

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

ÉCOLE DOCTORALE : Diversité du vivant

Par Floriane CHARDONNET

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Biologie des organismes

Rôle du gène *foraging* dans l'évolution du comportement alimentaire de noctuelles foreuses de céréales

Directeur de recherche : Laure Kaiser-Arnauld

Soutenance prévue le : 13 décembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

M. Emmanuel Desouhant , Professeur de l'Université UCBL (Villeurbanne)	Rapporteur
M. Alain Robichon , Directeur de Recherche CNRS à l'Institut Sophia Agrobiotech	Rapporteur
M. Christophe Lucas , Chargé de recherche à l'IRBI (Tours)	Examineur
Mme Martine Maibeche-Coisne , Professeur de l'Université UPMC (Paris)	Examinatrice
Mme Rejane Streiff , Chargée de recherche à l'INRA (Montferrier-sur-Lez)	Examinatrice
Mme Catherine Montchamp , Directrice de recherche au LEGS (Gif/Yvette)	Examinatrice
Mme Laure Kaiser-Arnauld , Chargée de recherche du LEGS (Gif/Yvette)	Directrice de thèse

Laboratoire de recherche :

Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation (LEGS)

Equipe DEEIT (Diversité, Ecologie et Evolution des Insectes Tropicaux, UR IRD 072)

CNRS

Bâtiment 13c

1 Avenue de la Terrasse

91198 Gif sur yvette

Tel : 01 69 82 37 48

Mail : floriane.chardonnet@legs.cnrs-gif.fr



Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements à ma directrice de thèse Laure Kaiser, pour cette expérience hors du commun qu'elle m'a permis de vivre au cours de ces trois années de thèse. Je la remercie pour ses enseignements, sa disponibilité, ses discussions scientifiques stimulantes et sa gentillesse au quotidien. Merci à mon comité de thèse, Christophe Lucas, David Giron, Jean-François Silvain, Bruno Le Rü, Catherine Montchamp-Moreau et Claire Capdevielle-Dulac, pour leurs conseils sur le choix des expérimentations à réaliser. Je remercie l'université Paris 6, l'école doctorale diversité du vivant (ED 392), le projet ANR « ADAPTANTHROP » (Adaptation des insectes aux anthroposystèmes, coordonné par Myriam HARRY), et le CNRS et l'IRD de Gif-sur-Yvette pour l'ensemble des fonds attribués, sans lesquels ce passionnant travail n'aurait pu être réalisé. Merci à Jean-François Silvain, directeur de l'unité de recherche IRD « Biodiversité et évolution des complexes plantes-insectes ravageurs-antagonistes », et à Pierre Capy, directeur du laboratoire « évolution génome et spéciation » pour leur accueil au CNRS de Gif-sur-Yvette.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe LEGS pour leur collaboration professionnelle et leur accueil convivial au sein du laboratoire. Mes remerciements vont tout particulièrement à Claire Capdevielle-Dulac pour son aide et son travail remarquable en biologie moléculaire, à Florence Mougél pour son aide précieuse en statistique, à Amandine Fossoud et Ferial Kaoula pour leur travail à l'élevage des noctuelles au laboratoire, à Annie Amirault et Sylvie Apruzzèse Sérazin pour toutes les tâches administratives liées à mon travail. Merci à tous les stagiaires Lise Prunier, Marion Möller, Nicolas Joly, et Thi Nguyet Minh Dao, ayant participé à ce projet. Je remercie également les membres de l'ICIPE pour leur soutien technique et l'approvisionnement en insectes. Merci également à l'IDEEV pour les bourses de participations aux colloques nationaux et internationaux, grâce auxquels j'ai pu diffuser une partie de mes résultats et en apprendre d'avantage.

Merci à Morgane, Axelle, Claire, François et Marion, pour ces bons moments passés au laboratoire et en-dehors. J'adresse enfin ma profonde reconnaissance à mes proches, dont le soutien permanent fut d'une aide inestimable durant l'accomplissement de ce travail.

Résumé

Avec l'augmentation des besoins alimentaires d'une population mondiale croissante, les surfaces dévolues à l'agriculture augmentent rapidement et soumettent l'environnement à de fortes pressions anthropiques. Certaines espèces d'insectes, capables de s'adapter à cette nouvelle ressource riche et abondante, acquièrent le statut de ravageurs en raison de leur impact économique négatif sur les cultures. L'espèce *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera : Noctuidae) est un représentant important des espèces ravageuses du maïs en Afrique et dans les pays méditerranéens. De façon caractéristique, cette noctuelle présente des populations écologiques distinctes. Elle colonise et ravage les champs de maïs dans les pays européens, tandis qu'elle demeure strictement inféodée aux herbacées sauvages en Afrique de l'est malgré la présence de cultures dans l'environnement. Les différences qualitatives de ces deux types de ressource suggèrent l'évolution de stratégies alimentaires distinctes, conférant aux insectes une fitness spécifique selon la plante-hôte consommée. Le gène *for* (*foraging*), qui code pour une protéine kinase dépendante de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP-PKG), est un gène candidat impliqué dans l'expression de stratégies alimentaires distinctes chez les arthropodes. Sur la base de ces connaissances, nous avons développé l'hypothèse que le gène *for* serait impliqué dans l'adaptation de *S. nonagrioides* aux plantes cultivées.

A partir d'une approche intégrative, nous avons testé cette hypothèse en comparant les deux populations écologiques de *S. nonagrioides* sur différents niveaux d'analyse. Ces populations se distinguent premièrement par des niveaux de recherche alimentaire différents (variation de la propension à se déplacer en présence de nourriture). De façon corrélative, deux variants alléliques du gène *for* ont été identifiés, respectivement associés à des niveaux d'expression différents. L'un des allèles est prédominant dans la population issue du maïs, alors que seul l'autre est présent dans la population sauvage. L'activation spécifique de la PKG via l'emploi d'un analogue de la GMPc a permis d'augmenter l'activité locomotrice associée à l'alimentation, suggérant un lien causal entre le gène *for* et les phénotypes comportementaux observés. L'analyse des traits d'histoire de vie et du niveau de plasticité comportementale des chenilles en réponse aux fluctuations de l'environnement nutritionnel, nous ont permis d'aborder la question des mécanismes impliqués dans le maintien du polymorphisme chez cette espèce. Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que le gène *foraging* est impliqué dans l'activité alimentaire de *S. nonagrioides*, et son polymorphisme pourrait prédisposer à l'apparition de populations d'insectes ravageurs.



Abstract

With the extension of agriculture areas in order to respond to the increase of the global food requirements, environment undergoes important anthropic pressures and changes fast. Some phytophagous insect species from the wild habitats have taken advantage of the abundant and nutritious cultivated host plants, where they establish and become pests. The species *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae) is an important representative of the insect pest species of corn in African and Mediterranean countries. Typically, this moth shows two populations distinct by their ecological preferences. One is a pest found on maize in European countries, while the other is exclusively found on wild herbaceous host-plants in Eastern Africa, in spite of the presence of maize and sorghum crops in the environment. The qualitative and quantitative differences between wild and cultivated resources should involve the expression and the selection of different foraging strategies. The *foraging* (*for*), which encodes a cGMP-dependent protein kinase (PKG), is a candidate gene and a major modulator of foraging strategies in a variety of arthropods. On the basis of this knowledge, we developed the hypothesis that this gene could be involved in the adaptation of *S. nonagrioides* to cultivated plants.

Following an integrative approach, we compared the crop and the wild populations of *S. nonagrioides*. These populations differed in their foraging behaviour, measured by how frequently they moved between food patches. We next identified a non-synonymous allelic variation of the gene, defining two allelic variants correlated with different level of gene expression. One variant was most common in the crop population and the other was ubiquitous in the wild population. Specific activation of the encoded cGMP-dependent PKG by an analogue of cGMP increased foraging activity, indicating a causal link between *for* and the identified behavioural phenotypes. The study of life history traits and of the level of behaviour plasticity in response to the fluctuations of nutritional environment, allowed us to discuss about the mechanisms involved in the polymorphism maintenance in this species. Together, our results suggest that evolution of the *foraging* gene could be one of the mechanisms involved in the adaptation of a phytophagous insect to a cultivated host plant.

Avant propos

L'objectif de ce manuscrit est de présenter de façon organisée l'intégralité de mon travail de thèse réalisé durant ces 3 dernières années. Mes recherches, effectuées sous la direction de Laure Kaiser-Arnauld, ont débuté en octobre 2010 au sein du laboratoire Evolution, Génome et Spéciation au CNRS de Gif-sur-Yvette. L'originalité de ce travail repose essentiellement sur l'utilisation d'une approche intégrative et pluridisciplinaire dans l'optique de comprendre les mécanismes génétiques impliqués dans l'adaptation des espèces aux différents environnements écologiques, et indirectement, d'appréhender les processus prédisposant à l'apparition d'espèces d'importance économique.

La diffusion des résultats obtenus étant essentielle pour la valorisation des avancées scientifiques réalisées, je me suis appliquée durant mon travail à transmettre ces découvertes par différents moyens de communications. Ce projet fait l'objet de : 5 publications scientifiques (1 publiée, 3 en préparation, et 1 article de synthèse du congrès « Biologie de l'insecte » de 2011 placé en annexe), 7 présentations orales dans le cadre de congrès ou séminaire universitaire, 3 posters présentés en colloques nationaux et internationaux, et 2 événements de vulgarisation scientifique.

Publications :

Chardonnet, F., Martinez-Takegami, P., Chouquet, B., Silvain, J.-F. and Kaiser, K. (2012). **An actimeter system for recording foraging activity in caterpillars.** *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142: 175–180.

- En préparation :

Chardonnet, F., Capdevielle-Dulac, C., Chouquet, B., Joly, N., Harry, M., Le Ru, B., Silvain, J.-F. and Kaiser, L. (2013). **Foraging behaviour of a Lepidoptera pest species modulated by a single gene polymorphism.**

Chardonnet, F., Capdevielle-Dulac, C., Le Ru, B., Mougél, F., Silvain, J.-F. and Kaiser, L. (2013). **Plastic behavioural and developmental responses to diet quality in a Lepidoptera and relationship with the foraging gene polymorphism**

Naino Jika, K., Le Ru, B., Capdevielle-Dulac, C., Chardonnet, F., Silvain, J.-F., Kaiser, L. and Dupas, S. **The ecology and phylogeography of *S. nonagrioides* analyzed from molecular markers.**

- Travaux complémentaires (annexe 3):

Chardonnet, F., Delava, E., Foray, V., Multeau, C., Vigneron, A. and Mondy, N. (2011). **The French touch in entomological biology: synthesis of the "16^e colloque de biologie de l'insecte.** *Annales de la Société Entomologique de France*, 3-4.

Présentations orales :

Quels sont les gènes impliqués dans l'évolution des comportements alimentaires de noctuelles foreuses de céréales? (2011). Journées du laboratoire Evolution Génome et Spéciation, Gif-sur-Yvette.

Le gène *foraging* serait-il impliqué dans l'apparition d'espèces de Lépidoptères ravageurs ? (2011). Journées Evosud, Orsay.

Rôle du gène *foraging* dans l'évolution du comportement alimentaire de noctuelles foreuses de céréales. (2011). Journées de l'école doctorale Diversité du Vivant, Roscoff.

Could the *foraging* gene be involved in becoming a pest in a Lepidoptera species? (2011). Colloque « *Annual Meeting of the EuroPhD Network in "Insect Sciences"* », Tours.

Rôle du gène *foraging* dans l'acquisition du statut de ravageur chez la sésamie du maïs, *Sesamia nonagrioides*. (2012). 34^{ème} réunion annuelle du groupe d'étude de biologie génétique des populations (le Petit Poids Dérivé), Avignon.

Posters :

Chardonnet, Chouquet, B., Le Ru, B., Silvain, J.-F. and Kaiser, K. (2010). **Automatisation de l'enregistrement de déplacements alimentaires chez une sésamie** ». 16^e Colloque « Biologie de l'Insecte », Lyon

Chardonnet, F., Capdevielle-Dulac, C., Chouquet, B., Joly, M., Le Ru, B., Silvain, J.-F. and Kaiser, L. (2012). **Involvement of the *foraging* gene in the acquisition of the pest status in a Lepidoptera species.** 16th Evolutionary Biology Meeting (EBM), Marseille.

Chardonnet, F., Capdevielle-Dulac, C., Chouquet, B., Joly, M., Le Ru, B., Silvain, J.-F. and Kaiser, L. (2013). **Single gene polymorphism and foraging activity of a pest Lepidoptera.** Congress of the European Society for Evolutionary Biology (ESEB congress), Lisbonne (Portugal)

Formations données :

Pourquoi un Lépidoptère devient-il un ravageur ? Hypothèse du gène *foraging* chez la sésamie du maïs (2012 - 2013). Enseignement aux étudiants du M2 DAA Protection des Cultures et Environnement (semaine "Ecologie chimique"), Université AgroParisTech.

Co-encadrement stagiaire de master 1, cursus BIP (P6) : « Une mutation qui fait des ravages - Variabilité génétique et physiologique chez un papillon foreur de poacées associé à un changement de plante hôte dû à l'anthropisation ».

Co-encadrement stagiaire de master 1, cursus éthologie (P13) : « Etude du comportement alimentaire à l'éclosion chez *Sesamia nonagrioides* ».

Co-encadrement stagiaire de master 2, cursus Ecologie-Ethologie (Saint-Etienne) : « L'adaptation au milieu cultivé chez la chenille *Sesamia nonagrioides* : rôle du gène *foraging* dans l'évolution du comportement alimentaire ».

Encadrement stagiaire L2 Bio+ (P11), « Rôle de la sélection sexuelle dans le maintien du polymorphisme du gène *for* au sein d'une population naturelle de *S. nonagrioides* ».

Animation de l'atelier « **Biodiversité et Lutte Biologique** », Fête de la science 2010 et 2011, Gif-sur-Yvette

Table des matières

INTRODUCTION	17
I - Changements anthropiques du milieu	18
II - Les ravageurs de cultures	19
III - Le gène <i>foraging</i>, facteur potentiel de l'adaptation aux changements rapides	22
IV - Objectifs	23
1/ Analyse des comportements de recherche alimentaire de chenilles foreuses de tiges	23
2/ Identification d'un substrat génétique sous-tendant l'expression des phénotypes comportementaux observés	24
3/ Etablissement d'un lien causal entre les comportements et le gène <i>for</i>	24
4/ Estimation du caractère adaptatif des différents morphes en fonction de la ressource alimentaire	24
 PREMIERE PARTIE : Cadre théorique	25
 I - L'approche du gène candidat	26
1/ L'approche du gène candidat en écologie comportementale	26
a) <i>Définitions</i>	26
b) <i>Méthodes</i>	26
2/ Les applications de l'approche gène candidat	30
a) <i>Modification artificielle des caractères</i>	30
b) <i>Estimation de l'influence d'un gène sur les processus évolutifs</i>	30
c) <i>Prédiction des comportements</i>	31
3/ Exemples d'utilisation de l'approche gène candidat en écologie comportementale ..	32
a) <i>Apprentissages et mémoire</i>	32
b) <i>Interactions sociales</i>	32
c) <i>Drosophila, modèle de prédilection en génétique des comportements</i>	33
 II - Conservation de la structure du gène <i>for</i>	35
1/ Structure de la PKG	35
a) <i>Structure secondaire</i>	35
b) <i>Structure tridimensionnelle</i>	37
2/ Fonctionnement cellulaire de la PKG	38
a) <i>Lieux de distribution de la PKG</i>	38
b) <i>Substrat et voies de signalisation de la PKG</i>	39

c) <i>Rôle de la PKG</i>	40
3/ Phylogénie du gène <i>for</i>	43
III - Conservation de la fonction du gène <i>for</i>	45
1/ Variation allélique du gène	45
a) <i>Drosophila melanogaster</i> : <i>Rover et Sitter</i>	46
b) <i>Ceanorabditis elegans</i> : <i>Roamer et Dweller</i>	51
2/ Pressions de sélection associées au maintien du polymorphisme.....	53
a) <i>La résistance aux conditions abiotiques</i>	53
b) <i>La densité des populations</i>	55
c) <i>La disponibilité des ressources alimentaires</i>	56
d) <i>Le parasitisme</i>	60
3/ Effet d'une variation des niveaux d'expression du gène	60
a) <i>Chez les abeilles Apis mellifera</i>	61
b) <i>Chez les fourmis</i>	63
c) <i>Chez les ravageurs de culture</i>	64
IV - Références	66
 DEUXIEME PARTIE : Approche expérimentale	73
I - Modèle biologique : <i>Sesamia nonagrioides</i>	74
1/ Classification	74
2/ Répartition géographique et structure génétique des populations	75
3/ Plantes hôtes	78
4/ Biologie de l'insecte	79
a) <i>Morphologie des différents stades</i>	79
b) <i>Cycle de développement</i>	81
5/ Moyens de lutte contre l'espèce	83
6/ Méthode d'élevage en laboratoire.....	85
a) <i>Elevage des stades larvaires</i>	86
b) <i>Récupération et traitement des chrysalides</i>	87
c) <i>Cages de pontes</i>	88
7/ Références.....	89
 II - Article 1 : Dispositif expérimental d'analyse des comportements	91
1/ Introduction.....	91

2/ Article: “An actimeter system for automated recording of foraging activity in stem borers caterpillars”	94
a) <i>Introduction</i>	94
b) <i>Materials and methods</i>	95
b.1. Insect sampling	95
b.2. Experimental design: the DAM system	96
b.3 Behavioural assays	96
b.4 Statistical analysis	98
c) <i>Results</i>	99
c.1. General locomotor activity with and without food (single monitor)	99
c.2. Effect of food quality manipulation (three monitors)	100
d) <i>Discussion</i>	102
e) <i>References</i>	104
3/ Discussion et conclusion.....	105
 III - Article 2 : le gène <i>for</i> associé aux comportements de recherche alimentaire chez <i>S. nonagrioides</i>	108
1/ Introduction.....	108
2/ Article: “Food searching behaviour of a Lepidoptera pest species modulated by the <i>foraging</i> gene polymorphism”	112
a) <i>Introduction</i>	113
b) <i>Results</i>	115
b.1. The gene is well conserved in the Lepidoptera and wild and crop populations present contrasted frequencies of allelic variants.....	115
b.2. Wild and crop populations present contrasting foraging behavioural phenotypes	117
b.3. Pharmacological treatment.....	120
b.4. Gene behaviour correlation.....	122
b.5. <i>SnFor</i> ^{Ser/Ser} and <i>SnFor</i> ^{Gly/Gly} homozygotes have different levels of <i>Snfor</i> gene expression	122
c) <i>Discussion</i>	124
d) <i>Experimental procedures</i>	129
d.1. Insect populations and rearing	129
d.2. Sequencing the <i>Snfor</i> gene.....	130
d.3. Comparing the <i>Snfor</i> sequence	130
d.4. Determination of the frequency of the two <i>Snfor</i> alleles and their related genotypes in the two populations	131
d.5. The “actimeter” system for the automated recording of the foraging activity.....	131
d.6. Pharmacological treatment.....	132
d.7. Gene-behaviour correlation	133

d.8. Comparison of the <i>Snfor</i> gene expression	133
e) <i>References</i>	135
3/ Explorations complémentaires et discussion des résultats	139
a) <i>Etablissement du lien causal entre le gène Snfor et les comportements locomoteurs</i>	139
b) <i>Quantification du niveau d'expression du gene for</i>	142
c) <i>Essai de quantification des niveaux d'activité PKG</i>	149
d) <i>Perspective : méthode alternative de quantification du niveau d'activité enzymatique</i>	152
IV - Article 3, facteurs potentiels du maintien du polymorphisme du gène <i>Snfor</i> dans les populations naturelles de <i>S. nonagrioides</i>	153
1/ Introduction.....	153
2/ Article: “Plastic behavioural and developmental responses to diet quality in a Lepidoptera and relationship with the <i>foraging</i> gene polymorphism”	156
a) <i>Introduction</i>	157
b) <i>Materials and methods</i>	159
b.1. Insect populations and rearing	159
b.2. Growth and evasion from diets of different qualities in the natural populations.....	160
b.3. Effect of the diet quality on the foraging activity pattern	161
b.4. Comparison of the <i>Snfor</i> gene expression between populations and nutritional conditions	162
b.5. Developmental and reproduction traits of the <i>S. nonagrioides</i> strains	163
c) <i>Results</i>	164
c.1. Growth rate of the natural population is affected by the diet quality...	164
c.2. Diet quality affects the escape rate of the natural populations.....	167
c.3. Foraging activity pattern are modulated by the diet quality in the natural populations and the homozygote strains	169
c.4. Levels of <i>Snfor</i> gene expression modulated by the diet quality and the population origin	170
c.5. Difference of fitness between the natural populations and homozygote strains in laboratory rearing conditions.....	171
d) <i>Discussion</i>	173
e) <i>References</i>	178
3/ Explorations complémentaires.....	181
a) <i>Traits d'histoire de vie et fitness des individus selon la ressource exploitée ..</i>	181
b) <i>Rôle de la sélection sexuelle</i>	182
c) <i>Valeur des hétérozygotes</i>	185
d) <i>Rôle de la consanguinité et de la dérive</i>	185

DISCUSSION GENERALE	188
I – Synthèse des résultats	189
1/ Conservation de la structure du gène <i>for</i> chez un Lépidoptère	189
2/ Conservation de la fonction du gène <i>for</i> chez un Lépidoptère	190
a) <i>Identification des phénotypes comportementaux des populations naturelles..</i>	190
b) <i>Etablissement du lien causal</i>	191
c) <i>Niveau d'expression du gène et niveau d'activité enzymatique</i>	192
d) <i>Approche écologique : variation des comportements en fonction de la qualité de la ressource alimentaire</i>	193
II – Facteurs potentiels de l'adaptation aux ressources cultivées	196
1/ Influence de la plante et de la distance géographique sur les fréquences alléliques de <i>Snfor</i>	196
2/ Race d'hôte : effet de la sélection de la plante par la femelles.....	198
3/ Dynamique de colonisation et potentiel de déplacement	200
4/ Résistance aux conditions environnementales.....	201
a) <i>Résistance au manque d'oxygène</i>	201
b) <i>Cytochrome P450 et résistance aux pesticides.....</i>	202
5/ Génétique du comportement : étude de systèmes complexes	202
III – Autres perspectives.....	204
1/ Physiologie digestive	204
2/ Transgénèse chez la drosophile <i>D. melanogaster</i>	205
3/ Expérimentations en condition naturelle ou semi-naturelle	206
REFERENCES	208
ANNEXES.....	212
ANNEXE 1 : Extrait du rapport de stage par Naino Jika A. Kader (M2, P6)	213
ANNEXE 2 : Article en préparation : “The ecology and phylogeography of <i>Sesamia nonagrioides</i> analyzed from molecular markers”	218
ANNEXE 3 : Article complémentaire : “The French touch in entomological biology: synthesis of the "16e colloque de biologie de l'insecte"." (2011). Chardonnet, F., Delava, E., Foray, V., Multeau, C., Vigneron, A. and Mondy, N.	238

INTRODUCTION

I/ Changement anthropique du milieu

L'augmentation croissante de la population mondiale et de ses besoins en ressources alimentaires nécessite un développement sans précédent des espaces dévolus à l'agriculture. Au cours des dernières décennies, les surfaces agricoles se sont étendues de près de 154 millions d'hectares chaque année afin de pouvoir répondre à cette demande vitale. Soumis à cette forte pression anthropique, l'environnement change rapidement (Foley et al. 2011). Cette modification majeure de l'occupation des sols constitue l'un des changements globaux prédominants de ce siècle. Selon la FAO (Food and Agriculture Organization) des Nations Unies, les surfaces agricoles couvrent aujourd'hui 4,91 milliard d'hectares, soit environ 38% de la surface des terres émergées non gelées. Certaines espèces végétales cultivées prédominent parmi ces estimations, telles que le riz, le maïs, et le blé, qui constituent actuellement 60% des ressources alimentaires humaines (Matson et al. 1997). L'importance capitale de ces céréales s'observe dans de nombreux pays tels qu'en Afrique, où la production de maïs s'est multipliée par deux entre les années 1980 et 2001, (Fakorede et al. 2003).

