essence*Temps	1	$1{,}25.10^{-3}$	$1{,}25.10^{-3}$	4,89	0,07	ns

FIG. 2.13 – Test n° 1 : ANOVA hiérarchique
L pour larves, N pour nymphes, A pour adultes. 1 : test du nombre d'insectes recensés dans les cages à 1 mois. 2 : test du nombre total d'insectes recensés à 2 mois. 3 : test du nombre total d'insectes aux deux dates. 4 : test de la densité sur les bûches aux deux dates.

Cage	Essence		
	Pin maritime	Pin sylvestre	Epicea
1	5 A, 4a	x	2 l
2	moisissure	x	rien
3	4 A, 3 a, 2 l	x	rien
4	19 A, 1 l	x	rien
5	45 l	x	rien
6	x	rien	2 l
7	x	rien	3 l
8	x	rien	5 l
9	x	rien	rien
10	1 A, 1 a, 1 N	rien	x
11	2 N, 3 l	2 N	x

Tab. 2.16 – Test n° 2 : Dénombrement et stade de développement des insectes à l'écorçage des bûches.
Un x indique que l'essence n'était pas proposée à la femelle dans la cage ; A pour Adulte émergé ; a pour adulte pré-émergeant trouvé dans sa loge ; N pour nymphe et l pour larve.

Diète	Essence de ponte			Test binomial	
	Pin	Ep	total	Pr(choix pin)	Pr(choix épicéa)
P	85	37	122	$3{,}45^{-6}$	1,00
E	61	113	174	1,00	$2{,}58^{-5}$
Total	146	150	296	0,57	0,39

Tab. 2.17 – Test n° 3 : Test binomial du choix de ponte selon la diète de la femelle

sur les buchettes d'épicéa par les femelles de diète épicéa (Test binomial, $P = 2,58.10^{-5}$). Ces résultats laissent penser qu'il y a un effet de la nourriture de mâturation sur la décision de ponte des femelles par la suite. Plus précisément, les femelles tendraient à pondre sur la même essence que celle qu'elles ont consommé depuis leur émergence.

2.7.4 Test n° 4 : transplant des oeufs

Indépendamment de l'essence d'origine des oeufs, 80% des oeufs transplantés sur les bûches de pin sylvestre ont éclos, contre 22% seulement pour ceux transplantés sur épicéa. Deux critères ont été mesurés et analysés dans cette expérience :

- le succès d'éclosion des oeufs (proportion d'oeufs inoculé pour lesquels ont été retrouvés, une larve vivante, un cadavre de larve ou une galerie larvaire partant du point d'inoculation),
- la masse larvaire des larves retrouvées, pour juger des réserves accumulées.

Critère	Source	ddl	Sc	Cm	F	Pr > F	Sign.
Succès d'éclosion	Hôte donneur	1	2.10^{-4}	2.10^{-4}	0,03	0,87	NS
	Hôte receveur	1	1,03	1,03	112,99	$< 1.10^{-4}$	***
	Donneur*Receveur	1	0,10	0,10	11,48	0,01	**
Masse larvaire	Hôte donneur	1	1.10^{-3}	1.10^{-3}	2.10^{-3}	0,96	NS
	Hôte receveur	1	20,37	20,37	26,96	$< 1.10^{-4}$	***
	Donneur*Receveur	1	0,14	0,14	0,18	0,67	NS

TAB. 2.18 – Test n° 4 : ANOVA sur les résultats de transplant des oeufs
Sc : somme des carrés ; Cm : carrés moyens.

Que le transplant soit réciproque ou natif, les oeufs ont plus de chance d'éclore sur pin sylvestre (Effet hôte receveur, table 2.18, page 85), mais le succès global ne dépend pas de leur essence d'origine (Pas d'effet hôte donneur). Par contre, sur l'épicéa, les oeufs ont plus de chance d'éclore s'ils proviennent de pin sylvestre que si ils proviennent d'épicéa (Effet d'interaction). Une fois sorties de l'oeuf, les larves semblent se développer mieux sur épicéa puisque leur masse est significativement supérieure sur cette essence. Cela ne semble pas pouvoir être rapproché d'un effet de densité sur l'accès à la nourriture puisque sur chaque bûche les points d'inoculation étaient suffisamment espacés pour que les galeries larvaires ne soient pas en contact.

2.7.5 Bilan

Le choix maternel semble :

- dépendre de l'origine maternelle (forêt mixte test 1, ou monospécifique test 2), ce qui est concordant avec les résultats de l'olfactométrie,
- être influencé par la nourriture (test 3),
- ne pas être corrélé a une meilleure performance de développement puisque les conditions semblent même meilleures pour les larves quand on les transplante (test 4).

Le rapprochement du plus grand succès d'éclosion sur pin sylvestre (test 4) avec le plus grand nombre de larves sur épicéa (test 1) tend à indiquer que l'épicéa a été plus attractif pour la ponte dans le test 1.

La performance larvaire semble donc meilleure sur pin sylvestre (Tests 1 et 4) à la fois :

- pour leur masse à 1 mois (test 1), ce qui est conforme à ce qui était déjà connu (Wainhouse *et al.*, 2001),
- et meilleure pour la probabilité d'éclosion (tests 1 et 4), ce qui renforce l'intérêt pour les facteurs conditionnant cet aspect de la biologie de l'insecte par rapport à ce qui était connu pour des essences secondaires (Thorpe et Day, 2002).

2.8 En résumé

Il est crucial pour un insecte phytophage de localiser sa plante-hôte pour subvenir à ses besoins nutritionnels et trouver un site d'oviposition convenable. Les capacités d'un insecte à effectuer cette tache peuvent donc influencer fortement sa biologie et même conditionner son évolution. Les aptitudes de *Hylobius abietis* à choisir ses deux plantes-hôtes principales, le pin sylvestre et l'épicéa de Norvège, ont été étudiées à travers deux types d'expériences. Dans le premier type, la préférence olfactive de l'insecte pour des plantules a été abordée. Dans le second type, la préférence des femelles pour leur essence de ponte a été testée. Différents facteurs susceptibles d'influencer la motivation et la discrimination des insectes ont été pris en compte tels que leur expérience récente (nourriture) et leur expérience de vie (essence de développement larvaire et site forestier d'origine). Il ressort de ces expériences que :

- des phénomènes d'imprégnation par la nourriture semblent pouvoir influencer à la fois l'attraction vers les odeurs des plantules et le choix de l'essence de ponte,
- des insectes provenant de grands massifs monospécifiques montrent des indices d'adaptation à leur essence d'hôte (cf insectes des Landes),
- plus que le choix des femelles pour l'essence de ponte, qui n'apparaît pas très marqué, les contraintes lors du dépôt des oeufs et le micro-environnement lors de l'éclosion semblent être les stades critiques susceptibles d'orienter une évolution dépendante de la plante-hôte.

Chapitre 3

La bactérie et le charançon : une vieille alliance ?

Sommaire

3.1 Introduction **90**
3.2 Matériel et méthodes **95**
3.3 Résultats **101**
3.4 Discussion **109**
3.5 En résumé **111**

Comme cela a été évoqué dans l'introduction de ce document, *Hylobius abietis* est un insecte qui présente des caractéristiques biologiques primitives au sein du vaste groupe des Curculionidés : un développement au détriment de conifères, un développement larvaire endophyte et sur matériel végétal mourant (Marvaldi *et al.*, 2002). La niche larvaire de l'hylobe est particulière à plusieurs égards. Les deux chapitres précédents ont abordé les adaptations de l'insecte à la répartition spatiale et temporelle de sa plante-hôte : capacité de dispersion et capacité de localisation et de discrimination. Le substrat de développement qu'est le bois mourant et plus largement les tissus corticaux des conifères imposent également au charançon des contraintes de toxicité et de qualité nutritive. Ce chapitre aborde les relations inter-spécifiques que l'insecte a pu établir au cours des temps avec des micro-organismes et qui ont potentiellement contribué à composer avec ces contraintes chimiques.

3.1 Introduction

3.1.1 Symbiose et endosymbiose

La symbiose est une relation d'interdépendance entre deux espèces. Ce type d'interaction inter-spécifique à bénéfices réciproques entre les partenaires est très répandu dans la nature et constitue un moteur de nouveauté évolutive et de diversité écologique.

Les symbiotes microbiens, en particulier, ont été des catalyseurs évolutifs majeurs au cours des 4 milliards d'années de la vie sur la terre, et ont largement façonné l'évolution des organismes complexes. L'illustration emblématique de cette influence sur l'évolution des espèces prend corps à travers la théorie de l'origine endosymbiotique des plastes et des mitochondries chez les cellules eucaryotes (Margulis, 1993).

Chez les insectes, deux grands types de symbiose microbienne sont à distinguer : l'*ectosymbiose* et l'*endosymbiose*. Il y a ectosymbiose lorsque les symbiotes se trouvent à l'extérieur de l'hôte qui bénéficie des micro-organismes pour son développement. Par contraste, pour l'endosymbiose (au sens large) les micro-organismes symbiotiques peuvent se localiser dans différents organes (tube digestif, tubes de Malpighi), dans des cryptes intestinales ou des chambres de fermentation comme chez les termites (Chararas, 1979).

L'endosymbiose *sensu stricto* est un type particulier de symbiose dans lequel un partenaire vit à l'intérieur de son hôte et représente le contact le plus intime entre les organismes interagissant (Wernegreen, 2004) : ces endosymbiotes sont caractérisés par leur localisation à l'intérieur de cellules spécialisées de l'hôte – les bactériocytes –, par leur stricte transmission maternelle à travers les lignées de l'hôte et par leur présence nécessaire pour la survie et la reproduction de l'hôte (Moran et Baumann, 2000). Ces endosymbiotes intra-cellulaires sont également appelés endocytobiotes.

Avant d'aborder plus en détail la question des endocytobiotes, voyons tout d'abord le type de « solutions » apportées par divers micro-organismes à des insectes qui exploitent des ressources similaires à celle de *Hylobius abietis* et qui font donc face à des contraintes similaires.

L'exemple des micro-organismes symbiotiques chez les insectes xylophages : rôle et importance Le bois est un matériau particulier en raison de ses propriétés physiques (dureté) et chimiques (différences selon les tissus). Beaucoup d'insectes xylophages vivent en association avec des organismes symbiotiques (voir Dajoz (1998) pour une revue chez les insectes forestiers et Klepzig et Six (2004), pour une revue consacrée aux Scolytes). Le plus souvent, il s'agit de champignons (ex. des Scolytes) mais la symbiose s'établit aussi avec des protozoaires (ex. des blattes) et des bactéries. Chararas (1979) a consacré un chapitre de son ouvrage à l'écophysiologie des insectes parasites des forêts au rôle des micro-organismes chez les insectes xylophages. Il passe en revue les connaissances de l'époque sur la nature et le rôle potentiel des micro-organismes symbiotiques associés aux Scolytidae, Curculionidae, Cerambycidae, Anobiidae, Lyctidae, Bostrychidae, Buprestidae et Termites. Les micro-organismes agissent de façon

très différente selon leur nature et selon les insectes. Ainsi, l'auteur reporte une intervention dans la maturation des ovocytes, une influence sur la vitellogenèse, ou encore une action dans la production des phéromones sexuelles. Cependant, c'est leur rôle dans la nutrition des insectes qui semble prépondérant. En résumé on retiendra que leur participation peut être soit indirecte en complémentant l'action des enzymes digestives de l'insecte, soit directe par l'apport de vitamines ou d'acides aminés que l'insecte ne sait pas synthétiser. L'auteur insiste sur l'importance de l'équipement enzymatique (particulièrement les osidases) offert par l'organisme mutualiste qui permet à l'insecte d'exploiter les composés les plus simples (saccharose par ex.) jusqu'aux plus complexes du bois (cellulose et hémicellulose). Afin de bénéficier des avantages offerts par les micro-organismes, les insectes ont développé des adaptations anatomiques (et sans doute physiologiques) pour les accueillir (et les contrôler). Ces adaptations sont le produit d'une longue évolution des insectes et d'une coévolution avec leurs symbiotes.

Le cas des Scolytinae et des Platypodinae Ces deux sous-familles de Curculionidés ont un mode de vie très particulier puisque les adultes pénètrent à l'intérieur du tronc des arbres pour y pondre et s'y nourrir. Les insectes s'exposent de ce fait aux défenses anatomiques et chimiques développées par les plantes pour repousser ou circonvenir ces agressions. Par ailleurs, exploiter l'importante biomasse représentée par ces tissus végétaux nécessite de pouvoir métaboliser les molécules qui les composent. Certains insectes ont développé un mutualisme obligatoire avec des champignons connus sous le nom d'« *ambrosia* » (les insectes, plus de 3400 espèces, sont appelés « ambrosia-beetles » par les anglo-saxons) dont les larves, qui sont incapables d'attaquer le bois, se nourrissent. Les autres ne sont pas associés à des *ambrosia* mais ont développé des relations mutualistes avec d'autres taxons de champignons qui leur permettent d'atteindre un équilibre nutritionnel, notamment par l'apports de stérols et de composés azotés (Klepzig et Six, 2004). De plus, le développement rapide du mycélium permettrait d'endiguer les flots de résines sensés étouffer l'insecte agresseur (Farrell *et al.*, 2001). Une étude conjointe de la diversité moléculaire chez les insectes et les champignons a montré que la diversification de ces groupes d'insectes est manifestement le résultat des différents types de mutualismes qui ont pu être développés avec les champignons (Farrell *et al.*, 2001).

3.1.2 L'endosymbiose bactérienne *sensu stricto* chez les insectes

3.1.2.1 Occurrence

Plus de 10% des espèces d'insectes, à travers plusieurs ordres taxonomiques plus ou moins éloignés, dépendraient de mutualistes bactériens pour leur viabilité et leur reproduction (Büchner, 1965; Wernegreen, 2002). Un aperçu de cette diversité est donné dans le tableau 3.1, page 92.

Les endosymbiotes bactériens ont d'abord été caractérisés grâce à la microscopie et il faut citer l'ouvrage de référence de Buchner (1965) qui fournit une description de la distribution et de la morphologie de nombreux endosymbiotes bactériens chez divers *taxa* d'invertébrés. Désormais, l'avènement des techniques de biologie moléculaire, via l'accès aux séquences d'ADN permet,

Insecte hôte Sous-Ordre	Famille	Endosymbiotes Groupe	Incidence des bactéries
Dictyoptera (termites, mantes et blattes)			
	Blattidae (Blattes, cafards)	Blattobacterium	Universelle
Hemiptera (punaises, coccides, cicadelles, etc...)			
Heteroptera (punaises *sensu stricto*)	Cimicidae (punaises des lits)	Subdivision γ-3 des protobactéries	
	Lygaeidae	Morphologies variables	Sporadique
Auchenorrhyncha	Fulgoridae (Fulgores et fulgorelles)	Plusieurs types bactériens Levures chez les Delphacidae	Universelle
	Cicadellidae (Cicadelles)	Plusieurs types bactériens	Chez la plupart des espèces
Sternorrhyncha (insectes suceurs de sève)	Aphididae (pucerons)	*Buchnera aphidicola* Levures chez les Hormaphididae	Chez la plupart des espèces
	Psyllidae (Psylles)	*Carsonella ruddii*	
	Aleyrodidae (Aleurodes, mouches blanches)	Subdivision γ-3 des protobactéries	
	Pseudococcidae (Cochenilles)	*T. princeps*	
Phthiraptera (Poux)			
Anoplura (Poux suceurs)		Plusieurs types bactériens	Universelle
Mallophaga (poux mordeurs)		Plusieurs types bactériens	Sporadique
Diptera (mouches)			
Brachycera	Glossinidae	*W. glossinidia*	Universelle
Coleoptera			
	Cerambycidae (Longicornes)	Levures	Large occurrence voire universelle chez 10 familles
Adephaga	Curculionidae (Charançons) Dryotphthorinae	Subdivision γ-3 des protobactéries	
Hymenoptera (Abeilles, guêpes, fourmis et mouches à scie)			
Apocrita	Formicidae (fourmis)		
	Tribu Camponotini	*Blochmania sp.* (S G-3)	Universelle
	Tribu Formicini	Subdivision γ-3 des protobactéries	Sporadique

Tab. 3.1 – Incidence d'endosymbiotes bactériens à travers certains *taxa* d'insectes

D'après Wernegreen (2002)

non seulement d'identifier et de comparer les bactéries à travers les taxons d'hôtes et de dater l'âge des associations (Moran et Baumann, 2000) mais aussi de comparer les taux d'évolution de différents gènes du symbiote selon leur degré d'implication dans la relation mutualiste (Wernegreen *et al.*, 2001). L'origine évolutive et les conséquences de cette association pour la bactérie et pour l'insecte sont maintenant abordables sous l'angle moléculaire.

Si la symbiose entre insectes et bactéries est assez répandue, elle semble concerner plus particulièrement les groupes d'insectes qui ont un régime alimentaire déséquilibré à base par exemple de phloème, de sang ou de bois comme souligné plus haut. La plupart des travaux détaillés sur les endosymbioses animaux-bactéries impliquent des insectes et en particulier, les symbioses des pucerons (Baumann *et al.*, 1995), des fourmis charpentières (Sauer *et al.*, 2002), des mouches tsé-tsé (Chen *et al.*, 1999) et des charançons de la sous-famille des Dryophthorinae (Heddi *et al.*, 1999).

3.1.2.2 Les interactions entre la bactérie endosymbiotique et l'insecte

C'est actuellement chez l'association puceron-*Buchnera* que la connaissance de ces interactions est la plus poussée : les pucerons dépourvus de leurs bactéries se développent mal et leur descendance est faible ou inexistante, et les *Buchnera* ne sont pas connues en dehors des pucerons et sont apparemment incultivables (Douglas, 1998). Cette association a une base nutritionnelle et il a été prouvé que la bactérie fournit des acides aminés essentiels à l'insecte (voir la revue de Douglas, 1998).

Un autre groupe d'insectes a également été intensivement étudié ces dernières années, il s'agit de charançons de la sous famille des Dryophthorinae (Famille des Curculionidae). Büchner (1965) consacre une section importante de son ouvrage aux Curculionides. Il y souligne qu'aucune autre famille d'insectes, exceptée celle des cicadelles, ne présente autant de diversité au niveau des sites d'hébergement des symbiotes. Cette diversité dans l'association avec les bactéries est sans doute à rapprocher de la grande diversité de ces insectes et de leurs modes de vie. Cependant, c'est dans le groupe des Dryophthorinae que l'étude de l'endosymbiose a été le plus poussée jusqu'à présent.

Le cas de la sous famille des Dryophthorinae L'objectif de ce paragraphe n'est pas de dresser un exposé exhaustif des études menées sur ce groupe, mais il apparaît important de donner certains éléments par rapports auxquels pourront être discutés plus loin à partir des résultats obtenus chez *Hylobius* (voir O'Meara (2001) et Lefèvre *et al.* (2004) pour plus de détails). De nombreux charançons de ce groupe, vivant majoritairement en zones tropicale et sub-tropicale, sont connus pour l'importance économique de leurs ravages sur des monocotylédones. La plupart de ces espèces se développent sur les stippes ou les racines des végétaux, mais certaines, notamment dans le genre *Sitophilus*, exploitent des graines de mono ou de dicotylédones. Si les centres primitifs de diversification semblent être localisés en Afrique et dans la zone Indo-pacifique (Zimmermann (1993) dans Lefèvre, 2004), bon nombre d'espèces de Dryophthorinae sont aujourd'hui

largement réparties sur la planète en raison de multiples introductions conjointes à celle de leur plante-hôte.

Plusieurs effets du principal endocytobiote du charançon *Sitophilus oryzae* (nommé SOPE) sur la physiologie de son insecte-hôte ont été montrés : il fournit au charançon des vitamines telles que l'acide pantothenique, la riboflavine et la biotine, il interagit avec les chaînes de phosphorylation oxidative de la mitochondrie en accroissant de l'activité enzymatique ce qui augmente la capacité au vol de l'insecte et il intervient dans le métabolisme des acides aminés (voir les citations dans Heddi *et al.*, 1999).

3.1.3 La symbiose chez *Hylobius abietis*

Hylobius abietis appartient à une autre sous famille d'importance parmi les Curculionoidea, celle des Molytinae.

Les structures hébergeant les endocytobiotes ont été déjà assez précisément décrites chez *Hylobius abietis* par Buchner et par son étudiant Scheinert. Le type de localisation est représenté par des organes compacts dans la région entre l'intestin antérieur et l'intestin moyen. Le « type *Hylobius* » représente une évolution du type « *Gymnetron* » qui consiste en une série d'invaginations de l'intestin. Si l'apparence externe est similaire à celle du type primitif, une coupe transversale montre que les parties sont fusionnées l'une avec l'autre et forment un bactériome[11] unique annulaire. Cependant, cette structure fusionnée n'apparaît que secondairement à partir d'une « phase *Gymnetron* ». Avec la phase de pupation de l'insecte, les bactériomes disparaissent. Cependant cette disparition ne procèderait pas d'une destruction des bactéricytes et d'une expulsion de leurs populations mais plutôt d'un déplacement des structures. Les lobes ou globules du bactériome semblent se résorber progressivement. Des coupes montrent que les structures glissent en partie postérieure de l'intestin entre l'épithelium imaginal et la musculature. Finalement, les bactériocytes[12] envahissent toute la surface de l'intestin moyen et se retrouvent après la métamorphose en de petits amas cellulaires. Cela ne constitue néanmoins pas une situation stable durant toute la vie imaginale de l'insecte mais correspondrait plutôt à un dispositif temporaire pour que l'hôte puisse se débarrasser de la plupart de ses invités superflux. C'est pourquoi, chez les imagos les plus vieux des deux sexes il est difficile de trouver des bactériocytes dans leur paroi intestinale.

3.1.4 Problématique et questions

Existe-t-il, chez les deux espèces du genre *Hylobius* disponibles, une ou plusieurs souches bactériennes répondant aux critères nécessaires (mais pas suffisants) pour les identifier comme endosymbiotiques ? Cette question nécessite d'examiner plusieurs points :

– la présence de bactéries à l'intérieur des cellules des organes supposés les abriter,

[11] Le terme « bactériome » a remplacé dans la littérature celui de « mycétome » employé dans l'ouvrage de Buchner

[12] *Ibid* pour « mycetocytes »

– la présence de cette (ou ces) souches à la fois chez la larve et chez la femelle, comme indice d'une transmission maternelle,
– et finalement, sous réserve des points précédents, quelle est la relation phylogénétique des bactéries identifiées chez *Hylobius* avec celles connues chez d'autres taxons d'insectes et particulièrement par rapport à celles connues chez les charançons Dryophthorinae ?

Cette caractérisation des micro-organismes bactériens de l'hylobe espère, en outre, élargir encore le spectre écologique et géographique dans lequel les charançons établissent des relations mutualistes avec des micro-organismes puisque les Dryophthorinae sont un groupe tropical et que *Hylobius abietis* est au contraire d'origine sub-arctique.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Matériel animal

Les insectes ont été collectés sur le terrain : à Lanarce (Ardèche, France) sur une parcelle reboisée en pin sylvestre et à Lugadets (Landes, France) sur coupe de pin maritime pour *Hylobius abietis* et à Vizille (Isère, France) sur une population de *Lythrum salicaria* (L., 1758) en bordure d'une phragmitaie, pour *Hylobius transversovittatus* (Goeze, 1777).

3.2.2 Obtention des séquences des insectes-hôtes

Les séquences de COI des Dryophthoridae ont été obtenues sur la base de données internet Genebank [13]. Leurs numéros d'accession sont donnés en annexe D, table D.2, page 134. La séquence d'*Hylobius abietis* a été obtenue au laboratoire en utilisant les amorces définies à partir de la séquence de *Pissodes strobi* (cf table D.2, page 134). Les amorces sont données en annexe D, table D.3, page 135. Les paramètres PCR étaient les suivants : 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30s, hybridation à 48°C pendant 1mn et élongation à 72°C pendant 1mn.

3.2.3 Obtention des séquences bactériennes

3.2.3.1 Choix du marqueur moléculaire

Le gène ribosomal 16S a été choisi pour cette étude afin de pouvoir mettre en perspective nos résultats par rapport à ceux des études précédentes sur les phylogénies moléculaires d'endosymbiotes d'insectes (voir par exemple Moran (1993) sur les endocytobiotes de pucerons, Schröder *et al.* (1996) sur ceux des fourmis du genre *Camponotus* et le travail de synthèse Lefèvre *et al.* (2004)). Le gène ribosomal 16S montre en effet un taux d'évolution relativement faible, ce qui est nécessaire pour envisager une reconstruction phylogénétique impliquant des taxons ayant potentiellement divergé depuis très longtemps.

[13] URL :www.ncbi.nlm.nih.gov/Genebank/

Les séquences des bactéries libres et des autres bactéries endosymbiotiques d'insectes utilisées proviennent du matériel supplémentaire de l'artice de Lefèvre *et al.* (2004), fournies sur le site du journal « *Molecular Biology and Evolution* »[14].

3.2.3.2 Dissection des insectes

Les femelles matures et accouplées ont été disséquées vivantes. Les *genitalia* ont été extraites de l'abdomen des insectes en tirant avec des pinces fines stérilisées sur le dernier segment abdominal. Les organes reproducteurs ont été recueillis dans un tampon isotonique (25 mM KCl, 10 mM MgCl2, 250 mM sucrose, 35 mM Tris-HCl, pH 7,5), selon la procédure de Lefèvre (2004), afin d'éviter l'éclatement des cellules et une éventuelle contamination ou une perte de matériel. Pour *H. transversovittatus*, le tissu utilisé a été un oeuf extrait du tractus d'une femelle. Les bactériomes des larves ont été disséqués dans les mêmes conditions.

3.2.3.3 Extraction et PCR

Les tissus obtenus ont été broyés et une extraction au phénol-chloroforme a été pratiquée pour obtenir la matrice d'ADN utilisée pour l'amplification PCR.

Des amorces universelles d'eubactéries ont été utilisées pour l'amplification de l'ADN ribosomal 16S puisqu'il n'était pas possible de présager de l'origine phylogénétique des bactéries. Les séquences de ces amorces sont données en annexe D, table D.1, page 134. Les paramètres PCR étaient les suivants : dénaturation initiale de l'ADN à 95°C pendant 10 minutes suivie de 25 cycles de trois étapes (1) dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, (2) hybridation à 56°C pendant 30 secondes et pour finir (3) élongation à 72°C pendant 30 secondes.

3.2.3.4 Clonage, mise en culture et criblage des souches

Comme des amorces bactériennes universelles ont été utilisées, il était probable que des séquences de bactéries non symbiotiques ou provenant d'une contamination aient été également amplifiées et aient été présentes dans le produit PCR obtenu. De plus, certains insectes abritent deux souches bactériennes symbiotiques en même temps. N'ayant aucun *a priori* pour *Hylobius abietis* et afin de séparer les différentes souches présentes une procédure de clonage a été menée. Le kit « TOPO TA Cloning Plasmid PCR 2.1-TOPO » de chez Invitrogen a été utilisé.

La procédure de clonage avec ce kit comprend 3 étapes :

- ligation du produit PCR avec un vecteur plasmidique (lié à des topoisomérases I à ADN qui fonctionnent à la fois comme enzymes de restriction et de ligation), pendant 15 minutes à température ambiante,
- électroporation pour insérer le produit *vecteur* + *insert* dans des bactéries compétentes (*E. coli*),
- mise en culture des bactéries,

[14](URL :mbe.oxfordjournals.org/cgi/content/full/msh063/DC1)

– criblage des colonies obtenues qui contiennent le plasmide avec l'insert.

3.2.3.5 Séquençage de l'ADN

Un séquençage préliminaire d'un brin d'ADN a été réalisé au LECA pour 11 clones. Une recherche d'homologie des séquences partielles obtenues a été effectuée dans la base Genebank au moyen d'une procédure de BLAST. Sur les 11 clones séquencés, 2 montraient des similitudes avec des bactéries extracellulaires (flore digestive) et ont par conséquent été écartés de la suite des analyses. Un clone montrait une forte homologie avec une séquence d'une souche *Wolbachia*. Les 8 autres montraient une forte homologie avec des séquences d'endosymbiotes bactériens de charançons Dryophthoridae. Pour chaque espèce d'*Hylobius*, un clone a été retenu et le séquençage complet des deux brins complémentaires de la séquence a été réalisé par Genome Express (Grenoble, France) sur séquenceur automatique Applied Biosystem. La taille des séquences obtenues était de 1520 paires de bases pour *H. transversovittatus* et de 1439 paires de bases pour *Hylobius abietis*.

3.2.4 Histologie

3.2.4.1 Microscopie optique et coloration

La présence de bactéries dans les tissus des charançons a été tout d'abord vérifiée par coloration de « squaches ». Un « squache » consiste à déposer un organe disséqué sur une lame poly-L-lysine et à l'écraser doucement au moyen d'une seconde lame. Les lames sont ensuite séchées à 45°C pour fixer les tissus. Les lames réalisées ont été colorées au bleu de Toluidine. Des squaches ont ainsi été réalisés à partir de bactériocytes isolés de bactériomes larvaires d'*Hylobius transversovittatus* et d'ovarioles isolées de *genitalia* de femelles d'*Hylobius abietis*. Toutes ces dissections ont été réalisées dans le tampon isotonique sous loupe binoculaire.

3.2.4.2 Hybridation *in situ* à fluorescence (FISH)

Afin de préciser la localisation des bactéries dans les tissus des insectes, une procédure FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) a été utilisée. Cette technique d'hybridation *in situ* permet de révéler sur des coupes histologiques, ou sur « squaches » de petits organes, la présence d'une séquence cible (ARN) sur laquelle une séquence sonde (ADN) marquée avec un fluorochrome s'est hybridée. Une sonde oligo-nucléotidique a été définie en examinant les régions spécifiques des séquences bactériennes obtenues pour les deux espèces d'*Hylobius*. Cette sonde a été synthétisée par la société Eurogentec et marquée en 5' à la rhodamine.

- Contraintes de la vie intracellulaire :
  - la séquestration dans les tissus de l'insecte isole les endocytobiotes des éléments créateurs de recombinaison génétique (phages, éléments transposables),
  - la transmission d'un faible nombre d'individus à chaque génération induit des goulots d'étranglement,
- Conséquences sur l'évolution du génome des endocytobiotes[1] :
  - manque de recombinaison génétique,
  - taux de mutation élevé,
  - fixation importante de mutation délétères par dérive génétique,
- Il en résulte une vitesse d'évolution du génome élevée.
- Parallèlement, on observe une accumulation de bases AT[2].

Tab. 3.2 – Contraintes de la vie en symbiose et conséquences sur l'évolution du génome des symbiotes
[1] Wernegreen (2002), [2] Heddi *et al.* (1998). Voir Lefèvre *et al.* (2004) pour une discussion détaillée de ces points.

Dans ce modèle, le processus de substitution des bases dans une des branches de l'arbre à reconstruire (c-à-d, la probabilité de changement d'un nucléotide à un autre) dépend de deux paramètres :

1. le ratio transition/transversion (T_s/T_v)
2. le taux de GC à l'équilibre (c-à-d, le taux de bases GC dans les séquences qui serait atteint après un temps d'évolution infiniment grand de celles-ci)

Ce deuxième paramètre est libre de changer entre les branches de manière à ce que le taux de GC diverge entre les lignées au cours du temps. Cette hypothèse apparaît nécessaire étant données la gamme de variation du taux de GC dans les séquences actuelles des taxons comparés.