Ces transformations massives de l'environnement sous l'action de l'homme, appelée phénomène d'anthropisation, s'opèrent via l'expansion et l'intensification des systèmes agricoles. L'expansion est définie comme l'agrandissement des surfaces agricoles au détriment des écosystèmes naturels, tandis que l'intensification réfère à l'utilisation d'OGM, d'engrais, de biocides et de systèmes d'irrigation permettant l'amélioration des rendements agricoles. L'ensemble de ces transformations ont un impact drastique sur les habitats, dégradant la diversité biologique, le climat, et la qualité de l'eau et du sol sur une échelle globale (Foley et al. 2005 ; Tilman et al. 2002). Si l'ensemble des écosystèmes sont concernés, l'agriculture se développe aujourd'hui principalement dans les tropiques, où 80% des nouvelles parcelles cultivées sont établies après déforestation (Gibbs et al. 2010 ; FAO 2010). En Bolivie par exemple, la culture du quinoa a augmenté de 206% en 40 ans, entraînant une déforestation massive du périmètre (figure 1).

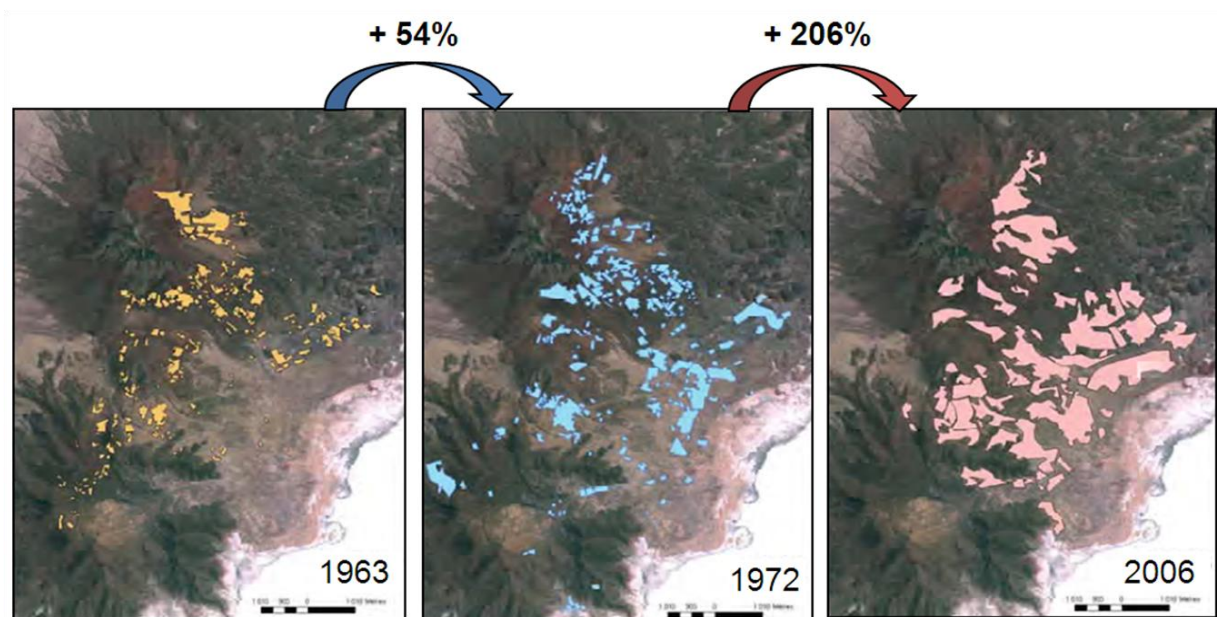


Figure 1. Evolution des zones de déforestation en Bolivie entre 1963 et 2006 (Amérique andine), conséquence de l'expansion des cultures de quinoa (Vassas comm. pers.).

De façon générale, ces changements dans l'usage des terres entraînent une altération des interactions biotiques et des patterns de disponibilité des ressources, exposant les espèces à une diminution de la diversité et de l'abondance (fragmentation des écosystèmes) de leurs ressources alimentaires naturelles (Foley et al. 2011, Matson et al. 1997). Certaines espèces d'insectes ont cependant été capables de s'adapter à ces modifications rapides de leur environnement en s'adaptant aux ressources cultivées, devenant de ce fait des ravageurs de cultures.

II/ Les ravageurs de culture

Un ravageur de culture est une espèce (ou une population d'espèce) qui exploite de manière plus ou moins stricte une ressource végétale agricole, forestière ou ornementale. De façon anthropocentrique, ces espèces sont dites « nuisibles », en raison de leur incidence économique négative directe (consommation) ou indirecte (perte de valeurs commerciales) sur les bénéfices de production attendus par l'homme (Rebaudo, 2012).



Figure 2. Exemples d'espèces ravageuses. De gauche à droite : larve et adulte de doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* (©Jean-Luc DUVAL) ; Adultes du charançon des rosiers, *Merhynchites wickhami* (©Adrian Thyse) ; Larve du sphinx du tabac, *Manduca sexta* (©Joanna Reuter)

Ce sont des insectes phytophages qui se nourrissent de matière végétale au détriment des plantes-hôtes exploitées. Les phytophages se distinguent en fonction des tissus végétaux qu'ils consomment. A titre d'exemple, nous pouvons citer les phyllophages (feuilles), les xylophages (bois), les clétrophages (granivores), ou encore les carpophages (frugivores). Les insectes phytophages sont pour la plupart des Coléoptères (Chrysomeloidea et Curculionoidea) avec 135 000 espèces décrites (Lawrence 1982), et des Lépidoptères avec plus de 140 000 espèces identifiées (Powell et al. 1999) (figure 2). Ce peuvent être des espèces autochtones ou introduites, attaquant pour l'essentiel des angiospermes, elles-mêmes autochtones ou introduites.

Parmi cette multitude d'espèces, peu d'entre elles sont définies comme des ravageurs de cultures. La diversité des lépidoptères foreurs de tiges récoltés sur des plantes hôtes appartenant au clade des monocotylédones (Poaceae, Cyperaceae et Typhaceae) à Madagascar, à Zanzibar, et en Afrique, constitue un exemple illustratif de ce phénomène (Le Ru et al. 2006). Parmi les 135 espèces de lépidoptères recensés sur 75 espèces de plantes sauvages, seulement 6 d'entre elles sont des ravageurs principaux ou secondaires des cultures en Afrique du Sud et de l'Est (Ingram 1958, Nye 1960, Polaszek 1998, Guofa 2002). Les espèces *Busseola fusca* (Noctuidae), *Sesamia calamistis* (Noctuidae), *Sesamia nonagrioides* (Noctuidae), *Chilo partellus* (Pyralidae), *Chilo orichalcociliellus* (Pyralidae), et *Eldana saccharina* (Pyralidae), représentent ainsi moins de 4% de la totalité des espèces identifiées dans cette étude.

Avec l'augmentation rapide des espaces dévolus à l'agriculture, le risque d'apparition et d'expansion territoriale des lépidoptères ravageurs de culture augmente (Zavaleta & Hulvey

2004). Pourtant, peu d'espèces d'exploitent cette nouvelle ressource riche et abondante, alors qu'un tel environnement nutritionnel favorable et vraisemblablement plus prédictif devrait favoriser un changement de ressource végétale. De plus, les espèces d'insectes ravageurs ont des apparentés phylogénétiquement proches, ou même des populations de leur propre espèce, strictement inféodés aux plantes sauvages (Zhang 1994, Kristensen 1999). Ces observations soulèvent la question des mécanismes évolutifs impliqués dans l'adaptation aux ressources cultivées. Certains traits d'histoire de vie spécifiques devraient ainsi moduler le potentiel adaptatif d'une population d'insectes phytophages à une nouvelle ressource alimentaire, en fonction de la disponibilité de cette nouvelle niche écologique.

La noctuelle *Sesamia nonagrioides* Lefèbvre (Lepidoptera : noctuidae) fait partie du petit nombre d'espèces ayant été capable de s'adapter aux céréales cultivées (figure 3). Originnaire d'Afrique, elle est aujourd'hui considérée comme un ravageur important du maïs et du sorgho dans l'ensemble des pays du pourtour méditerranéen (Anglade 1972, Cordero et al. 1998, Moyal et al. 2011). De façon intéressante, cette espèce foreuse de tige présente différentes populations caractérisables en fonction de leur préférence écologique.



Figure 3. *Sesamia nonagrioides* adultes (©Triturus)

En Europe, celle-ci est préférentiellement trouvée sur plantes cultivées, tandis qu'à l'Est de la Rift Valley en Afrique, l'espèce demeure strictement inféodée aux plantes herbacées sauvages (par exemple, Typhaceae) (Nye 1960, Ong'Amo et al. 2013). En raison d'une intensification des cultures destinée à l'amélioration des rendements agricoles via l'irrigation des sols et l'application de fertilisants, les plantes cultivées sont plus riches en eau et en nutriments que les Poacées sauvages (Matson et al. 1997, Schoonhoven et al. 1998). Les différences qualitatives et quantitatives de ces deux types de ressource suggèrent l'évolution de stratégies alimentaires distinctes, conférant une fitness spécifique aux individus de *S. nonagrioides* selon la plante-hôte consommée.

III/ Le gène *foraging*, facteur potentiel de l'adaptation aux changements rapides

Les différences comportementales sont courantes entre individus d'une même espèce, et celles-ci ont des conséquences importantes pour l'écologie et l'évolution des populations (Sokolowski et al. 1997). Le gène *foraging* (*for*), qui code pour une protéine kinase dépendante de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP-PKG), est un gène candidat pour l'étude de l'évolution des comportements alimentaires et des interactions gène-environnement (GEI). Les analyses phylogénétiques ont permis d'identifier une forte conservation de la structure et de la fonction de ce gène parmi de nombreuses espèces de l'embranchement des arthropodes (Fitzpatrick et al. 2005, Kaun et al. 2009, Sokolowski 2002). Ainsi, *for* pourrait constituer un facteur déterminant pour l'étude des mécanismes impliqués dans l'adaptation à des ressources alimentaires spécifiques.

Chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Sokolowski 2001) et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fujiwara et al. 2002), ce gène présente deux variants alléliques naturels associés à l'expression de deux phénotypes comportementaux distincts. Chez d'autres espèces, et plus particulièrement chez les hyménoptères sociaux (les abeilles *Apis mellifera* et les fourmis *Pheidole pallidula*), la modulation des comportements de recherche alimentaires résultent d'une variation du niveau d'activité du gène au cours de l'ontogénèse (Ben-Shahar 2005, Lucas & Sokolowski 2009). La drosophile *D. melanogaster*, présente deux allèles nommés « *rover* » et « *sitter* », chacun associé à l'expression d'une stratégie alimentaire spécifique. Les individus *rovers* se déplacent sur de plus longues distances et ont d'avantage tendance à quitter un site de nourriture que les *sitters* (Sokolowski 1980 ; Sokolowski 2001 ; Pereira & Sokolowski 1993). De plus, les individus *rovers* bénéficient de meilleures performances métaboliques, compensant ainsi la forte dépense énergétique inhérente à la locomotion (Kaun et al. 2007a, Kent et al. 2009). Ces caractéristiques confèrent un avantage adaptatif aux *rovers* lorsque que les ressources alimentaires sont pauvres ou limitées. Toutefois, le fort coût énergétique corrélé à l'expression d'une stratégie alimentaire de type *rover*, agirait en faveur des *sitters* dont la fitness est supérieure lorsque les ressources sont abondantes et non limitantes (Sokolowski et al. 1997). Ainsi, le polymorphisme du gène *for* est maintenu à l'état naturel en raison d'une relation dynamique entre le gène *for* et les conditions environnementales (Kent et al. 2009, Sokolowski et al. 1997).

Ce corpus de connaissances conjuguant les aspects génétique, physiologique, comportemental et écologique de la recherche alimentaire, suggèrent l'importance du gène *foraging* dans l'établissement de stratégies adaptées au type de ressources consommées. L'évolution du gène *for* pourrait ainsi contribuer à l'expression de préférences écologiques distinctes comme identifiées parmi les différentes populations de *S. nonagrioides*. Cette espèce peut être considérée comme un modèle intéressant pour étudier la conservation de la fonction du gène *for* chez un lépidoptère et de son rôle dans l'apparition de populations d'insectes ravageurs.

IV/ Objectifs

L'objectif principal de ce projet de thèse est de rechercher des mécanismes potentiellement adaptatifs impliqués dans l'évolution des populations d'insectes en réponse à des changements d'origine anthropique de leur milieu naturel. Sur la base d'une approche gène candidat, cette recherche sera abordée sur de multiples niveaux allant du gène aux comportements. Le travail réalisé s'inscrit ainsi dans une approche intégrative permettant d'étudier l'implication du gène *for* dans l'expression de stratégies alimentaires spécifiques. Quatre grands axes principaux ont été développés afin de répondre aux hypothèses développées dans cette étude.

1/ Analyse des comportements de recherche alimentaire de chenilles foreuses de tiges

S. nonagrioides étant une espèce non modèle et endophyte au stade larvaire, seul stade phytophage, peu de moyens étaient jusqu'ici disponibles pour analyser les comportements des individus. Le premier objectif consistait à développer une méthode originale et efficace d'analyse des déplacements alimentaires des stades larvaires de cette espèce. Le dispositif expérimental permettra d'identifier les phénotypes comportementaux spécifiques associés au type de ressource alimentaire exploitée par les différentes populations.

2/ Identification d'un substrat génétique sous-tendant l'expression des phénotypes comportementaux observés

En lien avec les différences comportementales observées, les populations écologiques seront comparées sur plusieurs niveaux d'analyse. Les variations moléculaires seront estimées à partir du séquençage du gène *foraging* suivi d'une comparaison des séquences obtenues. Ces résultats permettront d'identifier un éventuel polymorphisme du gène. Les recherches porteront également sur les niveaux d'expression du gène (qPCR) et les niveaux d'activité de la PKG (enzymologie). L'ensemble des résultats seront mis en perspective avec les conditions environnementales et nutritionnelles des différentes populations.

3/ Etablissement d'un lien causal entre les comportements et le gène *for*

Afin d'établir un lien causal entre le génotype et les phénotypes comportementaux identifiés, une approche pharmacologique sera employée. Ce procédé permettra de moduler artificiellement les niveaux d'activité de la PKG, et d'en observer les effets sur les niveaux de déplacements alimentaires

4/ Estimation du caractère adaptatif des différents morphes en fonction de la ressource alimentaire

La composante transmissible du polymorphisme du gène *for* nous permettra d'étudier les avantages sélectifs relatifs aux différents morphes (Ford 1964). La variabilité phénotypique observée au niveau des comportements de recherche alimentaire, associée la variabilité génétique du gène *for* (héritabilité), pourrait en effet résulter de pressions de sélection différentielles et dépendantes de l'environnement de développement des individus. Les traits d'histoire de vie de chacune des populations écologiques seront étudiés afin de discuter de la valeur adaptative relative des différentes stratégies alimentaires exprimées par les individus de *S. nonagrioides* en fonction de la plante-hôte consommée.

PREMIERE PARTIE

Cadre théorique

I – L’approche du gène candidat

1/ L’approche gène candidat en écologie comportementale

a) Définition

Les gènes ont un rôle déterminant dans la physiologie, la morphologie et la biochimie d’un organisme, et prédisposent ainsi l’expression de phénotypes comportementaux distincts. Malgré plusieurs millions d’années de divergence évolutive, il est fréquent d’observer une conservation de leur séquence et de leur fonction parmi différents taxons du règne animal. Le terme de « gène candidat » est alors employé pour définir ces gènes dont la fonction identifiée au sein d’un organisme apparaît comme similaire chez d’autres espèces (i.e. influence l’expression de phénotype analogue) (Fitzpatrick et al. 2005). A titre d’exemple, nous pouvons citer les gènes candidats *MHC II* (Major histocompatibility complex class 2, impliqué dans les fonctions immunitaires) et *MC 1R* (Melanocortin-1 receptor, impliqué dans le polymorphisme de coloration), dont les processus biologiques, biochimiques et moléculaires sont indépendants de l’espèce considérée (par exemple, voir Bernatchez & Landry 2003, Garrigan & Hedrick 2003, Piertney & Oliver 2006 ; Hoekstra 2006, Mundy 2005, Nachman et al. 2003).

Ainsi, l’approche du gène candidat réfère à l’identification de tels gènes sur la base des informations relatives à leur fonction. Cette approche constitue un outil efficace pour étudier les phénotypes comportementaux associés à l’expression d’un gène particulier. Elle permet ainsi d’améliorer notre compréhension des processus impliqués en écologie comportementale (Fitzpatrick & Sokolowski 2004, Fitzpatrick et al. 2005, Piertney & Webster 2010, Sokolowski 2001). La convergence des études portant sur les mécanismes biologiques et évolutifs des comportements via l’approche du gène candidat ouvre de larges perspectives aux recherches pluridisciplinaires et intégratives (Fitzpatrick et al. 2005).

b) Méthodes

Malgré l’intérêt grandissant pour les variations génétiques associées à l’expression de traits phénotypiques d’importance adaptative ou écologique, la complexité de cette approche nécessite l’emploi d’une méthode rigoureuse. En effet, plusieurs difficultés sont inhérentes à l’analyse des substrats génétiques sous-tendant l’expression de phénotypes comportementaux.

D'une part, les gènes interagissent entre eux de façon dynamique (i.e. épistasie), et un gène unique peut avoir des fonctions multiples (i.e. pléiotropie). D'autre part, les comportements exprimés peuvent être compris comme émanant d'une interdépendance entre les gènes et l'environnement auquel sont confrontés les organismes (Robinson 2004, Sokolowski 2001). Pour finir, si les espèces modèles sont fréquemment employées en perspective d'obtenir une compréhension généralisable des processus impliqués en génétique du comportement, il reste toutefois délicat d'en transposer les connaissances aux organismes non-modèles (Piertney & Webster 2010).

α. Analyse des comportements

Les comportements sont définis comme les actions et réactions d'un animal en réponse aux conditions de son environnement interne et externe. De part la diversité des facteurs pouvant moduler leur expression, ils font partis des phénotypes les plus complexes à étudier. Premièrement, les comportements sont difficiles à définir et à quantifier de façon pratique. En effet chaque séquence comportementale inscrite dans un paradigme précis peu être fractionnée en un ensemble de patterns comportementaux plus réduits (Sokolowski 2001). Par exemple, le comportement de parade sexuelle chez la drosophile peut être décomposé en un ensemble d'éléments plus simple tels que l'orientation vers le partenaire, la prise de contact (attouchement) et le chant, qui aboutiront au comportement d'accouplement en cas de succès. Il convient alors de déterminer les éléments comportementaux pertinents dans le cadre d'une analyse en génétique des comportements.