Tab. 3.3 – Modèle d'évolution non homogène des séquences de Galtier et Gouy (1998)

3.2.5 Analyses phylogénétiques

3.2.5.1 Relations entre insectes-hôtes

Les séquences téléchargées ont été alignées avec celle d'*Hylobius abietis* obtenue au laboratoire et les séquences de deux taxons choisis comme groupes externes (« outgroup »). Les relations phylogénétiques au sein du vaste groupe des Curculionidae n'étant pas clairement résolues (voir les polytomies obtenues avec les données tant moléculaires que morphologiques dans Marvaldi *et al.*, 2002), cela permet de vérifier la validité des groupes externes. Le choix d'un premier groupe externe s'est basé sur la thèse de O'Meara (2001) et sur l'article de Marvaldi *et al.* (2002) qui montrent que les Erirhininae sont un groupe-frère des Dryopthorinae qu'ils enracinnent de même que les Molytinae. L'espèce *Tanysphyrus lemnae* a donc été utilisée (voir la référence Genbank en annexe D.2). Le deuxième groupe externe, *Apion sp.* a été choisi à l'extérieur des Curculionidae, chez les Brentidae. Néanmoins les travaux de Marvaldi *et al.* (2002) ont montré que le groupe des Molytinae semble polyphylétique. Par précaution, une séquence de *Pissodes strobi*, un autre Molytinae se développant sur conifères, a été incluse dans l'analyse.

Les séquences ont été alignées avec ClustalW implémenté sous BioEdit (Hall, 1999). Dans une première étape, le script « Mr AIC »(Nylander, 2004) a été utilisé afin de trouver le modèle de substitution nucléotidique qui s'adapte le mieux au jeu de séquences. Ce programme utilise le logiciel PHYML (Guindon et Gascuel, 2003) pour calculer des scores de vraisemblance du jeu de données sous 24 modèles de substitution et établit les critères de Akaike (AIC, AICc, BIC) correspondants afin de les comparer entre eux pour déterminer le meilleur. Dans un second temps, le logiciel PHYML a été utilisé pour évaluer les relations phylogénétiques des insectes sous le modèle spécifié. Une première exécution du logiciel a permis d'obtenir la topologie la plus vraisemblable après une procédure de bootstrapp (100 itérations). Une deuxième exécution a permis d'optimiser le calcul de la longueur des branches en se basant sur la topologie obtenue à l'étape précédente.

Un test de l'horloge moléculaire a été effectué par la comparaison des ratio de vraisemblance avec les logiciels DNAML et DNAMLK du groupe PHYLIP (test LRT, Felsenstein, 1993).

3.2.5.2 Relations entre bactéries endosymbiotiques

Évolution du génome des symbiotes La vie intracellulaire impose certaines contraintes aux endocytobiotes dont les conséquences se manifestent au niveau de leur génome (*cf* encadré 3.2, page 98). Ces particularités nécessitent d'utiliser une méthodologie d'analyse adaptée détaillée ci-après.

Les séquences obtenues pour les deux espèces d'*Hylobius* ont été alignées avec les séquences fournies en supplément de l'article de Lefèvre *et al.* (2004) au moyen de ClustalW implémenté sous BioEdit. La méthodologie de reconstruction phylogénétique a été adaptée de celle développée par Cédric Lefèvre durant sa thèse (Lefèvre, 2004). Dans ses travaux, Lefèvre a montré l'importance de prendre en compte à la fois l'existence de taux de GC hétérogènes entre les séquences

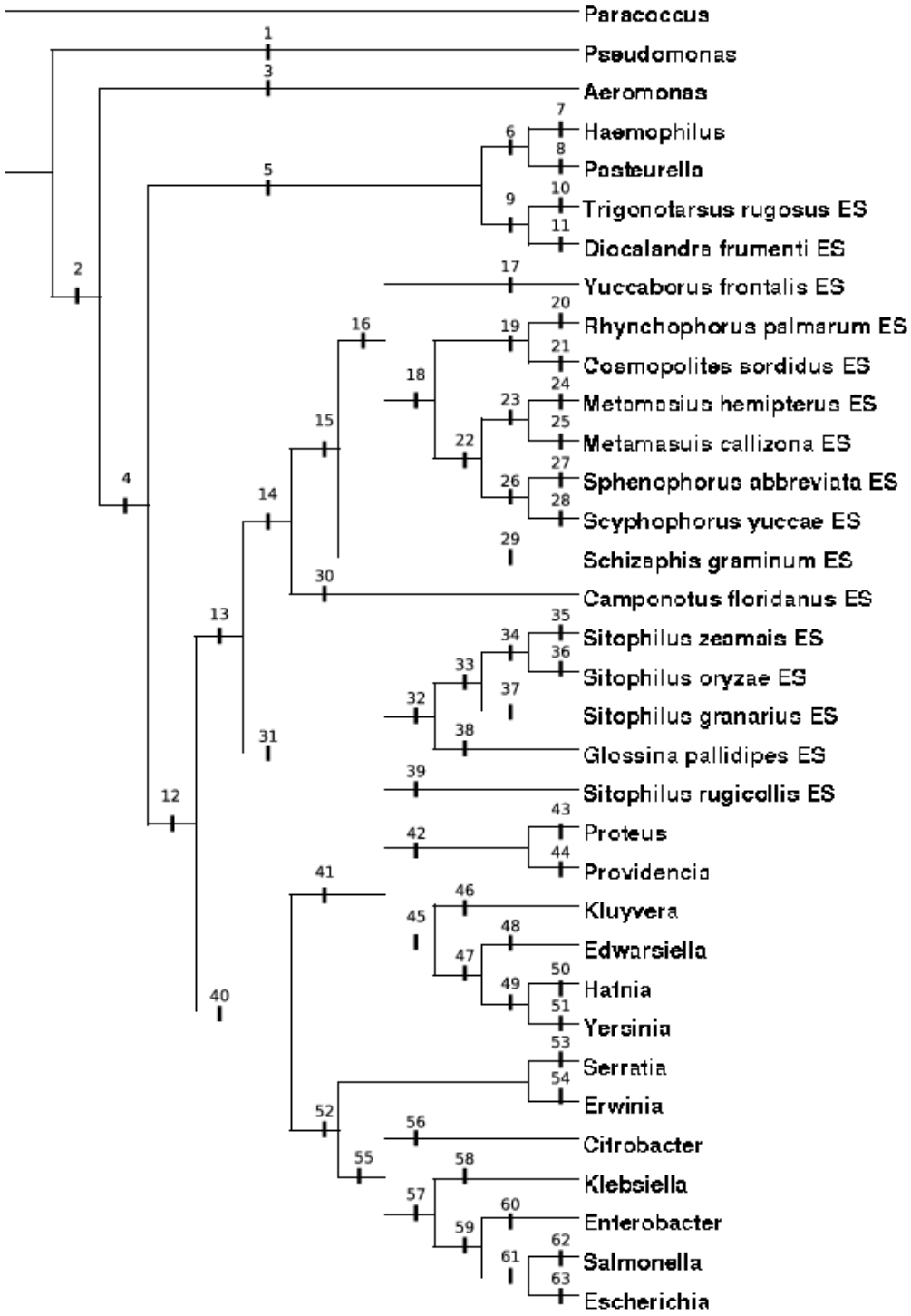


FIG. 3.1 – Topologie de référence d'après Lefèvre (2004) et numérotation des branches
Les bactéries endosymbiotiques sont signalées par la mention « ES »à côté du nom de genre et d'espèce de l'insecte-hôte.

et les différences de vitesse d'évolution entre les lignées bactériennes pour une reconstruction correcte de l'histoire évolutive de l'endosymbiose bactérienne. La démarche mise au point dans ce travail permet une exploration et une comparaison statistique des topologies vraisemblables. L'utilisation du modèle d'évolution de Galtier et Gouy (1998), permet d'inférer à partir du jeu de séquences, aussi bien les processus évolutifs (taux de substitution différents entre les lignées) que les motifs résultant de cette évolution (l'arbre phylogénétique). Une rapide explication du modèle est donnée dans l'encadré 3.3, page 98.

Les arbres phylogénétiques ont été obtenus avec le logiciel NHML développé par Galtier et Gouy (1998). Le synopsis de la démarche est détaillé en annexe D dans la figure D.1, page 136.

Le logiciel NHML permet la reconstruction d'arbres au moyen d'un modèle d'évolution de l'ADN non homogène prenant en compte la variabilité des taux de substitution entre les sites et des taux de bases GC entre les séquences. Les arbres sont estimés par la méthode du maximum de vraisemblance. La procédure *EVAL_NH* implémentée dans le logiciel calcule le logarithme de la vraisemblance d'une topologie d'arbre associée à un alignement de séquences. Il faut fournir au logiciel trois types de fichiers : un fichier comprenant les alignements de séquences, un fichier des topologies à évaluer et un fichier mentionnant les paramètres à estimer et à optimiser (longueur des branches, taux de GC ancestral, taux de GC à l'équilibre, taux transitions/transversions, forme de la loi gamma).

Exploration et test des topologies La topologie publiée par Lefèvre *et al.* (2004) a été utilisée comme *a priori* pour nos analyses. Les séquences des bactéries des deux espèces d'*Hylobius* ont été insérées sur 23 des 63 branches de la topologie. Afin de simplifier l'exposé des résultats et leur discussion, les branches ont été numérotées arbitrairement de 1 à 63 (cf figure 3.1, page 100). La vraisemblance de chacune des 23 paires topologie-alignement a été évaluée avec NHML.

Test des taux de substitution relatifs Le logiciel RRTree (Robinson et Huchon, 2000) a été utilisé pour comparer les taux de substitution entre les différentes lignées de bactéries . A cet effet, la séquence de la bactérie *Aeromonas haywardensis* a été utilisée comme groupe externe, comme l'avait fait Lefèvre. Ce test permet de vérifier si la vitesse d'évolution est homogène entre des clades choisis par l'utilisateur. Pour chaque test, un fichier de topologie correspondant à la topologie la plus vraisemblable obtenue par la démarche précédente a été fourni au logiciel.

3.3 Résultats

3.3.1 Morphologie du bactériome larvaire et histologie

La dissection de larves de stades IV ou V d'*Hylobius transversovittatus* a permis de vérifier chez cette espèce la présence d'un bactériome de conformation similaire à celle décrite chez

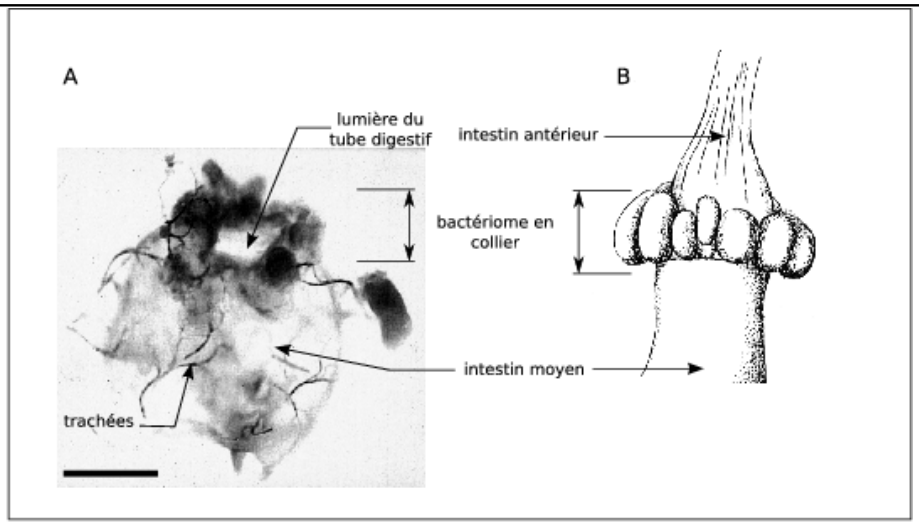


FIG. 3.2 – Morphologie du bactériome chez *Hylobius transversovittatus*
(A) : Photographie prise à la loupe binocculaire. (B) : Dessin tiré de Büchner (1965).

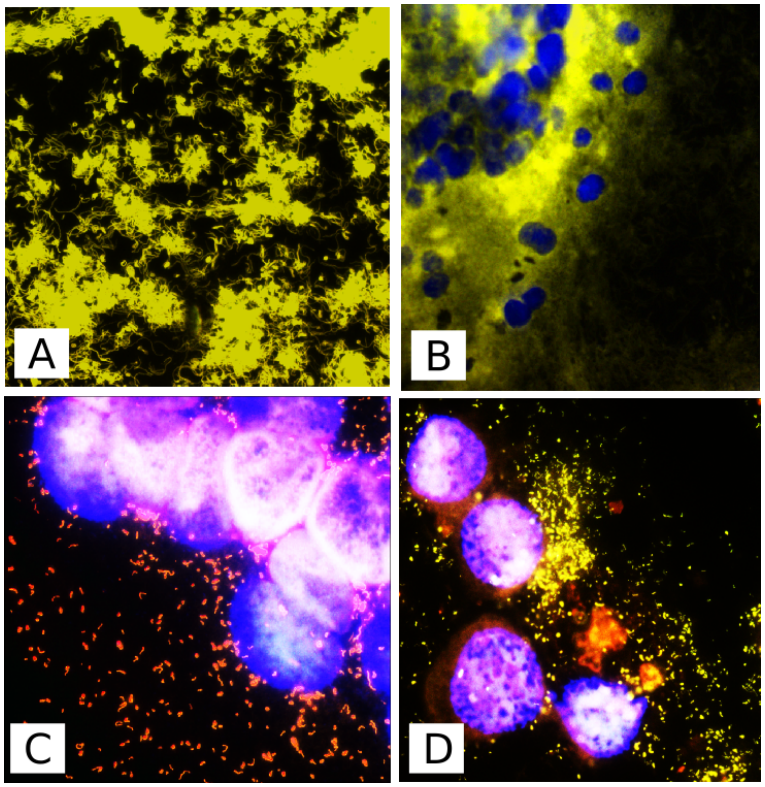


FIG. 3.3 – Histologie de l'endosymbiose bactérienne chez *Hylobius abietis* : résultats de la procédure FISH

(A) Bactéries marquées avec la sonde. (B) Squache de bactériocytes. Superposition des fluoresences de contrôle (DAPI) et de marquage spécifique : en jaune les bactéries, en bleu les noyaux des bactériocytes du charançon . (C) et (D) Squache sur apex des ovaires. Remarque : les différences de coloration d'un cliché à l'autre pour le même marquage s'expliquent par une différence de saturation utilisée pour obtenir un contraste suffisant sur les images.

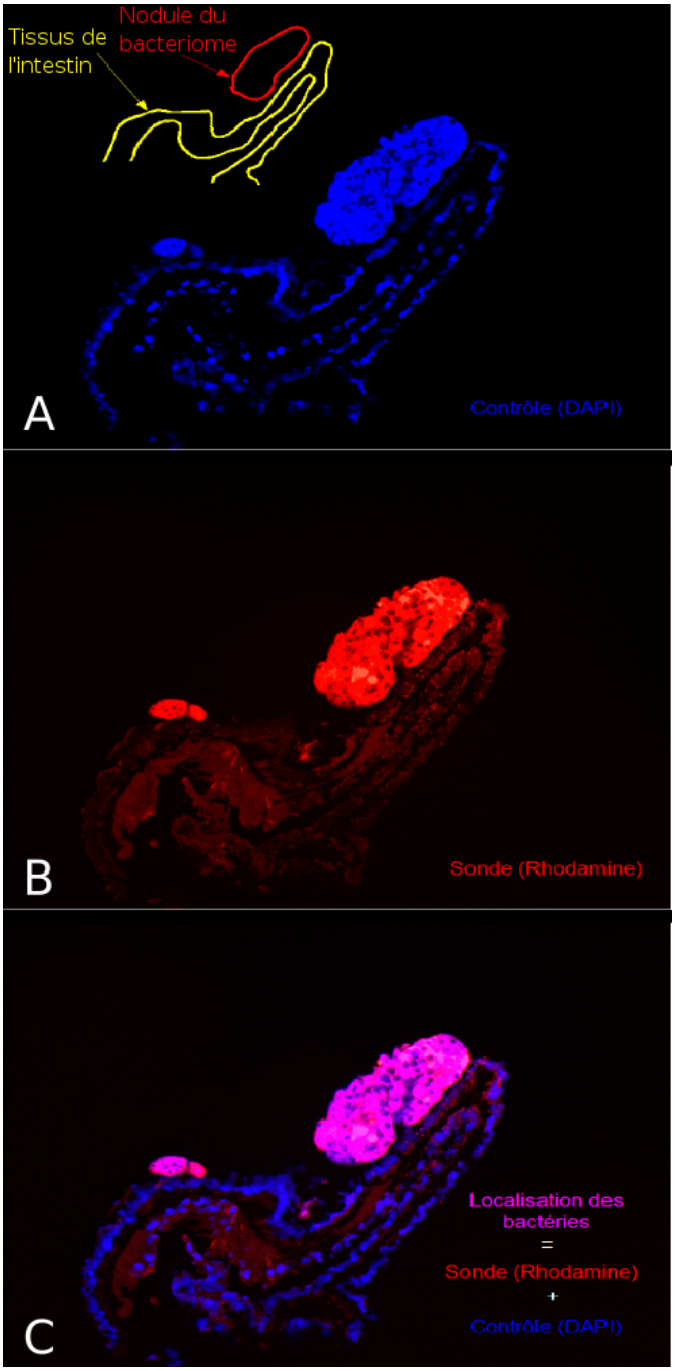


FIG. 3.4 – Histologie de l'endosymbiose chez *Hylobius abietis*

Coupe d'intestin de *Hylobius abietis* après inclusion. (A) Contrôle avec le DAPI et schéma d'interprétation. (B) Hybridation spécifique avec la sonde. (C) Fluorescences DAPI et spécifique superposées : les bactéries ne sont présentes qu'au niveau du nodule du bactériome et pas dans les tissus de l'intestin.

Hylobius abietis par Buchner (1965) (voir figure 3.2, page 102). Les résultats de l'hybridation à fluoresence sont observables dans les figures 3.3 page 102 et 3.4 page 103.

3.3.2 Analyses phylogénétiques

3.3.2.1 Relations entre les hôtes insectes

Le modèle de substitution des nucléotides décrivant au mieux l'alignement de séquences utilisé est un modèle GTR avec une proportion de sites invariants et une loi gamma pour la distribution des taux de variation entre sites, GTRIG (AIC : 19725.4477, LnL :-9825.7238, ddl :37, pour comparaison le modèle JC69 de Jukes et Cantor :AIC : 23386.1615, LnL :-11666.0807, ddl :27). L'arbre obtenu est donné en dans la figure 3.5, page 106. Tout d'abord, il apparaît que les séquences des deux espèces de Molytinae (*Pissodes strobi* et *Hylobius abietis*) sont significativement groupées ensemble (valeur de bootstrapp de 78%). Surtout, cet arbre positionne les deux Molytinae à la racine du groupe des Dryopthorinae, bien que la valeur de bootstrapp ne soit pas très haute (56%).

Afin de calibrer l'horloge moléculaire permettant d'estimer l'âge des Dryophthorinae à 100 millions d'années, O'Meara (2001) a utilisé le fossile le plus ancien connu dans ce groupe. Ce fossile du Miocène supérieur (>33 Ma), utilisé comme point de calibration, a été décrit par Zherikhin (2000). Dans ce travail, Zherikhin (2000) décrit également le genre *Sciabregma* qui est attribué à la sous-famille des Molytinae, ce qui fait remonter l'apparition de ce groupe à une époque comparable à celle établie pour les Dryophthorinae. Par ailleurs, dans leur revue des données fossiles disponibles sur les charançons et autres familles de coléoptères associées, Gratshev et Zherikhin (2003) supportent l'idée que la majorité des sous-familles de charançons, dont les Molytinae, existaient déjà au début de l'aire Tertiaire. A l'intérieur du groupe des Molytinae, les travaux de Craw (1999) sur les charançons de Nouvelle-Zélande, font remonter la tribu des *Molytini*, à laquelle appartient le genre *Hylobius*, à au moins 65 millions d'années. Cela ferait remonter l'apparition du groupe des *Molytini* à la fin du Crétacé. D'après Chararas 1979 : « en ce qui concerne les insectes des forêts, on possède relativement peu d'éléments phylogénétiques et paléontologiques et c'est le cas notamment pour les Curculionidae, les Scolytidae et les Platypodidae dont un grand nombre sont inféodés aux conifères. On sait cependant que les Curculionidae existaient au Jurassique supérieur et que les formes anciennes possédaient un rostre très long (Crowson, 1960). En se basant sur cette indication, il est à supposer que, parmi les Curculionidae spécifiques des conifères, les espèces à rostre long comme les *Pissodes* et les *Hylobius* seraient plus anciennes que les espèces à rostre court ». Cela reste néanmoins une indication très apporximative. D'après la bibliographie, les fossiles les plus anciens qui soient connus d'espèces d'*Hylobius* ont été trouvé au Yukon (Canada) et remontent à 125000 ans, soit la dernière période interglaciaire (Matthews et Telka, 1997).

Les fossiles les plus anciens connus pour les Molytinae (de même que pour les Cryptorhynchinae et les Scolytinae) ont été trouvés dans les argiles de Londres que Britton (1960) fait remonter au Paléocene tardif ou au début de l'Éocene, soit environ 55 millions d'années. Ce

fossile apparenté à l'une des deux lignées, *Hylobius* ou *Pissodes*, renseigne sur l'âge minimal de la divergence de ces deux genres. Cependant, l'horloge moléculaire globale pour l'arbre a été rejetée par le test LRT (lnL de -11257.90456 avec l'horloge et de -11234.31283 sans, 15 ddl, P =3,5.10^{-5}). Il n'est par conséquent pas possible en l'état d'utiliser ce fossile comme point de calibration pour estimer la date de la divergence entre Molytinae et Dryophthorinae.

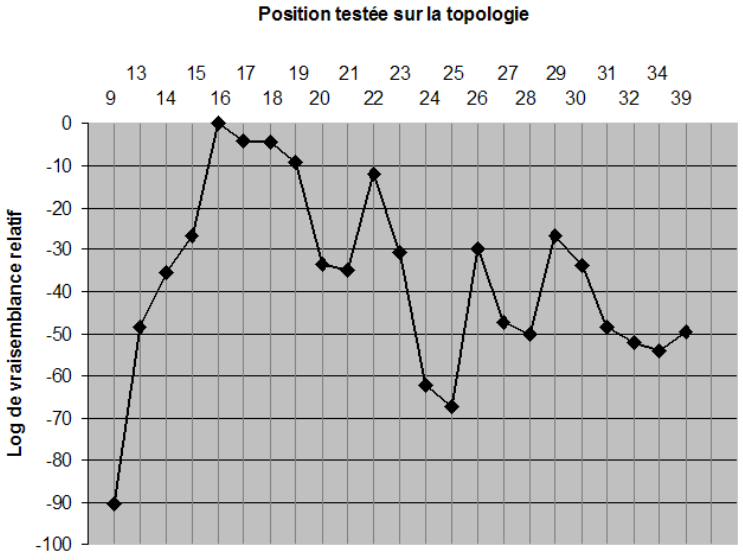


FIG. 3.7 – Graphique de l'exploration des vraisemblances des topologies comprenant les séquences des endocytobiotes de *Hylobius abietis* et *tranversovittatus*.

En abscisse : numéro de la branche sur laquelle sont insérées les séquences des endocytobiotes d'*Hylobius* (selon la figure 3.1, page 100) ; en ordonnée : logarithme de la vraisemblance des topologies relatif à la valeur la plus grande (celle de la position 16).

3.3.2.2 Relations entre les bactéries endosymbiotiques

Les séquences obtenues pour les endocytobiotes des deux espèces d'*Hylobius* montrent une composition fortement biaisée en bases AT, comme celle décrite par Lefèvre *et al.* (2004). De plus, ces séquences présentent deux insertions d'une cinquantaine de bases, riches en AT, aux mêmes positions que celles relevées chez l'endosymbiote de *Yuccaborus frontalis*.

Exploration des vraisemblances des topologies Le résultat de l'exploration des vraisemblances des 23 topologies choisies en fonction de l'alignement des séquences est résumé dans le graphique 3.7, page 105. Les cinq topologies les plus vraisemblables (n° 16, 17, 18, 19 et 22) ont été retenues pour la suite des analyses. Pour chaque topologie retenue la procédure *EVAL_NH* de NHML a été appliquée avec les 500 alignements générés par bootstrapp pour obtenir une estimation de la variabilité de la vraisemblance. Un test de Friedman pour données appariées suivi d'un test *a posteriori* avec correction de Bonferroni montrent que la topologie n° 16 est la plus

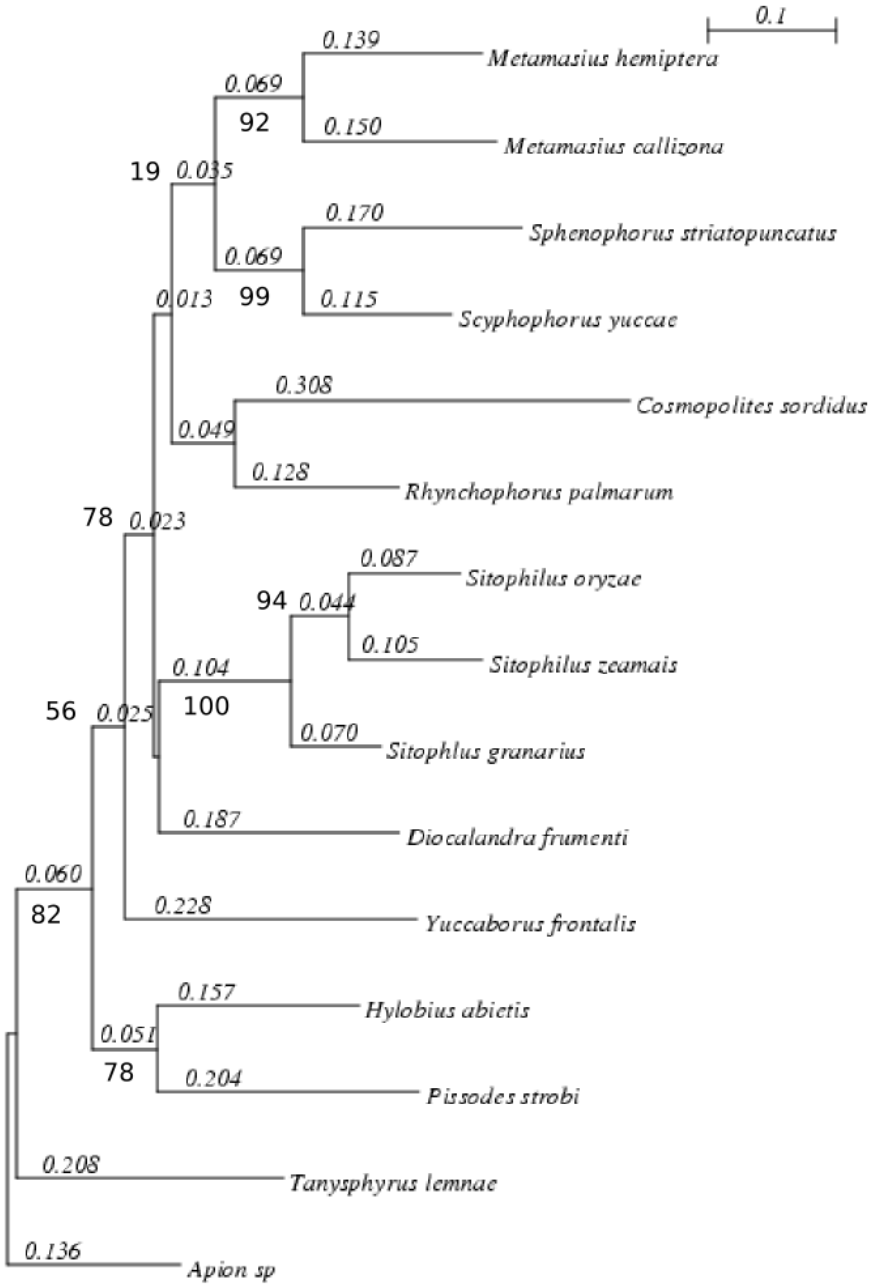


FIG. 3.5 – Estimation des relations phylogénétiques des insectes hôtes basé sur le COI

Arbre généré par PHYML sous un modèle GTRIG. Les chiffres en italique indiquent les longueurs des branches et en caractères droits les valeurs de bootstrapp.

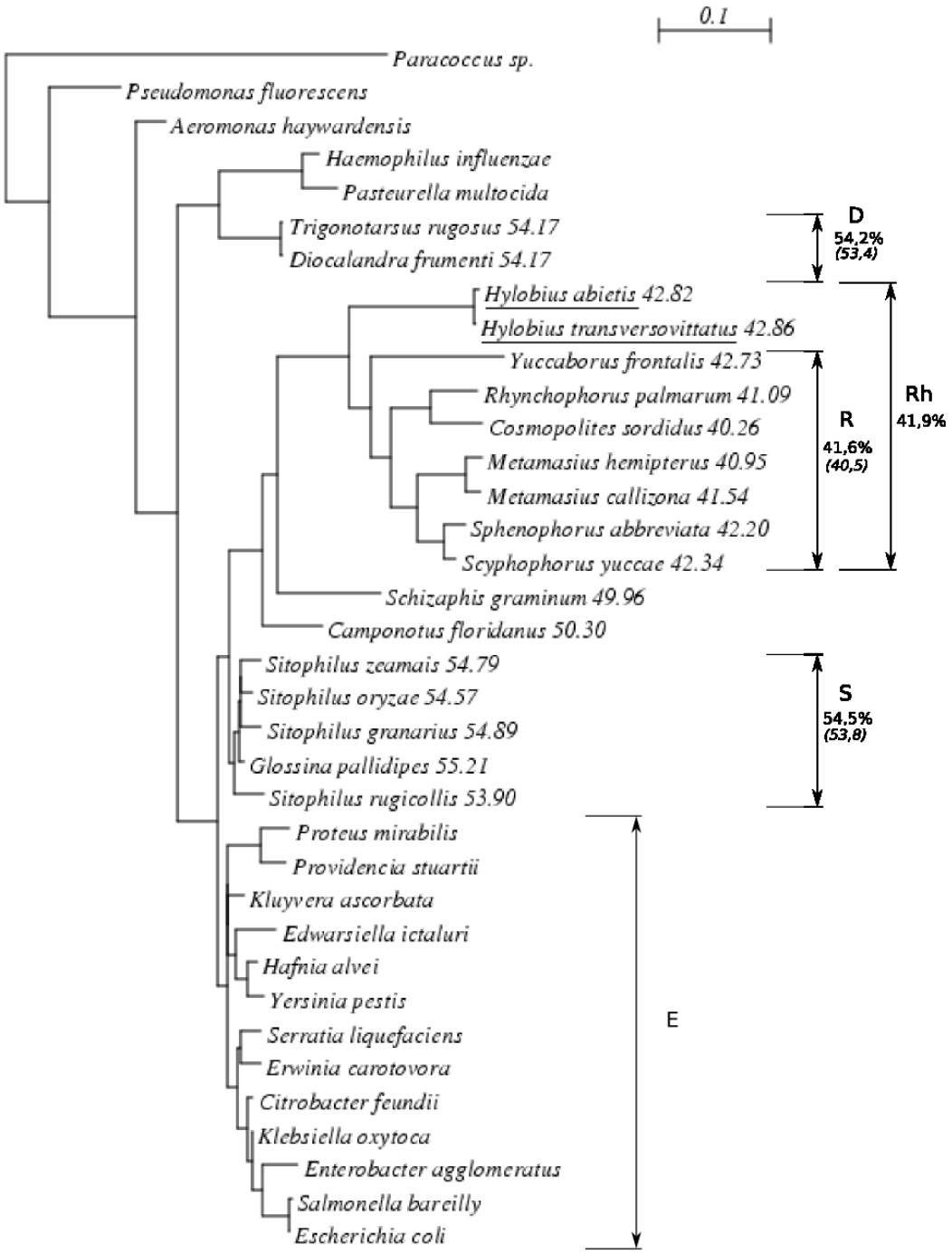


FIG. 3.6 – Position des endocytobiotes d'*Hylobius* sur l'arbre phylogénétique des endocytobiotes des Dryophthorinae
D, S et R : noms des clades d'endocytobiote de Dryophtorinae d'après Lefèvre (2004) ; Rh clade R avec les endocytobiotes d'*Hylobius* ; E pour le clade des Enterobacteriaceae. Le pourcentage de GC calculé sous le modèle de Galtier et Gouy (1998) est donné avec entre parenthèses les valeurs fournies dans l'article de Lefèvre (2004).

vraisemblable ($P = 1.10^{-3}$). Il s'agit de la topologie où les bactéries des deux espèces d'*Hylobius* enracinent le clade formé par les bactéries endosymbiotiques du clade R. Cette topologie a été utilisée par la suite pour la comparaison des taux de substitution entre les lignées.