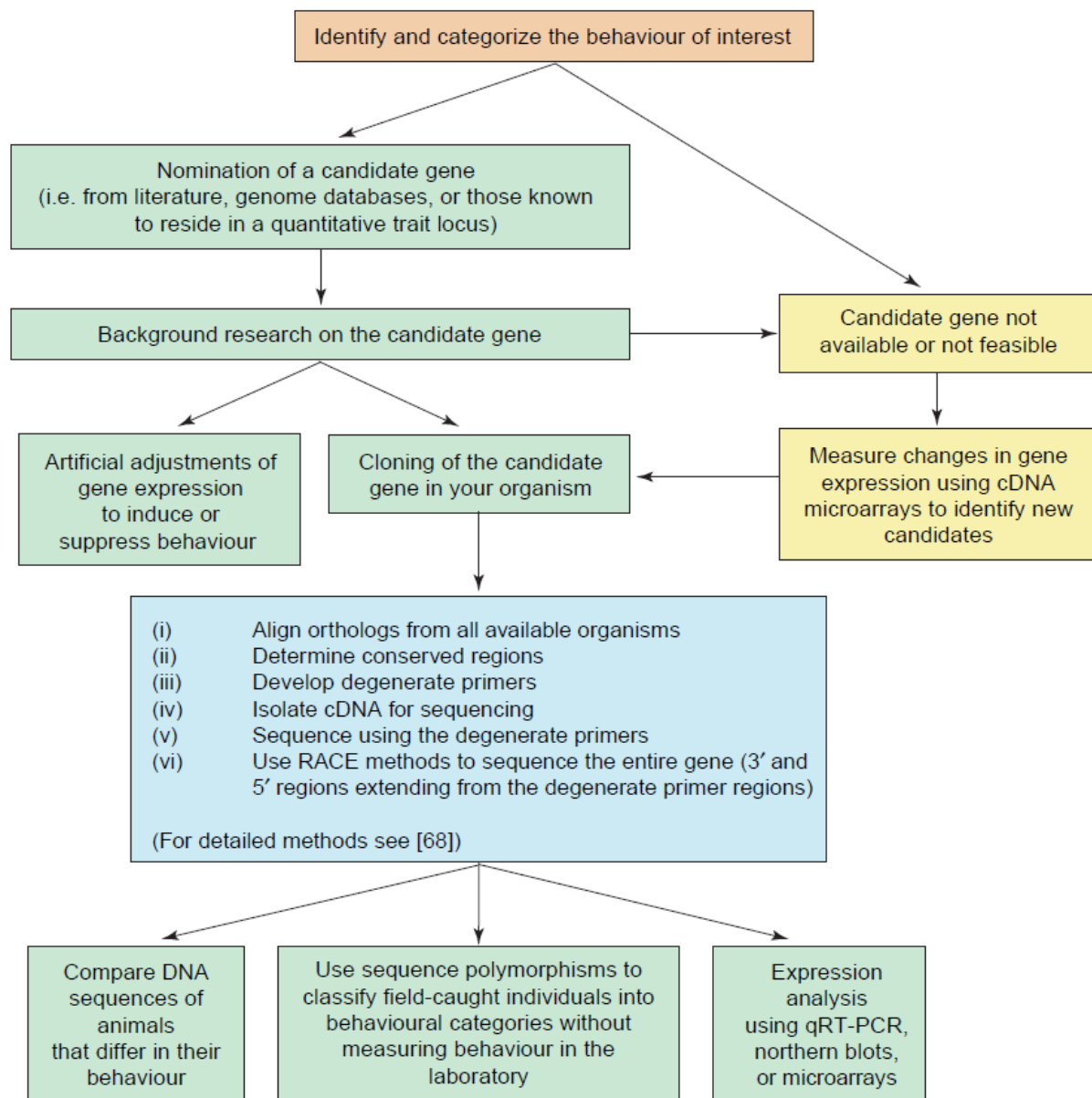
Sur la base d'une définition claire des comportements quantifiables, deux points méthodologiques majeurs sont à prendre en compte. D'une part, il s'agit de réduire les nombreuses variations intra-individuelles en minimisant l'influence de l'ontogénèse sur les comportements, via l'utilisation d'animaux d'âge, d'état reproducteur, et d'expérience comparables. Et d'autre part, de maximiser les variations intergroupes (i.e. entre lignées) par un choix approprié de conditions environnementales adaptées aux hypothèses testées (Sokolowski & Hansell 1992). A la différence des phénotypes non comportementaux (comme le développement d'un organe par exemple), les comportements sont soumis à des contraintes développementales plus réduites et sont donc d'avantages susceptibles de varier face aux conditions environnementales. Il est également indispensable de tenir compte du fait qu'un unique pattern comportemental peut être la résultante de l'expression de plusieurs

gènes, fonctionnant eux-mêmes dans différents tissus à différents moments de l'ontogénèse d'un organisme (Sokolowski 2001).

β. Analyse moléculaire

Les recherches en écologie moléculaire reposent en grande partie sur la caractérisation de la diversité génétique des organismes. Toutefois, les gènes candidats ne sont pas toujours identifiés, et la transposition des connaissances à d'autres organismes relativement divergents des espèces modèles étudiées est peu envisageable. Lorsque les gènes n'ont pas été antérieurement décrits, une analyse des niveaux d'expression d'un ensemble de gènes corrélé à l'expression de comportement différents est réalisable à partir de puces à ADN (Stearns & Magwene 2003). Les gènes dont les niveaux d'expression varient en fonction des phénotypes comportementaux observés sont alors sélectionnés. Lorsque les gènes sont déjà identifiés (via la littérature par exemple), une approche dite ascendante (« bottom-up ») est la plus fréquemment employée (Pierny & Webster 2010) (Figure 4).

Une fois sélectionné, le gène candidat est isolé et séquencé par PCR (*polymerase chain reaction*), via la construction d'amorces adaptées. La sélection des amorces est une étape importante car malgré le haut niveau de conservation attendu dans une approche gène candidat, des divergences évolutives ont pu apparaître entre l'organisme étudié et l'espèce modèle de référence. Dans un premier temps, les régions conservées des séquences protéiques codées sont reconnues en effectuant un alignement des séquences des orthologues disponibles (Fitzpatrick et al. 2005). Une région conservée est identifiée lorsque qu'une chaîne d'acides aminés est présente dans l'ensemble des orthologues sélectionnés. Dans de rare cas, les amorces développées pour une autre espèce peuvent être directement utilisées lorsque que les deux organismes sont suffisamment proches phylogénétiquement (Edwards et al. 1995; Edwards & Potts 1996). Cependant, il est plus généralement nécessaire d'avoir recours à l'emploi d'amorces dégénérées, qui ont pour caractéristique de contenir toutes les combinaisons nucléotidiques possibles permettant d'obtenir les régions conservées de l'espèce étudiée (Fitzpatrick et al. 2005, Pierny & Webster 2010). Ces amorces sont développées par transcription inverse puisque le séquençage des régions codantes du gène repose sur l'amplification d'ARNm.



TRENDS in Ecology & Evolution

Figure 4. Organigramme de l'approche gène candidat (Fitzpatrick et al. 2005)

Le produit PCR obtenu à partir des amorces dégénérées est ensuite séquencé puis comparé aux autres orthologues connus (alignement) afin de s'assurer de l'appartenance du fragment au gène candidat. De nouvelles amorces sont dessinées à partir de ce fragment afin d'explorer les régions exoniques se situant en amont et en aval de celui-ci, régions où peuvent exister des variations supplémentaires de la séquence ADN. La méthode RACE (rapid amplification of cDNA ends) permet notamment le clonage et le séquençage complet de la partie codante du gène candidat à partir de l'ADNc (Schaefer 1995). L'identification des variations alléliques fixées au sein de l'espèce peut ensuite être réalisée par « Northern blot » (aussi appelé transfert

d'ARN). En génotypant chaque individu sur un gel, le nombre de bandes obtenues permettra d'identifier le nombre et la taille des différents transcrits du gène (Palumbi 2002; Vasemagi & Primmer 2005). Pour finir, le niveau d'expression des différents variants peut être analysé par qRT-PCR (*Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR* ; Schaefer 1995).

2/ Les applications de l'approche Gène candidat

a) Modifications artificielles des caractères

Une fois le gène choisi et associé à l'expression de phénotypes comportementaux différents, son niveau d'expression peut être artificiellement modulé. Mettre en évidence une altération des phénotypes comportementaux en réponse aux variations du niveau d'expression du gène permet de s'affranchir d'une simple hypothèse corrélative et d'établir un lien causal entre le gène et le comportement. Plusieurs méthodes sont aujourd'hui disponibles pour atteindre cet objectif. Premièrement, il est possible pour un petit nombre d'espèces modèles de créer des organismes transgéniques, dont les constructions génétiques permettront d'altérer les niveaux d'expression du gène ciblé (Fitzpatrick et al. 2005). Ces niveaux peuvent être augmentés par surexpression du gène, supprimés par « knocking out », ou simplement réduits. Par exemple, la méthode des RNAi (*RNA-mediated interference*, inhibant l'expression d'un gène par destruction de molécules d'ARNm spécifiques) a récemment permis de mettre en évidence le rôle du gène *Smn* (*Survival motor neuron*) dans la régulation de l'activité des motoneurones associés aux performances locomotrices de *D. melanogaster* (Timmerman & Sanyal 2013). Une deuxième méthode, plus fréquemment employée lorsque les études portent sur des espèces non modèles, consiste à utiliser un agent pharmacologique connu pour moduler le niveau d'expression du gène ciblé (Fitzpatrick et al. 2005). Notamment, le rôle du gène candidat *foraging* sur les niveaux d'activité de recherche alimentaire fut démontré chez plusieurs espèces d'arthropode via l'emploi d'un analogue de la GMPc (guanosine monophosphate cyclique, second messenger de la protéine kinase PKG codée par *foraging*) (Dawson-Scully 2010, Ben-Shahar et al. 2002, Lucas & Sokolowski 2009).

b) Estimation de l'influence d'un gène sur les processus évolutifs

Le rôle d'un gène sur des processus évolutifs majeurs tels que la spéciation, peut être abordé par le biais d'une approche comparative. En effet, la comparaison d'espèces

phylogénétiquement proches, ou de populations divergentes au sein d'une même espèce, permet d'obtenir de nombreuses informations sur les mécanismes évolutifs des comportements (Fitzpatrick & Sokolowski 2004, Fitzpatrick et al. 2005). Par exemple, les comportements sexuels impliqués dans l'établissement d'un isolement reproducteur font partie des mécanismes contribuant au phénomène de spéciation (Panhuis et al. 2001). Par transfert du gène *no-on-transient A* (*nonA*, connu pour ses fonctions sur la vision et les comportements sexuels) de la drosophile *Drosophila virilis* à la drosophile *D. melanogaster* (transgénèse), Campesan et al. (2001) furent capable de créer une lignée transgénique de *D. melanogaster* exprimant dans sa parade sexuelle des comportements spécifiques à *D. virilis*. De plus, cette lignée initialement aveugle (puisque *knockout* pour sa propre copie du gène *nonA*) présentait une vision restaurée. Ces résultats suggèrent que le gène *nonA* est porteur d'informations spécifiques au genre *Drosophila*, malgré la conservation de sa fonction sur le système visuel au sein des deux espèces (Campesan et al. 2001).

Les gènes candidats sont également de très bons outils pour étudier la fitness (valeur adaptative) et les pressions de sélection associées à l'expression de phénotypes spécifiques dans un environnement particulier. De façon illustrative, nous pouvons citer l'exemple du gène candidat *MC 1R*, impliqué dans le polymorphisme de pigmentation des téguments (peau, poils, plumes) parmi de nombreux taxons (Nachman et al. 2003, Mundy 2005, Hoekstra 2006). Dans le cas de la souris *Chaetodipus intermidus*, la fréquence des différents allèles de ce gène varie en fonction de l'habitat des individus. Cette espèce de rongeur issue des régions désertiques du sud des Etats-Unis présente deux morphes de couleurs différentes : une forme au pelage clair, et une forme mélanique (sombre) résultant d'une mutation de *MC 1R* (Nachman et al. 2003). En raison d'une forte pression de prédation (terrestre et aérienne), les individus clairs prédominent dans les populations se développant en milieux rocheux et clair, tandis que les individus plus sombres sont majoritaires dans les populations vivant sur du basalte noir. Cette pression de sélection drastique favorisant systématiquement le morphe le plus cryptique en fonction de son habitat, permet ainsi d'expliquer les variations de fréquence des 2 allèles au sein des populations de *C. intermidus*.

c) Prédiction des comportements

Lorsqu'il existe une influence directe d'un polymorphisme allélique sur les comportements, et notamment dans le cas particulier des SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), l'identification des allèles portés par un individu permet d'en prédire le phénotype. Cette

approche est particulièrement utile lorsque les phénotypes ne sont pas caractérisables par des traits morphologiques directement perceptibles (Fitzpatrick et al 2005). Par extrapolation, cette méthode pourrait permettre de prédire les comportements d'individus capturés en milieu naturel quel que soit le stade de développement, ou encore de prédire la fréquence et la répartition des différents phénotypes au sein d'une population. Si cette méthode permet de réduire considérablement les analyses comportementales et les problèmes méthodologiques qui y sont associés, il est toutefois nécessaire de rester critique face à de telles généralisations. En effet, bien que génétiquement basés, les comportements ne sont pas strictement déterminés. Résultant d'une interdépendance entre les gènes et l'environnement, ils sont prédisposés à être exprimés dans des conditions environnementales particulières (Sokolowski 2001).

3/ Exemple d'étude en écologie comportementale basée sur l'approche gène candidat

a) Apprentissages et mémoire

Les mécanismes cellulaires et génétiques impliqués dans les capacités d'apprentissage sont particulièrement bien conservés au sein du règne animal (Alberini 1999, Tully et al. 2003). Par exemple, le gène candidat *FoxP2* influence à la fois les mécanismes d'apprentissage du langage chez l'être humain, et ceux du chant chez les oscines (Marler 1990, Doupe & Kuhl 1999). Le niveau d'expression de ce gène est particulièrement élevé dans les structures nerveuses associées à l'apprentissage du chant chez les oiseaux (Haesler et al. 2004), tandis qu'une mutation de *FoxP2* chez l'être humain entraîne de sévères anomalies dans la formation du langage (Lai et al. 2001). De façon générale, ces résultats montrent l'existence d'une conservation des mécanismes génétiques sous-tendant l'expression de traits complexes tels que l'apprentissage.

b) Interactions sociales

Les interactions sociales constituent un paradigme largement étudié en écologie comportementale. Les comportements sociaux étant pour une grande part modulés par les fonctions endocrines et neuro-peptidiques, plusieurs gènes candidats ont pu être identifiés et étudiés pour mieux comprendre l'évolution des interactions sociales (Fitzpatrick 2005). Par

exemple, la vasopressine est un neuropeptide connu pour son rôle important dans l'expression des comportements reproducteurs et parentaux des mammifères mâles. Sur la base de ces connaissances, Insel & Young (2000) démontrèrent l'influence du gène *V1aR* (vasopressin V1a receptors) dans l'établissement de stratégies d'appariement distinctes. Chez les campagnols, les espèces phylogénétiquement proches *Microtus ochrogaster* et *M. montanus* expriment toutes deux des comportements de soins biparentaux, mais diffèrent dans leur système d'appariement. *M. ochrogaster* est une espèce monogame, tandis que *M. montanus* est polygame. De façon corrélative, les deux espèces possèdent un allèle différent du gène *V1aR* (Young et al. 1999). Cette mutation du gène intervient au niveau de sa région régulatrice, induisant une plus forte densité des récepteurs à la vasopressine V1a chez les mâles de *M. montanus* que chez les mâles de *M. ochrogaster* (Insel & Young 2000). Ces résultats indiquent que la variation allélique du gène *V1aR* au niveau interspécifique est impliquée dans l'expression de système d'appariement distinct chez les campagnols.

c) *Drosophila*, modèle de prédilection en génétique des comportements

De part sa relative simplicité, l'organisme modèle *Drosophila* fut sans conteste un outil essentiel pour déterminer les mécanismes génétiques associés aux processus développementaux et physiologiques (Sokolowski 2001). De nombreux gènes identifiés chez la drosophile présentent en effet des homologues structuraux et/ou fonctionnels conservés chez les vertébrés (dont l'être humain), pourtant caractérisés par une plus grande complexité (Adams et al. 2000). Pour cette raison, la drosophile est un modèle tout à fait adapté aux recherches en génétiques des comportements, permettant d'étudier les bases moléculaires, cellulaires et évolutives des comportements simples et complexes (Sokolowski 2001).

α. Rythme circadien

Les mécanismes moléculaires régulant l'horloge interne des individus furent découverts pour la première fois chez la drosophile. Il est aujourd'hui admis que ces régulateurs du rythme circadien existent aussi chez de nombreuses autres espèces, dont certains vertébrés (Sokolowski 2001). Le gène *period* (*per*), découvert en 1971 par Konopka & Benzer, présente 3 allèles modulant la durée des différentes périodes du cycle chez *D. melanogaster* : *per l* rallonge le cycle, *per s* le raccourci, et *per 0* entraîne une arythmie des périodes. Ces résultats mirent en évidence l'effet d'une mutation d'un gène unique sur l'activité circadienne, telle que les comportements locomoteurs ou le rythme d'émergence des larves.

β. Parade sexuelle

Chez les drosophiles mâles, le comportement de parade sexuelle est spécifique. Ces comportements complexes peuvent être fractionnés en un ensemble d'éléments comportementaux stéréotypés plus simples, faisant intervenir l'ensemble des capacités sensori-motrices des individus (Sokolowski 2001). De ce fait, différentes régions du système nerveux sont impliquées dans l'expression d'une séquence comportementale complète menant à l'accouplement (Baker et al. 2001, Greenspan 1995). Pourtant, la mutation d'un unique gène, *fruitless* (*fru*), chez les mâles de *D. melanogaster* est à l'origine de l'expression d'un comportement de cours aberrant (Greenspan 1995, Goodwin et al. 2000). Les mâles mutants ne sont plus capables de distinguer les mouches mâles des mouches femelles, entraînant ainsi la formation de « chaînes » d'individus mâles se suivant les uns les autres. Ryner et al. (1996) montrèrent que le gène *fru* semble ainsi affecter la majorité des différentes étapes de la parade sexuelle.

γ. Recherche alimentaire

Bien que certaines variations des comportements de recherche alimentaire soient observées entre les différents individus d'une espèce (Kamil 1986), les mécanismes génétiques sous-jacent à leur expression sont particulièrement bien conservés (Fitzpatrick et al 2005). C'est dans ce contexte que fut probablement étudié l'un des meilleurs exemples de l'effet d'une variation allélique naturelle sur les comportements. En 1980, Marla Sokolowski découvrit chez *D. melanogaster* l'existence de deux phénotypes distincts dans leur comportement de fourragement, qui seront ensuite compris comme la résultante du polymorphisme du gène *foraging* (*for*) (Osborne 1997, Sokolowski & Riedl 1999, Sokolowski 1998). Comme évoquée en introduction, le gène *for* est un gène candidat influençant les comportements alimentaires de nombreux arthropodes (Ben-shahar 2005, Lucas & Sokolowski 2009, Lucas et al. 2010a, Lucas et al. 2010b, Ingram et al. 2005), du nématode *Caenorhabditis elegans* (Fujiwara et al 2002), et de vertébrés (Schafer 2002).

II/ Conservation de la structure du gène *for*

1/ Structure de la PKG

La protéine kinase dépendante de la guanosine 3,5-monophosphate cyclique (GMPc), également appelée PKG, appartient à la famille des kinases sérine/thréonine. Elle est largement distribuée parmi les eucaryotes allant de l'organisme unicellulaire *Paramecium* à l'être humain *Homo sapiens* (Alverdi et al. 2008, Hofmann et al. 2009, Kim et al. 2011). Elle constitue l'un des récepteurs majeurs de la GMPc, second messenger généré au niveau intracellulaire (Hofmann et al. 2009, Kim et al. 2011). La PKG est un élément majeur des voies de signalisation oxyde nitrique/GMPc, et joue un rôle central dans les systèmes régulateurs des fonctions cardiovasculaire et neuronales (Casteel et al. 2010).

a) Structure secondaire

Chez les mammifères, il existe deux gènes nommés *prkg1* (correspondant au gène *foraging* chez les arthropodes) et *prkg2*, codant respectivement pour les protéines PKG I et PKG II (Alverdi et al. 2008, Hofmann et al. 2006, Hofmann et al. 2009, Orstavik et al. 1997). Les premiers 90-100 acides aminés de la PKG I sont codés par deux exons alternatifs (i.e. épissage alternatif de l'ARNm), produisant deux isoformes nommées PKG I α et PKG I β (respectivement 671 aa et 686 aa chez l'être humain). Le transcrit du gène *prkg2* mesure quand à lui 3431 pb (Hofmann et al. 2009).

Toutes les isoformes de la PKG présentent une structure comparable (figure 5) (Alverdi et al. 2008, Hofmann et al. 2009, Kim et al. 2011). Elles sont formées d'un segment N-terminal et de deux sous unités fonctionnelles : un domaine régulateur (R) et un domaine catalytique (C). Le segment N-terminal est formé d'un site de dimérisation, constitué d'un zipper leucine/isoleucine suivi d'une séquence auto-inhibitrice (pseudo-substrat). Le pseudo-substrat, mime du substrat réel de la protéine, occuperait le site catalytique du domaine actif et auto-inhiberait l'enzyme (Ruth et al. 1991). Ce segment N-Terminal permet également le ciblage de l'enzyme à ses différentes localisations subcellulaires (Hofmann et al. 2009). Une région charnière connecte le segment N-terminal au domaine régulateur. Celui-ci est formé de 2 sites de liaison tandems à la GMPc d'environ 110 aa chacun, qui régulent coopérativement l'activité du domaine catalytique (Hofmann et al. 2009; Osborne et al. 2011). Ces 2 sites de

liaisons à la GMPc se différencient en fonction de leur degré d'affinité, l'un présentant une haute affinité (GMPc A), le second une faible affinité (GMPc B). Le domaine actif (catalytique) situé après le domaine régulateur est composé d'un site de liaison au MgATP et d'un site de liaison au substrat.

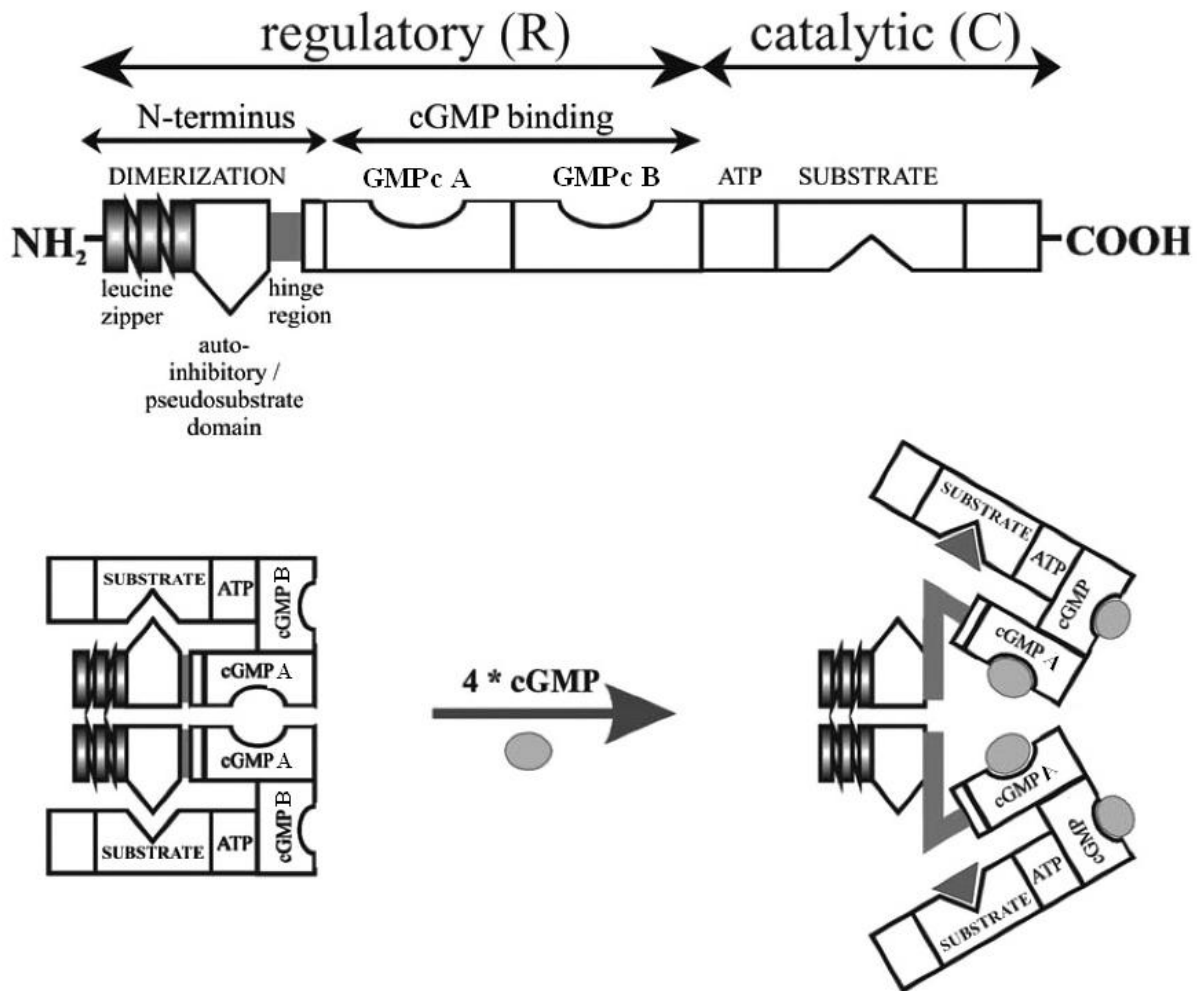


Figure 5. Structure de la PKG. Partie haute : représentation linéaire de l'enzyme. Partie basse : représentation schématique d'un dimère sous forme inactivée et activée. Voir le texte pour les détails (Hofmann et al. 2009).

L'occupation des deux sites de liaison du domaine R par la GMPc entraîne un changement important de la structure secondaire de la protéine (Landgraf et al. 1990). Dans un premier temps, l'autophosphorylation du segment N-terminal semble permettre de réduire l'inhibition du domaine catalytique induite par la séquence auto-inhibitrice du domaine N-terminal (Francis et al. 2002, Osborne et al. 2011). Cette autophosphorylation, initiée par la liaison d'une GMPc en faible concentration sur le site de haute affinité, augmente spontanément

l'activité de la PKG I et II (Francis et al. 2002, Hofmann et al. 2009). Toutefois, la liaison des deux GMPc A et B est nécessaire pour permettre un changement de configuration de la protéine et provoquer ainsi une activité kinase complète via une phosphorylation du domaine catalytique (Alverdi et al. 2008, Hofmann et al. 2009, Kim et al. 2011). L'activation de la protéine est ainsi associée avec une élongation de sa structure moléculaire (Alverdi et al. 2008, Osborne et al. 2011). L'activité maximale de la PKG est atteinte lorsque les 4 sites de liaison à la GMPc du dimère sont occupés. Les deux isoformes PKG I α et PKG I β sont activées à des concentrations submicro-molaires et micro-molaires de la GMPc, bien que la PKG I α soit plus sensible que la PKG I β en raison de différences dans les composants du segment N-terminal (Hofmann et al. 2009).

b) Structure tridimensionnelle

Afin de comprendre la structure tridimensionnelle de l'homo-dimère de la PKG, il était nécessaire d'effectuer une étape de cristallisation de l'enzyme. Bien qu'il semble évident que la PKG opère un changement de configuration suite à son activation par la GMPc, ceci ne fut prouvé que très récemment. Cette étape expérimentale est en effet d'une grande complexité, et les tentatives de cristallisation de la PKG restèrent longtemps infructueuses (Kim et al. 2011, Osborne et al. 2011). Ce n'est qu'en 2011, qu'Osborne et al. réussirent le pari de déterminer la structure cristalline du domaine régulateur de l'enzyme contenant les 2 sites de liaisons à la GMPc de la PKG I α (78-355 aa), permettant ainsi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la PKG (figure 6).

Les résultats mirent en évidence la présence d'une hélice allongée située à l'extrémité du site de liaison à la GMPc A (résidus 87–210) reliant les deux sites de liaison à la GMPc (GMPc B, résidus 211–327). Cette hélice intermédiaire semble constituer le centre de l'emplacement où les 2 sites de liaisons initient les réarrangements structuels de la protéine (changement de configuration) sous l'action de la GMPc (Osborne et al. 2011). Une « switch hélice » (SW, résidus 328–355) succédant aux deux sites de liaison à la GMPc complète le domaine régulateur de la PKG I α . Parallèlement, Kim et al. (2011) définirent la structure tridimensionnelle de la PKG I β (92-227 aa). De façon équivalente, ils démontrèrent l'existence d'un domaine intermédiaire aux deux sites de liaison à la GMPc, au niveau duquel semble être initié le changement de configuration de la protéine lors de l'activation par la GMPc.

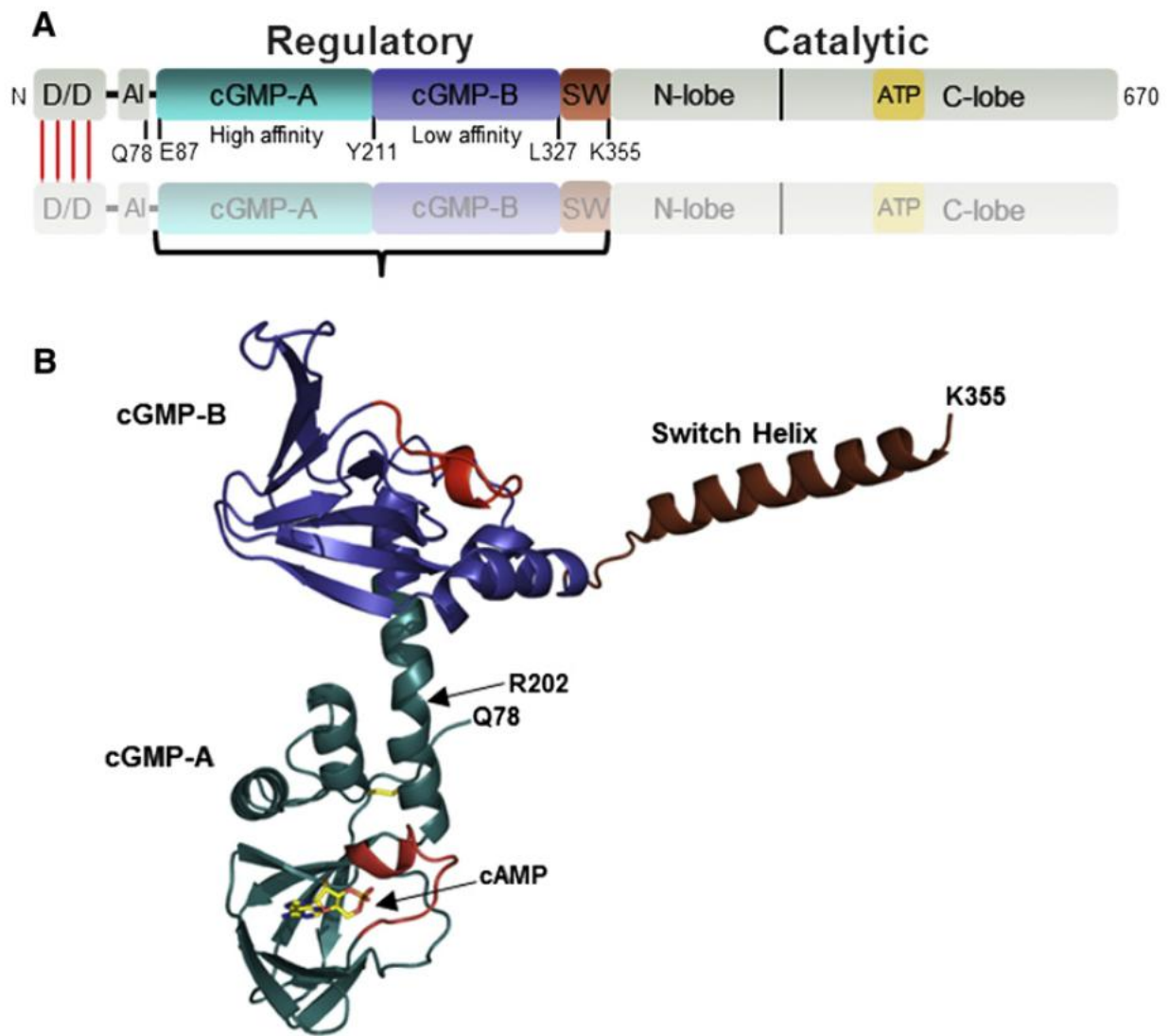


Figure 6. Architecture générale et organisation des domaines de la PKG I α . (A) D/D: domaine de dimérisation, AI: domaine autoinhibiteur, GMPC-A/B : sites de liaison à la GMPC A et B, SW: « switch helice ». (B) Structure tridimensionnelle du segment 78-355 de la PKG (Osborne et al. 2011).

2/ Fonctionnement cellulaire de la PKG

a) Lieu de distribution de la PKG

La PKG I est présente en grande concentration ($>0.1\mu\text{M}$) dans : les cellules des muscles lisses, les plaquettes, les reins, et plusieurs aires neuronales spécifiques telles que les cellules de Purkinje (neurones situés dans le cortex du cervelet), l'hippocampe et l'amygdale (Hofmann et al. 2009, Pilz & Casteel 2003). Elle est également trouvée en plus faible concentration dans le muscle cardiaque, l'endothélium vasculaire, les granulocytes (globules blancs), les chondrocytes (cellule composant le cartilage), les ostéoclastes (cellules

responsable de la destruction des tissus osseux), et diverses cellules du cerveau (Hofmann et al. 2009). Les isosymes I α et I β sont des protéines solubles et interagissent avec d'autres enzymes via leur segment N-terminal. Par contraste, la PKG II est attachée au niveau de la membrane plasmique. Elle est exprimée dans plusieurs cellules du cerveau, dans les sécrétions de l'épithélium intestinal, les reins, le cortex surrénal, les chondrocytes et les poumons (Hofmann et al. 2009).

b) Substrat et voies de signalisation de la PKG

La GMPc, second messenger de la PKG, est produite au niveau intracellulaire par le biais de deux catégories de guanylate cyclase (premier messenger amplifiant le message hormonal) (Alverdi et al. 2008). Premièrement, l'oxyde nitrique (NO, gaz soluble) augmente la concentration de GMPc dans la plupart des cellules par l'activation de la guanylate cyclase soluble (sGC) présente dans le cytoplasme (Hofmann et al. 2009). Deuxièmement, la GMPc peut être générée par les récepteurs transmembranaires guanylate cyclase (rGCs), eux même activés par plusieurs peptides natriurétiques (ANP) (Alverdi et al. 2008, Pilz & Casteel 2003) (figure 7).

La GMPc présente de nombreuses cibles intracellulaires : la PKG I α , la PKG I β , la PKG II, les canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques, et les phosphodiésterases qui hydrolysent la GMPc et/ou la AMPc (Pilz & Casteel 2003). La PKG demeure toutefois la cible principale de la GMPc, et chaque cellule de mammifère contient au moins l'une de ces trois PKGs (Hofmann 2005). Cependant, il est nécessaire de rester prudent quant aux interprétations des effets de la GMPc au sein des organismes, compte tenue de la possibilité d'une activation parallèlement de la PKA (protéine kinase dépendante de la AMPc) lorsqu'elle est présente en grande concentration dans les cellules (Hofmann et al. 2009, Pilz & Casteel 2003).

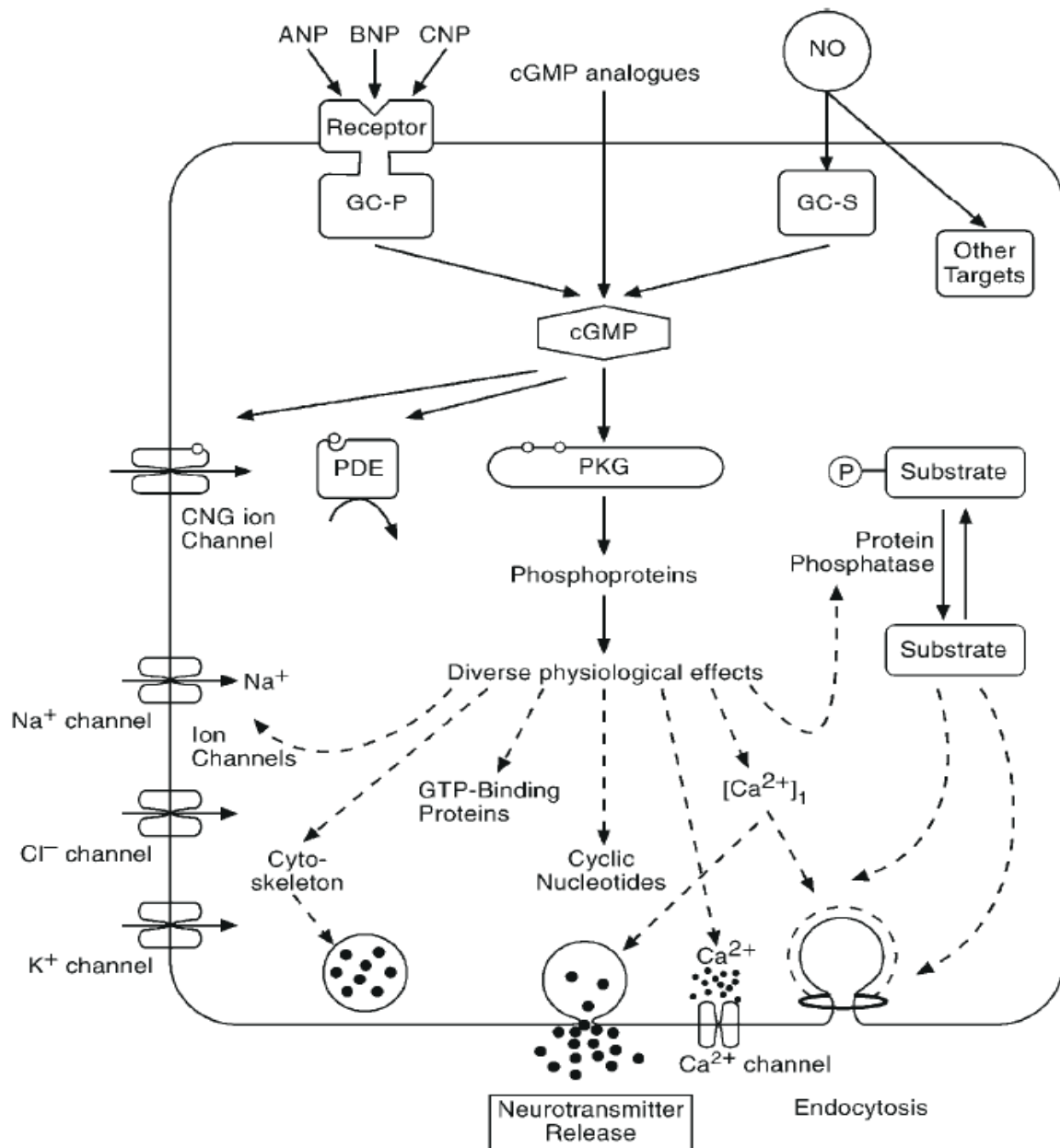


Figure 7. Voie de signalisation de la GMPC et de la PKG dans les neurones. ANP, BNP, CNP : peptides natriurétiques. 3 cibles intracellulaires de la GMPC : la PKG, les canaux ioniques, et les phosphodiesterases (Wang & Robinson 1997, modifié par Osborne et al. 2001).

c) Rôles de la PKG

α. Rôles spécifiques de la PKG I

In vivo, plus de 10 substrats différents sont phosphorylés par la PKG I (Hofmann et al. 2009). Cette enzyme est ainsi impliquée dans un grand nombre de réponses cellulaires, telles que la décontraction des muscles lisses, les mécanismes de différenciation cellulaire, la

vasodilatation, la biosynthèse des mitochondries, l'apoptose, ou encore la plasticité synaptique des neurones (Alverdi et al. 2008, Osborne et al. 2011, Pilz & Casteel 2003).

Par exemple, les niveaux de GMPc augmentés par la stimulation des guanylates cyclases solubles via l'oxyde nitrique permettent une décontraction des muscles vasculaires et des autres muscles lisses (Hofmann 2005). Cet effet relaxant fut démontré chez la souris, dont les individus transgéniques déficients pour la PKG I (délétion du gène) présentaient une hypertension vasculaire durant les 4 premières semaines de vie. Ces résultats suggèrent que la PKG I α et I β inhiberait les récepteurs induisant une contraction des muscles lisses, modulant ainsi la pression sanguine via des mécanismes multiples et complexes (Hofmann et al. 2009). Plus précisément, le tonus des muscles lisses est régulé par l'augmentation et la diminution de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} , elle-même modulée par la PKG I (la PKG réduirait la $[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Wang & Robinson 1997). La récupération d'une tension normale chez les individus plus âgés indique toutefois l'existence de mécanismes complémentaires impliqués dans la régulation de la pression vasculaire (Hofmann 2005).

De part l'action de la GMPc sur la PKG, les canaux ioniques, et les phosphodiésterases, de nombreuses recherches furent développées dans le cadre de ses implications pathophysiologiques chez les mammifères. Par exemple, en plus d'être impliquées dans la régulation de la pression sanguine, les voies de signalisation de NO/GMPc jouent un rôle dans la migration, la prolifération et la différenciation des cellules des muscles lisses vasculaires, considérées comme des éléments importants dans le développement de maladies vasculaires du type resténose (rétrécissement vasculaire) et athérosclérose (dépôt de lipide sur la paroi des artères) (Hofmann 2005, Hofmann et al. 2009, Pilz & Casteel 2003).

β . Rôles spécifiques de la PKG II

Les connaissances détenues sur les fonctions de la PKG II sont comparativement plus réduites que pour la PKG I. Seulement 4 domaines d'action ont été identifiés au niveau du système périphérique et neuronal (Hofmann et al. 2009). Au niveau du système périphérique, la PKG II est un important régulateur des sécrétions gastro-intestinales. Localisée dans l'épithélium de l'intestin grêle, elle stimule la sécrétion d'eau et de chlorure. Dans les reins, la PKG II influence la pression sanguine en partie par la régulation des sécrétions en rénine et aldostérone (Hofmann et al. 2009). Pour finir, la PKG II est impliquée dans la croissance des

os. Les souris knockout pour ce gène développent des os de petites tailles et présentent ainsi une forme de nanisme (Talbot et al. 1998).