Insecte-hôte de l'endocytobiote	**Taux de GC (%)** **obs.**	**A**	**B**
Scyphophorus yuccae	44,79	41,96	42,34
Sphenophorus abbreviata	43,55	41,58	42,20
Metamasius callizona	43,13	40,00	41,54
Metamasius hemipterus	42,97	40,50	40,95
Rhynchophorus palmarum	42,05	40,52	41,09
Cosmopolites sordidus	41,95	39,82	40,26
Yuccaborus frontalis	41,22	42,59	42,73
Hylobius transversovittatus	42,17	-	42,86
Hylobius abietis	42,11	-	42,82
moyenne :	*42,66*	*41,00*	*41,87*

Tab. 3.4 – Taux de GC (%) dans la séquence d'ADNr 16S des endocytobiotes bactériens du clade R et des endocytobiotes caractérisés chez les deux espèces d'*Hylobius*

Taux calculé avec le modèle de Galtier et Gouy (1998), (**A**) sans *Hylobius* et (**B**) avec *Hylobius*.

Clade testé	Clade de référence	Valeur P
Hylobius	Clade R	0,07
Hylobius	Clade S	10^{-7}
Hylobius	Clade D	10^{-7}
Hylobius	Enterobacteriaceae	10^{-7}
Hylobius	*Camponotus floridanus*	10^{-7}
Hylobius	*Schizaphis graminum*	3.10^{-5}
Clade Rh	Enterobacteriaceae	10^{-7}
Clade Rh	Clade S	10^{-7}
Clade Rh	Clade D	10^{-7}

Tab. 3.5 – Résultat des tests des taux d'évolution de l'ADNr 16S des endocytobiotes d'Hylobius par rapport aux autres lignées bactériennes avec RRTree

Rh désigne le clade formé des séquences des endocytobiotes de *Hylobius abietis* et *Hylobius transversovittatus* agrégées à celles du clade R. Dans chaque cas *Aquamonas haywardensis* a été utilisé comme groupe externe.

Taux de bases GC La différence des taux de GC observés par rapport à ceux fournis par Lefèvre (2004) dans leur travaux s'expliquent probablement par une différence de traitement des séquences en amont de l'analyse (options d'alignement, sites conservés pour l'analyse...). Cependant, les taux restent similaires et surtout les rapports entre clades et taxons restent les mêmes (Table 3.4, page 108 et figure 3.6, page 107). Il est intéressant de noter que le modèle sous-estime le taux de GC pour tous les taxons du clade R sauf pour les endocytobiotes de *Yuccaborus* et des deux *Hylobius* pour lesquels le modèle calcule un taux de GC supérieur à celui réellement observé. Cela est probablement imputable aux insertions riches en AT dans les séquences de ces taxons (cf *supra*) et au fait que les calculs se basent sur l'ensemble des séquences dont la majorité n'ont pas ces insertions. Il est également à noter que l'ajustement du modèle est meilleur pour les deux séquences des endocytobiotes d'*Hylobius* que pour les autres endocytobiotes du clade R (0,7% de différence pour *Hylobius* contre 1,2%).

Le positionnement des séquences d'*Hylobius* à la racine du clade R ne change pratiquement pas l'estimation du taux de GC ancestral (c'est à dire, celui estimé pour le noeud commun au groupe Hylobius(ES) & clade R) qui passe de 55,3% sans à 55,2% avec. Finalement, il semble possible de dire le taux de GC chez les endocytobiotes d'*Hylobius* est proche de celui du clade R et dénote une symbiose aussi ancienne selon l'hypothèse du biais en bases AT.

Comparaison des taux de substitution entre les lignées Les résultats des tests de comparaison sont résumés dans la table 3.5 en page 108. Les endocytobiotes des deux espèces d'hylobe montrent un taux d'évolution comparable à celui de ceux du clade R. Comme eux, les endocytobiotes identifiés ici évoluent plus vite que ceux des autres charançons et plus vite également que les entérobactéries testées.

3.4 Discussion

Les résultats présentés ici ont été obtenus sur un nombre modéré d'insectes provenant d'un faible nombre de sites naturels. Il faudrait bien entendu étendre l'échantillonnage pour vérifier la présence de ces bactéries dans d'autres populations de ces charançons à travers leur aire de répartition.

L'observation histologique par marquage spécifique a confirmé que les séquences d'ADN bactérien obtenues correspondent bien aux endocytobiotes observés dans les différents tissus des charançons.

Transmission verticale des bactéries La caractérisation des bactéries au moyen des sondes nucléiques spécifiques a permis de les localiser dans différents tissus (bactériome larvaire, apex des ovarioles, ovocytes) et à différents stades de vie des insectes (larve, femelle adulte). Ainsi, les différentes étapes d'une transmission verticale sont mises en évidence et cette hypothèse de propagation des bactéries peut être soutenue chez les deux espèces d'*Hylobius* étudiées. Cela renforce l'idée d'un mutualisme obligatoire. Cependant les mécanismes de translocation des

bactéries entre les différents organes au sein de l'insecte restent indéterminés, comme c'est le cas chez la plupart des autres charançons étudiés jusqu'à présent.

Co-spéciation et âge de l'endosymbiose chez les Curculionidés L'évolution parallèle de deux taxa associés, tels qu'un hôte et son symbiote peut conduire à des évènements de spéciation couplés ou parallèles : on parle alors de cospéciation. La congruence des phylogénies de l'hôte et du symbiote est un élément qui suggère fortement un tel scénario de cospéciation. Une transmission stable de la bactérie à travers les lignées de l'insecte est évidemment nécessaire. Parmi les groupes d'insectes possédant des endocytobiotes, la cospéciation est fortement soutenue chez les mouches tsé-tsé, les fourmis camponotes, les psylles et les pucerons (voir les citations respectives dans Wernegreen, 2002). Chez les Dryophthorinae, la forte congruence existant entre l'arbre des insectes (O'Meara, 2001) et celui des endocytobiotes du clade R a conduit Lefèvre (2004) a proposer le scénario d'une association symbiotique ancestrale à partir d'une γ3-protéobactérie dont les endocytobiotes du clade R seraient les descendants actuels. Selon ce scénario, l'association entre les charançons et leurs bactéries pourrait remonter à 100 millions d'années.

Les résultats de notre étude apportent de nouveaux éclairages sur l'évolution de l'endosymbiose chez les Curculionidés. Tout d'abord, ces résultats renforcent l'idée d'une endosymbiose bactérienne largement répandue chez les charançons puisque présente chez des groupes très différents et questionne d'autant plus son importance évolutive. Ensuite, la congruence entre l'arbre estimé des insectes-hôtes (Figure 3.5 et celui des endocytobiotes (Figure 3.6) pose la question de l'âge de l'association entre les hylobes et leurs bactéries. Si les Dryophthorinae représentent bien un groupe dérivé par rapport aux Molytinae de cette étude, alors il est possible que l'association entre les hylobes et leurs bactéries soit plus ancienne encore que celle des Dryophthorinae. Finalement, cette congruence des arbres pourrait suggérer une cospéciation entre les insectes et leurs hôtes. Cependant une cospéciation au fil des niveaux taxonomiques si éloignés que ces deux-sous familles parait une hypothèse très forte et conduit à imaginer des scénarios alternatifs pour expliquer les relations observées. Ainsi, on peut envisager une acquisition parallèle et à une époque similaire de bactéries à la fois chez les hylobes (ou leur ancêtre immédiat) et chez les Dryophthorinae. Cependant, cette hypothèse implique une acquisition dans des zones géographiques éloignée puisque les Dryophthorinae sont des insectes tropicaux et les hylobes sont réparis dans l'hémisphère nord. Cela confirmerait l'existence d'une souche bactérienne ubiquiste propice à l'établissement de relations mutualistes avec les charançons.

Rôle de l'endosymbiose chez *Hylobius abietis* Il serait évidemment hasardeux de spéculer trop avant quant aux apports exacts des endocytobiotes bactériens pour la biologie des charançons de cette étude. L'obtention de lignées d'insectes aposymbiotiques, c'est à dire dépourvus de leurs endocytobiotes bactériens, permettrait de se faire une idée d'un éventuel gain de performance pour l'insecte.

Il faut toutefois noter la faible divergence entre les deux séquences des endocytobiotes respectifs des deux espèces d'hylobes. Dans l'hypothèse d'un rôle actif des bactéries dans l'adaptation

à la plante-hôte, on pourrait s'attendre à une plus grande divergence entre des bactéries d'insectes exploitant des plantes-hôtes très différentes qu'entre bactéries d'insectes associés à des végétaux taxonomiquement proches. L'examen d'une seule séquence n'est bien sûr pas suffisant pour se prononcer mais des pistes de travail apparaissent. Pour répondre plus précisément à cette question, il faudrait établir une phylogénie du genre *Hylobius* pour estimer l'âge de la divergence entre ces espèces et rechercher les endocytobiotes chez les congénériques en vue de leur comparaison. Une approche de génomique serait indiquée pour espérer mettre en évidence des différences de métabolisme entre les bactéries.

Si l'impact des endocytobiotes bactériens caractérisés dans cette étude, sur la physiologie des deux espèces d'*Hylobius* reste spéculatif, il faut souligner que *H. abietis* profite vraisemblablement d'une symbiose d'une autre nature établie avec une levure du genre *Candida* (Thuillier *et al.*, 1966, 1967; Chararas, 1979). Cette levure a été trouvée à l'intérieur des cellules du bactériome larvaire et à la base des cellules de l'épithélium dans le tissu adipeux entourant l'intestin moyen. Sa localisation dans les zones de sécrétion et d'absorption digestives de l'insecte ainsi que son équipement enzymatique en osidases ont conduit les auteurs (voir références citée avant) à envisager la participation de cette levure aux processus de digestion des polysaccharides du bois. Il a par ailleurs été montré *in vitro* que des levures du genre *Candida* sont capables de dégrader des tanins condensés qui sont des composés secondaires réputés être responsables de la résistances des écorces face aux pathogènes (Ötük et Deschamps, 1983).

Métabolisation des substances nutritives et détoxication des composés allélopathiques sont vraisemblablement deux propriétés de la levure qui contribuent à l'adaptation fonctionnelle du charançon à son habitat. Par ailleurs, une corrélation a pu être établie entre la présence des bactéries symbiotiques et la capacité au vol des charançons de l'espèce *Sitophilus zeamais* (Grenier *et al.*, 1994). Étant donnée l'importance de l'aptitude à la dispersion chez *Hylobius abietis*, des indices de ces fonctions seraient à chercher chez les bactéries endosymbiotiques caractérisées dans notre étude pour soutenir l'hypothèse de la bactérie comme alliée adaptative du charançon. Toutefois, aucune indication ne permet à l'heure actuelle d'orienter le travail vers la recherche de propriétés redondantes ou complémentaires vis à vis de la biologie de l'insecte entre les deux types de micro-organismes.

3.5 En résumé

Une endosymbiose bactérienne a été mise en évidence et étudiée chez deux espèces du genre *Hylobius*. Des techniques d'histologie et de reconstruction phylogénétique ont permis :

1. l'identification d'une souche bactérienne proche des souches précédemment identifiées chez d'autres charançons,
2. sa localisation dans les tissus spécialisés du bactériome larvaire et dans les oeufs chez les femelles,
3. l'estimation des relations phylogénétiques avec les autres souches caractérisées chez les

charançons, les bactéries présentes chez les hylobes apparaissant monophylétiques avec celles du clade bactérien dont l'association est supposément la plus ancienne.

Ces résultats ont des implications quand à l'occurrence et à l'âge de l'endosymbiose bactérienne dans le vaste groupe des charançons. Nos résultats suggèrent que l'âge présumé jusqu'alors à partir des données sur les Dryophthorinae pourrait être repoussé. La présence et le rôle de ces bactéries endosymbiotiques sont discutés en perspective de l'adaptation du charançon à ses plantes hôtes.

Conclusion générale et perspectives

Différentes approches ont permis de cerner des éléments de l'adaptation de l'insecte ravageur *Hylobius abietis* à son environnement forestier. Pour ce faire, nous avons été amenés à considérer différentes échelles tant géographiques que temporelles. L'adaptation du charançon a été abordée à la fois comme un état de fait et comme un processus dynamique.

À une échelle écologique, à l'aide de marqueurs moléculaires, nous avons montré une cohérence génétique des populations du charançon à l'échelle de la région forestière et également que ces populations sont peu affectées par la nature de la plante-hôte.

À une échelle de la biologie de l'individu, nous avons montré que les adultes ne marquent pas une préférence très contrastée entre les essences proposées mais que cette réponse pourrait être affectée par l'histoire récente des insectes : nourriture de la femelle et expérience d'une seule essence dans le milieu d'origine.

À une échelle paléontologique nous avons montré que les hylobes ont établi une relation avec des micro-organismes bactériens qui est vraisemblablement de nature a augmenter leur adaptation au substrat de développement.

Ainsi, à la lumière des éléments apportés dans les trois grandes parties de ce travail, cette section finale se propose d'examiner tout d'abord en quoi les objectifs initiaux ont été atteints. Ensuite nous discuterons des écueils et limites rencontrés dans cette étude pour y proposer des solutions le cas échéant. Enfin une dernière partie sera consacrée aux perspectives ouvertes par ce travail tant pour le « système hylobe-conifères » que dans le cadre plus général des relations insectes-plantes.

1 Bilan

1.1 Degré de spécialisation d'*Hylobius abietis* : de l'état et du processus

Dans quelle mesure est-il possible de juger de l'adaptation de cette espèce à son environnement forestier ? Pour pouvoir juger plus avant il manque vraisemblablement un échantillonnage des insectes dans des peuplements forestiers qui ne sont pas soumis au cycle sylvigénétique

afin de fournir un point de comparaison. Cette option a été envisagée mais a dû être écartée puisque par définition les niveaux de population de l'insecte dans les forêts sub-naturelles sont bien inférieurs à ceux des plantations attaquées et le piégeage ne permettait pas d'obtenir des insectes d'une qualité suffisante pour les typages génétiques.

Adaptation spécifique à la plante-hôte ? Ainsi que le souligne Grove (2002) dans sa revue de l'écologie des insectes saproxyliques, pour envisager la spécificité des insectes se développant sur le bois mort il faut comprendre que la décomposition est un processus dynamique qui comprend différents stades procurant chacun un habitat différent pour un assemblage d'espèces donné. D'après ses observations bibliographiques, les insectes colonisant le bois fraîchement mort montreraient une spécificité étroite à l'hôte, rarement au niveau de l'espèce mais plus communément à des niveaux taxonomiques supérieurs. On peut rajouter que la même tendance est observée chez les insectes des champignons associés à la décomposition des arbres (voir par exemple Jonsell et G, 2004). Ceci est concordant avec le signal génétique observé bien que des *loci* atypiques n'aient pas pu être identifiés. Il faut remarquer que en raison de sa vaste aire de répartition, les facteurs poussant à une spécialisation de l'Hylobe ne sont peut être pas similaires en tous points : par exemple, dans la région fennoscandinave l'existence d'autres espèces d'hylobes ayant le même biotope larvaire produit peut être une pression de compétition. En effet, dans les pays nordiques, la présence d'autres hylobes semble être une force de nature à créer un partage des essences plus marqué qu'ailleurs : Langström (1982) montre à ce propos une partition assez nette entre *H. pinastri* l'on trouve quasiment exclusivement sur épicéa de Norvège et *H. abietis* sur pin sylvestre dans les zones de co-occurrence.

La dispersion chez *Hylobius abietis* : Ainsi que l'avaient pressentit Leather *et al.* (1999), notre étude a confirmé que le potentiel de dispersion des adultes de *Hylobius abietis* est un trait de grande importance dans la biologie de l'insecte et possède des implications dans le traitement du « problème phytosanitaire » qu'il pose en forêt cultivée. Si notre étude confirme de forts déplacements des insectes au cours de leur vie conduisant à un fort mélange des populations, des estimations quantitatives restent à fournir. Des estimations de la dispersion sur le terrain plus précises que celles existant seraient nécessaires pour confirmer ces résultats, notamment par des techniques de marquage-recapture. Cependant de telles études sont difficiles à mettre en place chez les espèces montrant un fort niveau de dispersion.

Un insecte spécialiste d'une configuration du paysage La rareté spatiale et temporelle du substrat de développement dans le milieu originel de l'hylobe a vraisemblablement guidé l'adaptation de ses systèmes locomoteur et olfactif. Cependant, ces mêmes particularités sont de nature à contrecarrer l'évolution d'une spécialisation à une essence donnée puisque les vastes mouvements d'individus empêchent la fixation d'adaptations locales par le mélange des gènes engendré et par le fait de changer d'habitat quasiment à chaque génération. Toutefois, la vaste étendue et le caractère monospécifique de la forêt des Landes sont peut être justement deux

caractéristiques exceptionnelles de nature à amorcer une spécialisation chez l'hylobe. Cela impliquerait toutefois que les flux de gènes en provenance des autres forêts de conifères autour ne soient pas trop importants. C'est pourquoi les populations de *Hylobius abietis* établies dans la vaste forêt de pin des Landes présentent un intérêt particulier pour l'étude de ces adaptations et de futurs travaux dans cette voie devraient les intégrer plus qu'il n'a été fait dans ce travail.

Potentiel d'évolution chez *Hylobius abietis* : un risque d'acquisition de nouvelles plantes-hôtes ? Dans la guerre que mène l'homme aux espèces qui sont en compétition avec lui pour les ressources végétales, celui-ci cherche à connaître suffisamment bien son « ennemi »pour pouvoir prédire son évolution à cours terme. Le risque d'évolution de la gamme d'hôte est une question d'importance concernant aussi bien les espèces invasives que celles utilisées comme agents de lutte biologique dont on attend une forte spécificité vis à vis de leur « espèce-cible » (Futuyma, 1999). Les techniques d'amélioration des plantes cultivées et l'emploi de variétés « exotiques » plus productives contribuent parfois à projeter des insectes « indigènes » dans des environnements nouveaux. L'étude des processus micro-évolutifs en jeu chez une espèce d'insecte donnée constitue une approche pour évaluer la probabilité de tels changements ou d'acquisition d'hôte. À l'heure actuelle la question se pose de trouver des essences résistantes aux morsures de l'hylobe, comme elle est abordée chez d'autres charançons ravageurs de conifères tel *Pissodes strobi* en Amérique du Nord. L'usage de diverses espèces de Pinacées par l'hylobe est contrasté. Prenons l'exemple de deux essences non natives d'Europe : si l'épicéa de sikta est à la fois attaqué par les adultes et peut accueillir les pontes et le développement, le sapin de Douglas, lui, ne semble propice que pour les adultes : en effet, les insectes peuvent se développer dessus mais ne le font pas en conditions naturelles. *Abies alba* n'est par contre ni consommé ni propice au développement. Cela pourrait reposer sur la reconnaissance olfactive des essences ainsi que le proposent Saintonge et Malphettes (1996) puisque quand les rondins de plusieurs essences sont disposés côte à côte, des pontes erronées et un développement sont relevées. Les souches de Douglas constitueraient en plus une niche avec encore moins de compétiteurs puisqu'elle est peu prisée des autres insectes. En outre, la vitesse de décomposition des résidus d'exploitation (branches, feuillage mais surtout système racinaire résiduel) étant significativement réduite dans les sites de coupe rase par rapport aux zones de couvert forestier normal (principalement à cause des conditions environnementales particulières Palviainen (2005)), cela pourrait laisser plus de chance aux insectes opportunistes ou aux comportements de ponte erratiques de se produire. Le signal d'adaptation locale des insectes des Landes sur pin maritime est de nature à laisser penser que l'hylobe pourrait tout de même tirer parti à moyen terme des vastes peuplements de sapin de Douglas exploités. L'influence de la plante de développement et celle de la diète de l'adulte sur ses préférences pourrait être de nature à favoriser une expansion de la gamme d'hôtes à une vitesse plus élevée que celle prédite par les modèles qui suppose qu'une variation génétique est requise. Cette question des bases de la préférence d'hôte et des facteurs susceptibles de favoriser l'acquisition d'un hôte dans le régime alimentaire de l'adulte ou de la larve est donc

cruciale. Comme pour les Scolytes dont la préférence entre différents hôtes a été peu étudiée en Europe (Sauvard, 2004), de telles connaissances chez l'hylobe seront hautement stratégiques à moyen terme en raison de l'accroissement des zones plantées d'arbres non indigènes et des futurs changements attendus face aux perturbations climatiques globales.

1.2 Intérêt pour les gestionnaires forestiers ?

Il faut rappeler que l'objectif de cette étude n'était pas d'apporter des éléments en lien direct avec l'établissement de stratégies de gestion du problème posé par *Hylobius abietis*, mais plutôt d'élargir le cadre des connaissances sur les composantes de son succès en tant que ravageur. Notre étude a montré que le motif de diversité génétique AFLP des populations de *Hylobius abietis* dans les forêts européennes était certainement le résultat des pratiques sylviculturales (expansion des forêts de conifères hors de leur répartition naturelle, pratique de la coupe rase avec souches rémanentes et plantation). C'est aussi l'expression dans ce contexte forestier des caractéristiques biologiques de cet insecte qui était originellement adapté à une ressource éparse et éphémère pour effectuer son développement. La plasticité des traits d'histoire de vie, la longévité et la relative polyphagie des adultes d'*Hylobius abietis* contribuent certainement à leur grande « capacité à s'affranchir des barrières » (« gap-crossing ability », *sensu* Tscharntke et Brandl 2004) et par là même à leur potentiel de dégâts pour l'exploitation forestière en Europe.

Par ailleurs, la dispersion à longue distance des adultes est de nature à prévenir une adaptation locale des populations, empêchant la formation de races-hôtes. La faible structuration génétique observée dans les sites européens suggère qu'un agent de contrôle biologique efficace pourrait être utilisé à grande échelle. Notre étude pourra donc servir de contrepoint aux projets actuels de caractérisation moléculaire des populations de nématodes entomopathogènes susceptibles de servir au contrôle des populations d'*Hylobius abietis* (Salinas, 2002).

2 Limites, écueils et propositions pour les contourner

2.1 Le biais entomocentriste

On a vu en introduction de ce travail que les études des relations plantes-insectes sont parfois biaisées en faveur des insectes par les écologues entomologistes. Ce travail ne prétend pas échapper totalement à ce biais. Les chapitres 2 et 3 ont été guidés par le parti pris de considérer le grain d'hétérogénéité offert par la plante-hôte au niveau de l'espèce. Une étude plus poussée des caractéristiques des plantes-hôtes susceptibles de sous-tendre celle observée chez l'insecte n'a pas été entreprise. Ces deux espèces qui appartiennent toutes deux à la famille des Pinacées, présentent une forte variabilité intraspécifique quant à leurs composés secondaires comme les terpènes. Si la chimie des deux arbres est variable au point que deux plants d'épicéa puissent différer plus entre eux que deux pins (voir la discussion du chapitre 2), il reste que certaines caractéristiques différencient ces essences. Outre les composés secondaires ou les quantités de lignine (voir Thorpe et Day (2002)), des propriétés physiques ou mécaniques de l'écorce et du

bois sont susceptibles de créer des sélections divergentes sur les larves de l'hylobe. Par exemple, alors que la forêt des Landes en France constitue en apparence un gigantesque réacteur pour *Hylobius abietis*, les dégâts sur les pins maritimes restent modérées (Lempérière, comm. pers.) ce qui suggère peut être que les insectes ne connaissent pas un succès reproductif à la hauteur du nombre de sites larvaires disponibles. Une explication tient peut être à la qualité des souches dont l'écorce est particulièrement épaisse à l'âge où les arbres sont abattus (observation personnelle lors de l'échantillonnage). Les insectes ne pourraient profiter que des souches issues des coupes d'éclaircies sur des arbres plus jeunes. Ceci serait cohérent avec les observations de Saintonge et Malphettes (1996) sur rondins de pin sylvestre, dont l'épaisseur d'écorce maximale restait toutefois modeste en regard de celle d'un pin maritime de 75 ans. Cette voie reste à explorer.

Une solution pourrait être d'étudier conjointement la variabilité génétique chez la (ou les) plante(s)-hôte(s) et chez l'insecte afin de mettre en évidence des facteurs de structuration insoupçonnés conduisant à une adaptation locale. Cependant, seules deux études auraient recherché une telle corrélation entre un insecte et ses plantes-hôtes (Michalakis *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 2004) et le système *Hylobius*/conifères ne semble pas propice, notamment pour les raisons discutées dans le chapitre 1.

2.2 Atouts et limites de l'outil moléculaire pour l'étude d'une espèce non-modèle

L'approche de génomique des populations Bien que la technique AFLP soit largement utilisée dans les études de génétique des population et de cartographie chez les plantes, son application aux animaux, et *a fortiori* chez les insectes, reste encore relativement restreinte (voir la revue de Bensch et Akesson, 2005). Une explication pourrait être que certains aspects de la technique moléculaire requièrent plus d'investigation et de soutien ; c'est le cas de l'hypothèse de base qui stipule que les fragments AFLP sont répartis aléatoirement dans le génome. Les fragments pourraient par exemple être concentrés dans des régions particulières du génome. Au delà de la description de la variabilité génétique et de l'inférence des forces évolutives la façonnant, l'identification des gènes (ou régions) impliquées dans des traits adaptatifs d'intérêt est une perspective particulièrement séduisante. Cependant, l'intérêt de la méthode qui s'applique aux espèces sans connaissance *a priori* de leur génome trouve ici sa limite puisque ces connaissances sont indispensables pour remonter au support génétique du trait d'intérêt. Néanmoins, l'étude de phénomènes dynamiques dont les frontières ne sont pas facilement précisables, comme le continuum biologique entre race hôte et espèce va sans doute profiter de l'usage de ces marqueurs d'« ampleur génomique » mais nécessitera un développement parallèle de techniques de traitement statistique (ce qui est en cours au laboratoire avec les thèses de M. Foll et P. Faubet entre autres).

Un autre point tient au caractère dominant des marqueurs AFLP qui confère un certain handicap à cette technique en génétique des populations. Outre le fait que peu de logiciels ont implémenté le traitement statistique des marqueurs dominants, l'inconvénient principal est que

la structure intra-population reste inaccessible.

Vers une précision du mouvement des insectes Il reste évidemment de nombreuses zones d'ombre concernant les mouvements de populations d'hylobe. Dans ce travail nous avons utilisé une méthode d'assignation avec un *a priori* sur le site de provenance. Il existe cependant d'autres méthodes d'assignation qui fonctionnent sans cet *a priori* : ces méthodes dites de « clustering » ou agrégatives permettent de mettre en évidence des groupes d'insectes selon leur proximité génétique. Ceci pourrait apporter des informations sur la fréquence des échanges d'individus entre grands massifs forestiers, grâce par exemple à un échantillonnage réalisé en bordure de ces derniers. Par ailleurs, l'utilisation d'autres marqueurs moléculaires tels l'ADN mitochondrial associé avec un échantillonnage dans la partie centrale et orientale de l'Europe, jusqu'en Asie pourrait aider à déterminer si le flux d'insectes en provenance de l'est du continent (depuis la dernière glaciation) est encore en cours.

3 Perspectives : idées et propositions

3.1 Interaction avec les micro-organismes symbiotiques

Un point de vue populationnel ? La coévolution entre les groupes d'insectes (Homoptera, Curculionidae par ex.) et leurs symbiotes a jusqu'ici été abordée sous l'angle phylogénétique. Dans sa revue sur la structure géographique des populations d'insectes Roderick (1996) évoque toutefois la possibilité d'étudier l'évolution de ces interactions au niveau des populations d'insectes. Ceci n'aurait pas encore été exploré mais peut être rapproché du récent travail de Klepzig et Six (2004). Dans leur article de revue de l'association des Scolytes avec des champignons, Klepzig et Six mettent en évidence que la nature de la relation entre l'insecte et les micro-organismes pourrait dépendre très largement de facteurs biotiques (nature de la plante-hôte) ou abiotiques (humidité et exposition locale des peuplement forestier), oscillant plus fréquemment qu'admis précédemment entre commensalisme, mutualisme et antagonisme. Ainsi, une étude expérimentale plus fine de ces interactions couplée à une caractérisation populationnelle des partenaires pourrait permettre de mieux comprendre (ou prédire) les épisodes éruptifs dans les peuplements cultivés. Ceci trouve une résonance particulière dans un contexte d'utilisation d'essences « exotiques » et d'amélioration génétique des variétés forestières.

Ménagerie symbiotique ou pathogène ? Comme on l'a vu (cf section 3.4), si des arguments existent en faveur de l'hypothèse d'une association symbiotique avec les levures du bactériome larvaire[15], les bénéfices retirés de l'hébergement des bactéries par le charançon ne sont pas démontrés jusqu'à présent. Les implications de cette symbiose bactérienne pour le métabolisme

[15]La co-occurence des deux types de micro-organismes n'a pas été recherchée dans nos échantillons faute de temps et de sondes appropriées mais est en projet.

du charançon ont été discutées dans le chapitre 3 puisque ce sont elles qui ont guidé cette recherche. Toutefois, de récents travaux sur les relations entre les insectes et leurs micro-organismes symbiotiques amènent à envisager cette association bactérie-insecte sous un autre angle : il s'agit de la résistance à la colonisation par des pathogènes. Le rôle des micro-organismes indigènes comme agents de résistance vis à vis des micro-organismes extérieurs pathogènes, connue par exemple pour le cas des enterobactéries du système digestif de l'homme, existerait également chez les insectes (Dillon et Dillon, 2004). Cette résistance à la colonisation par des germes pathogènes a récemment été montrée au niveau des ménageries symbiotiques de l'intestin antérieur d'un criquet, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera : Acrididae) (Dillon *et al.*, 2005). A l'occasion de ce travail, il a par ailleurs été mis en évidence que la diversité des souches bactériennes indigènes serait positivement corrélée avec la résistance à la colonisation.

A la lumière de ces données il apparaît que la « ménagerie » de micro-organismes mise en évidence chez *Hylobius abietis* (levure, bactérie endosymbiotique, *Wolbachia*) fait de cet insecte une espèce modèle pour l'étude des interactions interspécifiques et pourquoi pas pour l'élaboration de stratégies de bio-contrôle basées sur la perturbation de ces interactions[16].

3.2 Vers une approche comparative

Lors de l'interprétation des résultats obtenus dans les différentes partie de ce travail, le besoin de trouver des points de comparaison tant dans d'autres systèmes insectes-plantes en général que dans le système forestier en particulier, s'est fait ressentir. Parmi les insectes forestiers, le groupe des scolytes qui a été particulièrement étudié, par exemple pour leur comportement de sélection des plantes-hôtes (Wood, 1982; Byers, 1995) mais peu de données sont disponibles sur les variations intra-spécifiques de la préférence des insectes pour leurs plantes-hôtes (Sauvard, 2004). Chez *Hylobius* peu d'études n'ont encore entrepris d'intégrer les différentes espèces du genre pour comprendre le succès comme ravageur de *H. abietis*, à l'exception peut être du travail de Gourov (2000) qui reste toutefois largement descriptif.