γ. Rôle de la PKG sur les comportements

Durant les deux dernières décennies, l'intérêt pour les processus neuronaux modulés par les voies de signalisation de la GMPc a grandement augmenté (Wang & Robinson 1997). Chez les mammifères, de nombreux phénotypes sont associés à l'expression de la PKG I dans différents tissus. Par exemple, la PKG I α exprimée dans les neurones sensoriels des ganglions rachidiens est nécessaire pour l'organisation des axones sensoriels durant le développement embryonnaire. Cette enzyme semble aussi être impliquée dans les mécanismes de perception de la douleur (Hofmann 2005). La PKG I α et I β sont toutes deux associées à différents mécanismes moléculaires des processus de mémorisation et d'apprentissage chez les vertébrés. Dans les cellules de Purkinje, la PKG I α est impliquée dans les mécanismes de dépression à long terme (LDT, qui réduit les connexions synaptiques), notamment de par son action sur les concentrations intracellulaires en ions Ca^{2+} . La PKG I β est quand à elle, impliquée dans les mécanismes de potentialisation à long terme (PLT, qui renforce les connexions cellulaires) de l'hippocampe, associés aux capacités d'apprentissage (Hofmann 2005).

Au niveau neuronal, la PKG II est exprimée dans les noyaux supra-chiasmatiques, structures régulant les changements de phase de l'horloge interne (rythme circadien réglée sur une période approximative de 24h) (Hofmann 2005). D'autre part, la PKG II est largement distribuée dans les régions du cerveau contrôlant les réactions émotionnelles des mammifères telles que le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, et les cellules du raphé. Sur la base de ces observations, Werner et al. (2004) montrèrent le rôle de la PKG II dans le contrôle des comportements de type anxieux et la régulation des taux de consommation d'éthanol. Dans un test de choix, les souris knockout pour ce gène exprimèrent une plus forte préférence pour les solutions alcoolisées que les souris non mutantes (Werner et al. 2004).

Chez les arthropodes en revanche, les effets de la PKG sur les comportements ont largement été étudiés dans le paradigme des comportements de recherche alimentaire. Par exemple, la drosophile *Drosophila melanogaster* exprime deux gènes codant pour la PKG, nommés *dg1* et *dg2* (Kalderon & Rubin 1989). *dg2* est aujourd'hui identifié comme le gène codant pour l'analogue de la PKG I trouvée chez les mammifères (Osborne et al. 1997). La variation

allélique de ce gène induit l'expression d'un phénotype sédentaire (*sitter*) et d'un phénotype mobile lors de l'activité de fourragement (*rover*) (Sokolowski 2001). De façon intéressante, la PKG II est la forme de PKG associée à l'expression d'un style de vie de type sédentaire chez les mammifères (Hofmann 2005), à la différence des arthropodes où la PKG I est le principal modulateur comportemental.

3/ Phylogénie du gène *for*

L'approche phylogénétique est indispensable pour déterminer la conservation de la structure d'un gène, et ainsi estimer la pertinence de son utilisation dans une approche gène candidat. Fitzpatrick et al. (2004) proposent un arbre phylogénétique incluant les taxons des métazoaires, des viridiplantae (ou chlorobiontes) et des apicomplexa (organismes unicellulaires parasites des métazoaires). Dans le cadre de notre étude, nous portons une attention plus particulière aux arthropodes. Ainsi, l'arbre phylogénétique développé par Lucas et al. (2010a) constitue une illustration optimale de la conservation de la PKG I et II parmi une trentaine d'espèces d'insectes (figure 8). De par l'intérêt grandissant pour les études en génétique des comportements et en écologie moléculaire, l'influence du gène *for* sur les comportements a aujourd'hui été étudiée chez de nombreux arthropodes. De manière non exhaustive, nous pouvons citer la drosophile *Drosophila melanogaster* (Osborne et al. 1997), les abeilles *Apis mellifera* (Ben-Shahar et al. 2002), le bourdon *Bombus terrestris* (Tobback et al. 2011), la guêpe commune *Vespula vulgaris* (Tobback et al. 2008), la guêpe poliste *Polistes metricus* (Daugherty et al. 2011), les fourmis *Pogonomirmex barbatus* (Ingram et al. 2005), *P. occidentalis* (Ingram et al. 2011) et *Pheidole pallidula* (Lucas & Sokolowski 2009), le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Lucas et al. 2010a) et la Chrysomèle du maïs *Diabrotica virgifera virgifera* (Garabagi et al. 2008).

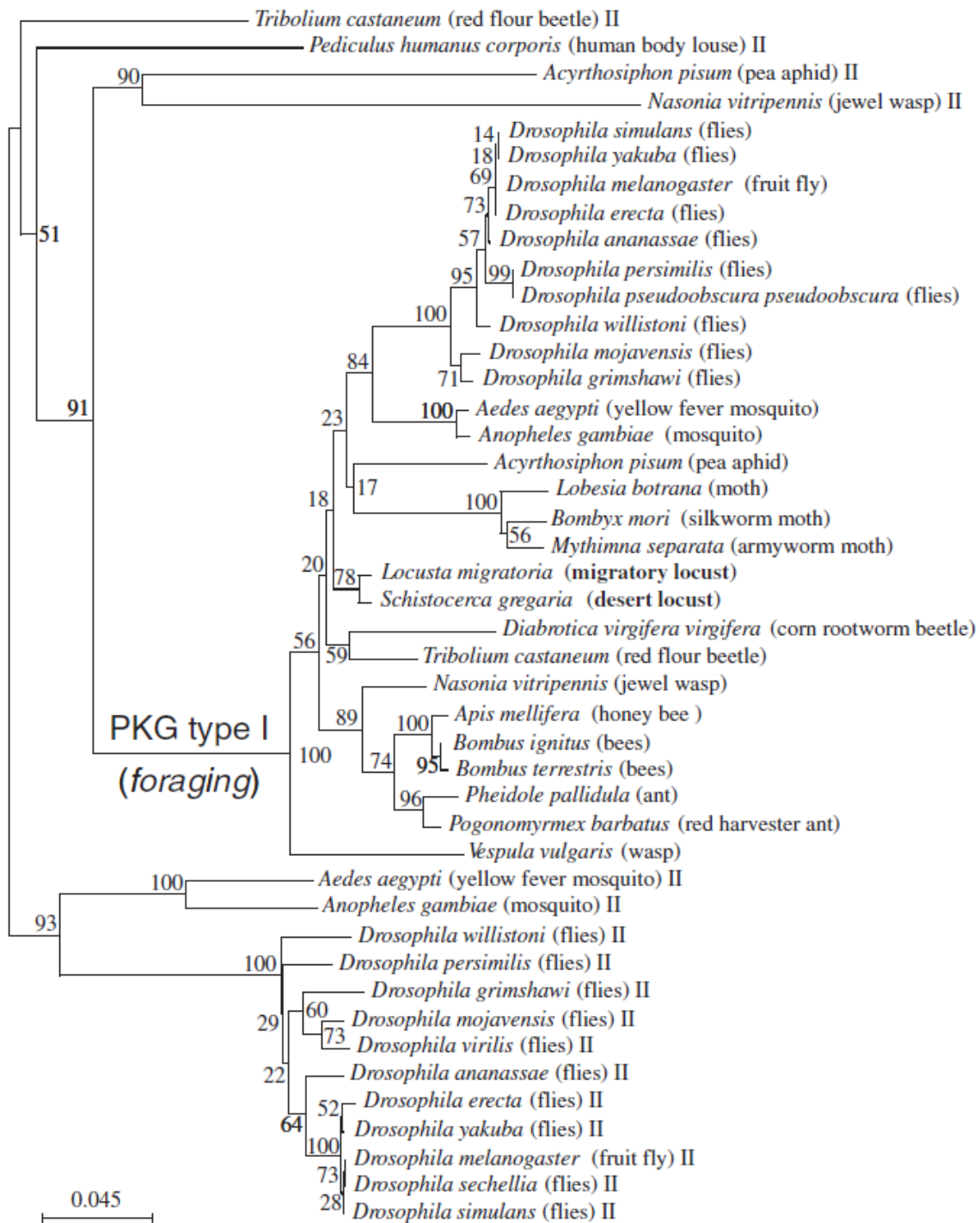


Figure 8. Analyse phylogénétique réalisée à partir 44 séquences de PKG (I et II) issues de 30 espèces d'insectes différentes (Lucas et al. 2010a).

III – Conservation de la fonction du gène *foraging*

Le gène *foraging* (*for*) joue un rôle déterminant dans l'expression des comportements alimentaires chez de nombreuses espèces animales (voir par exemple les revues suivantes : Douglas et al. 2005, Fitzpatrick et al. 2004, Kaun & Sokolowski 2009, Schafer 2002, Sokolowski 2001, Sokolowski 2002). Les comportements alimentaires sont complexes, tant ils réfèrent à la fois aux comportements de recherche alimentaire ainsi qu'au processus de consommation des aliments (Douglas 2005). Ces comportements varient au niveau inter et intra-spécifiques, et au sein d'un même individu en fonction de son environnement interne (cycle de vie) et externe. En dépit de ces difficultés, souvent inhérentes aux paradigmes en génétique du comportement, l'approche du gène candidat permet d'identifier les fonctions principales de la PKG au sein des organismes.

La fonction conservée du gène *for* sur les comportements alimentaires fut d'abord identifiée chez la drosophile, *Drosophila melanogaster* (Sokolowski 1980), puis chez de nombreuses autres espèces telles que le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fujiwara et al. 2002), les abeilles *Apis mellifera* (Ben Shahr et al. 2002), les fourmis *Pogonomyrmex barbatus* et *Pheidole pallidula* (Ingram et al. 2005, Lucas et al. 2009), ou encore le criquet *Locusta gregaria* (Lucas et al. 2010a). Les gènes peuvent toutefois affecter les comportements de façons différentes. Chez la drosophile et le nématode, le gène présente un polymorphisme naturel (variation allélique) associé à l'expression de deux phénotypes comportementaux respectifs. Chez les hyménoptères sociaux en revanche, les variations comportementales sont associées à une modification de l'expression du gène *for* au cours du temps (i.e de l'ontogénèse).

1/ Variation allélique du gène

De par son action précoce dans les voies de signalisation intracellulaire et la pluralité de ses substrats, la PKG a des fonctions pléiotropiques au sein des organismes (Sokolowski 2001). Chez *D. melanogaster*, les variations alléliques du gène *for* ont un impact sur les comportements locomoteurs associés à l'alimentation (Osborne et al. 1997), les performances métaboliques (Kaun et al. 2007a), la sensibilité gustative, l'habituation olfactive (Scheiner et

al. 2004), et les apprentissages associatifs chez les larves (Kaun et al. 2007b) et les adultes (Mery et al. 2007, Reaume et al. 2011). Chez *C. elegans*, la mutation du gène altère les comportements locomoteurs associés à l'alimentation (Fujiwara et al. 2002), l'adaptation olfactive (l'étoile et al. 2002), la taille du corps et la durée de vie (Hirose et al. 2003).

a) *Drosophila melanogaster* : Rover et Sitter

α. Phénotypes comportementaux

Chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, les comportements alimentaires présentent un polymorphisme naturel (Sokolowski 1980). Les larves « rover » se déplacent sur de plus longues distances que les individus « sitter » durant l'activité de fourragement (Sokolowski 2001). Placées dans un milieu nutritif hétérogène (aggrégats de nourriture), les larves rovers ont davantage tendance à quitter un site de nourriture que les sitters, qui restent préférentiellement se nourrir dans une même zone alimentaire (Sokolowski 2001). Ces distinctions comportementales s'observent également au stade adulte, les mouches rovers s'éloignant davantage de la ressource nutritive que les sitters (Pereira & Sokolowski 1993). En absence de nourriture, les deux phénotypes expriment des comportements locomoteurs comparables. Cette observations suggèrent que les variations comportementales observées sont dépendantes d'un contexte alimentaire et ne résultent pas d'une différence de performances locomotrices (capacité musculaire brute associée au déplacement) entre les deux morphes (Pereira & Sokolowski 1993, Sokolowski & Hansel 1992, Sokolowski 2001) (figure 9).

Ces variations comportementales sont attribuables à la variation allélique du gène *foraging* (de Belle et al. 1989, Osborne et al. 1997). Chez *D. melanogaster*, *for* correspond au gène *dg2*, l'un des deux gènes (*dg1* et *dg2*) codant pour la PKG (Osborne et al 1997, Kalderon & Rubin 1989). *Dg2* est constitué de plus de 40 kb (ADN génomique), et produit trois transcrits majeurs (T1-T3) après épissage alternatif. La variation génétique du gène produit deux allèles nommés *for^R* et *for^S*. Ce polymorphisme répond aux lois de la génétique mendélienne et se caractérise par une dominance de l'allèle *for^R* sur l'allèle *for^S* (de Belle & Sokolowski 1987, de Belle et al. 1989). Ces deux phénotypes naturels sont maintenus aux fréquences respectives de 70 % rovers (homozygotes et hétérozygotes *for^R*) et 30 % sitters (homozygotes *for^S*) en milieu naturel (de Belle & Sokolowski 1987, Sokolowski et al. 1997).

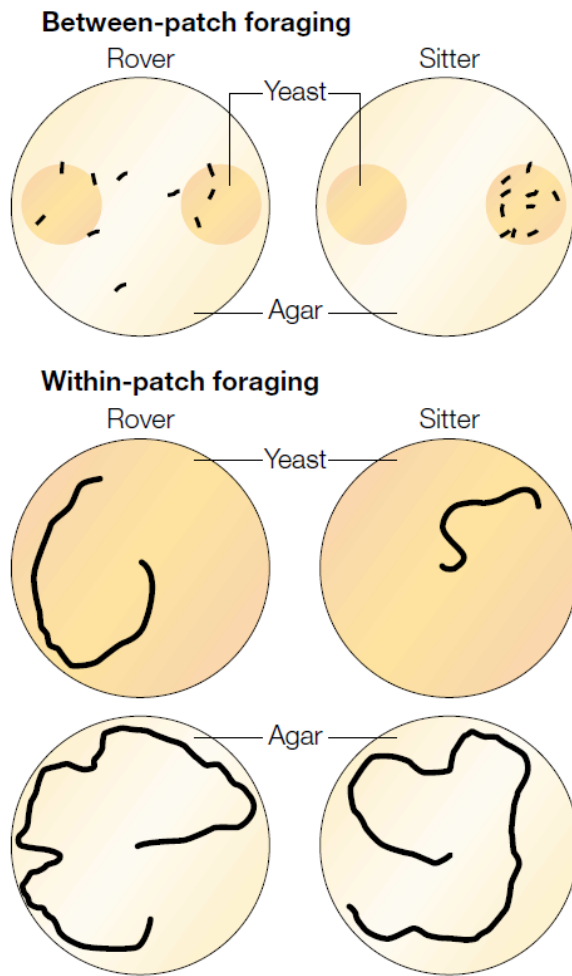


Figure 9. Représentation des comportements locomoteurs associés à l'alimentation chez les individus *rover* et *sitter* de *D. melanogaster* (Sokolowski 2001)

Dans un milieu hétérogène, les *rovers* ont d'avantage tendance à quitter un site de nourriture que les *sitters*. Après avoir rejoint le site alimentaire le plus proche, les *sitters* restent préférentiellement s'alimenter à l'intérieur de celui-ci.

Au sein d'un même site alimentaire, les *rovers* se déplacent d'avantage que les *sitters* dans un intervalle de temps de 5 minutes.

En absence de nourriture (agar) les deux phénotypes expriment une activité locomotrice similaire.

Afin d'établir un lien causal entre les phénotypes comportementaux et la variation du gène *for*, Pereira & Sokolowski (1993) réalisèrent une lignée transgénique *for^{s2}* (mutagénèse), dont les individus issus d'une souche *rover for^{R/R}* irradiée (de Belle et al. 1989) sous expriment le gène *for*. Les individus *rovers* sauvages ont ainsi un plus haut niveau de transcription de *for* et une activité enzymatique intracérébrale plus importante de 10 % comparés aux *sitters*, et de 25% comparés aux mutants *for^{s2}* (Osborne et al 1997). Ces résultats sont positivement corrélés au niveau d'activité locomotrice et permettent de valider le lien causal entre *for* et les variations du comportement alimentaire (Pereira & Sokolowski 1993, Osborne et al. 1997). Cela suggère aussi qu'une différence interindividuelle relativement faible dans l'expression d'un gène permet de générer des phénotypes comportementaux bien distincts. Les *sitters* sont ainsi porteurs d'une mutation hypomorphique, c'est-à-dire, d'une mutation n'éliminant pas complètement la fonction d'un gène de type « sauvage » (wildtype). Cette modification moins drastique qu'une perte de fonction totale (i.e. allèle nul), provoque une réduction de sa fonction tout en permettant la survie en milieu naturel (Sokolowski 2001).

β. Mécanismes sensoriels

Les mécanismes sensoriels sont essentiels pour obtenir des informations sur un environnement perpétuellement changeant. Chez la drosophile *D. melanogaster*, ces informations sont par exemple indispensables pour identifier un site alimentaire ou déterminer un site d'oviposition adéquats (Shaver et al. 1998). La gustation joue un rôle important dans les mécanismes de sélection alimentaire. Ce type d'acuité sensorielle peut être étudié via l'analyse de la sensibilité au saccharose dans un paradigme d'extension du proboscis (Belay et al. 2007, Shaver et al. 1998). Chez la drosophile, la méthode consiste à stimuler avec une solution sucrée les récepteurs gustatifs localisés sur le tarse antérieur des mouches adultes. Lorsque la concentration en saccharose est suffisante pour être détectée, les individus étendent leur proboscis en réponse au stimulus (Belay et al 2007).

En mesurant les réponses des mouches *rovers* (*for*^{R/R} naturels) et *sitters* (*for*^{s/s} naturels et *for*^{s2/s2} mutants), Scheiner et al. (2004) ont estimé le rôle de la PKG sur la sensibilité au saccharose des individus de cette espèce. Dans cette étude, les *rovers* étaient significativement plus sensibles au saccharose que les *sitters* naturels et mutants, quelque soient l'âge et le sexe des mouches testées. Les mouches mâles étaient toutefois plus sensibles que les femelles, probablement en raison d'un plus grand nombre de sensilles gustatives (environ 30% de plus que les femelles) au niveau de la zone stimulée (Nayak & Singh 1983). Dans une seconde étude, la surexpression artificielle (manipulation génétique) des niveaux d'expression du gène *for* dans le cerveau permet d'augmenter la sensibilité gustative des *sitters* (Belay et al. 2007). Ainsi, la variation du gène *for* modulerait la sensibilité au saccharose chez la drosophile.

Au même titre que la gustation, l'olfaction joue un rôle primordial dans l'évaluation des ressources alimentaires. Chez *D. melanogaster*, la sensibilité olfactive varie en fonction du niveau d'expression du gène *for* respectif à chaque génotype. Chez les mouches adultes, les mâles *sitters* mutant *for*^{s2/s2} exposés à une odeur alimentaire attractive (levure) rejoignent d'avantage la source du stimulus comparé aux mâles *rovers* (*for*^{R/R}). Ces variations comportementales ne peuvent être expliquées par une différence de sensibilité olfactive (perception), compte tenu des performances équivalentes des *rovers* et des *sitters* dans un test de reconnaissance olfactif dans un labyrinthe en T (Shaver et al. 1998). La PKG serait donc spécifiquement impliquée dans les réponses comportementales associées aux stimuli olfactifs alimentaires (Shaver et al. 1998).

L'ensemble des observations réalisées sur *D. melanogaster* suggèrent que le gène *for* serait impliqué dans les mécanismes d'évaluation des ressources alimentaires, et pourrait ainsi moduler les stratégies de fourragement respectives aux individus *rovers* et des *sitters* (Belay et al. 2007, Scheiner et al. 2004, Pereira & Sokolowski 1993).

γ. Mécanismes cognitifs

- *Apprentissages non-associatifs* : L'habituation est une forme d'apprentissage non-associatif dans lequel la réponse au stimulus diminue ou disparaît avec la répétition de la stimulation (Thompson & Spencer 1966). Bien que relativement simples, ces manifestations physiologiques peuvent constituer la base de paradigmes d'apprentissages associatifs plus complexes (Engel et al. 2002). Chez *D. melanogaster*, la variation allélique du gène *for* module la rapidité d'habituation à un stimulus gustatif (Scheiner et al. 2004). A sensibilité gustative égale, les mouches *sitters* *for^{s/s}* et *for^{s2/s2}* testées à partir du paradigme d'extension du proboscis expriment une plus forte habituation et une plus forte généralisation de cet apprentissage que les *rovers* *for^{R/R}*. En effet, les individus *sitters* naturels et mutants stimulés de façon répétée avec une solution sucrée d'égale concentration présentent une diminution plus rapide de la réponse comportementale que les mouches *rovers*. Ces résultats suggèrent l'existence d'une corrélation négative entre le niveau d'activité du gène et une forte habituation, indépendamment d'une différence de sensibilité sensorielle (Scheiner et al. 2004).

Des résultats similaires ont été observés dans un paradigme impliquant une autre modalité sensorielle : la vision (Engel et al. 2000). Chez la drosophile, la fibre nerveuse géante « jump-and-flight » (« saut et vol de fuite ») permet une réponse réflexe de saut et d'envol suite à la perception d'un stimulus visuel surprenant. Avec la stimulation électrique répétée de ce circuit, les individus *sitters* (naturels et mutants) montrèrent ici encore une habituation plus rapide que les *rovers*. Les *sitters* expriment également un rétablissement spontané de la réponse au stimulus et une déshabitude (rétablissement de la réponse à partir d'un nouveau stimulus) plus rapide que les *rovers*. Cette étude électrophysiologique réalisée sur des animaux intacts démontre que la *PKG* affecte la plasticité des réponses neurophysiologiques et comportementales dans un paradigme d'apprentissage simple (Engel et al. 2000).