Phylogénie de l'utilisation des plantes-hôtes Si l'adaptation à l'hôte a été abordée à une échelle micro-évolutive, au niveau des populations de *Hylobius abietis*, cette question pourrait également être abordée à une échelle macro-évolutive au sein du genre *Hylobius*. Bien que *Hylobius abietis* soit certainement l'espèce la plus emblématique du genre en raison des dégâts occasionnés (du moins en Eurasie), on a vu qu'il existerait une cinquantaine d'autres espèces dans le genre dont une quinzaine ont été recensées dans les forêts de Sibérie Septentrionale et seraient responsables de dégâts modérés dans les plantations de conifères (Gourov, 2000). Peu d'informations précises sont disponibles sur leur biologie mais il apparaît néanmoins des divergences quant à leurs plantes-hôtes (Gourov, 2000). Cette diversité spécifique plus importante dans ces régions laisse à penser que le centre de diversification des hylobes pourrait s'y trou-

[16](voir le paragraphe « Utilization of transgenic gut bacteria in biocontrol » dans la revue de Dillon et Dillon, 2004)

ver. Une reconstruction de leurs relations phylogénétiques permettrait non seulement de tester différentes hypothèses évolutives comme la question de la plante-hôte ancestrale mais pourrait également mettre en évidence les traits biologiques qui font de certaines espèces des ravageurs. De telles études ont par exemple permis de montrer chez le charançon du coton, *Anthonomus grandis* (Col., Curc), que c'est la préférence pour un habitat (zones humides) qui est probablement en cause dans l'acquisition d'une nouvelle plante-hôte (Jones, 2001).

Niche larvaire et endosymbiose bactérienne Ainsi que cela a été présenté, l'association avec des micro-organismes est peut être un facteur du succès de l'hylobe dans la conquête et l'exploitation de sa niche larvaire particulière (ou plus largement de son mode de nutrition). Diverses pistes ont été évoquées plus haut pour tester cela au niveau de de l'interaction bactérie-hylobe. La validation de cette hypothèse pourrait également passer par la recherche de telles associations chez des insectes proches, soumis aux mêmes contraintes. Si la recherche chez d'autres congénériques de l'hylobe vient tout de suite à l'esprit, d'autres insectes exploitant la même niche apparaissent comme de bon candidats. C'est le cas de certains *Hylastes* (Col., Scolytidae) (par exemple, *H. ater* ou *H. brunneus*) qui comme *Hylobius abietis* sont attirés par les conifères mourants ou en décomposition dans lesquels ils se développent mais ils attaquent également les jeunes arbres, parfois en même temps que les hylobes (Reay, 2000). Chez *Hylastes ater*, une symbiose bactérienne de même nature est soupçonnée : des bactéries ont été localisées au niveau des gaines ovariques mais il n'a pas été possible de déceler des bactériomes chez la larve (Chararas, 1979). En outre, lors des premiers stades de la symbiose, les transferts horizontaux des bactéries aux capacités pathogéniques pourraient avoir lieu fréquemment à la faveur des diètes similaires de leurs hôtes (voir citations à propos des endocytobiotes des glossines dans Lefèvre *et al.*, 2004). Hylobes et hylastes partageant fréquemment le même substrat, l'étude conjointe des micro-organismes chez ces deux groupes pourrait profiter des connaissances acquises dans le groupe des Scolytes pour étendre celles au niveau des Curculionidés.

3.3 *Hylobius abietis* : Dr Sapro' et Mr Xylo', ou le conflit potentiel entre biodiversité et exploitation forestière

Malgré son statut de ravageur des plantations forestières, le grand charançon du pin demeure l'un des premiers maillons de la succession d'espèces qui vont contribuer à la dégradation du bois. Bien que cela n'ait pas été l'objectif principal de mon travail, je tiens à aborder cet aspect dans ce bilan. En effet, il est clair que *Hylobius abietis* trouve une place dans cette cohorte d'espèces dont le rôle fonctionnel pour le système forestier est indéniable (Grove, 2002). Le bois mort, longtemps vu comme une source d'instabilité pour le système forestier cultivé est maintenant reconsidéré sous l'angle de son apport à la biodiversité tant il constitue une véritable interface entre les milieux biologiques épi- et endogés. Il est même qualifié parfois d'annexe du sol.

Depuis peu, les différents acteurs de la forêt cultivée se sont constitués en réseaux[17] ayant

[17]Voir par exemple, l'Institut Européen de la Forêt Cultivée (IEFC : www.iefc.net) qui regroupe des organismes

pour objectif de réfléchir sur les enjeux et problèmes posés par la gestion de la biodiversité dans ce système biologique particulier.

Ainsi, on voit se profiler des conflits d'intérêt entre les pratiques d'« aseptisation » des parcelles forestières cultivées et la nécessité de préserver des matériaux-refuges pour la faune et la flore associées. Dans une communication donnée lors du colloque « Bois mort et à cavités, une clé pour des forêts vivantes » qui s'est tenu à Chambéry, nous avons illustré cette ambivalence à travers trois cas d'espèces (Lempérière *et al.*, 2004a). Un exemple d'incohérence est donné avec les espèces du genre *Cerambyx*, dont certaines sont présentes à la fois sur la liste rouge internationale des espèces vulnérables de l'UICN et sur les listes des ravageurs forestiers comme celle du BAWBILT (sic !). Ensuite, une étude des successions entomocénotiques générées sur sapin par les scolytes permet de se rendre compte de la diversité du cortège associé. Enfin, le cas de *Hylobius abietis* permet d'illustrer ces espèces qui sont nuisibles à leur plante-hôte durant une partie de leur cycle et qui ont une action bénéfique en faveur de la dégradation du bois dans une autre partie.

Comme on a pu le voir plus haut, les souches et arbres mourants qui forment le substrat de ponte et de développement du grand charançon du pin constituent vraisemblablement une cible clé pour les stratégies de lutte à venir. Toute intervention à ce niveau devra donc tenir compte des conséquences sur la faune associée, acariens et vers par exemple, que l'on connaît encore peu. Il est ainsi fort probable que le « problème *Hylobius abietis* » soit à reconsidérer sous de nouveaux éclairages, à court terme !

de recherche, des universités et des organisations professionnelles.

Annexe A

Annexe de l'introduction générale

Chapitre 13

Taxonomy and systematics of Bark Weevils

G. Lempérière[1], A. Mantilleri[2] & C. Conord[1]

[1] *Université Joseph Fourier, UMR CNRS 5553, Grenoble*
[2] *Muséum National d'Histoire Naturelle, 55 rue Buffon, 75005, Paris*

1. RECENT STATUS OF THE FAMILY CURCULIONIDAE

The family Curculionidae includes the majority of species described from the Curculionoidea and it can be considered as the most derived taxonomic group of the super-family which is also part of the most derived group among the Coleoptera. During the second half of the last century, the concept of the Curculionidae family changed with Crowson (1955) including a large number of taxa which are now omitted from the group ; however he first formally mentioned the Scolytidae and Platypodidae as sub-families. Later on, the use of cladistic methods further clarified relationships between different groups of weevils.

Entire groups were then separated from the Curculionidae. It was the case for the Dryophthoridae (=Rhynchophoridae) (Morimoto 1962a, 1962b, 1976), and the Ithyceridae that form a monospecific group (Morimoto 1976, Sanborne 1981). After a study using the male genitalia, the Erirhinidae, Brachyceridae, Cryptolaryngidae and Raymondionymidae were separated from the Curculionidae (Thompson 1992). At the present time, only species that present male genitalia with a gonatocera type are considered as Curculionidae. In the Curculionidae *sensu stricto*, males have a manubrium which is smaller than the spiculum gastrale. If the spiculum gastrale is absent, then the rostrum is also absent. The Platypodinae do not follow this pattern because in this group, the sclerification of genitalia is very thin and the spiculum gastrale is not visible. This new way of looking at Curculionidae has been used by Alonso-Zarazaga and Lyal (1999) in their world catalogue of families and genera of Curculionoidea.

2. EXTERNAL MORPHOLOGY

A fundamental feature of the Curculionidae is the absence of specific external characters and the only apomorphism that allows definintion of the Curculionidae clade is based on a single character of the male genitalia. However, the Curculionidae have a very unique shape.

The head is produced into a rostrum of very variable length and form. It can be long and pointed in the genus *Curculio* or short and wide in the *Otiorrhynchus*. The rostrum can be turned-down on the prosternum in the Cryptorhynchinae.

The antennae are located on the rostrum and are geniculate after the scape and have a variable number of articles between 9 and 11. Eyes are present except for the *Torneuma* that live in the soil or in cavities or caves.

The thorax : the prothorax is variable and can present a furrow to screen the rostrum. The mesothorax is also variable with a scutellum which can be visible or not and the elytra that are dorsally attached to this segment. The metathorax is hidden by the elytra and the membranous wings are attached to it. Its ventral part shows furrows that can vary according to the sex. Legs are also variable and tarsi are usually cryptopentamere with four visible articles.

The abdomen consists of 9 segments with segments 8 and 9 modified and forming the sclerified parts of the sexual organs. On the dorsal part, 7 segments are visible under the elytra. On the ventral part, only 5 segments are visible, the two missing segments being reduced and included in the metathorax. The first two visible segments are more or less joined.

3. INTERNAL MORPHOLOGY

The digestive system is divided into three parts : the stomodeum with the oesophagus including the crop and the proventricle , the mesenteron and the proctodeum. The mesenteron often shelters symbiotic bacteria that have a cellulolitic role (Buchner 1933). The proctodeum is connected to the excretory system which is composed of the Malpighian tubules. There are six Malpighian tubules in the Curculionidae. The classic respiratory system is composed of tracheae with access to the environment through spiracles located on the thorax and the abdomen. The circulatory system does not show real vessels and the « blood » fills up the general cavity and is put in motion by a dorsal propulsive vessel. The nervous system is divided into a central, a visceral and a peripheral system (Hoffmann 1950). The central system is formed by a brain composed of three pairs of ganglia that innervate the eyes, the antennae and the labrum and a double chain of ventral ganglia. The visceral system includes dorsal ganglia that innervate the dorsal vessel, the genitalia and the spiracles. The peripheral nervous system consists of hypodermic cells located at the base of sensory hairs that cover the tegument. The muscles are well developed and

complex. Cephalic and thoracic muscles connected with mandibles for the first and legs and wings for the second are very strong. There are also muscles in the abdomen that are used during oviposition. Male genital copulatory sacs are composed of two testicles, the accessory glands, the *vas deferens*, the seminal vesicles, the ejaculatory duct and the *aedeagus* with the *spiculum gastrale*, tegmen and penis. Female genitals include ovaries, acrotrophic ovarioles, the oviduct, the copulatory sac, the spermatheca, the uterus, the vagina and the genitalia (ovipositor, *spiculum ventrale* and 8th abdominal tergite).

4. PHYLOGENETIC ANALYSIS

Most recent works on the phylogeny of Curculionidea (Farell *et al.* 2002 ; Marvaldi *et al.* 2002) using molecular analysis and new morphological data (larval characters, internal morphology) and including a large number of samples of Curculionidae in the analysis, show a weak resolution of the relationships within the family.

For instance, it is not certain that the traditional Adelognatha and Phanerognatha groups are monophyletic (Marvaldi 1997).

The species of weevils listed as BAWBILT (Bark and Wood Boring Insects in Living Trees) belong to the family Curculionidae. Recent work on the phylogenetic relationships in weevils (Wink *et al.* 1997) mention the two subfamily groups Adelognatha and Phanerognatha for the species of Curculionidae. They have male genitalia of the gonatocere type. Those species belong to the following six subfamilies Cossoninae Schoenherr 1825 (genus *Brachytemnus*), Cryptorhynchinae Schoenherr 1825 (genus *Cryptorhynchus*), Curculioninae Latreille 1802 (genus *Anthonomus*), Mesoptiliinae Lacordaire 1863 (genus *Magdalis*) and Molytinae Schoenherr 1823 (genera *Hylobius*, *Pissodes*, *Trachodes*) for the Phanerognatha clade and Entiminae Schoenherr 1823 (genus *Otiorrhynchus*, *Strophosoma*) for the Adelognatha clade (Lacordaire 1866). This last group is probably monophyletic with several synapomorphies based on larval characters (Marvaldi 1997) as well as molecular characters (Wink *et al.* 1997) or a combination of both (Marvaldi *et al.* 2002). It is one the subfamilies of Curculionidae which is strongly supported phylogenetically.

Curculioninae and Hylobiinae are heterogenous groups and their position in the Curculionidae is not yet resolved.

The following status for the list of species could be proposed as below :

– Adelognatha
– Subfamily : Entiminae Schoenherr 1823
  – Tribe : Otiorhynchini Schoenherr 1826
    – Genus : *Otiorrhynchus* Germar 1822 (type species : *Curculio rhacusensis* Germar 1822)

– Synomynies : *Pachygaster* Germar, 1817 non Meigen, 1803
Loborhynchus Dejean, 1821
Panaphilis Dejean, 1821
Loborhynchus Schoenherr, 1823 non Dejean, 1821
Otiorrhynchus Germar, 1824 non Germar, 1822
– Sub-genera : – *Otiorrhynchus* (s.st.) Germar, 1824
– *Dorymerus* Seidlitz, 1890
– *Tourniera* Stierlin, 1861
– *Postaremus* Reitter, 1912
– Species : – *O.*(s.st.) *arcticus* Germar, 1824
Synonymy : *O.*(s.st.) *monticola* Germar, 1824
– *O.*(s.st.) *niger* Fab., 1775
– *O.*(*Postaremus*) *nodosus* MÅller, 1764
Synonymy : *O.dubius* (Strîm,1783) ; the name *dubius* is still valid. It is now among the sub-genus (Postaremus) Reitter, 1912
– *O.*(*Tourniera*) *ovatus* L., 1758
– *O.*(*Dorymerus*) *singularis* L., 1767
– Tribe : Brachyderini Schoenherr, 1826
– Genus : *Strophosomus* Schoenherr, 1823 (type species : *Curculio melanogrammus* Forster, 1771). *Strophosomus* is not the valid name for this species and *Strophosoma* Bilberg, 1820 must be used.
Synonymies :
Judolus Dejean, 1821
Strophosomus Schoenherr, 1823
Bryssus Dejean, 1821
Strophosomum Gistel, 1856
– Species : – *S.*(s.st.) *melanogramma* Forster, 1771
Synonymies : *S.*(s.st.) *coryli* F., 1775
S.(s.st.) *illibata* Boh., 1833
S.(s.st.) *obesa* Thoms., 1868 non Marsham, 1802
S.(s.st.) *fagi* Chevrolat, 1865
– Species : – *S.*(s.st.) capitata De Geer 1775
Synonymies : *S.* (s.st.) *obesa* Marsham, 1802
S. (s.st.) *coryli* Boh., 1840 non Fabricius 1775
S. (s.st.) *fulvicornis* Walton, 1846
S. (s.st.) *desbrochersi* Tournier, 1876
S. (s.st.) *grisea* Tournier, 1876

– Phanerognatha
– Subfamily : Cossoninae Schoenherr, 1825
– Tribe : Onycholipini Wollaston, 1873
– Genus : *Brachytemnus* Wollaston, 1873 (type species : *Rhyncolus porcatus* Germar, 1824).
– Species : – *B.porcatus* Germar, 1824
– Tribe : Rhyncolini Gistel, 1856.
– Species : – *R.*(s.st.) *ater* L., 1758
– Subfamily : Cryptorhynchinae Schoenherr, 1825
– Tribe : Cryptorhynchini Schoenherr, 1825
– Genus : *Cryptorhynchus* Illiger, 1807 (type species : *Curculio lapathi* L., 1758).
Synomynies :
Aracnipus Dejean, 1821
Arachnipes Villa & Villa, 1833
Cryptorhynchidius Pierce, 1919
Eupterus Fiedler, 1941
Cryptorrhynchobius Voss, 1965
– Species : – *C. lapathi* L., 1758
– Subfamily : Curculioninae Latreille, 1802
– Tribe : Anthonomini Thomson, 1859
– Genus : *Furcipes* Bedel, 1884 (type species : *Curculio rectirostris* L., 1758). This name is not valid. It is a replacing name for the genus Furcipus Desbrochers, 1868 which is valid. *Furcipes Bedel* is then a synonym of *Furcipus* Desbrochers which has a priority as being older. *Furcipus* is a subgenus of the genus *Anthonomus* Germar, 1817.
– Genus : *Anthonomus* Germar, 1817
Synomyny : *Furcipes* Bedel, 1884
– Species : – *A. rectirostris* L., 1758
– Subfamily : Mesoptiliinae Lacordaire, 1863
– Tribe : Magdalini Pascoe, 1870
– Genus : *Magdalis* Germar 1817(type species : Curculio violaceus L., 1758)

– Sub-genera : *Magdalis* Germar, 1817
Aika Barrios, 1984
Dagmalis Kono & Morimoto, 1960
Edo Germar, 1819
Laemosaccidius Smreczynski, 1972
Odontomagdalis Barrios, 1984
Panus Schoenherr, 1823
Porrothus Dejean, 1821
Synomynies : *Thamnophilus* Schoenherr, 1823
Magdalinus Germar, 1843
Scaradamyctes Gistel, 1848
– Species : – *M.violaceus* L., 1758
– Subfamily : Molytinae Schoenherr, 1823
– Tribe : Hylobiini Kirby, 1837
– Sub-tribe : Hylobiina Kirby, 1837
– Genus : *Hylobius* Germar, 1817 (type species : Curculio piceus De Geer, 1875)
– Subgenera : – *Hylobius* Germar, 1817
Synonymy : *Hypomolyx* LeConte, 1876
– *Callirus* Dejean, 1821 (type species : *Curculio abietis* L., 1758)
Synomynies :
Hylobitelus Reitter, 1923,
Polyaunbus Kono, 1934
– Species : – *H.abietis* L., 1758
– *H.pinastri* Gyll., 1813
– Tribe : Pissodini Gistel, 1856
– Sub-tribe : Pissodina Gistel, 1856
– Genus : *Pissodes* Germar, 1817 (type species : *Curculio pini* L., 1758)
Synonymy : Piniphilus Dejean, 1821
– Subgenera : *Pissodes* Germar, 1817
Epipissodes Voss, 1956
– Species : – *P.castaneus* DeGeer, 1775
– *P.harcyniae* Herbst, 1795
– *P.piceae* Illiger, 1807
– *P.pini* L., 1758
– *P.piniphilus* Herbst, 1797
– *P.scabbricollis* Miller, 1859
– Tribe : Acicnemidini Lacordaire, 1866
– Genus : *Trachodes* Germar, 1824 (type species : *Curculio squamifer* Paykull, 1800)
Synonymies : *Blastophila* Gistel, 1856
Metrachodes Marshall, 1948

– Subgenera : – *Atrachodes* Morimoto, 1962
– *Trachodes* Germar, 1824
– Species : – *T.hispidus* L., 1758

The names and synonymies of the species as well as the names of authors together with the dates have to be clearly and carefully mentioned and identified in order to avoid any misinterpretation as recently observed in evolutionary works on bark beetles (Kelley et al.1999).

5. GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION

With 9 genera and 22 species, the BAWBILT weevils are among the largest beetle families recorded in Europe. The geographical distribution of most species has not been fully covered and information is fragmentary for the majority of them.

5.1. Adelognatha

5.1.1. Genus Otiorhynchus :

This is one of the largest weevil genera in Europe and it is represented in the BAWBILT list with 5 species.

O.(s.st.) *arcticus* is known to be a subalpine or alpine species with records from the Pyrenees and the Massif Central (Hoffmann 1958). Adult weevils live under mosses and stones and the larvae feed on the roots of various herbaceous plants and sometimes on the roots of young seedlings as recently mentioned on larch in Iceland (Halldorsson *et al.* 2000).

O.(s.st.) *niger* and *O.*(Postaremus) *nodosus* are mentioned as pests in forest nurseries, specially on spruce and pine seedlings in central and eastern Europe and in Sicily (Hoffmann 1958). More recently *O.*(s.st.) *niger* has been recorded in northern Europe (Lunderstadt 1981) while *O.*(Postaremus) *nodosus* was causing problems to natural regenerations of Scots pine in Lapland (Suoheimo 1984).

O.(Tourniera) *ovatus* is also a pest of forest nurseries. This species is polyphagous and widely distributed throughout Europe and present in North America. Damage has been mentioned in the past on spruce plantations and in forest nurseries in Czechoslovakia (Srot 1979)and in the German Democratic Republic (Bogs and Braaschd 1988). Adult weevils feed on flowers of various plants.

O.(Dorymerus) *singularis* larvae are rhizophagous (Schauermann, 1977). Adult weevils are polyphagous and feed on beech, alder, walnut, spruce, pines. This species is recorded from western and Central Europe, in Baden-Wurtemberg for instance where it has damaged young oak and lime plantations (Bogenschutz 1982).

5.1.1. Genus Strophosoma

There are 6 species in Europe all parthenogenetic. Two of them are harmful to forestry.

The larvae of *S.melanogramma* feed on roots of various herbaceous plants and also on beech and oak while the adults feed on leaves, shoots and buds of various plants including oak, walnut, maple, hawthorn, pine. Recent damage has been recorded in forest nurseries and reforestation sites, in the UK (Parry 1983, Parry *et al.* 1990, Stork *et al.* 2001), but also in southern Sweden on beech, oak and Norway spruce (Löf 2000, Prieme *et al.* 2000), in the the mountain regions of Germany (Biernath et al. 1996), in central France (Lemperiere pers obs.). Outbreaks of the weevil were mentioned in the Czech republic in 1995 on beech, Norway spruce and Sorbus aucuparia (Urban 1995).

The larvae of *S.capitata* feed on the roots of heather and ericaceous plants and the adults on oak, beech, arbutus, hornbeam. Damage is recorded from central France on oak (Rougon et al. 1995), from Norway on Scots pine planted after forest fires (Solbraa 1983). In Poland, several observations mention damage on young Scots pines (Szmidt and Stachowiak 1980, Stachowiak 1991 and 1992) but also on hazelnuts (Gantner 2001) and birch plantations (Korczynski 2001).

5.2. Phanerognatha

5.2.1. Genus Brachytemnus

Adults and larvae of *B.porcatus* live on firs, spruces and pines like *Pinus maritima*, *P.laricio*, *P.halepensis* of the mediteranean area. The insect is also mentioned from central Europe (Hoffmann 1958).

5.2.2. Genus Cryptorhynchus

The poplar weevil *C.lapathi* is the only species of the genus in northern and central Europe. It is also found in Siberia and Japan (Hoffmann 1958).

Larvae and adults live in the wood of Salicaecae and Betulaceae : *Salix caprea*, *S. viminalis*, *S. purpurea*, *S. triandra*, *S. fragilis* ; *Populus alba*, *P. canadensis*, *P. virginiana*, *P. nigra*, *P. tremula*.

Adults feed on the bark while larvae tunnel in the inner bark. Damage is recorded on young trees as well as mature stands all over Europe with records from Italy on poplars (Allegro 1989, 1990, 1997, Arru 1977, Cavalcaselle and Allegro 1986, Giorcelli and Allegro 1999, Lapietra and Allegro 1987, 1990, Montermini *et al.* 1998, Pollini 1990, Verenini 1984), from Spain on *Salix* (Anton 1979, Sabate and Rojo 1982), from south-east and south-west France on poplar plantations (Attard 1978, 1979), from Croatia (Jodal 1987) and Hungary (Prenner et al. 1983, Szontagh 1985). In central Europe the weevil is more polyphagous with records on *Salix* in Poland (Czerniakowski 2001) and southern Russia (Maksimenko *et al.* 2001) onAlnus (Chlodny 1982) in Poland and on Norway spruce in Czechoslovakia (Kristek 1989). In the north west of Europe the weevil was observed on poplar in the Netherlands (Moraal 1996) and *Salix viminalis* in Ireland (Neeman and Kennedy 1989).

5.2.3. Genus Anthonomus

A.rectirostris is found in northern and central Europe and also found in Siberia and Japan. Larvae feed in the kernel of many wild and cultivated cherry trees : *Cerasus padus*, *C. avium*, *C. vulgaris.*(Holighaus and Dahlbender 1995).

5.2.4. Genus Magdalis

M. violaceus is known from Central and 'boreal' Europe, Switzerland, the Italian Alps and Belgium and live on *Picea excelsa* and *Abies pectinata*. It could be considered as a saproxylic weevil as living on dying or dead trees and/or dead parts of trees(branches). Pupal chambers penetrate deep in the wood as in *Pissodes* species (Hoffmann 1958).

5.2.5. Genus Hylobius

Of the four species of the genus found in Europe, *H.abietis* and the somewhat smaller *H.pinastri* are very hard to tell apart. They feed on the cambium and bark of many conifers. H.abietis is very common in Europe from Siberia to northern Spain and its distribution and spread are refered to sylvicultural practices (clear cuttings and reforestation programmes).It is considered as the worst pest of young conifers. There are numerous records of the presence of the insect in its distribution zone, from Siberia (Gourov 1994), Russia (Charitonova 1965, Lure 1966), the nordic countries (Bejer-Petersen *et al.* 1962), including Norway (Christiansen 1971), Sweden (Eidmann 1964 , 1971, 1981, Langström 1982, Nordenhem 1989), Finland (Langström 1985), Eastern Europe including Bulgaria (Cankov 1970), the Czech Republic (Zumr and Stary 1994), Poland (Sierpinski 1972, Szmidt and Korczynski 1983) , the north west of Europe with the Netherlands (Elton 1964), the United Kingdom (Stoakley 1968, Bevan 1987), Belgium (Nef 1992), France (Hoffmann 1958, Malphettes 1966).

H. pinastri is less abundant and has a more nordic distribution(Eidmann 1974, Lindelow *et al.* 1993 ; Langströ 1982). *H. piceus* species is observed on larch and Scots pine, in Siberia, northern Europe, (Eidmann 1974, Langström 1982). This rare species is known from the Alps in the region of the Queyras (Lemperiere, pers.com.).

5.2.6. Genus Pissodes

The genus is represented by 8 species in Europe. This genus comprises some forestry pests.

P. castaneus is known from southern France (Lieutier *et al.* 1997), Turkey (Tozlu 2001), Moldova (Poiras 1991) and Russia (Kulinich and Orlinskii 1998) on different pine species as a secondary pest.

P. harcyniae was recorded as a secondary pest on *Pinus silvestris*, *Picea excelsa*, *Abies pectinata*. It is mentioned as rare in eastern and southern France (Hoffmann 1954) but is more common in central Europe (Kula and Zabecki 1997, 2000).

P. piceae lives on silver firs and sometimes on spruce and is primarily a montane species. It is common in all the mountains of continental Europe where it can cause damages on ailing and weaken trees. It is mentioned in Italy (Tiberi 1997, Moriondo and Tiberi 2000), in the eastern part of the Carpathian mountains in Romania (Simionescu 1995, Simionescu *et al.* 1998), in Poland (Podlaski 1996, 2002, Starzyk 1996), in Bulgaria (Tsankov 1994) and central France (Lempérière 1987).

P. pini is common in central and southern Europe, in the Alps on Scots pines where it feeds on the top of trees. It is also mentioned on *Pinus uncinata* in the Pyrenees (Hoffmann 1954) and in Germany (Habermann and Geibler 2001).

P. piniphilus is known from central Europe, in Germany (Habermann and Geibler 2001), in Austria (Cecht and Tomiczek 1996), in Poland (Kurowska and Falencka-Jablonska 1994, Witrylak 1995) and northern Europe, in Estonia (Luik 1994, Voolma 2001), Finland (Pappinen and Weissenberg 1996) and also Russia and Siberia (Bogdanova 1998, Demakov 1994, 1996, 1998 ; Maslov *et al.* 1999) on Scots pine and *Abies nordmanniana*. The insect develops on dying trees (Karoles 1992) and is considered as rare in France (Hoffmann 1954).

P. scabricollis is known as a secondary pest on spruce in central Europe (Oppermann 1985).

5.2.6. Genus Trachodes

This genus hold half a dozen of species not very well known.

T.hispidus live in the thin and dry branches of oak, beech and birch. They are recorded from Northern Europe, Switzerland and Belgium (Hoffmann 1958).

REFERENCES

Allegro, G. 1989. La difesa contro gli insetti parassiti del pioppo : un aggiornamento tecnico. Informatore Agrario, 45 (16), 93-96.

Allegro, G. 1990. Lotta meccanica contro i principali insetti xilofagi del pioppo mediante impiego di sbarramenti sui tronchi. Informatore Agrario, 46 (11), 91-95.

Allegro, G. 1997. Conoscere e combattere il punteruolo del pioppo *Cryptorhynchus lapathi* L.). Sherwood - Foreste ed Alberi Oggi, 3 (11), 33-38.

Alonso-Zarazaga, M. & Lyal, C.H.C. 1999. A world catalogue of families and genera of Curculionoidea (Insecta : Coleoptera) (excepting Scolytidae and Platypodidae). Barcelona : Entomopraxis.

Arru, G.M. 1977. *Populus deltoides* Bartr. and insect problems in Italy. In. Symposium on Eastern Cottonwood and Related Species, B.A. Thielges and S.B. Land (Eds.). Baton Rouge, La. (USA). Lousiana State University and Agricultural and Mechanical College. Division of Continuing Education.

Attard, G. 1979. Principales insectos del chopo en el sureste de Francia. Boletin del Servicio de Defensa contra Plagas e Inspeccion Fitopatologica, 5, 25-29.

Bejer-Petersen, B., Juutinen, P., Kangas, E., Bakke, A., Butovitsch, B., Eidmann, H.H., Hedqvist, K.-J. & Lekander, B. 1962. Studies on Hylobius abietis L. - Development and life cycle in the Nordic countries. Acta Entomologica Fennica, 17, 6-106.

Bejer-Petersen, B. 1975. Length of development and survival of *Hylobius abietis* as influenced by silvicultural exposure to sun light. Kongelige Veterinaer og Landbohoejskole, 111-20.

Biernath, M., Messing, M., Pohris, V. & Lunderstadt, J. 1996. Arthropodon an Jungbuchen (*Fagus sylvatica* L.) in Naturverjungungen und Voranbauten des Erzgebirges und des Harzes. In. Schriften aus der Forstlichen Fakultat der Universitat Gottingen und der Niedersachsischen Forstlichen Versuchsanstalt, (Eds.). Gottingen : Universitat Gottingen. Bogdanova, D.A. 1998. Foci of Heterobasidion annosum and xylophagous insects in Scots pine forests of the Upper Ob region. Lesovedenie, 2, 80-85.

Bogenschutz, H. 1982. Schaden durch Russelkaferfrass in einer Laubholz-Pflanzung. Allgemeine Forstzeitschrift, 28, 855. Bogs, D. & Braasch, D. 1988. Dickmaulrussler als Schadlinge der Baumschule und Staudengartnerei und ihre rationelle Bekampfung. Nachrichtenblatt fur den Pflanzenschutz in der DDR, 42 (12), 233-36.

Calder, A.A. 1989. The alimentary canal and nervous system of Curculionoidea (Coleoptera) : gross morphology and systematic significance. Journal of Natural History, 23, 1205-65.

Calder, A.A. 1990. Gross morphology of the soft parts of the male and female reproductive systems of Curculionoidea (Coleoptera). Journal of Natural History, 24, 453-505.

Cankov, G. 1970. Biologie, Ökologie und Bekämpfungsmethoden des grossen braunen Rüsselkäfers (*Hylobius abietis* L.) in Bulgarien. Deut. Akad. Landwirtschaftswiss., Tagungsbericht, 110, 109-15.

Cavalcaselle, B. & Allegro, G. 1986. Phytosanitary situation of poplar plantations in Italy during the period 1985-1986. In. Compte rendu des réunions des groupes de travail entomologie et technologie de la Commission Internationale belge du Peuplier, L. Nef and A. Leclerq (Eds.). 1986 September Bruxelles, Belgium.

Cech, T. & Tomiczek, C. 1996. Zum Kiefernsterben in Niederosterreich. Forstschutz Aktuell, 17/18, 12-13.

Chlodny, J. 1982. Uwagi o zagrozeniu przez szkodliwe owady drzewostanow i zadrzewien GOP w latach 1976-1980. Sylwan, 126 (5), 19-26.

Crowson, R.A. 1955. The natural classification of the families of Coleoptera. London : Lloyd and Co.

Czerniakowski, Z.W. 2001. Praktyczne uwagi o sygnalizacji i zwalczaniu krytoryjka olszowca (*Cryptorhynchus lapathi* L.) na plantacjach wikliny amerykanki. Progress in Plant Protection, 41 (2), 439-41.

Demakov, Y.P. 1994. Effect of the pine weevil *Pissodes piniphilus* on the mortality pattern in Scots pine stands. Lesovedenie, (4), 54-60.

Demakov, Y.P. 1996. The pine weevil in the forests of the Marii El republic. Lesnoe Khozyaistvo, (2), 47-49.

Demakov, Y.P. 1998. The structure of xylophilous entomological complexes during a mass outbreak of *Pissodes piniphilus* Herbst. Lesovedenie, (4), 43-51.

Eidmann, H.H. 1964. Studien über die Entwicklung von Hylobius abietis L. im Freiland und in Laboratoriumversuchen. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 54, 140-49.

Eidmann, H.H. 1971. Selected literature on *Hylobius abietis* L. and related species. Skogshöskolan, Ra o. Upps., 9, 1-22.

Eidmann, H.H. 1981. Pine weevil research for better reforestations. In. Proc. I.U.F.R.O Congr., Japan, Tokyo.

Elton, E.T., Blankwaardt, H.F.H., Burger, H.C., Steemers, W.F. & Tichelman, L.G. 1964. Insect communities in barked and unbarked pine stupms, with special reference to the large pine weevil (*Hylobius abietis* L., Coleoptera : Curculionidae). Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 55, 1-54.

Erichson, W.F. 1842. Die Larven des Coleopteren. Archiv für Naturgeschichte, 8 (1), 373-75.

Fabricius, J.C. 1792. Entomologia systematica emendata et aucta. Secundum classes, ordines, genera, species adjectis synonimis, locis, observationibus, descriptionibus. Vol. 1.

Farrell, B.D. 1998. Inordinate Fondness Explained : Why Are There So Many Beetles ? Science, 281 (24), 555-59.

Gantner, M. 2001. Occurrence of hazelnut pests in Southeastern Poland. Acta Horticulturae, 556, 469-77.

Geoffroy, E.L. 1762. Histoire abrégée des insectes qui se trouvent aux environs de Paris dans laquelle ces animaux sont rangés suivant un ordre méthodique. Paris : Durand.

Giorcelli, A. & Allegro, G. 1999. I trattamenti per una corretta difesa fitosanitaria del pioppeto. Sherwood - Foreste ed Alberi Oggi,

Gourov, A. 1994. Distributional patterns and behaviour of *Hylobius spp.* adults during the additional feeding on conifers in Siberia. In. I.U.F.R.O Eur. *Hylobius* Meet., (Eds.). France, Sainte-Eulalie.

Habermann, M. & Geibler, A.V. 2001. Regenerationsfahigkeit von Kiefern (*Pinus sylvestris* L.) und Befall durch rindenbrutende Sekundarschadlinge nach Frass der Nonne (*Lymantria monacha* L.). Forst und Holz, 56 (4), 107-11.

Halldorsson, G., Sverrisson, H., Eyjolfsdottir, G.G. & S., O.E. 2000. Ectomycorrhizae reduce damage to russian larch by *Otiorrhynchus* larvae. Scandinavian Journal of Forestry Research, 15, 354-58.

Herbst, J.F.W. 1793. Natursystem aller bekannten in- und auslandischen Insekten, als eine fortsetzung der von Buffonschen Naturgeschichte. In. Der Käfer, NC (Eds.). Berlin :

Hoffmann, A. 1950. Coléoptères Curculionides (Première partie). Paris : Lechevalier.

Hoffmann, A. 1954. Coléoptères Curculionides (Deuxième partie). Paris : Lechevalier.

Hoffmann, A. 1958. Coléoptères Curculionides (Troisième partie). Paris : Lechevalier.

Holigaus, F. & Dahlbender, W. 1995. Der Kirschkernstecher - ein vergessener Schaedling ? Obstau, 20 (2), 70-71.

International Commission on Zoological Nomenclature 1991. *Curculio viridicollis* Fabricius, 1792 (currently *Phyllobius viridicollis* ; insecta, Coleoptera) : specific name conserved, and Rhyncolus Germar, 1817 : *Curculio ater* Linnaeus, 1758 designated as the type species. Bulletin of Zoological Nomenclature, 48 (3), 268-69.

Karoles, K. 1998. Sustainable forest management in Estonia. Ministry of the environment of Estonia, Estonian forest board. 1998, Tallin, Estonia.

Kelley, S.T. & Farrell, B. 1998. Is specialization a dead end ? The phylogeny of host use in Dendroctonus. Evolution, 52 (6), 1731-43.

Kristek, J. 1989. Die Populationsdynamik der Forstschadinsekten als Grundlage des integrierten Forstchutzes gegen sie. Acta Universitatis Agriculturae, Facultas Silviculturae, 58 (1-4), 47-83.

Kula, E. & Zabecki, W. 1997. Vliv socialniho postaveni stromu na faunu kambioxylofagu smrku. Lesnictvi - Forestry, 43 (6), 269-78.

Kula, E. & Zabecki, W. 2000. Struktura kambioxylofagni fauny smrku pri ruzne vycetni tloustce a socialnim postaveni stromu. Lesnicky Casopis, 46 (3), 257-71.

Kulinich, O.A. & Orlinskii, P.D. 1998. Distribution of conifer beetles (Scolytidae, Curculionidae, Cerambycidae) and wood nematodes (*Bursaphelenchus spp.*) in European and Asian Russia. Bulletin OEPP, 28 (1/2), 39-52.

Kurowska, B. & Falencka-Jablonska, M. 1994. Analiza zmian wystepowania szkodnikow wtornych w strefach zagrozenia wokol Elektrowni 'Kozienice'. Sylwan, 138 (1), 67-78.

Kuschel, G. 1995. A phylogenetic classification of Curculionoidea to families and subfamilies. Memoirs of the Entomological Society of Washington, 14, 5-33.

Lacordaire, T. 1863. Histoire Naturelle des Insectes - Genera des Coleoptera. Paris : Roret.

Lacordaire, T. 1866. Histoire Naturelle des Insectes. Genera des Coléoptères ou exposé méthodique et critique de tous les genres proposés jusqu'ici dans cet ordre d'insectes. Paris : Roret.

Lapietra, G. & Allegro, G. 1987. Nuove possibilita di lotta contro il punteruolo del pioppo nel periodo autunno-invernale. Quaderni di Ricerca - Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale/Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura, (16), 9.

Lapietra, G. & Allegro, G. 1990. Insects damaging poplars in Italy during 1987-89, control strategies and future perspectives. In. Proc. FAO International Poplar Commission, FAO (Eds.). Working Party on Insects and Other Animal Pests 1990 March 19-23 Buenos Aires, Argentina.

Latreille, P.A. 1806. Genera Crustaceorum et Insectorum, secundum ordinem naturalem in familias disposita, iconidus exemplisque plurimis explicata. Parisiis et Argentorati : Koenig.
Långström, B. 1982. Abundance and seasonal activity of adult *Hylobius*-weevils in reforestation areas during first years following final felling. Communicationes Instituti Forestalis Fenniae, 106, 23.
Långström, B. 1985. Damage caused by *Hylobius abietis* in Finland in the years 1970-1971 ; Results from the Finnish part of a joint Nordic study. Folia For, 612, 1-11.
Lempérière, G. & Malphettes, C.B. 1987. Observations sur une infestation de *Pissodes piceae* Illiger - Le pissode du Sapin - dans le Limousin. Revue Forestière Française, 29 (1), 39-44.
Lieutier, F., Vouland, G. & Pettinetti, M. 1997. Test de choix de pins mediterraneens par les Scolytides et autres insectes xylophages en conditions naturelles. Revue Forestière Française, 49 (3), 215-24.
Linnaeus, C. 1758. Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum caracteribus, differentiis, synonymis. Salvii, Holmiae :
Löf, M. 2000. Influence of patch scarification and insect herbivory on growth and suriva in *Fagus sylvatica* L., *Picea abies* L. Karst. and *Quercus robur* L. seedlings following a Norway spruce forest. Forest Ecology and Management, 134, 111-23.
Luik, A. 1994. Some aspects of the life history and population dynamics of *Pissodes piniphilus* Hrbst. (Coleoptera, Curculionidae). Eesti Teaduste Akadeemia Toimetised, Bioloogia, 43 (1), 27-36.
Lunderstadt, J. 1981. Ernahrungsphysiologische Gesichtspunkte fur die Systembindung von forstlich wichtigen Phytophagen. Zeitschrift fur Angewandte Entomologie, 92 (5), 510-20.
Lyal, C.H.C. & King, T. 1996. Elytro-tergal stridulation in weevils (Insecta : Coleoptera : Curculionoidea). Journal of Natural History, 30, 703-73.
Maksimenko, A.P., Fedchenko, A.V., Yaroshenko, V.A. & Titarenko, L.N. 2001. Alder or poplar snout beetle. Zashchita i Karantin Rastenii, 8, 38.
Marvaldi, A.E. 1997. Higher level phylogeny of Curculionidae (Coleoptera : Curculionoidea) based mainly on larval characters, with special reference to broad-nosed weevils. Cladistics, 13, 285-312.
Marvaldi, A.E., Sequeira, A.S., O'Brien, C.W. & Farrell, B. 2002. Molecular and morphological phylogenetics of weevils (Coleoptera, Curculionoidea) : Do niche shifts accompany diversification ? Systematic Biology, 51 (5), 761-85.
Maslov, A.D., Gunev, A.G. & Matusevich, L.S. 1999. Mass outbreak of Lyda nemoralis in the Tver' region of Russia.
Lesnoe Khozyaistvo, Montermini, A., Vai, N., Barani, A., Nanni, C., Boselli, M., Scaravelli, P., Marchetti, L., Pacchiarini, L., Oliva, G. & Vezzadini, S. 1998. Messa a punto di un modello di informazione per la difesa fitosanitaria ragionata del pioppo. In. Atti, Giornate fitopatologiche, Scicli e Ragusa, (Eds.). 1998 Maggio 3-7
Moraal, L.G. 1996. Aantastingen door insekten en mijten in 1995 : in bossen, natuurgebieden en wegbeplantingen. Nederlands Bosbouwtijdschrift, 68 (3), 111-20.
Moriondo, F. & Tiberi, R. 2000. Aspetti fitopatologici delle abetine di Vallombrosa. Italia Forestale e Montana, Moritomo, K. 1962. Comparative morphology, phylogeny and systematics of the superfamiliy Curculionoidea of Japan I. Journal of the Faculty of Agriculture of the Kyushu University, 11, 331-73.
Moritomo, K. 1962. Key to families, subfamilies, tribes and genera of the superfamily Cuculionoidea of Japan excluding Scolytidae, Platypodidae and cossoninae. Journal of the Faculty of Agriculture of the Kyushu University, 12, 21-66.
Moritomo, K. 1976. Notes on the family characters of Apionidae and Brentidae (coleoptera), with key to the related families. Kontyu, 44 (469-476).
Moritomo, K. 1978. Cherk-list of the family Rhynchophoridae (Coleoptera) of Japan, with description of a new genus and five new species. Esakia, 12, 103-18._ Neenan, M. & Kennedy, T.F. 1989. *Cryptorhynchus lapathi* (L.), a potential pest of willow plantations. Irish Naturalists' Journal, 23 (1), 32.

Nordenhem, H. 1989. Age, sexual development, and seasonal occurence of the pine weevil *Hylobius abietis* (L.). Journal of Applied Entomology, 108, 206-70.
Oppermann, T.A. 1985. Bark and wood insect pests of pollution-damaged spruce and pine. Forstzool. Inst., Univ. Freiburg : Br., German Fed-Rep, 213-217.
Pappinen, A. & Weissenberg, K.v. 1996. Weevil feeding on Scots pine affects germination of Endocronartium pini. European Journal of Forest Pathology, 26 (5), 225-34.
Parry, W.H. 1982. The overwintering of adult Strophosomus melanogrammus (Coleoptera : Curculionidae) in forest soils. In. Intl Colloquium of Soil Zoology, P. Lebrun, H.M. André, A. De Medts, C. Grégoire-Wibo and G. Wauthy (Eds.). New Trends in Soil Biology Louvain-la-Neuve (Belgium).
Podlaski, R. 2002. Relationship between the microhabitat and trophic conditions and the numbers of *Pissodes piceae* (III.) (Col., Curculionidae) in stumps of *Abies alba* Mill. in the Swietokrzyski National Park (Poland). Journal of Applied Entomology, 126 (5), 207-11.
Pollini, A. 1990. I nemici del pioppeto specializzato. Vita in Campagna, 8 (5), 49-51.
Prenner, J., Palfy, C., Nagy, L. & Molnar, J. 1983. Erdeszeti novenyvedelmi technologiak. Novenyvedelem, 19 (11), 508-15.
Prieme, A., Knudsen, T.B., Glasius, M. & Christensen, S. 2000. Herbivory by the weevil, *Strophosoma melanogrammum*, causes severalfold increase in emission of monoterpenes from young Norway spruce (Picea abies). Atmospheric Environment, 34, 711-18.
Rougon, C., Roques, A., Rougon, D. & Levieux, J. 1995. Impact of insects on the regeneration potential of oaks in France. I. Action of phyllophagous Curculionidae (Coleoptera) on female flowers prior to fecundation. Journal of Applied Entomology, 119 (7), 455-63.
Sabate, P. & Rojo, M. 1982. Cryptorhynchus lapathi, L., gorgojo perforador del chopo. Experiencias de lucha en Cataluna. Agricultura, 605, 999-1001.
Sanborne, M. 1981. Biology of Ithycerus noveboracensis (Forster) (Coleoptera) and weevil phylogeny. Evolutionary Monograph, 4, 1-80.
Schoenherr, C.J. 1823. Curculionides. Isis von Onken, 10, 1132-46.
Schoenherr, C.J. 1833-1845. Genera et species curculionidum, cum synonymia hujus familiae. Species novae aut hactenus minus cognitae, descriptionibus a Dom. Leonardo Gyllenhal, C. H. Boheman et entomologis aliis illustratae. Paris : Roret.
Sierpinski, Z. 1972. Insect pests in stands of *Pinus silvestris* in Poland. Folia Entomologica Hungarica, 25, 263-69.
Simionescu, A. 1995. Protectia rasinoaselor din nordul Carpatilor Orientali calamitate de vint si zapada. Revista Padurilor, 110 (2), 16-25.
Simionescu, A., Negura, A. & Cucos, V. 1998. Inmulirea, prevenirea si combaterea gandacilor de scoarta ai rasinoaselor in anii 1993-1996 din nordul Carpatilor Orientali. Revista Padurilor,
Solbraa, K. 1983. Pests and diseases on pine planted after wildfires in Norway. Freiburger Waldschutz-Abhandlungen, 4, 247-58.
Srot, M. 1979. Prispevek k bionomii lalokonosce vejciteho (*Otiorrhynchus ovatus* L.). Lesnictvi - Forestry.
Stachowiak, P. 1991. Liczebnosc i szkodliwosc foliofagicznych chrzaszczy (Coleoptera) w roznowiekowych uprawach i mlodnikach sosnowych. Trudy Zoologicheskii Institut, Akademii Nauk SSSR, (221), 173-83.
Stachowiak, P. 1992. Badania nad zerami imagines zmiennika brudnego (*Strophosoma capitatum* Deg.) i choinka szarego (*Brachyderes incanus* L.) (Coleoptera, Curculionidae). Prace z Zakresu Nauk Lesnych, 74, 107-11.
Starzyk, J.R. 1996. Bionomics, ecology and economic importance of the fir weevil, *Pissodes piceae* (III.) (Col., Curculionidae) in mountain forests. Journal of Applied Entomology, 120 (2), 65-75.
Stoakley, J.T. 1968. Control of the pine weevil, *Hylobius abietis* L., and of Hylastes species. Forestry, 41, 182-88.
Stork, N.E., Hammond, P.M., Russell, B.L. & Hadwen, W.L. 2001. The spatial distribution of beetles within the canopies of oak trees in Richmond Park, UK. Ecological Entomology, 26

(3), 302-11.
Suoheimo, J. 1984. Isokorvakarsakkaan aikuisten esiintyminen ja merkitys mannyn luontaiselle uudistamiselle Pohjois-Lapissa. Silva Fennica, 18 (3), 255-59.
Szmidt, A. & Stachowiak, P. 1980. *Strophosoma capitatum* Deg. (Coleoptera, Curculionidae). Nasilenie wystepowania chrzaszczy, ich wybiorczosc zerowa oraz szkodliwosc. Prace Komisji Nauk Rolniczych i Komisji Nauk Lesnych, 50, 145-53.
Szmidt, A. & Korczynski, I. 1983. Population density of *Hylobius abietis* L. beetles and thier feeding intensity as the prognosis indexes. Pr. Kom. roln. lesn., 54, 137-44.
Thompson, R.T. 1992. Observations on the morphology and classification of weevils (Coleoptera, Curculionoidea) with a key to major groups. Journal of Natural History, 26, 835-91.
Tiberi, R. 1997. I principali insetti fitofagi della foresta di Vallombrosa. Italia Forestale e Montana, 52 (4), 274-83.
Tozlu, G. 2001. Sarikamis (Kars) Ormanlarinda Saricam (*Pinus sylvestris* L.)'da zarar yapan Elateridae, Buprestidae, Cerambycidae, Curculionidae (Coleoptera) ve Diprionidae (Hymenoptera) familyalarina bagli turler uzerinde calismalar. Turkiye Entomoloji Dergisi, 25 (3), 193-204.
Tsankov, G., Mirchev, P. & Ovcharov, D. 1994. Insect pests and their role in the decline and dying of silver fir (*Abies alba*) in Bulgaria. Nauka za Gorata, 31 (3), 23-33.
Urban, J. 1999. Listopas sedy : opomijeny skudce mladych listnacu a jehlicnanu. Lesnicka Prace, 78 (2), 73-75.
Voolma, K. & Luik, A. 2001. Outbreaks of *Bupalus piniaria* (L.) (Lepidoptera, Geometridae) and *Pissodes piniphilus* (Herbst) (Coleoptera, Curculionidae) in Estonia. Journal of Forest Science, 47 (Special Issue 2), 171-73.
Wink, M., Mikes, Z. & Rheinheimer, J. 1997. Phylogenetic relationships in weevils (Coleoptera : Curculionoidea) inferred from nucleotids sequences of mitochondrial 16S rDNA. Naturwissenschaften, 84, 318-21.
Witrylak, M. 1995. Biologia, ekologia i znaczenie gospodarcze wgryzonia jodlowca *Cryphalus piceae* (Ratz.) (Coleoptera, Scolytidae) w gorskich drzewostanach Lesnego Zakladu Doswiadczalnego w Krynicy. Sylwan, 139 (8), 51-66.
Woods, S.L. 1986. A reclassification of the genera of Scolytidae (Coleoptera). Great Basin Naturalist Memoirs, 10, 1-126.
Zumr, V. & Stary, P. 1992. The occurence of the large pine weevil *Hylobius abietis* L., in individual forest zones. Forest Ecology and Management, 51, 251-58.

Annexe B

Annexe du Chapitre 1

Type	Séquence
Adaptateur *Eco*RI	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
Adaptateur *Eco*RI	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
Adaptateur *Taq*I	5'-GACGATGAGTCCTGACTGAC-3'
Adaptateur *Taq*I	5'-CGGTCAGGACTCAT-3'
Amorce présélective *Eco*RI E/A	5'-GACTGCGTACCAATTC**A**-3'
Amorce présélective *Taq*I T/A	5'-GATGAGTCCTGACCGA**A**-3'
Amorce sélective *Eco*RI E/ATC	5'-GACTGCGTACCAATTC**ATC**-3'
Amorce sélective *Eco*RI E/AGT	5'-GACTGCGTACCAATTC**AGT**-3'
Amorce sélective *Taq*I T/ACA	5'-GATGAGTCCTGACCGA**ACA**-3'
Amorce sélective *Taq*I T/AAG	5'-GATGAGTCCTGACCGA**AAG**-3'

Tab. B.1 – Séquence des adaptateurs et des amorces utilisées pour l'AFLP
Les bases en gras représentent les nucléotides sélectifs. Trois paires d'amorces ont été sélectionnées parmi dix-sept couples testés : E/ATC-T/ACA, E/ATC-T/AAG et E/AGT-T/AAG.

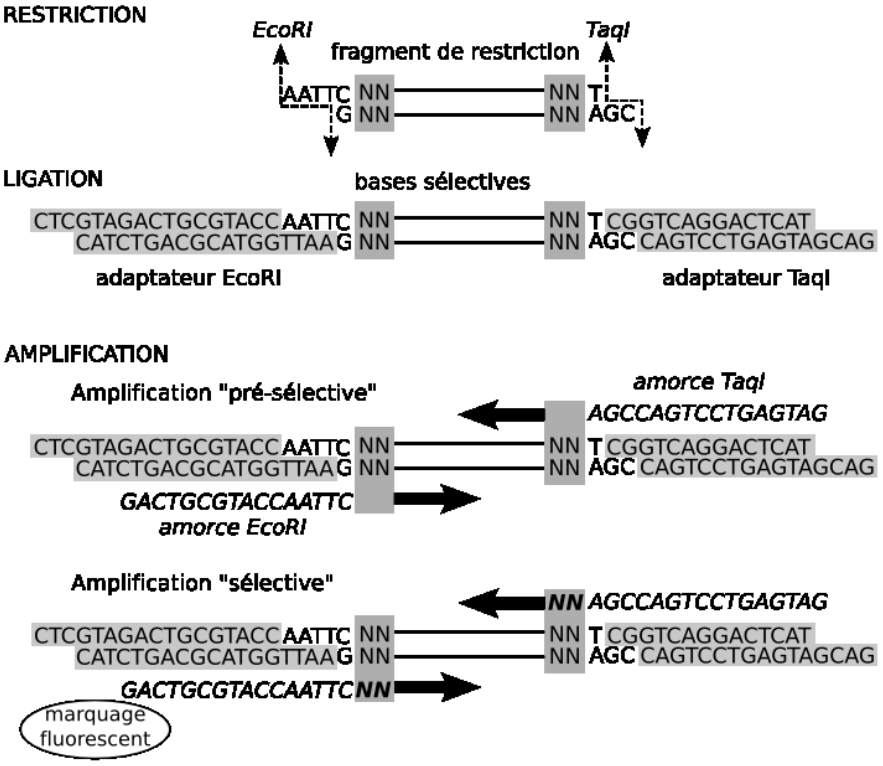


Fig. B.1 – Principe de la technique AFLP

Genetic structure of the forest pest *Hylobius abietis* on conifer plantations at different spatial scales in Europe.

C. Conord[1], G. Lempérière, P. Taberlet and L. Després.

1 Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

Word count for main text: 4571

Keywords: AFLP; population differentiation; dispersal; host-plant adaptation; forest pest; *Hylobius abietis*,

Corresponding author: Conord Cyrille, cyrille.conord@ujf-grenoble.fr , Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France; Tel: +33(0)4 76 63 54 37; Fax: +33(0)4 76 51 42 79

Running title: Population genomics of the large pine weevil

ABSTRACT

The distribution of genetic variation within and among 20 European sites infested by the large pine weevil, *Hylobius abietis*, was analysed using dominant AFLP markers. Analysis of molecular variance was performed at the European, regional and local scales. Most of the genetic variability was found within rather than among populations and the global fixation index averaged over *loci* was low (0.07). We found no evidence of genetic drift, even in relatively isolated sites. This genetic pattern tends to confirm the high dispersal ability of the weevil and the influence of human-mediated expansion of its range through conifer plantations across Europe since the XIXth century. Assignment tests demonstrated that the regional forest is a pertinent geographic scale for defining populations in the large pine weevil. Testing the potential influence of the larval host-plant identity (Scot Pine vs. Norway Spruce) on the genetic structure revealed a weak but significant effect in two of the three regions tested (in Ardèche and in Limousin but not in Finland). One *locus* that varied with host-plant use was shared by individuals of the two French regions indicating a potential role in host-plant adaptation. However, host race formation is not observed in *H. abietis;* we discuss this result in the light of our current knowledge of this insect's biology. Altogether, this study shows that the use of different host-plants for development does not constitute a strong barrier to gene flow for *H. abietis* and confirms the high dispersal ability of this forest pest.

INTRODUCTION

The large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: *Curculionidae*, L.), is the most economically important pest of young conifer plantations in commercial forestry throughout western Europe (Grégoire & Evans, 2004; Leather *et al.*, 1999; Lempérière & Julien, 2003). Adults are attracted to stumps of felled trees where the females lay eggs in the bark. The larvae feed under the bark of stumps and roots where they do no economic damage. In contrast, adults feed around the root collar of seedling trees (Lempérière & Julien, 2003). When the feeding damage on newly replanted seedlings is severe, the trees die.

In their attempt to summarize the crucial issues and the research priorities for Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe (BAWBILT organisms), Lieutier *et al.* (2004) raise the point that if populations of *H. abietis* are highly damaging to forest trees, they are also difficult to track in time and space. Knowledge of the population dynamics and of its driving forces is then crucial for forest management. For this purpose, molecular tools are increasingly and successfully used in population genetic studies of insect pests to infer ecological characteristics that are crucial for establishing management strategies, as for example the elucidation of long range movement in the boll-weevil (Kim & Sappington, 2004), or the clarification of the host plant role as a potential barrier to colonization and spread in a Chrysomelid pest of willows (Batley *et al.*, 2004). Moreover, identifying ecotypes or host races within the target pest species is a central issue in the establishment of successful control programs (Bourguet et al., 2000). For *H. abietis* demonstrating occurrence of host races could be important to predict pest response to environmental changes such as introduction of new conifer cultivars, or the success of a biological control agent such as entomopathogenic nematodes (Salinas, 2002).

Because of their wide distribution across the Eurasian continent, populations of the large pine weevil are expected to undergo variable selection pressures due to the climatic conditions and the nature and availability of the host-plant. This spatial variation in selection

creates the potential for local adaptation, but its outcome depends on the magnitude of selection relative to effects of genetic drift and gene flow (Slatkin, 1973). These evolutionary forces do not act similarly on the whole genome: genetic drift affects all loci in the same way, whereas natural selection acts only on a few genes involved in adaptation (Campbell & Bernatchez, 2004). Simultaneously analysing multiple *loci* scattered throughout the genome allows us to disentangle those effects. For this study we therefore chose the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique which generates a large number of markers distributed throughout the genome without prior knowledge about it (Vos *et al.,* 1995). Genome-wide analysis of population differentiation not only allows inferences about the relative importance of genetic drift and migration among populations, but also allows assessment of the adaptive differentiation of populations by searching for atypical *loci* or "outliers", *i.e. loci* that exhibit exceptionally high or low values of F_{ST} between groups of individuals in different environments (Beaumont & Nichols, 1996; Luikart *et al.*, 2003).

The present study addresses the following questions on the biology of the insect through examination of its population genetic patterns:

1) Is the genetic structure shaped by outbreak dynamics?

Perhaps because of the ephemeral nature of its habitat *H. abietis* is a moderately outbreaking species (Speight & Wainhouse, 1989). This means that it periodically undergoes eruptive outbreak events that are followed by population size decreases when conditions become unfavourable. Depending on the minimum population size reached, those crashes may create genetic bottlenecks. The genetic composition may also be strongly influenced by founder effects when new populations are established by few migrants. In this context, genetic drift may play an important role in the genetic composition of a given population. Thus genetic drift may be responsible for decreasing genetic variation within geographically isolated populations and increasing genetic variation among geographically isolated populations without causing a pattern of isolation by distance.

2) Alternatively, is the structure shaped by high population mixing?

This insect became a major pest as a consequence of human forestry activity (Leather *et al*. 1999). Indeed, clear-cutting provides numerous favourable breeding sites which no longer represent a limiting factor (Örlander *et al.*, 1997). Therefore it might be predicted that the populations of this insect will remain dense in managed forest regions where breeding sites are always available. This could promote high levels of population mixing depending on the weevil dispersal behaviour. Under this scenario we might expect a high amount of genetic variation found within populations and reduced genetic differentiation among populations.

3) Does the larval host-plant act as a selective factor

In phytophagous insects, distribution, availability, longevity and chemistry of the host plant are major factors responsible for genetic differentiation of populations (Mopper, 1996; Zangerl, 2003). In *H. abietis,* recent studies highlight the importance of considering influence of the tree species on the larval performance (Thorpe & Day, 2002; von Sydow & Birgersson, 1997). There was considerable variation in larval mortality, development time and weight of adults at emergence depending on the host species (Thorpe & Day, 2002). This can affect the potential of the insect to damage its hosts. It can also prevent gene flow, even locally, if differential selection on the alternate hosts is strong enough to cause local adaptation to each host species. Among the many conifer species cultivated throughout the Eurasian continent, Norway spruce (*Picea abies* Karst) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) are of primary importance for *H. abietis*. Their current distribution in Europe is mainly the result of the relatively recent plantations for commercial forestry and they overlap in managed forests such as in the regions of Limousin and Ardèche, France. In contrast the forest of Landes (South-west of France) has comprised a monoculture of *Pinus pinaster* (Ait.) trees since the XIXth century. If the use of several host plants by the larvae were a source of diversifying selection, we would expect to find a lower proportion of neutral genetic variation in populations established in monocultures than in more diversely planted forest regions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Study sites and sampling

The 367 weevils (305 larvae and 62 adults) were collected in 20 sites across Europe in Estonia, Finland, France, Ireland and Poland. Sampling sites are summarised in Table 1 and the locations are shown in Figure 1. Collecting sites mainly consisted of exploited forest parcels where larvae were collected on stumps. In order to avoid sampling other Curculionid species, we sampled only the late instars of *H. abietis* larvae which can be unambiguously identified by their size and cephalic capsule characteristics. We also collected larvae on trees fallen after storms (Les Quatre Vios in Ardèche and Royère in Limousin, France). Forest parcels in which we collected larvae both on pine and spruce stumps are designated as "mixed" localities because the two host-plants were available at the same time for the females laying eggs. Thus we obtained three forest region replicates for comparing the host plant influence: two in France (Ardèche and Limousin) and one in Finland. To test for the effect of the host-plant on the genetic diversity of the insects, adults were excluded from the tests because it was not possible to know the host plant they developed on as larvae. Insects were immediately killed at sampling by putting them in absolute ethanol for optimal DNA preservation.