- *Apprentissages associatifs* : La capacité à associer un signal à la présence de nourriture est un mécanisme adaptatif qui permet à un animal d'identifier rapidement la qualité de la ressource alimentaire rencontrée (bonne, mauvaise, ou même dangereuse). Dans un contexte alimentaire, les apprentissages associatifs peuvent ainsi constituer un avantage sélectif pour les individus. Le paradigme du conditionnement opérant (se distinguant du conditionnement classique de part l'apprentissage de réponses non-réflexes en fonction des conditions environnementales) constitue la base méthodologique des études sur les apprentissages associatifs. Dans ce contexte, Kaun et al. (2007b) montrèrent que la variation naturelle du gène *for* chez les larves de *D. melanogaster* jouait un rôle important dans les mécanismes d'association entre un stimulus olfactif ou visuel et une récompense alimentaire (renforcement positif). Dans cette étude, les individus *rovers* se sont caractérisés par une meilleure capacité d'apprentissage visuelle et olfactive que les *sitters* (effet toutefois plus robuste pour la modalité olfactive). Les performances des *rovers* tendent également à diminuer plus rapidement (perte de l'apprentissage) que celles des *sitters*. Les variant alléliques du gène *for* moduleraient ainsi la dynamique d'acquisition et de rétention en mémoire des informations (Kaun et al 2007b). Ces conclusions sont confirmées par l'expérience de Wang et al. (2008), dans laquelle des individus transgéniques déficitaires en PKG à basse température présentaient un rétablissement de leur mémoire visuelle associative une fois le niveau d'expression augmenté par une exposition à des températures plus élevées.

L'association entre le gène *for* et les différentes formes de mémoire (i.e. à court terme et à long terme) fut plus finement analysée sur la base d'un conditionnement olfactif aversif (Mery et al. 2007). Dans un test où est évaluée la capacité à associer une odeur à un choc mécanique (stimulus aversif), les mouches *rovers* montrent une meilleure mémoire à court terme (fort évitement de l'odeur associée au choc après 15 minutes), mais une plus faible mémoire à long terme (diminution de l'évitement 24 heures après l'apprentissage) comparées aux mouches *sitters*. Les *rovers* expriment également une plus forte interférence rétroactive (Reaume et al. 2011). L'interférence rétroactive est une composante majeure du phénomène d'oubli, et se définit comme la diminution de l'accessibilité à une information acquise précédemment due à un nouveau stockage d'information plus récent. Ainsi, les réponses des *rovers* sont d'avantages déterminées par leur expérience la plus récente, tandis que les *sitters* accumulent les informations au cours du temps sans mécanisme de hiérarchisation de leur importance (Reaume et al. 2011).

Les analyses tissulaires réalisées à partir d'un système d'imagerie par fluorescence, montrèrent que le gène *for* était plus particulièrement exprimé dans les corps pédonculés, qui sont des centres nerveux de l'apprentissage olfactif chez la drosophile (Kaun et al. 2007b, Mery et al. 2007). Par l'augmentation des niveaux de PKG dans les corps pédonculés d'individus *sitters* (expression transgénique du transcrit T2 restreinte à cette structure nerveuse), ceux-ci expriment des performances similaires au *rovers* pour les deux types de mémoire (Mery et al. 2007). Sous l'effet de la PKG, ces structures cérébrales joueraient donc un rôle important dans l'acquisition des apprentissages associatifs.

b) Caenorhabditis elegans : roamer et dweller

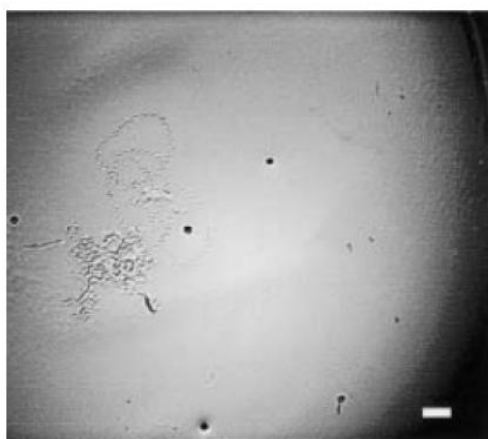
α. Phénotypes comportementaux

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, l'orthologue du gène *for* nommé *egl-4* présente une variation allélique influençant l'expression de deux phénotypes comportementaux associés à l'alimentation, appelés « *roamer* » et « *dweller* » (Fujiwara et al. 2002). Les *dwellers* restreignent leur activité locomotrice à un espace réduit et s'arrêtent régulièrement lors de l'alimentation (semblablement aux individus *sitters* de *D. melanogaster*), tandis que les *roamers* fourragent sur de plus longues distances et sans interruptions (de façon similaire aux *rovers*) (figure 10). Via l'utilisation d'une lignée transgénique knock-out pour *egl-4*, Fujiwara et al. (2002) montrèrent qu'une diminution des taux de PKG entraîne une augmentation des comportements de type *roamer*. Chez cette espèce, un haut niveau d'expression du gène est donc associé à une plus faible activité locomotrice lors du fourragement, à l'inverse de la drosophile. Bien que la fonction de la PKG soit conservée au sein du règne animal, il semble cependant exister des chemins évolutifs différents en fonction de l'espèce étudiée.

β. Mécanismes sensoriels

La PKG a également des effets pléiotropiques chez *C. elegans* (Hao et al. 2011, Kaun & Sokolowski 2009). Par exemple, les individus mutants présentent une altération morphologique au niveau de leurs sensilles olfactives. De façon corrélative, ils ont une perception sensorielle réduite. L'étude développée par l'Etoile et al. (2002) démontra l'implication du gène *egl-4* dans la régulation de l'adaptation olfactive. L'adaptation olfactive est un mécanisme réversible d'habituation suite à l'exposition prolongée à une odeur spécifique. Chez les individus mutants pour les récepteurs de la guanylate cyclase (récepteurs

“Dweller”



“Roamer”

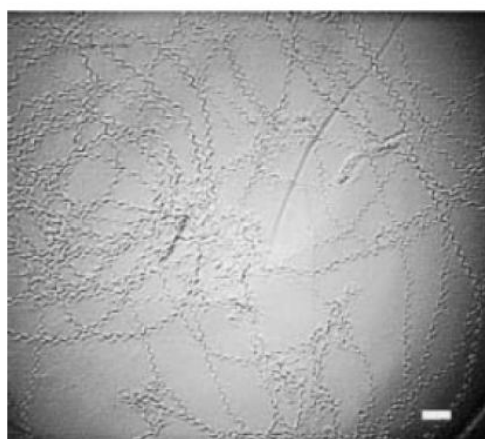


Figure 10. Empreintes des déplacements effectués par un individu unique (*dweller* ou *roamer*) lors du fourragement sur une période de 18 heures (Fujiwara et al. 2002).

impliqués dans les voies de signalisation de la PKG) produisant une plus faible quantité de GMPc que le morphe « sauvage », aucun phénomène d’adaptation olfactive n’est observable. En effet, après une heure d’exposition à un stimulus odorant attractif, les individus mutants continuent de s’orienter vers la source du stimulus, à la différence des individus « sauvages » qui expriment une chimiotaxie réduite et occupent l’ensemble de l’espace (L’Etoile & Bargmann 2000, L’etoile et al. 2002). Les résultats obtenus par Hong et al. (2008) sur la réponse chimiotaxique aux phéromones chez des lignées spécifiques de l’espèce *Pristionchus pacificus* corroborent l’hypothèse d’une implication de la PKG dans les processus olfactifs chez le nématode. Chez cette espèce cette fonction serait primordiale dans les mécanismes de détection de l’hôte (Sokolowski & Fitzpatrick 2008).

γ. Effet de la PKG sur le développement

Raizen et al. (2006) développèrent une lignée de *C. elegans* mutante pour le gène *egl-4*, possédant une activité du gène supérieure au morphe sauvage. Cette activité plus élevée induit plusieurs différenciations phénotypiques : ces individus ont une longévité et une taille corporelle plus réduite, un taux de stockage des lipides dans l’intestin plus élevé, et une diminution de l’activité locomotrice en présence de nourriture. A l’inverse, les lignées mutantes dont le gène est inactivé (perte de fonction) ont une meilleure longévité et des individus plus gros de 50% par rapport aux individus non-mutants (figure 11) (Hirose et al.

2003). L'ensemble de ces observations confirment l'hypothèse d'une action pléiotropique de la PKG chez le nématode *C. elegans*.

wild-type

***egl-4* mutant**



Figure 11. Variation de la taille du corps chez le nématode adulte âgé de 4 jours. L'individu mutant *egl-4* sous-exprimant la PKG est presque deux fois plus gros que l'individu sauvage (Hirose et al. 2003).

2/ Pressions de sélection associées au maintien du polymorphisme

Au cours des dernières décennies, l'intérêt pour les mécanismes de sélection modulant la fréquence et la distribution de la diversité génétique des populations naturelles a grandement augmenté. Quand le polymorphisme comportemental a une composante transmissible, les avantages sélectifs relatifs aux morphes exposés aux différentes conditions de l'environnement peuvent être mesurés (Ford 1964). Le polymorphisme *rover/sitter* observé chez *D. melanogaster* constitue ainsi un outil idéal pour comprendre les bases génétiques des traits adaptatifs et les mécanismes impliqués dans le maintien du polymorphisme.

a) La résistance aux conditions abiotiques

α . Thermotolérance

En milieu naturel, les larves de *D. melanogaster* s'alimentent de levures présentes dans les fruits en phase de fermentation, dans lesquels la température varie entre 10 et 50°C (Feder 1997). Une température sub-létale élevée entraîne un dysfonctionnement du système nerveux, se traduisant par une arythmie des patterns moteurs, suivie d'une immobilité totale (échec des neurotransmissions). Ces dysfonctionnements nerveux précédant l'apparition de dommages permanents, une diminution de la température à des seuils tolérables pour l'espèce

permet de rétablir un fonctionnement normal des circuits (Dawson-Scully et al. 2007). A l'inverse, une augmentation de la température est alors létale. La capacité d'adaptation aux conditions thermiques jouerait donc un rôle essentiel dans la fitness et la survie des individus de *D. melanogaster*.

En étudiant les comportements alimentaires des larves (mesurés à partir des traces laissées par les structures buccales sur le substrat nutritif) comme marqueur comportemental du fonctionnement des transmissions neuromusculaires, Dawson-Scully et al. (2007) démontrèrent l'implication du gène *for* et de son polymorphisme allélique dans les niveaux de tolérance aux stress thermiques. Les auteurs identifièrent une corrélation négative entre le niveau d'activité de la PKG et degrés de tolérance aux hautes températures. En effet, les individus *rovers* ne s'alimentaient plus dès 37°C, tandis que les *sitters* naturels et mutants (*for^{s2}*) maintenaient leur activité jusqu'aux températures respectives de 39 et 41,5°C. Un pattern similaire de tolérance est observé entre les différents génotypes au niveau des transmissions neuromusculaires. Par une approche pharmacologique, une augmentation de l'activité PKG réduisait les seuils de tolérance thermique chez tous les morphes (33°C) tandis qu'une diminution permettait de les augmenter (42°C).

Ainsi, la variation des seuils de tolérance thermique modulée par la PKG pourrait être un facteur du maintien du polymorphisme naturel de *for* chez *D. melanogaster*. Les résultats suggèrent que les *sitters* seraient avantagés dans des conditions thermiques élevées. Cependant, des populations échantillonnées dans des zones désertiques telles qu'en Tunisie, tendent davantage à se comporter comme des individus *rovers* (Sokolowski 1990 in Dawson Scully et al. 2007). Les individus *rovers* seraient par exemple plus aptes à éviter les environnements trop chauds de par leur plus grande propension à se déplacer, contrairement aux *sitters* qui devraient compenser une plus faible adaptabilité comportementale par une plus grande résistance physiologique. Les caractéristiques comportementales et physiologiques sont donc à prendre en considération pour comprendre les mécanismes d'adaptation aux conditions thermiques (Dawson-Scully et al. 2007).

β. Tolérance au manque d'oxygène

La tolérance au manque d'oxygène permet la survie des individus dans un environnement anoxique sans déficits neuronaux pour une période de temps déterminé (Haddad 2006). Chez la drosophile *D. melanogaster*, les adultes sont capables de survivre

plusieurs heures dans un environnement à 0 % d'oxygène. Les individus exposés à de telles conditions extrêmes expriment rapidement un dysfonctionnement moteur (immobilité) et tombent dans un coma anoxique, toutefois réversible si les taux d'oxygène ré-augmentent avant l'apparition de dégâts physiologiques irréversibles (Haddad 2006).

Les niveaux d'activité de la PKG, associés au polymorphisme du gène *for*, seraient un élément majeur du seuil de tolérance au manque d'oxygène chez la drosophile (Dawson-Scully et al. 2010). Exposées à un taux d'oxygène inférieur à 2%, les individus *rovers* entrent dans un coma anoxique plus rapidement que les individus *sitters* naturels et mutants. L'approche pharmacologique employée *in vivo* permet de confirmer le lien causal entre la PKG et la tolérance au manque d'oxygène : l'augmentation de l'activité enzymatique réduisait la latence d'apparition du coma, tandis qu'une diminution de l'activité PKG l'augmentait. En revanche, les *rovers* survivent mieux (50%) que les *sitters* naturels et mutants (25%) après 6 heures d'exposition à un environnement sans oxygène, suivi d'une ré-oxygénation normale. Des résultats similaires ont été observés au niveau prénatal (embryons) et chez les larves, où les individus *rovers* ont un meilleur taux de survie que les *sitters* face au manque d'oxygène (Wingrove & O'Farrell 1999).

Ainsi, la tolérance au manque d'oxygène pourrait être un facteur de sélection différentielle des allèles naturels du gène *for*. Par exemple, les chutes de pluies abondantes peuvent provoquer une réduction de la quantité d'oxygène dans l'habitat des drosophiles (habitats imbibés d'eau). En fonction des conditions climatiques, les *rovers* et les *sitters* auraient donc une fitness différentes.

b) La densité des populations

La densité des populations est une condition variable dans le temps et l'espace, qui affecte significativement l'évolution des caractéristiques individuelles de l'espèce. Sokolowski et al. (1997) montrèrent que le polymorphisme *rover-sitter* était différentiellement sélectionné en fonction de la densité des populations (élevée ou basse). En condition de sélection naturelle en laboratoire, les larves de phénotype *rover* sont sélectionnées sous haute densité, tandis que les *sitters* sont favorisées dans les populations de basse densité. Cette pression de sélection directionnelle associée au polymorphisme du gène *for* semble essentiellement agir au stade larvaire de l'espèce. Dans les modèles populationnels, les stratégies de type « actif » (de type K, correspondant ici au phénotype *rover*) ont un avantage sélectif dans les populations

établies, tandis que les stratégies de type « passif » (de type r, référant au phénotype *sitter*) ont une meilleure fitness lors de l'établissement de nouvelles populations (Benus et al. 1991). Ainsi, la fréquence des différentes stratégies alimentaires exprimées dans les populations semble être dépendante des conditions de densité (Sokolowski et al. 1997).

Dans ce contexte, la densité peut être comprise comme un facteur de modulation des niveaux de compétition interindividuelle. À densité élevée, les ressources alimentaires sont plus difficiles d'accès et diminuent plus rapidement. Les larves sont alors contraintes d'effectuer d'importants déplacements pour contourner les congénères et trouver de nouveaux sites de nourriture. Ces conditions confèrent une meilleure fitness aux individus *rovers*, qui sont davantage susceptibles de localiser de nouvelles ressources de part leur plus forte activité locomotrice, leur plus grande tendance à quitter un patch de nourriture (Sokolowski 2001), et leur vitesse angulaire réduite (i.e. trajectoire plus linéaire, à la différence des *sitters* qui tournent d'avantage sur eux-mêmes) (Pereira & Sokolowski 1993). En revanche sous condition de basse densité, la nourriture est continuellement distribuée et de relativement haute quantité et qualité. Une forte activité locomotrice énergétiquement coûteuse (Berrigan & Pepin 1995) serait alors inutile, favorisant la stratégie *sitter*. Ainsi, les *rovers* plus mobiles seraient plus aptes à exploiter des environnements où les ressources alimentaires sont distribuées en patches, alors que les *sitters* exploiteraient plus efficacement des milieux où la nourriture est distribuée de façon homogène, sans gaspiller l'énergie nécessaire à la locomotion (Sokolowski et al. 1997).

c) La disponibilité des ressources alimentaires

α. Les performances cognitives

Les capacités d'apprentissage sont soumises à des pressions de sélection directionnelles dépendantes de l'environnement dans lesquelles elles sont exprimées (Mery et al. 2007). L'habileté à apprendre et retenir une information rapidement (mémoire à court terme) serait avantageuse dans un environnement changeant fréquemment, alors qu'une bonne capacité de rétention de l'information (mémoire à long terme) serait plus utile dans les environnements plus stables. Par exemple, la disponibilité des ressources alimentaires (quantité et distribution) varie dans le temps et l'espace (Reaume & Sokolowski 2006). Les individus *rovers* se caractérisent par une meilleure mémoire à court terme et plus faible mémoire à long terme que les individus *sitters* (Mery et al. 2007). Les mouches *rovers*, plus

mobiles, sont d'avantages exposées à de nouveaux environnements. Leur capacité à former rapidement une association entre une odeur et une ressource alimentaire pourrait constituer un avantage conséquent pour l'estimation de la qualité nutritive de la ressource (Kaun et al. 2007b). Cependant, la rétention de ces informations étant énergétiquement coûteuse, et la probabilité d'expérimenter à nouveau une condition identique étant faible, un compromis évolutif pourrait expliquer la plus faible mémoire à long terme (Kaun et al. 2007b) et la plus forte interférence rétroactive (Reaume et al. 2011) exprimées par les *rovers*. Les *sitters*, plus sédentaires, sont exposés à un environnement plus stable (Pereira & Sokolowski 1993, Sokolowski 2001). La capacité à effectuer des associations entre de nouveaux stimuli serait donc moins avantageuse que l'habileté à mémoriser sur le long terme les espaces alimentaires déjà exploités (Kaun et al. 2007b, Reaume et al. 2011). Les stratégies évolutives des *rovers* et des *sitters* seraient donc associées à une adaptation à un environnement plus ou moins variable (Mery et al. 2007). Les différences de performances cognitives nécessaires à la gestion de ces informations nutritionnelles entre les *rovers* et les *sitters*, seraient un facteur modulateur important de la fréquence et de la fitness des différents phénotypes de *D. melanogaster*.

β. Les performances métaboliques

Dans les environnements naturels où l'abondance et la qualité de la nourriture peuvent radicalement changer au fil du temps, les animaux doivent continuellement adapter leurs stratégies d'acquisition de la nourriture. Bien que les patterns comportementaux des phénotypes *rovers* et *sitters* soient « génétiquement basés », ils demeurent plastiques et peuvent être modifiés par l'environnement interne et externe des individus (Sokolowski 2001). Par exemple, les larves et les adultes *rovers* expriment un comportement de type *sitter* après une courte période de privation alimentaire (Graf & Sokolowski 1989), et augmentent d'avantage leur comportement de prise alimentaire que les *sitters* (plus forte compensation ; Kent et al. 2009). Un phénomène similaire est observé lorsque la concentration en sucre de la source alimentaire est augmentée (ressource plus nutritive), les adultes *rovers* restant préférentiellement à proximité (Graf & Sokolowski 1989). Les *rovers* ont ainsi une plasticité phénotypique plus importante, adaptant d'avantage leur comportement de recherches alimentaires en fonction des conditions environnementales.

Toutefois, l'activité locomotrice de haut niveau exprimée généralement par les *rovers* de *D. melanogaster* lors du fourragement est coûteuse en énergie (Berrigan & Pepin 1995), ce qui

suggère des besoins énergétiques plus importants chez les *rovers* que chez les *sitters*. Leurs stratégies d'acquisition des nutriments devraient donc différer, les *rovers* étant supposés exprimer une plus forte consommation alimentaire. Via l'utilisation d'un colorant alimentaire additionné au milieu nutritif artificiel donné aux larves, Kaun et al. (2007a) montrèrent qu'étonnamment, les larves *rovers* élevées sur un substrat nutritif non limitant ont un taux de consommation inférieure à celui des *sitters* naturels et mutants (Kaun et al. 2007a) (figure 12 A). Le maintien d'un développement similaire soulève un paradoxe inattendu, toutefois résolu lorsque les performances métaboliques des deux morphes sont analysées. Les *rovers* peuvent en effet contrebalancer leur consommation alimentaire réduite par des taux d'absorption des nutriments supérieurs : 50% du glucose ingéré est absorbé chez les individus *for^R* contre 15% chez les *for^s* et *for^{s2}* (figure 12 B). De plus, les nutriments assimilés tendent à être stockés de manière différente entre les phénotypes. Les *sitters* naturels et mutants stockent d'avantage l'énergie sous forme glucidique (rapport glucide/lipide plus élevé) que les *rovers* (Kent et al. 2009, Kaun et al. 2008) (figure 13). Les glucides étant généralement associés à la résistance au stress abiotique et les lipides à la résistance au manque de nourriture et aux efforts locomoteurs prolongés (Kent et al. 2009), ces différences métaboliques pourraient être un facteur régulateur supplémentaire des stratégies d'acquisition des ressources.