AFLP protocol

The protocol is known to be sensitive to contamination especially from bacterial or fungi exogenous DNA (Savelkoul *et al.*, 1999) which can be abundant in the digestive system of the insect. To avoid such contaminations muscular tissues were dissected and isolated from both larvae and adults. Total DNA was extracted using the Dneasy Tissue Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Genomic DNA was first digested with 2U of *Taq*I at 65°C for 1 hour, and secondly with 6U of *Eco*RI at 37°C for 1 hour. Double-stranded *Taq*I and *Eco*RI adapters were ligated to restriction fragments for 3 hours at 37°C. *Eco*RI adapters

were: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' and 5'AATTGGTACGCAGTCTAC-3'. *Taq*I adapters were: 5'-GACGATGAGTCCTGAC-3' and 5'-CGGTCAGGACTCAT-3'. The preselective PCR amplification parameters were as follows: 2 min at 72°c, 30 cycles of 30s denaturing at 94°C, 30s annealing at 56°C and 2 min extension at 72°C, ending with 10 min at 72°C for complete elongation, using *Taq*I primer T/A (5'-GATGAGTCCTGACCGAA-3') and *Eco*RI primer E/A (5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'). For the selective amplification, touchdown PCR parameters were: 10 min at 95°C followed by 36 cycles of 30s denaturing at 94°C, 30 s annealing and 1 min extension at 72°, ending with 10min at 72°C for complete extension. Annealing was initiated at 65°C and then reduced by 0.7°C for the next 12 cycles and maintained at 56°C for the remaining 23 cycles. Three selective PCR primer pairs were selected over 17 tested for the quality of the produced bands (i.e. even distribution of bands with relatively homogeneous intensity): E/ATC-T/ACA, E/ATC-T/AAG and E/AGT-T/AAG. Selective products were analysed on an ABI Prism 3100 DNA automated sequencer and AFLP patterns were visualized with Genescan® Analysis 3.7 (Applied Biosystem). AFLP profiles were recorded in a matrix as presence (1) or absence (0) of bands for each individual. A fragment was considered as absent in a given individual if the electrophoregram showed a peak not higher than 10% of the size of the highest peak found among all compared individuals. Fragments that could not be scored unambiguously were not included in the analysis. Reproducibility of each primer pair was tested by carrying out the whole AFLP protocol twice for each of 35 randomly chosen individuals (9.5%). Using the methodology of Bonin *et al.* (2004), we calculated a reproducibility rate of 92% as the ratio between observed number of phenotypic differences and total number of phenotypic comparisons.

Data analysis

Independence of markers was assessed by calculating their pairwise linkage index $D_{A,B}=1/n\Sigma i \left| V(A,i)-V(B,i) \right|$ where $V(A,i)$ is the allele value of individual i for the marker A

and n, the total number of individuals analysed. D-values were calculated using the program DDM (disequilibrium between dominant markers) version 0.1 (P. Berthier, pers. comm.).

Genetic diversity within populations was quantified using POPGENE version 1.32 (Yeh *et al.*, 1997) in three ways: (i) the percentage of polymorphic *loci*, (ii) Nei's (1978) unbiased expected heterozygosity (H_E) and (iii) Shannon's index of phenotypic diversity (I, Lewontin 1972). Values of H_E and I were obtained by averaging across *loci*.

Genetic differentiation among populations and groups was calculated as the unbiased F_{ST} estimator θ of Weir & Cockerham (1984) and its 95% confidence interval, obtained by bootstrapping 1000 replicates over *loci* using TFPGA Version 1.3 (Miller 1997). In order to test for population differentiation, exact tests (Raymond & Rousset 1995) were performed with TFPGA. These tests use a contingency table approach (Fisher's RxC test) and a Markov Chain Monte Carlo approach to determine if significant differences in allele frequencies exist among groups of individuals.

The genetic structure was examined by an Analysis of Molecular Variance (AMOVA) using the ARLEQUIN 2.011 software package (Excoffier *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 2000). This method was used to partition the genotypic variance among groups, among populations within groups and within populations. The individuals were grouped either by geographical location or by host species (for larvae only) or both. Levels of significance were determined through the computing of 1000 random permutations replicates. For host-plant effect we also considered the F_{st} values that ARLEQUIN provides for each individual *locus*. *Loci* with $p<0.05$ for F_{st} were considered significantly differentiated (Emelianov *et al.*, 2004).

In order to test for a correlation between genetic distances (pairwise $F_{ST}/(1- F_{ST})$ according to Rousset (1997) and geographical distances (in km) among populations, Mantel tests were performed using GenAlEx V5 computing 1000 permutations (Peakall & Smouse, 2001).

Assignment tests were performed using AFLPOP 1.1, the population allocation software based on AFLP markers, of Duchesne & Bernatchez (2002). We used the re-allocation procedure which estimates the expected allocation success rate for each of the source populations. Each individual was withdrawn from its population and allelic frequencies for this population were computed anew (leave one out procedure). The likelihood that the individual genotype was found in each of the tested populations was calculated. Each individual was then allocated to the population showing the highest likelihood for the genotype.

RESULTS

AFLP polymorphism

Using three primer combinations we unambiguously scored 83 polymorphic markers. The 367 genotyped insects gave 367 different haplotypes. The mean linkage index was 0.45. No marker pairs had D values lower than 0.01 or higher than 0.99 meaning that all 83 markers were unlinked. Consequently, they were all retained for further analyses.

High within-population genetic diversity

The percentage of polymorphic loci (*P%*) and the Nei (H_E) and Shannon (*I*) indices within each of the 20 sites were highly correlated (Table 2, pairwise Spearman's rank correlation coefficient *P%* vs H_E: $r_s = 0.650$ with $P = 0.002$ and *I* vs. H_E: $r_s = 0.959$ *I* vs. *P%*: $r_s = 0.813$ both $P < 0.0001$). The percentage of polymorphic *loci* was the only diversity index to be significantly positively correlated to the sample size (Spearman's rank correlation coefficient $r_s = 0.672$ $P = 0.001$). The three within-population diversity indices did not significantly differ across French regions and other European countries (Global Kruskal-Wallis test $P = 0.136$). More precisely, diversity in isolated populations such as Ireland and Landes (France) was not significantly lower than in other regions. Similar tests showed no significant differences for the three indices among groups of individuals associated with different hosts, between insects at single-host and mixed-host sites or between adults and larvae.

Low among-population differentiation

Nei's unbiased genetic distance ranged from 0.0039 between populations 11 and 12, to 0.0935 between populations 1 and 14 (Table 3). Pairwise exact tests of population differentiation indicate that there are no significant genetic differences among French sites.

Finnish and Irish sites were differentiated from nearly all the other sites, while the Estonian site did not significantly differ from the Polish site or from several French sites.

The global *Theta* value among countries was 0.03 (95% confidence interval (CI) 0.023-0.049) and it was 0.07 (95% CI 0.057-0.085) among the 20 sites, indicating weak among-population differentiation. In France, the global *Theta* among sites and among regions (Ardèche, Landes, Limousin) was 0.05 (95% CI 0.042-0.070) and 0.03 (95% CI 0.016-0.053), respectively.

At the European scale, the major part of genetic variation was found within countries (94.46%), with only 5.54% of variation among countries (Table 4, a1). Exact tests showed a strong genetic differentiation in all pairwise comparisons of the five countries ($P < 0.0001$) except for Estonia and Poland which were not significantly different ($P = 0.1030$). At the regional scale in France, the genetic variation was principally found within sites in regions 93.12% versus 2.93% among regions (Table 4, a2). When Ardèche and Limousin regions were analysed separately, the greatest part of genetic variation was found within sites rather than among sites and the differentiation across the sites was much lower in Ardèche (Table 4, a2.1 and a2.2). Exact test indicated a clear genetic differentiation among the three French regions ($P < 0.0001$).

Performing a hierarchical AMOVA allowed to simultaneously test for the effect of the geography and host-plant on genetic differentiation. We defined three geographical groups containing non-significantly differentiated sites according to the exact test (Table 3). We retained all sites in Ardèche, we excluded site 14 in Limousin and site 1 in Finland. Each group was partitioned into two subgroups corresponding to pools of larvae collected on pine and spruce. Sample sizes were 28, 75, 38 on pine, and 50, 30, 35 on spruce respectively. Most of the genetic variation (corrected for sample size) was found within host-plant groups (94.34%); the genetic variation between geographic groups was weak (4.53%) while that between host-plant within the geographical groups was significant but low (1.13%) (Table

4b). When each geographic region was considered separately, the AMOVA revealed low but significant genetic variation between larvae collected on pine and those collected on spruce: 1.16% and 1.75% respectively for Ardèche and Limousin ($P < 0.01$) but no significant variation between host-plants for the mixed site in Finland (not shown). Testing the reciprocal hierarchical grouping (i.e. two groups based on the host-plant type each containing three geographical subgroups) revealed a comparable amount of genetic variation explained by the geographic structure (6.1% $P < 0.0000$). However, in this case, the host-plant grouping did not significantly structure the observed genetic variation (-1.49% $P = 0.68$). Significant divergence between spruce and pine pools of larvae was found for five *loci* (among 83) in Ardèche and nine *loci* in Limousin. Averaged F_{st} for those outlier *loci* across host-plant groups were comparable for the two regions: 0.15 and 0.13 respectively. Ardèche and Limousin shared one outlier *locus* responsible for 13 and 12.5% of variation respectively in each region.

Genetic vs geographical structure

The overall Mantel test based on the 20 sites showed a marginally significant positive correlation between geographic and genetic distances ($r = 0.3909$; $P = 0.016$). In France, there was no correlation when considering the 14 localities ($r = 0.251$; $P = 0.125$), but a positive significant correlation was found at the regional scale in Limousin ($r = 0.642$; $P = 0.013$).

Assignment tests

Individuals were grouped by geographic level of assignment (Figure 1). For Estonia, Finland and Poland, the dotted pattern indicated the proportion of individuals that were not assigned to their country of origin but which were assigned to one of the two others (they were grouped in a North-Eastern “supra-region” in the analysis). In France, the mean percentage of correct assignment (in white) to localities was low (21%), but the mean proportion of individuals assigned outside of France (in black) was also weak (16%). Most

individuals were correctly assigned to one of the sites in the same forest region (in grey, 43%). In general, Irish individuals were correctly allocated to their own site and none of them was allocated to the other Irish site.

DISCUSSION

Within population diversity

Whatever the geographic level considered, most of the genetic diversity was found within populations of the large pine weevil. A similar pattern (with 82 to 86% of variation within populations) was found using mitochondrial sequences in the Scolytid *Tomicus piniperda* L. (Kerdelhué *et al.*, 2002). Similarly, RAPD analysis of the common pine sawfly *Diprion pini* L. also indicated that on average 84% of the genetic diversity comprised intra-population variation (Baumann *et al.*, 2003). Such a large proportion of genetic variation within population was found in insect species with recent range expansion due to increased availability of a cultivated host. This was the case of the boll-weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) which took advantage of the extensive culture of cotton in North America (Kim and Sappington, 2004). *H. abietis* was first described as a forest pest at the early beginning of the XIXth century (Leather *et al.,* 1999). Extensive conifer plantations in Western Europe go back to the two last centuries (Agnoletti and Anderson, 2000). The host-plant's expansion of geographic range together with the modern harvesting techniques used in forests boosted the population dynamics of *H. abietis*. Indeed, recent estimations of *H. abietis* larval population size ranged from 46,400 to 170,825 individuals per hectare in clear-cut sites (Day *et al.*, 2004). Such large populations are unlikely to loose alleles through genetic drift and our results support that they do not undergo drastic size reduction. They do not appear to be driven by a severe outbreak regime. Even apparently isolated sites (two sites from Ireland and two sites from the Landes forest in France) did not exhibit reduced diversity as expected if

genetic drift was occurring. Altogether our study did not reveal influences of genetic drift in European *H. abietis* populations.

Among-population dispersal

In accordance with the high amount of diversity observed within rather than among populations, the overall F_{st} estimate ($\theta = 0.03$) was weak. This weak spatial genetic structure can be related to high migration rates across populations. However we did not attempt to estimate migration rates from observed F_{st} because *Hylobius* populations are unlikely to be at demographic equilibrium, especially in managed forests. Such weak spatial genetic structuring was reported for highly migratory insect species like the grain aphid *Sitobion avenae* (Llewellyn *et al.*, 2003). If populations are large and/or migrants are numerous, migration will lead gene frequency homogenization across populations, so that F_{st} will tend to zero. The assignment tests failed to accurately allocate individuals to their sampling site but they were correctly allocated to their forest region. Accordingly, the proportion of genetic diversity revealed by the AMOVA was higher across regions than among the sites and most of pairwise comparisons among sites were nonsignificant within regions. The regional scale therefore seems to be a more coherent geographic level for genetically homogeneous unit definition in *H. abietis*. The Estonia-Finland-Poland group demonstrates that there is a geographic coherence in assignments since the majority of the outside-allocated individuals were allocated to one of those three eastern countries.

Comparative studies of population structure in phytophagous insects have shown that genetic structure is mostly determined by the vagility of the species (Peterson and Denno, 1998). The very low genetic variation observed among *H. abietis* populations is likely to reflect its high dispersal ability. This was already observed in previous non-genetic studies (Nilssen, 1984; Solbreck, 1980). Using an indirect method (*i.e.* mills experiments) Solbreck (1980) estimated that female weevils might theoretically disperse as far as 80 km during the entire flight season. This was supported by the results of Nilssen (1984) who found many

H. abietis larvae developing on trap logs disposed at more than 80 km from the nearest coniferous forest in Finland. However our study provides the first clues of wider dispersal behaviour in *H. abietis*, given the wide geographic range surveyed. In the Limousin region, the isolation by distance pattern observed indicated that adults tend to move preferentially between neighbouring sites. However, the low F_{st} observed between Landes, Limousin and Ardèche, and the lack of isolation-by-distance at the scale of France indicates that adults may be able to disperse up to 300km.

This high dispersal ability in *H. abietis* might result from an adaptation to the patchy and ephemeral breeding resource in unmanaged forests. Although *H. abietis* exploits woody plants for breeding, the conifer stumps are only suitable for egg laying during a given time-window which varies with the tree species (von Sydow and Birgersson, 1997). It has been shown that evolution may increase dispersal ability in insects for which availability of suitable breeding habitat is unpredictable in space or in time (Gandon *et al.*, 1998; Roff, 1994). These theoretical studies are supported by several observations in forest insects (Eidmann, 1985). For example longhorn beetles developing on decaying host plants exhibit higher dispersal ability than taxonomically close species developing on living host plants (see the review on Cerambycid beetles by Hanks, 1999). High dispersal ability was also shown by genetic analysis in *Ips typographus*, a bark beetle attacking weakened trees (Stauffer *et al.*, 1999). Thus, habitat persistence may influence gene flow through its effect on the evolution of dispersal behaviour (Roderick, 1996). Our study supports this hypothesis in *Hylobius abietis*.

Furthermore, *Hylobius abietis* adults can live up to four years (Day *et al.*, 2004) which increases the potential distance that a weevil can cover during its life. Moreover, as compared to larvae, adults are relatively polyphagous: they were shown to be able to feed in the crown of mature trees in absence of young conifer seedlings (Ördlander, 2000). This feeding plasticity reduces the potential barriers to weevil dispersal. For the adults, the forest landscape

certainly appears “fine-grained” for feeding although it can appear “coarse-grained” for egg laying.

The role of the host-plant

This study evidences that the host-plant does not constitute a strong barrier to gene flow in *H. abietis*. Although a host-plant effect was found in two of the three tested forest regions, the reciprocal hierarchical AMOVA showed that geography plays a stronger role in differentiating populations than the host-plant over this geographic range. The amount of genetic variation due to host-plant is very low and does not suggest host-plant associated selection.

This study shows that larvae sampled on the two alternate host-plants are genetically differentiated at 5 to 9 *loci* and that pools of individuals differ more according to their geographical origin than to their host-plant. The few genetic differences observed across host-plant larval pools may therefore be due to within-generation selection, rather than stable genetic differences between host-associated populations, i.e. high admixture among adults re-homogenise diverging pools. Alternatively, these differences may reflect the early stages of host-specialisation process occurring in some geographical locations (in France) but not in others (Finland). Such geographical variation in the pattern of adaptation to the host-plant is predicted by the geographic mosaic theory of coevolution, which states that the form of selection between interacting species varies across a landscape with coevolution being important and active in some locations (*i.e.*, coevolutionary hotspots) but not in others (*i.e.*, coevolutionary coldspots, Thompson, 2005). Very few AFLP studies to detect *loci* involved in adaptation, in wild populations, have been conducted so far. In their study on 306 AFLP markers in intertidal snails, Wilding et al (Wilding *et al.*, 2001) identified 15 outliers (4.9 %) linked to different morphological types, and Campbell and Bernatchez (2004) found 14 outliers out of 440 AFLP markers (3.2 %) in the whitefish linked to trophic specialization. In the present study, we found 5-9 atypical *loci* out of 83 markers (6.0-10.8 %) in only two out

of three geographical regions. Our study suggests that few genes may be underlying processes of local adaptation. However, increasing the number of markers could reveal more outlier *loci* linked to host-plant specialization.

Given the limited evidence for genetic differentiation across host plants, is this weevil likely to evolve host-races? Factors favouring host race formation include host fidelity and correlation between host choice and mate choice (Drès and Mallet, 2002). Although *H. abietis* has been extensively studied for its attraction behaviour to different synthetic chemicals (reviewed by Schlyter 2004), its precise mating behaviour in the field is largely unknown. To date, no study has directly tested for host-fidelity or assortative mating in *H. abietis*. In other phytophagous insects, a phenological shift in host-plant availability can promote divergence of host-associated pools of insects like in the apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella* (Feder *et al.*, 1993), or in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Thomas *et al.*, 2003). The monitoring of chemical and physiological properties of Norway spruce and Scots pine stumps showed that the pine becomes suitable as a breeding substrate earlier than the spruceline (von Sydow and Birgersson, 1997). By contrast, the length of the pre-oviposition period was shown to be shorter when females feed on Norway spruce than on Scot pine (Wainhouse *et al.*, 2001). Therefore, the phenological delay in host availability (pine first, then spruce) is counterbalanced by the opposite phenological delay in female maturity (spruce first, then pine), precluding a divergence based on phenological delay. Mating in *Hylobius abietis* does not take place immediately at emergence on the host-plant stump as adult feeding on conifer transplants or on twigs of mature trees is required for sexual maturation of weevils (Wainhouse, 2001). If males and females are often found around the stumps during the reproduction period, mating may also take place during adult feeding on conifer seedlings which can be different tree species. Indeed, adults are less specific than larvae for their feeding thus a strong correlation between host choice and mate choice is unlikely.

Our study showed that the current AFLP pattern of genetic diversity in *H. abietis* populations from managed European forests was strongly influenced both by the sylvicultural practices (expansion of coniferous forests outside their natural range, clear cutting and planting) and by the biological characteristics of this insect which was originally adapted to a scarce and relatively ephemeral breeding resource. Plasticity in life-history traits, longevity and the relative polyphagy of *H. abietis* adults contributed to enhance their "gap-crossing ability" (*sensu* Tscharntke, 2004) and their harmfulness for the European forestry. Large scale adult migration is likely to prevent local adaptation, overcoming the formation of two host-races. The weak genetic structure observed throughout Europe suggests that an efficient biological control agent could be used widely.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank M. Deschanel (ONF), A. Lapouge and R. Pin for their help in the field work. We thank all the *H. abietis* collectors: H. Viiri (Forest Research Institute, Finland), D. Ward (Forest Protection, Ireland), K. Voolma (Forest Research institute, Estonia) and I. Skrzecz (Forest Research Institute, Poland). Special thanks to C. Miquel for technical help at the sequencer. We acknowledge S. Blanc-Manel, A. Beja-Pereira, O. Gaggiotti, G. Luikart and M. Singer for helpful comments on the manuscript. This work was supported by the French Ministère de la Recherche.

REFERENCES

Agnoletti M, Anderson S (2000). *Forest history: international studies on socioeconomic and forest ecosystem change* CAB International, Wallingford.

Batley J, Edwards KJ, Barker JHA, Dawson KJ, Wiltshire CW, Glen DM *et al.* (2004). Population structure of the beetle pests *Phyllodecta vulgatissima* and *P. vitellinae* on UK willow plantations. *Insect Mol Biol* **13**:413-421.

Baumann R, Schubert R, Heitland W *et al.* (2003). Genetic diversity within and among populations of *Diprion pini* (Hym., Diprionidae) determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction of haploid males. *J App Ent* **127**:258-264.

Beaumont MA, Nichols RA (1996). Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **263**:1619-1626.

Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P *et al.* (2004). How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol Ecol* **13**: 3261-3273.

Campbell D, Bernatchez L (2004). Generic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric Whitefish ecotypes. *Mol Biol and Evol* **21**: 945-956.

Day KR, Nordlander G, Kenis M, Halldorson G (2004). General biology and life cycles of bark weevils. In: Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire JC, Evans HF (eds) *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis* Kluwer Academic, Dordrecht. pp 331-349.

Drès M, Mallet J (2002). Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Phil Trans Royal Soc of London B* **357**: 471-492.

Duchesne P, Bernatchez L (2002). AFLPOP: a computer program for simulated and real population allocation, basedon AFLP data. *Mol Ecol Notes* **2**: 380-383.

Eidmann HH (1979). Intergrated management of pine weevil (*Hylobius abietis* L.) populations in Sweden. In: *Current topics in forest entomology*. USDA Forest Service General Technical Report.

Eidmann HH (1985). Silviculture and insect problems. *Z Ang Entomol* **99**: 105-112.

Emelianov I, Marec F, Mallet J (2004). Genomic evidence for divergence with gene flow in host races of the larch budmoth. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **271**: 97-105.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.

Feder JL, Hunt TA, Bush L (1993). The effects of climate, host plant phenology and host fidelity on the genetics of apple and hawthorn infesting races of *Rhagoletis pomonella*. *Entomol Exp Appl* **69**: 117-135.

Gandon S, Ebert D, Olivieri I, Michalakis Y (1998). Differential adaptation in spatially heterogeneous environments and host-parasite coevolution. In: Mopper S, Strauss S (eds) *Genetic structure and local adaptation in natural insect populations* Chapman & Hall, New York, pp 325-343

Grégoire JC, Evans HF (2004). Damage and control of BAWBILT organisms - an overview. In: Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire JC, Evans HF, (eds) *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*, Kluwer Academic, Dordrecht. pp 19-37.

Hanks LM (1999) Influence of the larval host plant on reproductive strategies of Cerambycid Beetles. *Ann. Rev. of Entomol.* **44**, 483-505.

Kerdelhué C, Roux-Morabito G, Forichon J *et al.* (2002). Population genetic structure of *Tomicus piniperda* L. (Curculionidae: Scolytinae) on different pine species and validation of *T. destruens* (Woll.). *Mol Ecol* **11**: 483-494.

Kim KS, Sappington TW (2004). Boll Weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) Dispersal in the Southern United States: Evidence from Mitochondrial DNA Variation. *Environ Entomol* **33**: 457-470.

Leather S, Day KR, Salisbury AN (1999). The biology and ecology of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae): a problem of dispersal? *Bull Entomol Res* **89** : 3-16.

Lempérière G, Julien J (2003). Protection contre l'hylobe du pin: efficacité d'un insecticide systémique à base de carbosulfan. *Revue forestière française* **LV** : 129-140.

Lieutier F, Day KR, Evans HF, Langström B.(2004). General conclusion and research priorities for BAWBILT organisms in Europe. In: Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire JC, Evans HF, (eds) *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*, Kluwer Academic, Dordrecht. pp 541-552.

Llewellyn KS, Loxdale HD, Harrington R *et al.* (2003). Migration and genetic structure of the grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain related to climate and clonal fluctuation as revealed using microsatellites. *Mol Ecol* **12**: 21-34.

Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P (2003). The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews* **4**: 981-994.

Miller MP (1997). *Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data*.

Mopper S (1996). Adaptative genetic structure in phytophagous insect populations. *TREE* **11**: 235-238.

Mopper S, Beck M, Simberloff D, Stiling P (1995). Local adaptation and agents of selection in a mobile insect. *Evolution* **49**: 810-815.

Nilssen AC (1984). Long range aerial dispersal of bark beetles and bark weevils (Coleoptera, Scolytidae and Curculiondae) in northern Finland. *Ann Entomol Fenn* **50**: 37-42.

Örlander G, Nilsson U, Nordlander G (1997). Pine weevil abundance on clearcuts of different ages: a 6-year study using pitfall traps. *Scand J Forest Res* **15**: 194-201.

Örlander G, Karlsson C (2000) Influence of shelterwood density on survival and height increment of *Picea abies* advance growth. *Scand J Forest Res* **15**:20-29.

Peakall R, Smouse P (2001). *GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.* Australian National University, Canberra, Australia.

Peterson MA, Denno RF (1998). Life-history strategies and the genetic structure of phytophagous insect populations. In: Mopper S, Strauss SY (eds) *Genetic structure and local adaptation in natural insect populations*, Chapman & Hall, New York. pp 236-322.

Raymond M, Rousset F, (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution* **49**: 1280-1283.

Roderick GK (1996). Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Ann Rev Entomol* **41**: 325-352.

Roff DA (1994). Habitat persistence and the evolution of wing dimorphism in insects. *American Nat* **144**: 772-798.

Rousset F (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F statistics under isolation by distance. *Genetics* **145** : 1219-1228.

Salinas S (2002). Entomopathogenic nematodes in Norwegian forest soils. *Nematology* **4**: 197

Savelkoul PH, Aarts HJM, de Haas J *et al.* (1999). Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the state of an art. *J of Clinical Microbiol* **37**: 3083-3091.

Schneider S, Küffer J, Rössli D, Excoffier L (2000). Arlequin Version 2.0: a software for Population Genetic Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.

Schlyter F 2004: Semiochemicals in the life of bark feeding weevils. -*In*: Ed. by F. Lieutier, K. R. Day, A. Battisti, J.-C. Grégoire & H. F. Evans, Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer, pp. 351-364.

Six DL, Paine TD, Hare JD (1999). Allozyme diversity and gene flow in the bark beetle, *Dendroctonus jeffreyi* (Coleoptera: Scolytidae). *Can J of Forest Res* **29**: 315-323.

Slatkin M (1973). Gene flow and selection in a cline. *Genetics* **75**: 733-756.

Slatkin M (1987). Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science* **236**: 787-792.

Solbreck C (1980). Dispersal distances of migrating pine weevils, *Hylobius abietis*, Coleoptera: Curculionidae. *Entomol Exp et Appl* **28**: 123-131.

Speight MR, Wainhouse D (1989). *Ecology and Management of Forest Insects* Oxford Science: Oxford.

Stauffer C, Lakatos F, Hewitt GM (1999). Phylogeography and postglacial colonization routes of *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) *Mol. Ecol.* **8**: 763-773.

Thomas Y, Bethenod M, Pelozuelo L, Frerot B, Bourguet D (2003). Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner. I. Sex pheromone, moth emergence timing, and parasitism. *Evolution* **57**: 261-273.

Thompson JN (2005). The Geographic Mosaic of Coevolution, Chicago, University of Chicago Press.

Thorpe KV, Day KR (2002). The impact of host plant species on the larval development of the large pine weevil *Hylobius abietis* L. *Agr and Forest Entomol* **4**: 187-194.

Tscharntke T, Brandl R (2004) Plant-Insect interactions in Fragmented Landscapes. *Ann Rev Entomol* **49**: 405-430.

von Sydow F, Birgersson G (1997). Conifer stump condition and pine weevil (*Hylobius abietis*) reproduction. *Can J of Forest Res* **22**: 1254-1262.

Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al.* (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuclear Acids Res* **23**: 4407-4414.

Wainhouse D, Ashburner R, Boswell R (2001). Reproductive development and maternal effects in the pine weevil *Hylobius abitetis*. *Ecol Entomol* **26**: 655-661.

Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating F-Statistics for the analysis of populations structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.

Wilding CS, Butlin RK, Grahame J (2001). Differential gene exchange between parapatric morphs of *Littorina saxatilis* detected using AFLP markers. *J Evol Biol*, 611-619.

Yeh F, Yang R-C, Boyle T (1997). *POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis.* Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton.

Zangerl AR, Berenbaum MR (2003). Phenotype matching in wild parsnip and parsnip webworms: causes and consequences. *Evolution* **57**, 806-815.

Site	Region-country	Longitude / latitude	Sample Size (and life stage: "A" for adults and "L" for larvae)	Host plant (for larvae) (s for spruce, p for pine)	Collector
1 Jalkala	Finland	27°15'E/62°33'N	10 L	spruce	H. Viiri
2 Kalakukkokangas	Finland	27°15'E/62°43'N	73 L	mixed (35s, 38p)	H. Viiri
3 Mooste	Estonia	27°08'E/58°10'N	15 A	-	K. Voolma
4 Celestynów	Poland	21°14'E/51°18'N	25 A	-	I. Skrzecz
5 Les Quatre Vios	France - Ardèche	4°13'E/44°28'N	56 L	mixed (38s, 18p)	C. Conord
6 Lachamp Raphaël	France - Ardèche	4°18'E/44°49'N	8 L	spruce	C. Conord
7 Mézilhac	France - Ardèche	4°21'E/44°48'N	10 L	pine	C. Conord
8 S^{t} Etienne de Lugdares	France - Ardèche	3°57'E/44°39'N	4 L	spruce	C. Conord
9 Annouillards	France - Limousin	2°12'E/45°40'N	28 L	mixed (23s, 5p)	C. Conord
10 Basville	France - Limousin	2°24'E/45°52'N	10 L	pine	C. Conord
11 Bellechassagne	France - Limousin	2°13'E/45°39'N	7 L	pine	C. Conord
12 Ebraly	France - Limousin	2°22'E/45°34'N	29 L	pine	C. Conord
13 Maussac	France - Limousin	2°09'E/45°28'N	19 L	pine	C. Conord
14 Pontgibaud	France - Limousin	2°52'E/45°49'N	10 L	pine	C. Conord
15 Puits de la Blanche	France - Limousin	2°01'E/45°17'N	7 L	spruce	C. Conord
16 Royère	France - Limousin	1°54'E/45°49'N	5 L	pine	C. Conord
17 Le Sen	France - Landes	1°30'W/44°07'N	6 L	pine	C. Conord
18 Pontenx	France - Landes	2°52'W/44°15'N	14 L	pine	C. Conord
19 Callan Forest	Ireland	7°37'W/52°42'N	9 L	pine	D. Ward
20 Galway	Ireland	9°03'W/53°16'N	22 A	-	G. Lempérière

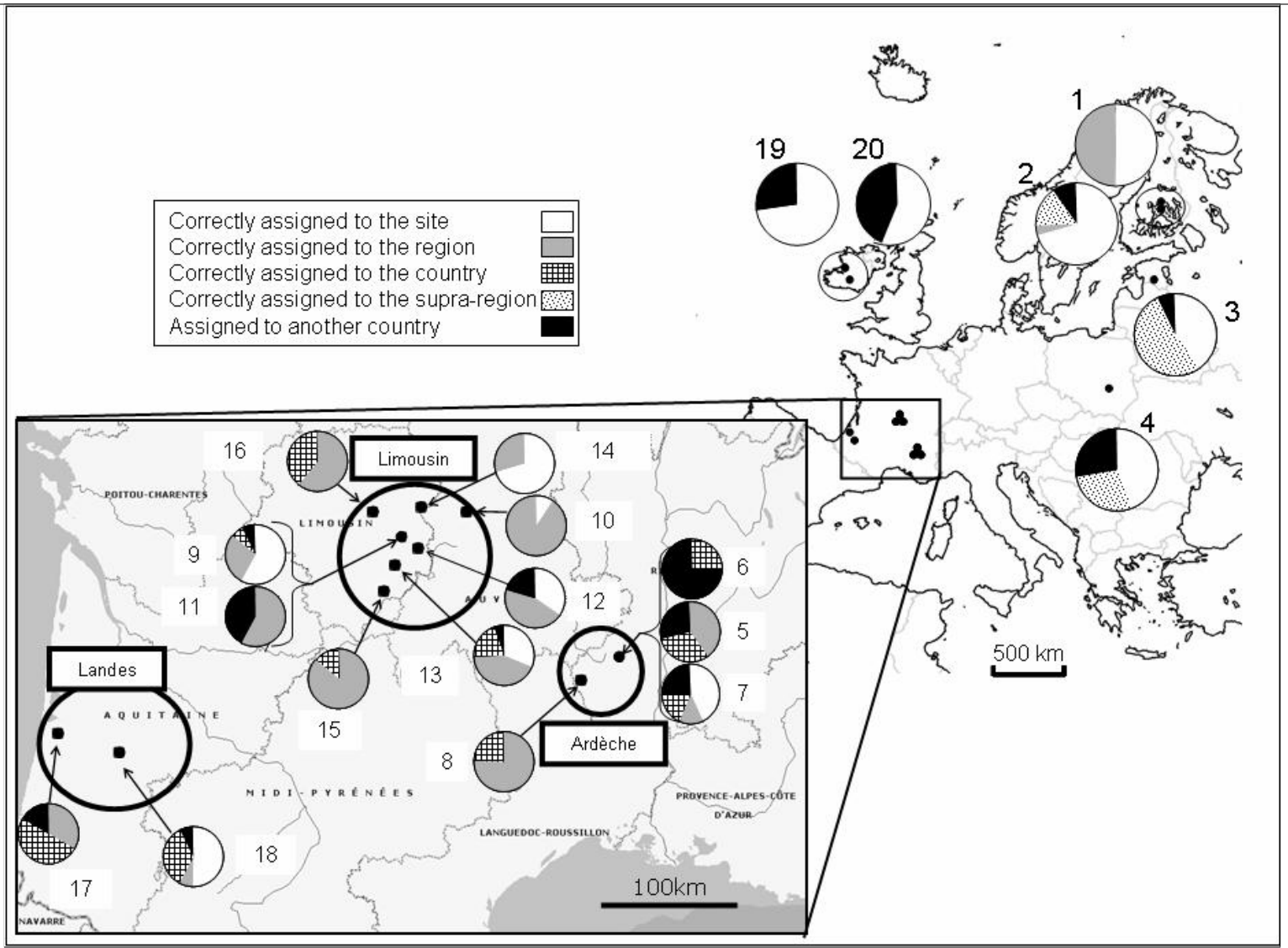
Table 1 Geographic location, collector name and characteristics of *Hylobius abietis* sites collected

554 **TITLE AND LEGEND TO FIGURE**

555 **Figure 1:** Geographic location of the 20 sampled sites of *Hylobius abietis* and results of the
556 assignment tests. For each site, the diagrams show the proportion of individuals according to
557 the geographic level they were assigned to.