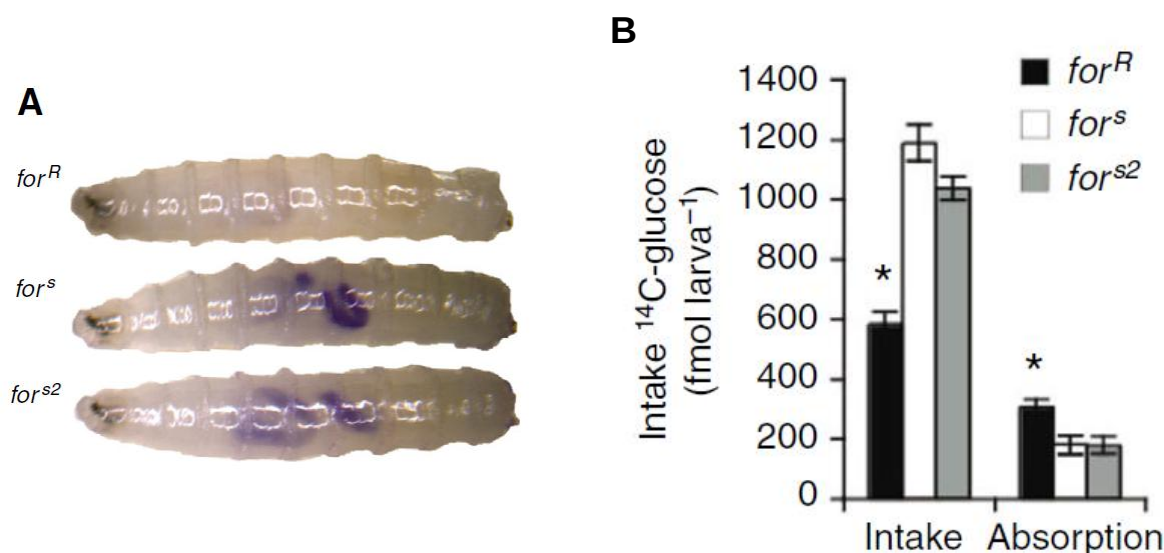


Figure 12. Effet du gène *for* sur la consommation alimentaire. (A) Larves rover (*for^R*) et sitter (*for^s* et *for^{s2}*) de troisième stade larvaire, dont la nourriture consommée (en bleue) est visible par transparence dans le tube digestif grâce à l'emploi d'un colorant alimentaire dans le milieu nutritif. (B) Après 15 minutes passé dans un environnement nutritif contenant du glucose 14C, le taux de 14C ingéré et assimilé varie en fonction du génotype *foraging* (Kaun et al. 2007a).

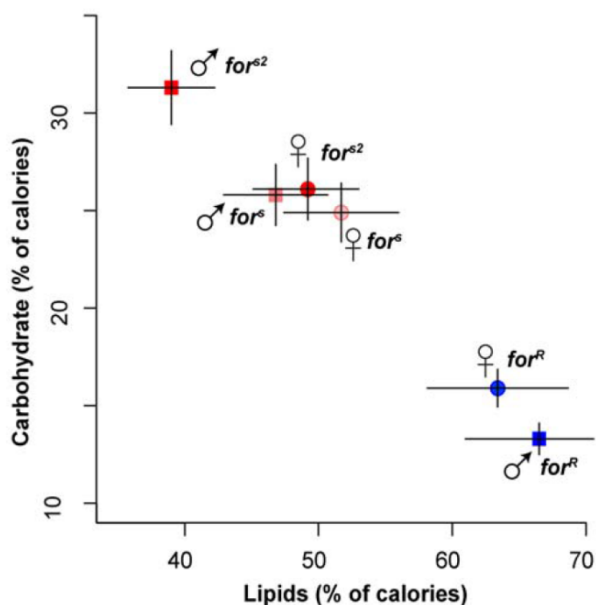


Figure 13. Les rovers (bleus) et les sitters (rouges) naturels et mutants stockent les nutriments assimilés de façon différente (Kent et al. 2009).

La proportion des calories totales due aux lipides (abscisse) et aux glucides (ordonnée) est mesurée sur des individus entiers mâles et femelles âgés de 5 jours (pour les trois souches testées).

Les rovers et les sitters stockent d'avantage l'énergie sous forme lipidique que glucidique, bien que le rapport lipides/glucide soit nettement plus important chez les rovers

Lorsque la nourriture est rare ou faiblement nutritive, les larves *for^R*, *for^s* et *for^{s2}* augmentent leur consommation de nourriture à un niveau maximal commun. Les taux d'assimilation du glucose ne variant pas avec la qualité de la ressource alimentaire, les meilleures performances métaboliques des larves rovers *for^R* leur permettent de se développer plus rapidement et de maintenir un taux de survie plus élevé que les sitters *for^s* et *for^{s2}* (Kaun et al 2007a). L'utilisation d'une lignée transgénique *sitter* surexprimant le transcrit *forT2* (Osborne et al. 1997), permis d'obtenir des individus originellement sitters montrant des taux de consommation et d'assimilation des nutriments identiques à celui des rovers (Kaun et al 2007a). L'ensemble de ces données peuvent expliquer pourquoi la sélection à long terme sous haute densité larvaire est favorable aux rovers (Sokolowski et al 1997), compte tenue de la faible accessibilité des ressources dans ces conditions.

Fitzpatrick et al. (2007) montrèrent qu'une faible abondance des ressources alimentaires dans l'environnement induit l'émergence d'un pattern clair de sélection fréquence-dépendante négative. C'est-à-dire que chacun des phénotypes à une fitness maximale lorsqu'il est faiblement représenté dans la population. Ainsi, lorsque les ressources alimentaires sont insuffisantes, les rovers ont une chance de survie maximale dans les populations essentiellement composées d'individus sitters. Ce phénomène ne s'observe pas lorsque la nourriture est abondante et ne constitue pas un facteur limitant, démontrant le rôle de la compétition entre les larves d'un même phénotype pour les ressources alimentaires (Fitzpatrick et al. 2007). La

probabilité qu'un phénotype augmente dans la génération suivante est donc conjointement modulée par la variabilité génétique de la population associée aux conditions nutritionnelles.

d) Le parasitisme

Il existe un conflit évolutif entre la capacité d'infestation des guêpes parasitoïdes et la capacité de l'hôte à s'échapper ou à se défendre contre ce prédateur (Carton & Sokolowski 1992). Le parasitisme constitue ainsi une pression influençant la sélection de phénotypes spécifiques permettant la défense des hôtes. *Leptopilina boulardi* et *Ganaspis xanthopoda* sont deux espèces de parasitoïde dont les femelles parasitent les larves *rovers* et *sitters* de *D. melanogaster*. Ces espèces ont une stratégie de recherche des larves hôtes différente : la recherche de contact par l'ovipositeur et la vibrotaxie (Vet & van Alphen 1985). *L. boulardi* utilise son ovipositeur pour détecter les larves en surface du milieu, tandis que *G. xanthopoda* utilise la perception des vibrations produites par les individus durant leurs déplacements comme moyen de localisation des hôtes (Carton & Sokolowski 1992). Les études en laboratoire ont montré que *L. boulardi* parasite d'avantage les larves *sitters* qui se déplacent peu et reste d'avantage en surface de la ressource alimentaire, tandis que *G. xanthopoda* parasite préférentiellement les larves *rovers* qui produisent plus de vibrations, même lorsque celles-ci sont enfouies sous la surface du substrat nutritif. Les caractéristiques comportementales impliquées par le gène *for* semblent ainsi être différenciellement sélectionnées selon le type de pression de parasitisme présente dans l'environnement (Carton & Sokolowski 1992)

3/ Effet d'une variation d'expression du gène

Chez les hyménoptères sociaux tels que les fourmis et les abeilles, la répartition des tâches parmi les ouvrières de la colonie (caste non reproductrice) est organisée sur la base d'un polyéthisme d'âge. Durant les premiers jours de vie suivant l'émergence, les jeunes ouvrières exécutent des activités à l'intérieur de la ruche telles que les soins au couvain (*nurse*). Ce n'est qu'une fois plus âgés que les individus modifient leur comportement et deviennent des fourrageuses, explorant l'environnement extérieur à la recherche des ressources alimentaires nécessaires à la survie de la colonie (figure 14). Bien que stéréotypée, cette division du travail est remarquablement plastique, les individus étant capable d'accélérer ou d'inverser leur

développement comportemental selon les besoins de la colonie (Bloch & Robinson 2001, Gordon 1989). Chez les différentes espèces d'hyménoptères étudiées, ces changements d'activité associés à la division du travail au sein de la colonie semblent être en partie régulés par la variation de l'expression du gène *foraging* au cours de l'ontogénèse.

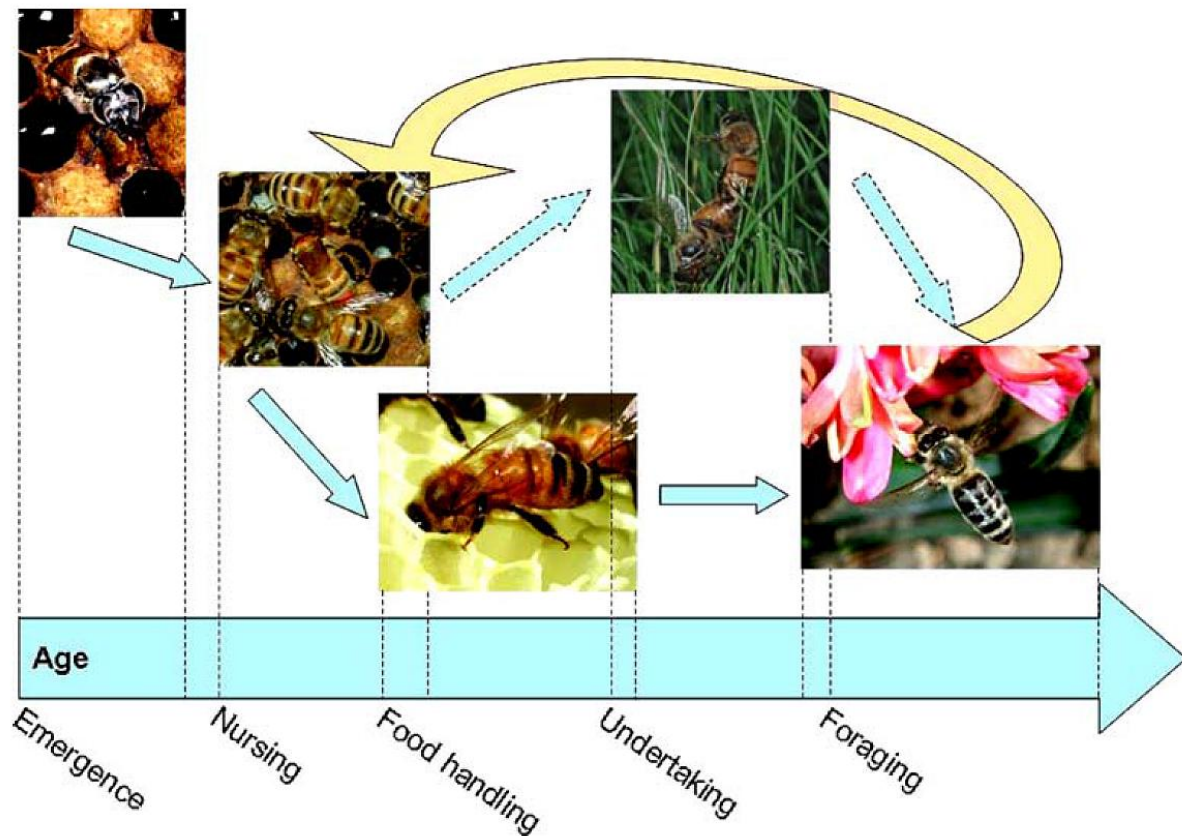


Figure 14. Division du travail et polyéthisme d'âge chez les abeilles (Ben-Shahar et al. 2005). Bien que le développement comportemental soit stéréotypé (flèches bleues), les abeilles sont capables de modifier leur comportement en fonction des besoins de la colonie (flèche orange). Dans des conditions habituelles, du premier au septième jour les ouvrières effectuent des tâches de maintenance de la ruche, puis deviennent des *nurses* et potentiellement des *undertaker* (voir texte ci après) durant la deuxième semaine de vie. A environ 3 semaines, les individus commencent à exprimer un comportement de fourragement à l'extérieur du nid.

a) Chez les abeilles, *Apis mellifera*

En utilisant l'approche du gène candidat, Ben-Shahar et al. (2002) identifièrent l'orthologue du gène *foraging* chez l'abeille *Apis mellifera* (*Amfor*, 87% d'homologie avec le gène de la drosophile) et analysèrent son influence sur la régulation de la division du travail dans les colonies. Les niveaux d'expression intracérébraux d'*Amfor*, de même que l'activité enzymatique de la PKG, sont plus élevés chez les fourrageuses que chez les *nurses*. Pour déterminer si ce phénomène est principalement corrélé au comportement de fourragement ou

à l'âge plus élevé des fourrageuses, Ben-Shahar et al. (2002) ont modulé artificiellement les niveaux de PKG des individus et la structure sociale de la colonie afin d'influencer le déclenchement du fourragement. De jeunes abeilles âgées de 4 à 7 jours dont les niveaux d'activité enzymatique étaient augmentées par un analogue pharmacologique du second messager de la PKG (la GMPc), ont exprimé un comportement de fourragement précoce. En condition naturelle, la transition entre ces deux types d'activité semble résulter d'un pic d'expression d'*Amfor*, plutôt que d'une augmentation progressive et continue de l'expression au cours de l'ontogénèse. Cette brusque augmentation de la PKG agirait comme un déclencheur (effet « *trigger* ») des activités externes à la ruche (Heylen et al. 2008). Ben-Shahar et al. (2002) firent une analogie illustrative mais provocante entre le polymorphisme *rover-sitter* observé chez la drosophile et les différentes catégories d'abeilles. Les *nurses* (activité PKG réduite) se déplaçant dans l'environnement restreint de la ruche seraient comparables aux *sitters*, tandis que les fourrageuses (activité PKG élevée) effectuant de long trajet pour récolter le pollen et le nectar seraient comparables aux *rovers*.

Chez les abeilles, *Amfor* est largement exprimé dans les corps pédonculés (Ben-Shahar et al 2002), structures nerveuses qui constituent le centre principal du traitement sensoriel multimodal chez l'insecte (Heisenberg 1998). Plus précisément, une importante quantité d'ARNm est localisée dans les cellules de Kenyon (petits neurones présents dans les corps pédonculés) qui reçoivent essentiellement des inputs visuels (Ben-Shahar et al. 2002). *Amfor* pourrait donc être impliqué dans la régulation des comportements des abeilles par le biais du système visuel. L'analyse des comportements exprimés en réponse à des stimuli lumineux révéla une phototaxie positive beaucoup plus prononcée chez les fourrageuses que chez les *nurses* (Ben-Shahar et al. 2003). De plus, un traitement pharmacologique à la GMPc chez de jeunes individus permet une augmentation significative des réponses phototaxiques positives. Le rôle de la PKG sur le seuil de déclenchement des activités en extérieur est confirmé par l'analyse d'une catégorie particulière d'ouvrières, les « *undertakers* », chargées d'évacuer les cadavres de congénères de la ruche. Ces individus présentent des caractéristiques intermédiaires aux *nurses* et aux fourrageuses. Bien qu'elles soient plus jeunes que les fourrageuses habituelles, elles présentent un niveau d'expression d'*Amfor* similaire et effectuent de nombreux aller-retour à l'extérieur de la ruche. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les changements phototaxiques en association avec une augmentation de l'expression d'*Amfor* constitueraient un facteur déclenchant des activités externes à la ruche (comportement de fourragement ou d'évacuation des cadavres) (Ben-Shahar et al 2002 ; Ben-

Shahar et al 2003). Cette variabilité des seuils de réponse comportementale aux stimuli tâche-spécifiques, affectant la probabilité qu'une abeille effectue une tâche particulière selon son stade de développement, pourrait permettre d'expliquer l'organisation comportementale de la colonie comme un mécanisme auto-organisé (Ben-Shahar et al. 2005).

b) Chez les fourmis

Chez la fourmi moissonneuse *Pogonomyrmex barbatus*, toutes les ouvrières ont une morphologie similaire (absence de caste morphologique) et la maturation des comportements s'effectue au cours de l'ontogénèse (polyéthisme d'âge) (Gordon 1989). Les jeunes ouvrières restreignent leur activité à l'intérieur du nid (i. e. soins aux couvains), puis deviennent des fourrageuses en progressant à l'extérieur du nid une fois plus âgées (Wilson 1971). Selon le type de tâche effectuée, l'expression intracérébrale de l'orthologue du gène *foraging* (*Pbfor*) varie : les niveaux d'ARNm sont significativement supérieurs dans le cerveau des jeunes ouvrières que dans celui des fourrageuses expérimentées. Le niveau d'expression de *Pbfor* serait donc corrélé au polyéthisme temporel chez *P. barbatus* (Ingram et al 2005).

Cependant, si l'association entre le gène *for* et les comportements alimentaires semble être conservée parmi les insectes sociaux, les processus de régulation des voies de signalisation de la PKG peuvent avoir évolué de manière différente. Chez les abeilles *A. mellifera*, les fourrageuses sont caractérisées par une plus forte expression, tandis que chez *P. barbatus*, celles-ci ont une expression plus réduite comparée aux individus plus jeunes restant à l'intérieur du nid. Il existe ainsi un rapport inverse entre le niveau d'expression du gène et le comportement chez ces deux espèces d'hyménoptères. Ces résultats suggèrent que les mécanismes de régulation génétique associés aux comportements alimentaires peuvent avoir évolué différemment selon l'histoire évolutive et les pressions écologiques spécifiques aux différentes espèces (Ingram et al. 2005).

Chez la fourmi *Pheidole pallidula*, la division du travail est conjointement régulée par un polyéthisme d'âge et de caste (Lucas & Sokolowski 2009). Les ouvrières de cette espèce se distinguent en deux morphes : les minors et les majors. Les majors (ou soldats), qui sont physiquement plus grandes et possèdent des mandibules hypertrophiées, sont prédisposées à la défense du nid. Les minors, plus petites, deviennent quant à elle des fourrageuses. Ces deux sous-castes exerçant des activités à l'extérieur du nid ont un niveau de maturité similaire (même âge). En dépit de cette prédisposition à des spécialisations comportementales, les

individus d'une même caste sont capables d'adapter leurs comportements en fonction des besoins de la colonie (Wilson 1984). Cette plasticité comportementale, avantageuse pour la colonie lorsque les conditions environnementales changent rapidement, semble être modulée chez cette espèce par les niveaux d'activité de la PKG codée par l'orthologue du gène *for* (*Ppfor*) (Lucas & Sokolowski 2009). Dans des conditions stables, les majors ont un niveau d'activité enzymatique intracérébrale plus élevé que celui des minors. Toutefois, ces niveaux « basals » peuvent être modulés par l'exposition de la colonie à des stimuli spécifiques tels que la présence d'une proie ou d'un intrus. Lorsqu'une proie est accessible, les minors comme les majors expriment un comportement de fourragement, associé à une diminution de leurs niveaux d'activité PKG. A l'inverse, les comportements de défenses et les niveaux d'activité enzymatique augmentent dans les deux castes lors de la rencontre avec un intrus. De plus, l'augmentation artificielle de l'activité enzymatique via un traitement pharmacologique à la GMPc, montrent qu'une plus grande activité de PPFOR augmente les comportements de défense et réduit le fourragement des individus en fonction du contexte. Ainsi, le type et la flexibilité des réponses comportementales en fonction des variations de l'environnement seraient modulés par le gène *Ppfor* chez *P. pallidula* (Lucas & Sokolowski 2009).

c) Chez les ravageurs de cultures

α. La chrysomèle du maïs, *Diabrotica virgifera virgifera*

La chrysomèle *Diabrotica virgifera virgifera*, originaire d'Amérique centrale, est un ravageur important du maïs depuis plus de 50 ans (Garabagi et al 2008). L'espèce présente une seule génération par an. A la fin de l'été, les femelles pondent leurs oeufs dans les champs de maïs, dont les plantes seront nécessaires au développement des larves qui émergeront le printemps suivant. En effectuant une alternance annuelle entre les cultures de maïs et de plantes non-hôtes (telles que le soja), le développement de la génération suivante pouvait être empêché. Cette méthode de rotation des cultures fournissait alors aux agriculteurs un moyen de lutte efficace contre cette espèce (Krysan & Branson 1983). Cependant celle-ci perdit rapidement de son efficacité avec l'apparition d'un nouveau comportement « variant ». Au lieu de pondre spécifiquement leurs œufs dans les champs de maïs, les femelles « variantes » sélectionnent leur site d'oviposition dans des parcelles de plantes non-hôtes, dans lesquelles est planté du maïs l'année suivante. Lors de l'émergence, les larves disposent donc de la ressource alimentaire adéquate à leur survie et leur développement (Garabagi et al 2008).