Country	Region	Site	Number of polymorphic *loci*	Percentage of polymorphic *loci* (P%)	Nei's diversity index (H_E)	Shannon index (*I*)
Finland	-	Jalkala	62	74.70%	0.201 (0.170)	0.318 (0.240)
	-	Kalakukkokangas	81	97.59%	0.278 (0.147)	0.434 (0.186)
			T: 82	**M: 86.14% (11.44%)**	**M: 0.239 (0.038)**	**M: 0.376 (0.058)**
Estonia			**T: 74**	**89.16%**	**0.289**	**0.439**
Pologne			**T: 83**	**100%**	**0.288 (0.133)**	**0.450 (0.166)**
France	**Ardèche**	Les Quatre Vios	83	100%	0.285 (0.142)	0.445 (0.178)
		Lachamp Raphaël	77	92.77%	0.293 (0.157)	0.448 (0.206)
		Mézilhac	72	86.75%	0.266 (0.168)	0.409 (0.226)
		S^t Etienne de Lugdares	65	78.31%	0.288 (0.182)	0.429 (0.253)
			t: 83	**m: 91.32% (8.0%)**	**m: 0.283 (0.010)**	**m: 0.432 (0.015)**
	Landes	Le Sen	66	79.52%	0.268 (0.177)	0.406 (0.246)
		Pontenx	72	86.75%	0.274 (0.171)	0.418 (0.231)
			t: 79	**m: 83.13% (3.61%)**	**m: 0.271 (0.003)**	**m: 0.412 (0.006)**
	Limousin	Annouillards	80	96.39%	0.280 (0.145)	0.436 (0.184)
		Basville	69	83.13%	0.261 (0.170)	0.401 (0.233)
		Bellechassagne	70	84.34%	0.261 (0.159)	0.404 (0.220)
		Ebraly	82	98.80%	0.268 (0.140)	0.423 (0.179)
		Maussac	80	96.39%	0.290 (0.148)	0.448 (0.190)
		Pontgibaud	65	78.31%	0.272 (0.190)	0.407 (0.262)
		Puits de la Blanche	67	80.72%	0.256 (0.177)	0.392 (0.243)
		Royère	63	75.90%	0.260 (0.182)	0.393 (0.254)
			t: 83	**m: 86.75% (8.48%)**	**m: 0.268 (0.011)**	**m: 0.413 (0.019)**
			T: 83	**M: 87.00% (8.06%)**	**M: 0.273 (0.012)**	**M: 0.418 (0.019)**
Ireland	-	Callan	69	83.13	0.254 (0.183)	0.388 (0.252)
	-	Galway	51	61.45	0.196 (0.194)	0.298 (0.275)
			T: 76	**M: 72.29 (10.84)**	**M: 0.225 (0.029)**	**0.343 (0.045)**

Table 2 Within-population genetic diversity indices of the 20 sites studied.
Total (T) or mean (M) values for the different scales (uppercase for countries; lowercase for regions). Standard deviations in parentheses.



Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance	% total	Φ statistics	*P*
(a) Geographical grouping						
(a1) European Scale						
Among countries	4	261.747	0.909	5.54		
Within countries	362	5615.038	15.511	94.46		
Total	366	5876.785	16.420		Φ_{ST} = 0.0554	<0.0001
(a2) Regional Scale in France						
Among regions	2	117.805	0.477	2.93	Φ_{CT} = 0.0293	0.0009
Among sites within regions	11	255.791	0.641	3.94	Φ_{SC} = 0.0406	<0.0001
Within site	199	3015.681	15.154	93.13		
Total	212	3389.277	16.298		Φ_{ST} = 0.0687	<0.0001
(a2.1) Ardèche						
Among sites	3	57.003	0.301	1.91		
Within site	74	1142.343	15.437	98.09		
Total	77	1199.346	15.738		Φ_{ST} = 0.0191	0.0117
(a2.2) Limousin						
Among sites	7	185.431	0.843	5.30		
Within site	107	1611.195	15.057	94.70		
Total	114	1796.626	15.900		Φ_{ST} = 0.0530	<0.0001
(b) Hierarchical grouping: geographical – host-plant						
Among geographical groups*	2	171.028	0.734	4.53	Φ_{CT} = 0.0453	<0.0001
Among host-plant groups within regions	3	67.029	0.183	1.13	Φ_{SC} = 0.0118	<0.0001
Within host-plant group	270	3824.416	15.298	94.34		
Total	275	4062.473	16.215		Φ_{ST} = 0.0566	<0.0001

*Ardèche, Limousin and Finland

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) of *Hylobius abietis* populations using 83 AFLP *loci* .
The source of variation was tested using three scales of geographic partitioning (European, regional and local) and according to the larvae's host plant.
df, degrees of freedom; *P* , probability of obtaining a more extreme component estimate by chance alone (1000 permutations).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2	*0.0239* ***	-																		
3	0.0465 ***	0.0083 *	-																	
4	0.0324 ***	0.0063 ***	0.0113 ns	-																
5	0.0299 ***	0.0104 ***	0.0143 ***	0.0057 ***	-															
6	0.0609 **	0.0238 ns	0.0171 ns	0.0088 ns	*0.008 ns*	-														
7	0.0424 *	0.015 **	0.0108 ns	0.008 ns	*0.0078 ns*	*0.0139 ns*	-													
8	0.0514 ***	0.0195 ***	0.0145 ns	0.0077 ns	*0.0094 ns*	*0.0084 ns*	*0.0103 ns*	-												
9	0.0377 ***	0.0202 ***	0.0192 ***	0.0136 ***	0.0076 ***	0.0113 ns	0.0100 ns	0.0118 ns	-											
10	0.0538 **	0.0301 ***	0.0246 **	0.024 ***	0.0241 ***	0.0258 ns	0.0226 ns	0.0262 ns	*0.0173 ns*	-										
11	0.0216 ns	0.0092 ns	0.0226 ns	0.005 ns	0.007 ns	0.0218 ns	0.0139 ns	0.0204 ns	*0.0107 ns*	*0.0222 ns*	-									
12	0.0257 ***	0.0155 ***	0.02 ***	0.0101 ***	0.0085 ***	0.0148 ns	0.0124 ns	0.0214 ***	*0.0058 **	*0.0154 ns*	*0.0039 ns*	-								
13	0.0378 ***	0.016 ***	0.0159 **	0.0116 ***	0.0089 ***	0.0104 ns	0.0078 ns	0.0152 ns	*0.005 ns*	*0.0137 ns*	*0.0061 ns*	*0.0067 ns*	-							
14	0.0935 ***	0.0574 ***	0.0426 ***	0.0504 ***	0.0475 ***	0.0434 ns	0.0365 ns	0.0410 **	*0.0344 ***	*0.0499 ns*	*0.0417 *	*0.0413 ***	*0.0363 ***	-						
15	0.0496 **	0.0267 **	0.0263 ns	0.0199 ns	0.013 ns	0.0182 ns	0.0132 ns	0.0308 ns	*0.0134 ns*	*0.0208 ns*	*0.0219 ns*	*0.0119 ns*	*0.0119 ns*	*0.0485 *	-					
16	0.0501 ns	0.0212 ns	0.0153 ns	0.022 ns	0.0198 ns	0.0192 ns	0.0141 ns	0.0275 ns	*0.0156 ns*	*0.0194 ns*	*0.0139 ns*	*0.0175 ns*	*0.0161 ns*	*0.0257 ns*	*0.0286 ns*	-				
17	0.0541 **	0.0361 ***	0.0277 ns	0.0342 ns	0.0273 ns	0.0348 ns	0.0322 ns	0.0258 ns	0.0292 ns	0.0402 ns	0.0342 ns	0.0351 ns	0.0303 ns	0.0542 ns	0.0406 ns	0.0267 ns	-			
18	0.0571 ***	0.0284 ***	0.0162 **	0.0276 ***	0.0205 ***	0.0328 ns	0.0189 ns	0.0244 **	0.0224 ***	0.0332 ***	0.0296 *	0.0257 ***	0.0206 ***	0.0368 ***	0.0239 ns	0.0213 ns	*0.0128 ns*	-		
19	0.0297 ns	0.0231 ***	0.0381 ***	0.019 ***	0.018 ***	0.0457 ns	0.0376 ***	0.038 ***	0.0339 ***	0.0418 ***	0.0126 ns	0.0217 ***	0.0308 ***	0.0857 ***	0.0357 ***	0.0466 **	0.0555 ***	0.0441 ***	-	
20	0.053 ***	0.0195 ***	0.0178 ***	0.0136 ***	0.0192 ***	0.0265 ns	0.019 ***	0.0175 ***	0.0244 ***	0.0437 ***	0.021 ***	0.0251 ***	0.0243 ***	0.0426 ***	0.0348 ***	0.0224 *	0.0371 ***	0.0259 ***	*0.0319 ***	-

Table 3 Pairwise Nei's unbiased genetic distance among populations of European pine weevils and exact tests of population differentiation.
Populations numbered as in figure 1. Pairwise comparisons within regions are in italic.
Significance levels of exact tests of differentiation are shown by : ns: non significant; *0.01<P<0.05; **0.001<P<0.01; ***P<0.001.

Annexe C

Annexe du Chapitre 2

```
data olfacto;
infile 'C:\ArdEst.txt';
input Sexe$ Nourriture$ Bloc$ Orig$ CodeInsecte$ Epicea PinS AirOppEp AirOppPs;
proc sort;
by Sexe Nourriture Bloc orig CodeInsecte;
data long; /*remanie le tableau de données*/
set olfacto;
duree = PinS; attractivite = 1; OUTPUT;
duree = AirOppEp; attractivite = 2; OUTPUT;
duree = AirOppPs; attractivite = 3; OUTPUT;
duree = Epicea; attractivite = 4; OUTPUT;
DROP PinS AirOppEp AirOppPs Epicea;
run;
/*proc print data=long; /*imprime le tableau de données remanié*/
/*run;*/
proc mixed data=long;
class Sexe Nourriture bloc orig CodeInsecte attractivite;
model duree = attractivite nourriture attractivite*Nourriture;
random bloc;
/*déclaration de la structure de covariance*/
repeated attractivite / subject=CodeInsecte group=bloc type=cs;
lsmeans attractivite / pdiff adjust=tukey;
lsmeans nourriture*attractivite / pdiff adjust=sidak;

contrast 'attractivite AirOppEp vs AirOppPs' attractivite 0 1 -1 0;
contrast 'attractivite PinS vs AirOppEp' attractivite 1 -1 0 0;
contrast 'attractivite PinS vs AirOppPs' attractivite 1 0 -1 0;
contrast 'attractivite PinS - moyAir' attractivite 1 -.5 -.5 0;
contrast 'attractivite Epicea vs AirOppEp' attractivite 0 -1 0 1;
contrast 'attractivite Epicea vs AirOppPs' attractivite 0 0 -1 1;
contrast 'attractivite Epicea - moyAir' attractivite 0 -.5 -.5 1;
contrast 'attractivite PinS vs Epicea' attractivite 1 0 0 -1;
contrast 'attractivite PinS-moy vs Epicea-moyAir' attractivite 1 -.5 -.5 0,
                                                  attractivite 0 -.5 -.5 1;
contrast 'attractivite moyOdeur vs moyAir' attractivite .5 -.5 -.5 .5;
contrast 'attractivite Odeur vs Air' attractivite 1 -1 -1 1;

contrast 'Nourriture(Ep)*Attr(Ep) vs Nourriture(Ps)*Attr(Ep)' nourriture 1 -1
                                                              attractivite*nourriture  0 0 0 1 0 0 0 -1;
contrast 'Nourriture(Ep)*Attr(Ps) vs Nourriture(Ps)*Attr(Ps)' nourriture 1 -1
                                                              attractivite*nourriture  1 0 0 0 -1 0 0 0;
contrast 'Nourriture(Ps)*Attr(Ep) vs Nourriture(Ps)*Attr(Ps)' attractivite 1 0 0 -1
                                                              attractivite*nourriture  0 0 0 0 1 0 0 -1;
contrast 'Nourriture(Ep)*Attr(Ep) vs Nourriture(Ep)*Attr(Ps)' attractivite 1 0 0 -1
                                                              attractivite*nourriture  1 0 0 -1 0 0 0 0;
run;
```

FIG. C.1 – Code de la procédure SAS utilisée pour traiter les données d'olfactométrie

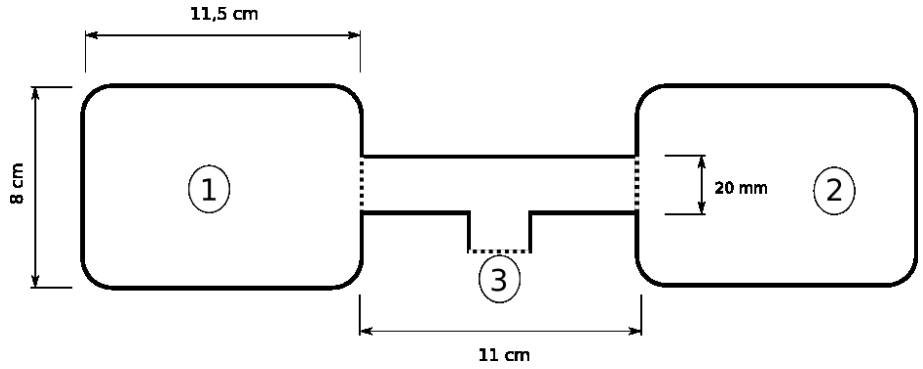


FIG. C.2 – Dispositif de choix de ponte sur bûchettes
Les buchettes sont disposées dans les compartiments 1 et 2. L'insecte est introduit dans le dispositif par l'ouverture 3, qui est après rebouchée avec de la gaze.

Annexe D

Annexe du Chapitre 3

Nom	Séquence	Position des nucléotides*
008for	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	8–27
1389rev	5'-GACGGGCGGTGTGTACAA-3'	389–1406

Tab. D.1 – Séquence des amorces utilisés pour le séquençage de l'ADNr 16S bactérien
*Position par rapport à la séquence référence chez *Escherichia coli*, n° GenBank J01859

Numéro d'accession	Taxon	Référence bibliographique
AY131098	*Tanysphyrus lemnae*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131099	*Sitophilus oryzae*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131100	*Sitophilus zeamais*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131101	*Sitophilus granarius*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131104	*Diocalandra frumenti*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131106	*Sphenophorus striatopunctatus*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131108	*Metamasius hemipterus*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131109	*Yuccaborus frontalis*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131110	*Scyphophorus yuccae*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131111	*Cosmopolites sordidus*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131114	*Metamasius callizona*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131121	*Rhynchophorus palmarum*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131121	*Apion sp.*	O'Meara,B. et Farrell,B., non publié
AY131096	*Pissodes strobi*	Laffin,R., Langor,D. et Sperling,F., 2004

Tab. D.2 – Numéro d'accession, sur la base Genebank, des séquences d'ADN mitochondrial codant pour la sous-unité I de la Cytochrome oxydase des insectes-hôtes

Nom	Séquence	Position des nucléotides*
XtianSteph01U	5'-TCG TTC AAT GAT TTC C-3'	1178
XtianSteph01L	5'-TCT TGT AGT ATA ATA GTT TTT C-3'	1616
XtianSteph02U	5'-GAA TAG ATG TTG ATA CCC-3'	887
XtianSteph02L	5'-AAT CCT AAG AAA TGT TGA G-3'	1280
XtianSteph03U	5'-AGA CCG AAA TAT CAA TAC-3'	633
XtianSteph03L	5'-GAT CAT AAA GAG GAG GG-3'	1006
XtianSteph04U	5'-CCT GAT ATA GCT TTC CC-3'	268
XtianSteph04L	5'-ACC AAA AAA TCA AAA TAG-3'	700
XtianSteph05U	5'-AAC TTT ATA TTT CAT TTT TG-3'	48
XtianSteph05L	5'-CTG CTA TGT GGA GTC TAA-3'	443

Tab. D.3 – Séquence des amorces utilisés pour le séquençage de l'ADNmt d'*Hylobius abietis*
*Position par rapport à la séquence référence chez *Pissodes strobi*.

47-TAACTTTATATTTCATTTTTGGAACATGGTCCGGAATAGTTGGTACATCTCTTAGTATA
CTAATTCGTACTGAATTAGGAAATCCTGGAAGATTAATCGGAGATGACCAAATTTATAATAC
TATTGTGACAGCTCATGCTTTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATGCCAATTATAATTGGGG
GATTTGGAAATTGATTAGTTCCATTAATACTGGGGGCCCCTGATATAGCTTTTCCACGATTA
AATAATATAAGATTTTGGCTCCTACCTCCATCTTTAACTCTTCTTTTAATAAGAAGAATTGT
TGATAAAGGAGCTGGAACTGGGTGAACCGTATACCCACCTTTATCAGCCAATATTGCTCATG
AAGGGGCATCTGTAGATTTTGCAATTTTTAGRCTMCAYATAGCAGRAATTTCATCTATTTTA
GGAGCAATTAACTTTATTTCTACAGCAATTAATATACGTTCATCAGGAATAAAATCTGATCA
AATATCTCTCTTTATCTGAGCAGTAAAAATTACTGCTATTCTATTACTACTATCATTACCAG
TTTTAGCCGGTGCTATTACTATACTATTAACTGATCGTAATATTAATACTTCATTTTTTGAT
CCTGCCGGAGGTGGAGATCCTATTCTCTATCAACATCTATTTTGANNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCTCTCATATTATCGGACAAGAAAGAG
GTAAAAAAGAAGCTTTTTGGAGGTCTAGGAATAATTTATGCAATAATNGCAATTGGAATCCT
CGGATTTGTTGTCTGAGCTCACCATATATTCACCGTTTGAATAGATGTTGATACCCGGGCCT
ATTTTACTTCAGCAACAATAATTATTGCAGTTCCAACTGGAATTAAAATTTTTAGTTGATTG
GCAACTTATCATGGAACTCAAATTTCATTTAATCCATCTTCTCTATGATCAATTGGATTTAT
CTTCCTTTTTACAATTGGAGGATTAACCGGAGTAGTTTTAGCTAATTCATCTATTGATATCA
TTCTACATGATACCTATTATGTTGTAGCTCATTTTCACTATGTTTTATCAATAGGGGCAGTA
TTTGCAATTCTTGCTGGAATTGTTCAATGATTCCCCCTATTCACAGGTCTTACACTAAATTC
TAAATTTTTAAAAGTACAATTTTCTGTAATATTTATTGGAGTAAATTTAACCTTTTTCCCTC
AACATTTCTTAGGATTA-1300

Tab. D.4 – Séquence du COI de l'ADNmt d'*Hylobius abietis*

Nucléotides 47 à 1300 par rapport à la séquence de *Pissodes strobi* AY131096.

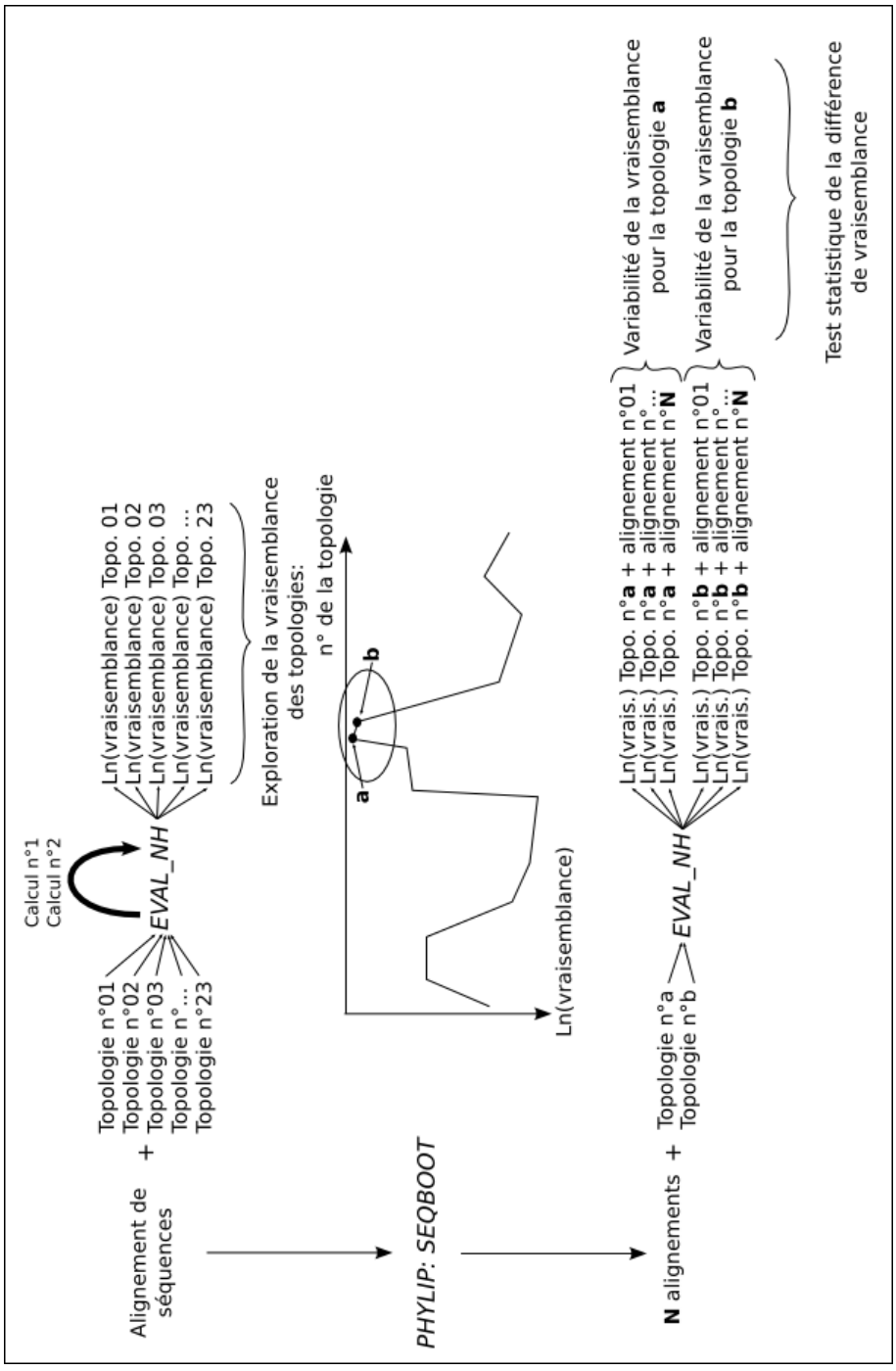


FIG. D.1 – Synopsis de la reconstruction phylogénétique de l'arbre des endocytobiotes

Bibliographie

Agnoletti M, Anderson S (2000) *Forest history : international studies on socioeconomic and forest ecosystem change*, tome 2 de *IUFRO Reseach Series*. CAB International, Wallingford New York.

Agrawal AA (2000) Host-range evolution : adaptation and trade-offs in fitness of mites on alternative hosts. *Ecology*, 81(2), 500–508.

Anderson B, Olivieri I, Lourmas M, Stewart BA (2004) Comparative population structures and local adaptation of two mutualists. *Evolution*, 58, 1730–1747.

Ballabeni P, Gotthard K, Kayumba A, Rahier M (2003) Local adaptation and ecological genetics of host-plant specialization in a leaf beetle. *Oikos*, 101, 70–78.

Batley J, Edwards KJ, Barker JHA, *et al.* (2004) Population structure of the beetle pests Phyllodecta vulgatissima and P. vitellinae on UK willow plantations. *Insect Molecular Biology*, 13, 413–421.

Baumann P, Lai CY, Baumann L, *et al.* (1995) Mutualistic Associations of Aphids and Prokaryotes : Biology of the Genus Buchnera. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 1–7.

Baumann R, Schubert R, Heitland W, *et al.* (2003) Genetic diversity within and among populations of Diprion pini (Hym., Diprionidae) determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction of haploid males. *Journal of Applied Entomology*, 127, 258–264.

Büchner P (1965) *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. Interscience, Inc., New York.

Beaumont MA, Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London : Biological Sciences*, 263, 1619–1626.

Beccaloni GW, Symons FB (2000) Variation of butterfly diet breadth in relation to host-plant predictability : results from two faunas. *Oikos*, 90, 50–66.

Becerra JX (1997) Insects on plants : macroevolutionary chemical trends in host use. *Science*, 276, 253–256.

Becerra JX, Venable DL (1999) Macroevolution of insect-plant associations : The relevance of host biogeography to host affiliation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12626–12631.

Bejer-Petersen B, Juutinen P, Kangas E, *et al.* (1962) Studies on Hylobius abietis L. - Development and life cycle in the Nordic countries. *Acta Ent. Fennica*, 17, 6–106.

Bensch S, Akesson M (2005) Ten years of AFLP in ecology and evolution : why so few animals ? *Molecular Ecology*, 14, 2899–2914.

Berlocher SH, Feder JL (2002) Sympatric Speciation In Phytophagous Insects : Moving Beyond Controversy ? *Annual Review of Entomology*, 47, 773–815.

Bernays EA (2001) Neural Limitations in Phytophagous Insects : Implications for Diet Breadth and Evolution of Host Affiliation. *Annual Review of Entomology*, 46, 703–727.

Björklund N (2004) *Movement behavior and resource tracking in the pine weevil Hylobius abietis.* Thèse de doctorat, Swedish University of Agricultural Sciences.

Bourguet D, Bethenod MT, Trouve C, Viard F (2000) Host-plant diversity of the European corn borer Ostrinia nubilialis : what value for sustainable transgenic insecticidal Bt maize ? *Proceedings of the Royal Society of London B*, 267, 1177–1184.

Britton EB (1960) Beetles from the London Clay (Eocene) of Bognor Regis, Sussex. *Bulletin of the British Museum (Natural History) (Geology)*, 4, 27–50.

Byers JA (1995) Host tree chemistry affecting colonization in bark beetles. Dans : Cardé RT, Bell WJ, rédacteurs, *Chemical Ecology of Insects 2*, Chapman and Hall, New York, p. 154–213.

Byers JA (2004) *Chemical ecology of bark beetles in a complex olfactory landscape*, chapitre 8. Kluwer, p. 89–134.

Campbell D, Bernatchez L (2004) Generic Scan Using AFLP Markers as a Means to Assess the Role of Directional Selection in the Divergence of Sympatric Whitefish Ecotypes. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 945–956.

Chararas C (1979) *Ecophysiologie des insectes parasites des forêts.* Edité par l'auteur, Paris.

Chen X, Li S, Aksoy S (1999) Concordant Evolution of a Symbiont with Its Host Insect Species : Molecular Phylogeny of Genus Glossina and Its Bacteriome-Associated Endosymbiont, Wigglesworthia glossinidia. *Journal of Molecular Evolution*, 48, 49–58.

Christiansen E (1971) Developmental stages in ovaries of pine weevils, Hylobius abietis L. (Coleoptera : Curculionidae), present in reforestation areas during the first years after the final felling. *Meddelelser fra Det Norske Skogforsokvesen*, 107(XXVIII 7), xx–xx.

Craw RC (1999) Molytini (Insecta : Coleoptera : Curculionidae : Molytinae). *Fauna of New Zealand*, 39, 68.

Cronin JT, Abrahamson WG, Craig TP (2001) Temporal variation in herbivore host-plant preference and performance : constraints in host-plant adaptation. *Oikos*, 93, 321–320.

Crowson RA (1960) The phylogeny of Coleoptera. *Annual Review of Entomology*, 5, 111–134.

Cunningham JP, West SA (2001) Host selection in phytophagous insects : a new explanation for learning in adults. *Oikos*, 95(3), 537–543.

Dagnelie P (1998) *Statistique théorique et appliquée - Tome 2 : Inférence statistique à une et deux dimensions*. De Boeck Université, Paris.

Dajoz R (1998) *Les insectes et la forêt*. Tec & Doc - Lavoisier, Paris.

Dambroski HR, Linn C, Berlocher SH, *et al.* (2005) The genetic basis for fruit odor discrimination in Rhagoletis flies and its significance for sympatric host shifts. *Evolution*, 59, 1953–1964.

Day KR, Nordlander G, Kenis M, Halldorson G (2004) General biology and life cycles of bark weevils. Dans : Lieutier F, Day KR, Battisti A, *et al.*, rédacteurs, *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*, Kluwer Academic, Dordrecht, p. 331–349.

Decourt N (1999) *La forêt*. Que sais-je ?, Presses Universitaires Françaises.

Dillon RJ, Dillon VM (2004) The gut bacteria of insects : nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, 49, 71–92.

Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK (2005) Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters*, 8, 1291–1298.

Dopman EB, Sword GA, Hillis DM (2002) The importance of the ontogenetic niche in ressource-associated divergence : evidence from a generalist grasshopper. *Evolution*, 56(4), 731–740.

Douglas AE (1998) Nutritional interactions in insect-microbial symbioses : Aphids and their symbiotic Bacteria Buchnera. *Annual Review of Entomology*, 43, 17–37.

Drès M, Mallet J (2002) Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 357, 471–492.

Duchesne P, Bernatchez L (2002) AFLPOP : a computer program for simulated and real population allocation, basedon AFLP data. *Molecular Ecology Notes*, 2, 380–383.

Dyer LA (1995) Tasty generalists and nasty specialists ? Antipredator mechanisms in tropical lepidopteran larvae. *Ecology*, 76, 1483–1496.

Ehrlich PR, Raven PH (1964) Butterflies and plants : a study in coevolution. *Evolution*, 18, 586–608.

Eidmann HH (1985) Silviculture and insect problems. *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie*, 99, 105–112.

Emelianov I, Marec F, Mallet J (2004) Genomic evidence for divergence with gene flow in host races of the larch budmoth. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 271, 97–105.

Erwin TL (1982) Tropical forests : their richness in Coleoptera and other arthropo species. *Coleopterist Bulletin*, 36.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.

Farrell B, Seqeira AS, O'Meara BC, *et al.* (2001) The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae : Scolytinae and Platypodinae). *Evolution*, 55(10), 2011–2027.

Farrell BD (1998) Inordinate Fondness Explained : Why Are There So Many Beetles ? *Science*, 281(24 july), 555–559.

Feder JL, Hunt TA, Bush L (1993) The effects of climate, host plant phenology and host fidelity on the genetics of apple and hawthorn infesting races of Rhagoletis pomonella. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 69, 117–135.

Felsenstein J (1993) PHYLIP : phylogeny inference package.

Fäldt J (2000) *Volatile constituents in conifers and conifer- related wood-decaying fungi.* Thèse de doctorat, Royal Institute of Technology.

Fox LR, Morrow PA (1981) Specialization : species property of local phenomenon. *Science*, 211, 887–893.

Fry JD (1996) The evolution of host specialization : are trade-offs overrated ? *The American Naturalist*, S148, 84–107.

Futuyma DJ (1999) Potential Evolution of Host Range in Herbivorous Insects. Dans : Spencer NR, rédacteur, *X International symposium on biological control of weeds*, Montana state university, Bozeman, Montana, USA, p. 43–53.

Futuyma DJ, Moreno G (1988) The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19, 207–233.

Galtier N, Gouy M (1998) Inferring pattern and process : maximum-likelihood implementation of a nonhomogeneous model of DNA sequence evolution for phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 871–879.

Gandon S, Ebert D, Olivieri I, Michalakis Y (1998) Differential adaptation in spatially heterogeneous environments and host-parasite coevolution. Dans : Mopper S, Strauss S, rédacteurs, *Genetic structure and local adaptation in natural insect populations*, Chapman & Hall, New York, p. 325–340.

Gotthard K, Margraf N, Rasmann S, Rahier M (2005) The evolution of larval foraging behaviour in response to host plant variation in a leaf beetle. *Oikos*, 109, 503–512.

Gourov AV (2000) Hylobius species (Coleoptera : Curculionidae) from Siberia and the distribution patterns of adults feeding in Scots pine stands. *Entomologica Fennica*, 11(1), 57–66. 0785 8760.

Gratshev VG, Zherikhin VV (2003) The fossil record of weevils and related beetle families (Coleoptera, Curculionoidea). *Acta zoologica cracoviensia*, 46 (suppl. Fossil Insects), 129–138.

Grenier AM, Nardon C, Nardon P (1994) The role of symbiotes in flight activity of Sitophilus weevils. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 70, 201–208.

Grove SJ (2002) Saproxylic insect ecology and the sustainable management of forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 1–23.

Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate phylogenies by maximum likelihood. *Systematics Biology*, 52, 696–704.

Guslits IS (1970) Morphological and physiological description of the pine weevil, Hylobius abietis, during the period of maturation and oviposition. *Zoologicheskii Zhurnal*, 49, 862–868.

Hall TA (1999) BioEdit : a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95 98 NT. Dans : *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, tome 41, p. 95–98.

Hanks LM (1999) Influence of the larval host plant on reproductive strategies of Cerambycid Beetles. *Annual Review of Entomology*, 44, 483–505.

Hawthorne DJ, Via S (2001) Genetic linkage of ecological specialization and reproductive isolation in pea aphids. *Nature*, 412(30), 904–907.

Heddi A, Charles H, Khatchadourian C, *et al.* (1998) Molecular characterization of the principa symbiotic bacteria of the weevil *Sitophilus oryzae* : a peculiar G+C content of an endocytobiotic DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 47, 52–61.

Heddi A, Grenier AM, Khatchadourian C, *et al.* (1999) Four intracellular genomes direct weevil biology : Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and Wolbachia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 6814–6819.

Heritage S, Moore R (2001) The assesment of site characteristics as part of a management strategy to reduce damage by Hylobius. Rapport technique, Forestry Comission UK.

Hoffman A (1950) *Coléoptères Curculionides (Première partie)*. Lechevalier.

Hoffman A (1958) *Coléoptères Curculionides (Troisième partie)*. Lechevalier.

Holmgren NMA, Getz WM (2000) Evolution of host plant selection in insects under perceptual constraints : A simulation study. *Evolutionary Ecology Research*, 2, 81–106.

Huey RB (1991) Physiological consequences of habitat selection. *The American Naturalist*, 137(S), 91–115.

Hutchinson GE (1959) Homage to Santa Rosalia or why are there so many kinds of animals. *The American Naturalist*, 93, 145–159.

Irschick D, Dyer L, Sherry TW (2005) Phylogenetic methodologies for studying specialization. *Oikos*, 110, 404–408.

Jaenike J (1990) Host specialization in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 21, 243–273.

Janz N (2003) The cost of polyphagy : oviposition decision time vs error rate in a butterfly. *Oikos*, 100, 493–496.

Janz N, Nylin S (1997) The role of female search behaviour in determining host plant range in plant feeding insects : a test of the information processing. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 264, 701–707.

Jones RW (2001) Evolution of the Host Plant Associations of the Anthonomus grandis Species Group (Coleoptera : Curculionidae) : Phylogenetic Tests of Various Hypotheses. *Annals of the Entomological Society of America*, Vol. 94(1), 5158.

Jonsell M, G N (2004) Host selection patterns in insects breeding in bracket fungi. *Ecological Entomology*, 29, 697–705.

Julien J (1995) *Aspects ecologiques et epidemiologiques des populations d' insectes xylophages. Statistiques types*. Thèse de doctorat, Universite-de-Paris, Paris France. French.

Kassen R (2002) The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of evolution. *Journal of Evolutionary Biology*, 15, 173–190.

Kawecki TJ, Bartin NH, Fry JD (1997) Mutational collapse of fitness in marginal habitats and the evolution of ecological specialisation. *Journal of Evolutionary Biology*, 10, 407–429.

Kenis M, Wegensteiner R, Griffin CT (2004) Parasitoids, predators, nematodes and pathogens associated with bark weevil pests. Dans : Lieutier F, Day KR, Battisti A, *et al.*, rédacteurs, *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*, chapitre 18, Kluwer Academic, p. 395–414.

Kerdelhué C, Roux-Morabito G, Forichon J, *et al.* (2002) Population genetic structure of Tomicus piniperda L. (Curculionidae : Scolytinae) on different pine species and validation of T. destruens (Woll.). *Molecular Ecology*, 11, 483–494.

Kim KS, Sappington TW (2004a) Boll Weevil (Anthonomus grandis Boheman) (Coleoptera : Curculionidae) Dispersal in the Southern United States : Evidence from Mitochondrial DNA Variation. *Environmental Entomology*, 33(2), 457–470.

Kim S K, Sappington W T (2004b) Genetic structuring of boll weevil populations in the US based on RAPD markers. *Insect Molecular Biology*, 13(3), 293–303.

Klepzic KD, Schlyter F (1999) Laboratory evaluation of plant derived antifeedants against the pine weevil Hylobius abietis (Coleoptera : Curculionidae). *Forest Entomology*, 92(3), 644–650.

Klepzig KD, Six DL (2004) Bark Beetke-Fungal symbiosis : context dependency in complex associations. *Symbiosis*, 37, 189–205.

Langström B (1982) Abundance and seasonal activity of adult Hylobius abietis weevils in reforestation areas during first years following final felling. *Commun. Inst. For. Fenn.*, 106, 4–23.

Langstrom B, Day KR (2004) Damage, control and management of weevil pests, especially Hylobius abietis. Dans : *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*, Kluwer, p. 415–444. Book.

Leather S, Ahmed SI, Hogan L (1994) Adult feeding preference of the large pine weevil, *Hylobius abietis*(Coleoptera : Curculionidae). *European Journal of Entomology*, 91, 385–389.

Leather SR, Day KR, Salisbury AN (1999) The biology and ecology of the large pine weevil, Hylobius abietis (Coleoptera : Curculionidae) : a problem of dispersal ? *Bulletin of Entomogical Research*, 89, 3–16.

Lefèvre C (2004) *Caractérisation et phylogénie des bactéries symbiotiques intracellulaires des charançons de la famille des Dryophthoridae*. Thèse de doctorat, Institut National des Sicences Appliquées de Lyon.

Lefèvre C, Charles H, Vallier A, *et al.* (2004) Endosymbiont phylogenesis in the Dryophthoridae weevils : Evidence for bacterial replacement. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6), 965–973.

Lempérière G, Conord C, Fleury S, Day K (2004a) Dr Saproxyl' et Mr Pest' : compromis ou conflits potentiels entre santé de la forêt et biodiversité. Dans : *Colloque Bois mort et à cavités, une clé pour des forêts vivantes.*, Tech & Doc, Lavoisier, p. 98–102.

Lempérière G, Julien J (1989) Premiers resultats de tests pour l' evaluation de l' efficacite d' un insecticide systemique contre l' hylobe (Hylobius abietis, Col. curculionidae). *Revue forestiere francaise*, 41(5), 411–422. 1989 0035 2829 French.

Lempérière G, Julien J (2003) Protection contre l' hylobe du pin : Efficacite d' un insecticide systemique a base de carbosulfan. *Revue Forestiere Francaise*, 55(2), 129–140. 2003 0035 2829 French.

Lempérière G, Mantilleri A, Conord C (2004b) *Taxonomy and systematics of bark weevils*, chapitre 13. Kluwer Academic, Dordrecht, p. 317–330.

Li X, Baudry J, Berenbaum MR, Schuler MA (2004) Structural and functional divergence of insect proteins : from specialist to generalist cytochrome P450. *PNAS*, 101, 2939–2944.

Lieutier F, Day KR, Evans HF, Langström B (2004) General conclusion and research priorities for BAWBILT organisms in Europe. Dans : Lieutier F, Day KR, Battisti A, *et al.*, rédacteurs, *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*, Kluwer Academic, Dordrecht, p. 541–552.

Lill JT, Marquis RJ, Ricklefs RE (2002) Host plant influence parasitism of forest caterpillars. *Nature*, 417, 170–173.

Llewellyn KS, Loxdale HD, Harrington R, *et al.* (2003) Migration and genetic structure of the grain aphid (Sitobion avenae) in Britain related to climate and clonal fluctuation as revealed using microsatellites. *Molecular Ecology*, 12, 21–34.

Loxdale HD, Lushai G (1999) Slaves of the environment : the movment of herbivorous insects in relation to their ecology and genotype. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 334, 1479–1495.

Luikart G, England PR, Tallmon D, *et al.* (2003) The power and promise of population genomics : from genotyping to genome typing. *Nature Reviews*, 4, 981–994.

MacArthur RH, Levins R (1964) Competition, habitat selection and character displacement in a patchy environment. *PNAS*, 51, 1207–1210.

Manlove JD, Styles J, Leather SR (1997) Feeding of the adults of the large pine weevil, *Hylobius abietis*(Coleoptera : Curculionidae). *European Journal of Entomology*, 94, 153–156.

Mansson PE, Schlyter F (2004) Hylobius pine weevils adult host selection and antifeedants : feeding behaviour on host and non-host woody scandinavian plants. *Agricultural and Forest Entomology*, 6, 165–171.

Marage D, Lempérière G (2005) The management of snags : a comparison in managed and unmanaged ancient forests of the Southern French Alps. *Annals of Forest Science*, 62, 1–7.

Margulis L (1993) *Symbiosis in Cell Evolution*. Freeman, New York, 2nde édition.

Martel C, Réjasse A, Rousset F, *et al.* (2003) Host-plant associated genetic differenciation in Northern French populations of the European corn borer. *Heredity*, 90, 141–149.

Marvaldi AE (1997) Higher level phylogeny of Curculionidae (Coleoptera : Curculionoidea) based mainly on larval characters with special reference to broad-nosed weevils. *Cladistics*, 13, 285–312.

Marvaldi AE, Sequeira AS, O'brien CW, Farrel BD (2002) Molecular and morphological phylogenetics of weevils (Coleoptera, Curculionoidea) : do niche shifts accompany diversification ? *Systematic Biology*, 51(5), 761–785.

Matthews JVJ, Telka A (1997) *Insects of the Yukon*, chapitre Insect fossils from the Yukon. Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods), p. 911–962.

Merivee E, Sibul I, Luik A (1998) Diel dynamics of feeding and locomotor activities in the large pine weevil, Hylobius abietis. *Baltic Forestry*, 2, 59–62.

Michalakis Y, Sheppard AW, Noël V, Olivieri I (1993) Population structure of a herbivorous insect and its host plant on a microgeographic scale. *Evolution*, 47, 1611–1616.

Müller D, Ro H, Mustaparta H (2002) Olfaction in Heliothine moths. IV. Coding properties and dendrite arborizations in identified glomeruli of antennal lobe output neurones. *FENS Abstr.*, 1, 470.

Moore R, Brixey JM, Milner AD (2004) Effect of time of year on the development of immature stages of the Large Pine Weevil (Hylobius abietis L.) in stumps of Sitka spruce (Picea sitchensis Carr.) and influence of felling date on their growth, density and distribution. *Journal of Applied Entomology*, 128, 167–176.

Mopper S (1996) Adaptative genetic structure in phytophagous insect populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 11(6), 235–238.

Moran NA, Baumann P (2000) Bacterial endosymbionts in animals. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 270–275.

Mustaparta H (1975) Responses of single olfactory cells in the pine weevil Hylobius abietis L. (Col. : Curculionidae). *J. Comp. Physiol.*, 97, 271–290.

Mustaparta H (2005) Innate and changed responses to plant odours in moths and weevils. *Chemical Senses*, 30(S1), i297–i298.

Nilssen AC (1984) Long range aerial dispersal of bark beetles and bark weevils (Coleoptera, Scolytidae and Curculiondae) in northern Finland. *Annales Entomologica Fennici*, 50, 37–42.

Nordlander G (1990) Limonen inhibits attraction to alpha pinene in the pine weevils Hylobius abietis and Hylobius pinastri. *Journal of Chemical Ecology*, 16(4), 1307–1320.

Nosil P (2002) Transition rates between specialization and generalization in phytophagous insects. *Evolution*, 56(8), 1701–1706.

Nuorteva M (1972) Die Geschwiindigkeit der Nahrungspassage durch den Darmkanal bei Hylobius abietis Imagines. *Annales Zoologici Fennici*, 38(3), 113–118.

Nylander JAA (2004) MrAIC.pl. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Odegaard F (2000) How many species of arthropods ? Erwin's estimate revised. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71, 583–597.

O'Meara B (2001) *Bacterial symbiosis and plant host use evolution in Dryophthorinae (Coleoptera, Curculionidae) : a phylogenetic study using parsimony and bayesian analysis*. Thèse de maître, Harvard University.

Palviainen M (2005) *Logging resiues and ground vegetation in nutrient dynamics of a clear-cut boreal forest*. Thèse de doctorat, University of Joensuu.

Peakall R, Smouse P (2001) GenAlEx V5 : Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.

Pesson P (1974) *Écologie forestière : la forêt, son climat, son sol, ses arbres, sa faune*. Géobiologie - Ecologie - Aménagement, Bordas, Paris.

Peterson MA, Denno RF (1998a) The influence of dispersal and diet breadth on patterns of genetic isolation by distance in phytophagous insects. *The American Naturalist*, 152(3), 428–446.

Peterson MA, Denno RF (1998b) Life-history strategies and the genetic structure of phytophagous insect populations. Dans : Mopper S, Strauss SY, rédacteurs, *Genetic structure and local adaptation in natural insect populations*, Chapman & Hall, New York, p. 236–322.

Petersson M, Örlander G, Nordlander G (2005) Soil features affecting damage to conifer seedlings by the pine weevil Hylobius abietis. *Forestry*, 78(1), 83–92.

Pettersson M, Kännaste A, Langström B, Borg-Karlson AK (2005) Why are the mini plants not attacked by the large pine weevil ? Emissions from mini plants and 1-year-old seedlings of Picea abies. Dans : *21st Annual Meeting of the ISCE*, p. 122.

Prinzing A (2003) Are generalists pressed for time ? An interspecific test of the time-limited disperser model. *Ecology*, 84, 1744–1755.

Ramirez CC, Fuentes-Contreras E, Rodriguez LC, Niemeyer HM (2000) Pseudoreplication and its frequency in olfactometric laboratory studies. *Journal of Chemical Ecology*, 26(6), 1423–1431.

Reay SD (2000) *Aspects of the ecology and behaviour of Hylastes ater (Paykull) (Coleoptera : Scolytidae) in second rotation Pinus radiata forests in the central North Island, New Zealand, and options for control.* Thèse de doctorat, University of Canterbury.

Örlander G, Nilsson U, Nordlander G (1997) Pine weevil abundance on clearcuts of different ages : a 6-year study using pitfall traps. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 15, 194–201.

Örlander G, Nordlander G, Wallertz K, Nordenhem H (2000) Feeding in the crowns of Scots pine trees by the pine weevil Hylobius abietis. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 15, 194–201.

Robinson M, Huchon D (2000) RRTree : Relative-Rate Tests between groups of sequences on a phylogenetic tree. *Bioinformatics*, 16, 296–297.

Roderick GK (1996) Geographic structure of insect populations : gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41, 325–352.

Roff DA (1994) Habitat persistence and the evolution of wing dimorphism in insects. *The American Naturalist*, 144(5), 772–798.

Saïd I, de la Torre RA, Morin JP, Rochat D (2006) Adaptation of a four-arm olfactometer for behavioural bioassays of large beetles. *Chemoecology*, 16, 9–16.

Saintonge F (2005) Une enquête concernant les attaques d'hylobe, présentation et résultats de 2003 et 2004. Rapport technique, Département Santé des Forêts DSF.

Saintonge FX, Malphettes CB (1996) Prevision des attaques d' Hylobes (Hylobius abietis L.) (Coleoptera ; Curculionidae) apres une coupe rase : Importance des sites de reproduction. *Revue Forestiere Francaise*, 48(2), 120–129. 1996 0035 2829 French.

Salinas S (2002) Entomopathogenic nematodes in Norwegian forest soils. *Nematology*, 4, 197.

Sandoval CP, Nosil P (2005) Counteracting selective regimes and host preference evolution in ecotypes of two species of walking-sticks. *Evolution*, 59, 2405–2413.

Sauer C, Dudaczek D, Hölldobler B, R G (2002) Tissue localization of the endosymbiotic bacterium Candidatus Blochmannia floridanus in adults and larvae of the carpenter ant Camponotus floridanus. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4187–4193.

Sauvard D (2004) *Bark and wood boring insects of living trees in Europe, a synthesis*, chapitre 7 - General biology of bark beetles. Kluwer Academic, p. 63–88.

Savelkoul PH, Aarts HJM, de Haas J, *et al.* (1999) Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis : the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3083–3091.

Scheirs J, Jordaens K, De Bruyn L (2005) Have genetic trade-offs in host use been overlooked in arthropods ? *Evolutionary Ecology*, 19, 551–561.

Schlyter F (2004) Semiochemicals in the life of bark feeding weevils. Dans : Lieutier F, Day KR, Battisti A, *et al.*, rédacteurs, *Bark and wood boring insects in liveing trees in Europe, a synthesis*, Kluwer Academic, Dordrecht, p. 351–364.

Schneider S, Küffer J, Rössli D, Excoffier L (2000) Arlequin Version 2.0 : a software for Population Genetic Data Analysis.

Schönwitz R, Merk L, Ziegler H (1989) Variability in the monoterpenes in needles of Picea abies (L) Karst. *Flavour Fragrance Journal*, 4, 149–153.

Schoonhoven LM, Jermy T, van Loon JJA (1998) *Insect-plant biology : from physiology to evolution*. Chapman & Hall.

Schröder D, Deppisch H, Obermayer M, *et al.* (1996) Intracellular endosymbiotic bacteria of Camponotus species (carpenter ants) : systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Molecular Microbiology*, 21, 479–489.

Selander J (1979) *Olfactory behaviour of the large pine weevil, Hylobius abietis L. (Coleoptera, Curculionidae) with pertinent aspects concerning its integrated control*. Thèse de doctorat, University of Helsinki.

Selander J, Kalo P, Kangas E, Perttunen V (1974) Olfactory behaviour of Hylobius abietis L. (Col., Curculionidae). I. Response to several terpenoid fractions isolated from Scots pine phloem. *Annales Entomologica Fennici*, 40, 108–115.

Shaffer JP (1981) The analysis of variance mixed model with allocated observations : applications to repeated measurements designs. *Journal of the American Statistical Association*, 76(375), 607–611.

Singer MC (1983) Determinants of multiple host use by a phytophagous insect population. *Evolution*, 37(2), 389–403.

Singer MC (2000) Reducing ambiguity in describing plant-insect interactions : "preference", "accpetability" and "electivity". *Ecology Letters*, 3, 159–162.

Singer MC, Parmesan C (1993) Sources of variation in patterns of plant-insect association. *Nature*, 361, 251–253.

Singer MS, Stireman JO (2005) The tri-trophic niche concept and adaptive radiation of phytophagous insects. *Ecology Letters*, 8, 1247–1255.

Skrzecz I, Moore R (1996) The attractiveness of pine branches infected with selected wood-colonising fungi to the Large Pine Weevil (Hylobius abietis). Dans : Grégoire JC, Liebhold AM, Stephen FM, *et al.*, rédacteurs, *Integrating Cultural Tactics into the Management of Bark Beetle and Reforestation Pests*, Northeastern Forest Experiment Station, Radnor, PA Forest Health Technology Enterprise Team, Ft. Collins, CO Forest Insect and Disease Research Staff, Washington, DC, Vallombrosa, Italy, p. 1–7.

Slatkin M (1973) Gene flow and selection in a cline. *Genetics*, 75, 733–756.

Solbreck C (1980) Dispersal distances of migrating pine weevils, Hylobius abietis, Coleoptera : Curculionidae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 28, 123–131.

Speight MR, Wainhouse D (1989) *Ecology and Management of Forest Insects*. Oxford Science.

Stauffer C, Lakatos F, Hewitt GM (1999) Phylogeography and postglacial colonization routes of Ips typographus L. (Coleoptera, Scolytidae). *Molecular Ecology*, 8, 763–773.

Strauss SY, Zangerl AR (2002) *Plant-animal interactions*, chapitre Plant-insect interactions in terrestrial ecosystems. Blackwell Publishing, p. 77–106.

Szmidt A (1983) Occurrence of parthogenesis in Hylobius abietis L. (Coleoptera, Curculionidae). *Polskie pismo entomologiczne*, 53, 191–194.

Thomas Y, Bethenod MT, Pelozuelo L, *et al.* (2003) Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, Ostrinia nubilalis Hübner. I. Sex pheromone, moth emergence timing, and parasitism. *Evolution*, 57(2), 261–273.

Thompson JN (1994) *The coevolutionary process*. Chicago University Press, Chicago.

Thompson JN (2005) *The geographic mosaic of coevolution*. University of Chicago Press.

Thorpe KV, Day K (2002) The impact of host plant species on the larval development of the large pine weevil Hylobius abietis L. *Agricultural and Forest Entomology*, 4, 187–194.

Thuillier A, Courtois JE, Chararas C (1966) Isolation of Candida brumptii from the mycetocytes of the larva of Hylobius abietis L. (Curculionidae xylophage). Study of its oxidases. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 262(26), 2757–2759.

Thuillier A, Lambin S, Courtois JE, Chararas C (1967) Isolation of an intracellular yeast, Candida brumptii, from a xylophagous insect, Hylobius abietis. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)*, 113(1), 97–107.

Ötük G, Deschamps AM (1983) Dégradation d'un tanin condensé par plusieurs types de levures. *Mycopathologia*, 83, 107–111.

Tscharntke T, Brandl R (2004) Plant-Insect Interactions in Fragmented Landscapes. *Annual Review of Entomology*, 49, 405–30.

Tunset K, Nilssen AC, Andersen J (1993) Primary attraction in host recognition of coniferous bark beetles and bark weevils (Col., Scolytidea and Curculionidae). *Journal of Applied Entomology*, 115, 155.169.

Turlings TCJ, Davison AC, Tamo C (2004) A six-arm olfactometer permitting simultaneous observation of insect attraction and odour trapping. *Physiological Entomology*, 29, 45.

Ueno H, Fujiyama N (1999) Genetic basis for established and novel host plant use in a herbivorous ladybird beetle, Epilachna vigintioctomaculata. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91, 245–250.

van Zandt PA, Mopper S (1998) A meta-analysis of adaptative deme formation in phytophagous insect populations. *The American Naturalist*, 152(4), 595–604.

Vet L, Janse C, van Achterberg C, van Alphen JJM (1983) Microhabitat location and niche segregation in two sibling species of Drosophilid parasitoids : Asobara tabida (Nees) and A. rufescens (Foerster) (Braconidae : Alysiinae). *Oecologia*, 61, 182–188.

Via S (1990) Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects : the experimental study of evolution in natural and agricultural systems. *Annual Review of Entomology.*

Visser JH (1986) Host odor perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 31, 121–144.

von Sydow F, Birgersson G (1997) Conifer stump condition and pine weevil (Hylobius abietis) reproduction. *Canadian Journal of Forest Research*, 22, 1254–1262.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* (1995) AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nuclear Acids Research*, 23(21), 4407–4414.

Wainhouse D (2004) Hylobius abietis - Host utilisation and resistance. Dans : *Bark And Wood Boring Insects In Living Trees In Europe A Synthesis.*, Kluwer, p. 365–379. Book.

Wainhouse D, Ashburner R, Boswell R (2001) Reproductive development and maternal effects in the pine weevil Hylobius abitetis. *Ecological Entomology*, 26, 655–661.

Watson PG (1999) Influence of insecticide, wax and biofungicide treatments, applied to Pinus sylvestris and Picea abies, on the olfactory orientation of the large pine weevil, Hylobius abietis L. (Coleoptera : Curculionidae). *Agricultural and Forest Entomology*, 1, 171–177.

Weir B, Cockerham C (1984) Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358–1370.

Wernegreen JJ (2002) Genome Evolution in Bacterial Endosymbionts of Insects. *Nature Genetics*, 3.

Wernegreen JJ (2004) Endosymbiosis : Lessons in Conflict Resolution. *PLoS Biology*, 2(3), 307–311.

Wernegreen JJ, Richardson AO, Moran NA (2001) Parallel acceleration of evolutionary rates in symbiont genes underlying Host nutrition. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(3), 479–485.

Wibe A, Borg-Karlson AK, Persson M, *et al.* (1998) Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in some conifers and receptor neurone discrimination of a-pinene and limonene enantiomers in the pine weevil, Hylobius abietis. *Journal of Chemical Ecology*, 24(2), 273–287.

Wilding CS, Butlin RK, Grahame J (2001) Differential gene exchange between parapatric morphs of Littorina saxatilis detected using AFLP markers. *Journal of Evolutionary Biology*, 14, 611–619.

Wood DL (1982) The role of pheromones, kairomones and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Annual Review of Entomology*, 27, 411–446.

Xiaosui W, Yuanyu K, Minqing S, *et al.* (2004) Biology of Hylobitelus xiaoi (Coleoptera : Curculionidae), a new pest of Slash Pine, Pinus elliottii. *Journal of Economic Entomology*, 97(6), 1958–1964.

Yazdani R, Nilsson JE, Ericsson T (1985) Geographical variation in the relative production of monoterpenes in cortical oleoresin of Pinus sylvestris in Sweden. *Silvae Genetica*, 34(6), 201–208. Référence trouvée dans Wibe et al 1997.

Yeh F, Yang RC, Boyle T (1997) POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis.

Zagatti P, Lempérière G, Malosse C (1997) Monoterpenes emitted by the large pine weevil, Hylobius abietis (L.) feeding on Scot pine, Pinus sylvestris L. *Physiological Entomology*, 22, 394–400.

Zahradnik J, M L (1991) *La grande encyclopédie des insectes*. Gründ.

Zangerl AR, Berenbaum MR (2003) Phenotype matching in wil parsnip and parsnip webworms : causes and consequences. *Evolution*, 57(4), 806–815.

Zherikhin VV (2000) Tertiary brachycerid weevils (Coleoptera : Brachyceridae) from the collections of Muséum National d Histoire Naturelle, Paris, with a review of other fossil Brachyceridae. *Paleontological Journal*, 34, S333–S343.

Abstract

Phytophagous insects are often specialized to a host-plant and develop adaptations for locating, reaching and exploiting this resource. The large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) rely on an ephemeral and rare resource since its larvae develop on dying conifers. However, forestry methods have modified the deal by providing more egg laying and feeding sites. Many factors of this pest's adaptation to its forest environment have been tested. Molecular markers showed that larval host-plants do not hinder gene flow and do not promote divergence in Hylobius. Strong insect dispersal has been confirmed by the low population structure at a large scale. In the laboratory, olfactive and oviposition preferences are weak, sometimes contradictory with larval performance, and are influenced by insect experience. Characterisation of weevil inhabiting bacteria revealed proximity with endosymbiotic strains known in other insects. They are probably involved in host-plant exploitation. This mutualistic association has been developed in the « deep time ». Altogether, the results evicted a host-plant specialization. The larval niche is a crucial point of the insect's biology as well as pest control strategies target as arena of evolution.

Keywords: insects-plants relationships, population genetics, adaptation to the host-plant, olfactometry, bacterial endocytobiosis

Résumé

L'association d'un insecte phytophage avec sa plante-hôte est telle que de fortes pressions de sélection s'exercent sur l'herbivore, le conduisant à se spécialiser. Entre autres, l'insecte développe des adaptations pour localiser, atteindre et exploiter la ressource végétale.

Le grand charançon du pin (*Hylobius abietis* L.) fait partie des insectes dont biologie et la dynamique de population sont déterminées par un facteur qui tend à n'exister qu'en quantité limitée dans l'espace et dans le temps puisque ses larves se développent sur des conifères mourants. Cependant, les méthodes d'exploitation forestière ont changé la donne pour cet insecte à une large échelle en Europe en accroissant le nombre sites de ponte et de nourriture. Nous avons donc testé plusieurs facteurs susceptibles de rendre compte de l'adaptation de l'Hylobe à son environnement forestier : influence de la géographie et de la plante hôte sur la structuration des populations, capacité de discrimination olfactive des essences et caractérisation de la flore microbienne associée.

L'utilisation de marqueurs moléculaires nous a permis de montrer que l'utilisation de différentes plantes-hôtes pour le développement des larves ne constitue pas une forte barrière au flux de gènes et ne semble pas induire de divergences chez l'Hylobe. En outre, notre étude confirme la forte capacité de dispersion de ce ravageur forestier comme en témoigne la faible structuration a grande échelle.

Des expériences de laboratoire ont permis de montrer que les charançons montrent une préférence quand on leur propose plusieurs essences même si elle n'est pas très marquée ni toujours conforme aux performances de leurs larves sur celle-ci. En outre ce comportement est influencé par l'expérience des individus qui montrent une grande plasticité.

Enfin, nous avons mis en évidence et caractérisé des souches bactériennes hébergées par le charançon. Ces bactéries, proches des souches endosymbiotiques connues chez d'autres insectes sont vraisemblablement impliquées dans l'adaptation de l'insecte à l'exploitation de sa plante-hôte. Nos résultats révèlent une association mutualiste entre deux partenaires qui s'est établie sur le « temps profond ».

L'ensemble de ces résultats a permis d'écarter l'existence d'une spécialisation à la plante-hôte chez *H. abietis* même si de vastes forêts monospécifiques pourraient conduire une adaptation « locale ». La niche larvaire apparaît comme le point crucial de la biologie de l'insecte, tant comme cible pertinente des stratégies de gestion de ce ravageur que comme arène de l'évolution de l'Hylobe.

Mots-clés: relations insectes-plantes, génétique des populations, adaptation à la plante-hôte, olfactométrie, endosymbiose bactérienne