En étudiant les comportements de déplacement des individus de *D. v. virgifera* issus de populations adaptées (variantes) et non-adaptées au système de rotation des cultures, Knolhoff et al. (2006) montrèrent que les femelles “variantes” sont plus actives que celles issues d’une population non-adaptée. Ces résultats suggèrent l’existence d’un substrat génétique sous-tendant l’expression de ces variations comportementales. Pour explorer cette possibilité, Garabagi et al. (2008) étudièrent les niveaux de transcription de l’orthologue du gène *for* (*Dvfor1*) dans le cerveau des femelles *D. v. virgifera* issues des deux types de populations. La protéine DvFOR1, homologue à environ 70% de la PKG de *D. melanogaster*, était d’avantage exprimée dans les cerveaux des femelles adaptées que non-adaptées (Garabagi et al 2008). Bien que le gène *Dvfor* puisse être impliqué dans les mécanismes adaptatifs de *D. v. virgifera* au système de rotation des cultures, cette étude encore incomplète ne permet pas de conclure sur les effets directs de la PKG chez cette espèce. Par exemple, celle-ci pourrait intervenir dans un ensemble de caractères tels que la régulation des comportements locomoteurs, des préférences alimentaires ou encore de la sélectivité pour le site d’oviposition, qui permettrait de façon indirecte l’expression du phénotype variant observé.

β. Le criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria*

Le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* est une espèce ravageuse Africaine connue pour sa capacité à former des essaims migrants particulièrement dévastateurs. L’apparition de telle migration est directement corrélée au niveau de densité de la population. Lorsque la densité est faible, les individus sont cryptiques et expriment un comportement solitaire et relativement sédentaire. En revanche lorsque la densité de la population augmente, les individus développent une coloration vive et changent radicalement de comportement, devenant grégaire et se déplaçant sur de longues distances sous forme d’essaim (Lucas et al. 2010a). Ce phénomène constitue un modèle intéressant du polyphénisme, cas particulier de plasticité phénotypique où un seul génotype produit plusieurs phénotypes distincts en réponse à une variation fiable et prédictible de l’environnement.

Les différences de comportements locomoteurs associés à l’alimentation observés entre les phases sédentaire et migratrice laissent à penser que le gène *foraging* pourrait intervenir dans la régulation de cette transition comportementale. L’orthologue du gène *for* chez *Schistocerca gregaria* présente un taux d’homologie d’environ 70% avec le gène *dg2* de la drosophile *D. melanogaster* (Lucas et al. 2010a). Le niveau d’activité de la PKG était plus élevé chez les individus en phase migratrice que sédentaire, indiquant une corrélation positive entre le

niveau d'activité enzymatique et les niveaux de déplacements, comme observé chez la drosophile *D. melanogaster* et les abeilles *A. mellifera*. Ainsi, ces résultats suggèrent un rôle de la PKG dans l'expression des caractéristiques comportementales respectives aux deux phases.

Tableau 1. Tableau récapitulatif des différentes espèces ayant fait l'objet d'une étude corrélative entre le gène *for* et les comportements associés à l'alimentation. Dans toutes ces espèces, y compris celles qui ne présentent pas de variation allélique du gène, une variation du niveau d'expression de gène ou du niveau d'activité de la protéine a été corrélée aux variations comportementales observées. Les sens de la régulation des comportements (i. e. sens de la corrélation entre le niveau d'activité du gène et le niveau d'activité comportementale) peut être positif (+) ou négatif (-).

Espèce	Fonction	Variation allélique	Sens de la régulation
<i>Drosophila melanogaster</i>	Locomotion alimentaire Consommation-assimilation Sensibilité gustative et olfactive Performance mnésique Résistance aux stress abiotiques	Oui	+
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Locomotion alimentaire Sensibilité olfactive Développement et durée de vie	Oui	-
<i>Apis mellifera</i>	Passage à la tâche de butineuse Phototaxie	Non	+
<i>Pogonomyrmex barbatus</i>	Passage à la tâche de fourrageuse	Non	-
<i>Pheidole pallidula</i>	Passage à la tâche de fourrageuse Plasticité fourrageuse/gardiennne	Non	-
<i>Bombus terrestris</i>	Passage à la tâche de fourrageuse	Non	+
<i>Vespa vulgaris</i>	Passage à la tâche de fourrageuse	Non	-
<i>Schistocerca gregaria</i>	Passage à la phase grégaire	Non	+
<i>Diabrotica virgifera</i> v.	Variant résistant à la rotation des cultures	Oui	+

IV – Bibliographie

- Adams, M. D. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287, 2185–2195 (2000).
- Alberini, C. M. (1999). Genes to remember. *J. Exp. Biol.* 202, 2887–2891.
- Alverdi, V., Mazon, H., Versluis, C., Hemrika, W., Esposito, G., van den Heuvel, R., Scholten A. & Heck, A. J. R. (2008). cGMP-binding Prepares PKG for Substrate Binding by Disclosing the C-terminal Domain. *J. Mol. Biol.* 375, 1380–1393.

- Anglade, P. (1972). Les *Sesamia*. Entomologie Appliquée à l'Agriculture. II, Lépidoptères (Masson et Cie, Paris, France, ed. by A S Balachowsky), pp. 1389-1400.
- Baker, B. S., Taylor, B. J. & Hall, J. C. (2001). Are complex behaviors specified by dedicated regulatory genes? Reasoning from *Drosophila*. *Cell*. 105, 13–24.
- Belay, A. T., Scheiner, R., So, A. K.-C., Douglas, S. J., Chakabarty-Chatterjee, M., Levine, J. D. & Sokolowski M. B. (2007). The *foraging* gene of *Drosophila melanogaster*: spatial-expression analysis and sucrose responsiveness. *J. Comp. Neuro.* 504, 570-582.
- Ben-Shahar, Y., Robichon, A., Sokolowski, M. B. and Robison G. E. (2002). Influence of gene action across different times scales on behavior. *Science*. 296, 741-744.
- Ben-Shahar, Y., Leung, H.-T., Pak, W. L., Sokolowski, M. B. and Robinson G. E. (2003). cGMP-dependent changes in phototaxis: a possible role for the *foraging* gene in honey bee division of labor. *J. Exp. Biol.* 206, 2507-2515.
- Ben-Shahar, Y. (2005). The *foraging* gene, behavioral plasticity, and honeybee division of labor. *J. Comp. Physiol.* 1991, 987-994.
- Benus, R. F., Bohus, J. M., Koolhaas, J. M. & van Oortmerssen, G. A. (1991). Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. *Experientia*. 47, 1008–1019.
- Bernatchez L. and Landry C. (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J Evol Biol.* 16:363–377.
- Berrigan, D. & Pepin, D. J. (1995). How maggots move: Allometry and kinematics of crawling in larval Diptera. *Journal of Insect Behavior*, 41: 329–337
- Bloch, G. & Robinson, G. E. (2001). Chronobiology. Reversal of honeybee behavioural rhythms. *Nature*. 410:1048.
- Campesan, S. et al. (2001). The nonA gene in *Drosophila* conveys species-specific behavioral characteristics. *Genetics*. 158, 1535–1543
- Carton, Y. & Sokolowski, M. B. (1992). Interactions between searching strategies of *Drosophila melanogaster* parasitoids and the polymorphic behavior of their hosts. *Journal of Insect Behavior*, 5(2): 161-175.
- Casteel, D. E., Smith-Nguyen, E. V., Sankaran, B., Roh, S. H., Pilz, R. B. & Kim, C. (2010). A Crystal Structure of the Cyclic GMP-dependent Protein Kinase I β Dimerization/Docking Domain Reveals Molecular Details of Isoform-specific Anchoring. *Journal Of Biological Chemistry*. 285(43), 32684–32688
- Chapman, T. et al. (2003) The sex peptide of *Drosophila melanogaster*: female post-mating responses analysed by using RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9923–9928
- Cordero, A., Malvar, M. A., Butrón, A., Revilla, P., Velasco, P. and Ordás, A. (1998). Population dynamics and life-cycle of corn borers in south Atlantic European coast. *Maydica*. 43, 5-12.
- Daugherty, T. H. F., Toth, A. L. & Robinson, G. E. (2011). Nutrition and division of labor: Effects on foraging and brain gene expression in the paper wasp *Polistes metricus*. *Mol. Ecol.* 20, 5337-5347.
- Dawson-Scully, K., Armstrong, G. A., Kent, C., Robertson, R. M. and Sokolowski, M. B. (2007). Natural variation in the thermotolerance of neural function and behavior due to a cGMP-dependent protein kinase. *PLoS ONE* 2, e773.
- Dawson-Scully, K., Bukvic, D., Chakabarty-Chatterjee, M., Ferreira, R., Milton, S. L. and Sokolowski M. B. (2010). Controlling anoxic tolerance in adult *Drosophila* via the cGMP–PKG pathway. *J. Exp. Biol.* 213, 2410-2416.
- de Belle, J. S. & Sokolowski, M. B. 1987. Heredity of rover/sitter: alternative foraging strategies of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 59 : 73–83.
- de Belle, J. S., Hilliker, A. J. and Sokolowski, M. B. (1989). Genetic localization of *foraging* (*for*): a major gene for larval behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 123, 157-164.
- Douglas, S. J., Dawson-Scully, K. & Sokolowski, M. B. (2005). The neurogenetics and evolution of food-related behaviour. *TRENDS in Neurosciences*. 28(12), 644-652.
- Doupe, A. J. & Kuhl, P. K. (1999). Birdsong and human speech: common themes and mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 567–631.

- Edwards S. V., Potts W. K. (1996). Polymorphism of Mhc genes: implications for conservation genetics of vertebrates. In: Smith TB, Wayne RK (eds) *Molecular genetic approaches to conservation*. Oxford University Press, Oxford, pp 214–237.
- Edwards S. V., Grahm M., Potts W. K. (1995). Dynamics of mhc evolution in birds and crocodilians—amplification of class-ii genes with degenerate primers. *Mol Ecol.* 4:719–729.
- Engel, J. E., Xie, X.-J., Sokolowski, M. B. & Wu C.-F. (2000). A cGMP-dependent protein kinase gene, *foraging*, modifies habituation-like response decrement of the giant fiber escape circuit in *Drosophila*. *Learning Memory*, 7: 341–352.
- Fakorede M. A. B., Akinyemiju (2003). Climatic change: effects on maize production in tropical rainforest location. In *Maize revolution in west and central Africa*. IITA Ibadan Nigeria. Pp. 272–285.
- FAO. (2010). Evaluation des ressources forestières mondiales 2010. Chap. 2, Etendue des ressources forestières. Pp 11–51.
- Feder, M. E. (1997). Necrotic fruit: a novel model system for thermal biologists. *J. Therm. Biol.* 22: 1.
- Fitzpatrick, M. J. and Sokolowski, M. B. (2004). In search of food: exploring the evolutionary link between cGMP-dependent protein kinase (PKG) and behavior. *Integr. Comp. Biol.* 44, 28–36.
- Fitzpatrick, M. J., Ben-Shahar, Y., Smid, H. M., Vet, L. E. M., Robinson, G. E and Sokolowski, M. B. (2005). Candidate genes for behavioural ecology. *Trends Ecol. Evol.* 20(2), 96–104.
- Fitzpatrick, M. J., Feder, E., Rowe, L. & Sokolowski, M. B. (2007). Maintaining a behavior polymorphism by frequency-dependent selection on a single gene. *Nature*, 447: 210–213
- Foley, J. A. et al. (2005). Global consequences of land use. *Science*. 309, 570–574.
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., Mueller, N. D., O’Connell, C., Ray, D. K., West, P. C., et al. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*. 337(478), 337–342.
- Ford, E. B. (1964). *Ecological Genetics* (Wiley, New York).
- Francis, S. H., Poteet-Smith, C., Busch, J. L., Richie-Jannetta, R., & Corbin, J. D. (2002). Mechanisms of autoinhibition in cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Front. Biosci.* 7, d580–d592.
- Fujiwara, M., Sengupta, P. and McIntire, S. L. (2002). Regulation of body size and behavioural state of *C. elegans* by sensory perception and the EGL-4 cGMPdependent protein kinase. *Neuron*. 36, 1091–1102.
- Garabagi, F., French, B. W., Schaafsma, A. W. & Pauls K. P. (2008). Increased expression of a cGMP-dependent protein kinase in rotation-adapted western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 697– 704.
- Garrigan D. and Hedrick P. W. (2003) Perspective: detecting adaptive molecular polymorphism: Lessons from the MHC. *Evolution Int J Org Evolution*. 57:1707–1722
- Gibbs, H. et al. (2010). Tropical forests were the primary sources of new agricultural land in the 1980s and 1990s. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 16732–16737.
- Goodwin, S. F. et al. (2000). Aberrant splicing and altered spatial expression patterns in fruitless mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 154, 7225–7245.
- Gordon, D. M. (1989). Dynamics of task switching in harvester ants. *Animal Behaviour*. 38, 194–204.
- Graf, S. A. & Sokolowski, M. B. (1989). The rover/sitter *Drosophila* foraging polymorphism as a function of larval development, food patch quality and starvation. *Journal of Insect Behavior*, 2: 301–313.
- Greenspan, R. J. (1995). Understanding the genetic construction of behavior. *Sci. Am.* 272, 74–79.
- Guofa, Z., Overholt, W. A. & Mochiah, M. B. (2002) Changes in the distribution of lepidopteran maize stem borers in Kenya from 1950s to 1990s. *Insect Science and Its Application*. 21, 395–402.
- Haddad, G. G. (2006). Tolerance to low O₂: lessons from invertebrate genetic models. *Exp. Physiol.* 91, 277–282.
- Haesler, S. et al. (2004). *FoxP2* expression in avian vocal learners and non-learners. *J. Neurosci.* 24, 3164–3175

- Hao, Y., Xu, N., Box, A. C., Schaefer, L., Kannan, K., Zhang, Y., Florens, L., Seidel, C., Washburn, M. P., Wiegraabe, W., *et al* (2011). Nuclear cGMP-dependent kinase regulates gene expression via activity-dependent recruitment of a conserved histone deacetylase complex. *PLoS Genetics*. 5(7), 1-15.
- Heisenberg, M. 1998. What Do the Mushroom Bodies Do for the Insect Brain? An Introduction. *Learning Memory*, 5(1): 1-10
- Heylen, K., Gobin, B., Billen, J., Hua, T.-T., Arckens, L. & Huybrechts R. (2008). *Amfor* expression in the honeybee brain: A trigger mechanism for nurse–forager transition. *Journal of Insect Physiology*, 54: 1400–1403.
- Hirose, T. *et al.* (2003) Cyclic GMP-dependent protein kinase EGL-4 controls body size and lifespan in *C. elegans*. *Development*. 130, 1089–1099
- Hoekstra, H. E. (2006). Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97:222–234.
- Hofmann, F. (2005). The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 280:1–4
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T. & Schlossmann, J. (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*. 86: 1–23.
- Hofmann, F., Bernhard, D., Lukowski, R. & Weinmeister P. (2009). cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handb Exp. Pharmacol*. 191: 137–162
- Hong, R. L., Witte, H., and Sommer, R. J. (2008). Natural variation in *P. pacificus* insect pheromone attraction involves the protein kinase EGL-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Ingram, W. R. (1958) The lepidopterous stalk borers associated with Graminae in Uganda. *Bulletin of Entomological Research*. 49, 367–383.
- Ingram, K. K., Oefner, P. & Gordon, D. M. (2005). Task-specific expression of the *foraging* gene in harvester ants. *Mol. Ecol*. 14: 813-818.
- Ingram, K. K., Kleeman, L. & Peteru, S. (2011). Differential regulation of the *foraging* gene associated with task behaviors in harvester ants. *BMC Ecology*. 11(19).
- Insel, T. R. & Young, L. J. (2000). Neuropeptides and the evolution of social behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol*. 10, 784–789
- Kalderon, D. & Rubin, G. M. (1989). cGMP-dependent protein kinase genes in *Drosophila*. *J. biol. Chem*. 264(18), 10738-10748.
- Kamil, A. C. *et al.* (1986). *Foraging Behaviour*, eds Plenum Press
- Kaun, K. R., Riedl, C. A. L., Chakabarty-Chatterjee, M., Belay, A. T., Douglas, S. J., Gibbs, A. G. & Sokolowski, M. B. (2007a). Natural variation in food acquisition mediated via a *Drosophila* cGMP-dependent protein kinase. *The journal of Experimental Biology*, 210: 3547-3558.
- Kaun, K. R., Hendel, T., Gerber, B. & Sokolowski, M. B. 2007b. Natural variation in *Drosophila* larval reward learning and memory due to a cGMP-dependent protein kinase. *Learning Memory*, 14: 342-349.
- Kaun, K. R., Chakabarty-Chatterjee, M. and Sokolowski, M. B. (2008). Natural variation in plasticity of glucose homeostasis and food intake. *J. Exp. Biol*. 211, 3160-3166.
- Kaun, K. R. and Sokolowski, M. B. (2009). CGMP-dependent protein kinase: linking foraging to energy homeostasis. *Genome*. 52, 1-7.
- Kent, C. F., Daskalchuk, T., Cook, L., Sokolowski, M. B. and Greenspan R. J. (2009). The *Drosophila foraging* gene mediates adult plasticity and gene–environment Interactions in behaviour, Metabolites, and gene expression in response to food deprivation. *PloS Genetics*. 5(8).
- Kim, J. J., Casteel, D. E., Huang, G., Kwon, T. H., Ren, R. H., Zwart, P., Headd, J. J., Brown, N. G., Chow, D.-C., Palzkill, T., *et al.* (2011). Co-Crystal Structures of PKG Ib (92–227) with cGMP and cAMP Reveal the Molecular Details of Cyclic-Nucleotide Binding. *PLoS One*. 6(4), e18413.
- Knolhoff, L. M., Onstad, D. W., Spencer, J. L., Levine, E. (2006). Behavioral differences between rotation-resistant and wild-type *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol*. 35, 1049–1057.

- Konopka, R. J. & Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 68, 2112–2116.
- Kristensen, N. P. (1999). Lepidoptera, moth and butterflies, Volume 1: Evolution, systematic, and biogeography (Berlin, New York: Walter de Gruyter).
- Krysan, J. L. & Branson, T. F. (1983). Biology, ecology, and distribution of *Diabrotica*. In: Gordon, D.T., Knoke, J.K., Nault, L.R., Ritter, R.M. (Eds.), Proceedings of the International Maize Virus Discussion Colloquium and Workshop, Wooster, OH, pp. 144–150.
- Landgraf, W., Hofmann, F., Pelton, J. T., Huggins, J. P. (1990). Effects of cyclic GMP on the secondary structure of cyclic GMP dependent protein kinase and analysis of the enzyme's amino-terminal domain by far-ultraviolet circular dichroism. *Biochemistry*. 29:9921–9928.
- Lawrence, J. F. (1982). Coleoptera. In Parker, S. B. (ed.) Synopsis and Classification of Living Organisms. Vol. 2, pp. 482–553. (New York: McGraw-Hill).
- Lai, C. S. L. et al. (2001). A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature* 413, 519–523
- Le Ru, B. P., et al. (2006). Diversity of lepidopteran stem borers on monocotyledonous plants in eastern Africa and the islands of Madagascar and Zanzibar revisited. *Bulletin of Entomological Research*. 96, 1–9
- L'Etoile, N. D. & Bargmann, C. I. (2000). Olfaction and odor discrimination are mediated by the *C. elegans* guanylyl cyclase ODR-1. *Neuron* 25, 575–586.
- L'Etoile, N. D. et al. (2002). The cyclic GMP-dependent protein kinase EGL-4 regulates olfactory adaptation in *C. elegans*. *Neuron*. 36, 1079–1089.
- Lucas, C. & Sokolowski, M. B. (2009). Molecular basis for changes in behavioral state in ant social behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106(15), 6351–6356.
- Lucas, C., Kornfein, R., Chakaborty-Chatterjee, M., Schonfeld, J., Geva, N., Sokolowski, M. B. and Ayali, A. (2010a). The locust *foraging* gene. *Arch. Insect. Bioch.* 74(1), 52–66.
- Lucas, C., Hughson, B. N. & Sokolowski, M. B. (2010b). Job switching in ants Role of a kinase. *Communicative & Integrative Biology*. 3(1), 6–8.
- Marler, P. (1990). Song learning: the interface between behaviour and neuroethology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* 329, 109–114.
- Matson, P. A., Parton, W. J., Power, A. G. and Swift, M. J. (1997). Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *Science*. 277, 504–509.
- Mery, F., Belay, A. T., So, A. K.-C., Sokolowski, M. B. and Kawecki, T. J. (2007). Natural polymorphism affecting learning and memory in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(32), 13051–13055.
- Moyal, P., Tokro, P., Bayram, A., Savopoulou-Soultani, M., Conti, E., Eizaguirre, M., Le Ru, B., Avand-Faghih, A., Frérot, B. and Andreadis, S. (2011) Origin and taxonomic status of the Palearctic population of the stem borer *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 103, 904–922
- Mundy, N. I. (2005) A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage colouration in birds. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 272:1633–1640.
- Nachman M., Hoekstra H. E. and D'Agostino S. L. (2003) The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5268–5273.
- Nayak, S. V. & Singh, R. N. (1983). Sensilla on the tarsal segments and the mouthparts of adult *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 12: 273–291.
- Nye I. W. R. (1960). The insect pests of graminaceous crops in East Africa. *Colonial Research Studies*. 31, 1–48.
- Ong'amo G. O., Le Ru B., Calatayud P.-A., Ogol C. K. P. O. and Silvain J. F. (2013). Composition of stem borer communities in selected vegetation mosaics in Kenya, Arthropod-Plant Interactions. In press.
- Orstavik, S., Natarajan, V., Tasken, K., Jahnsen, T. & Sandberg, M. (1997). Characterization of the human gene encoding the type I alpha and type I beta cGMP-dependent protein kinase (PRKG1). *Genomics*. 42:311–318
- Osborne, B. W., Wu, J., McFarland, C. J., Nickl, C. K., Sankaran, B., Casteel, D. E., Woods, V. L. Jr., Korney, A. P., Taylor, S. S. and Dostmann, W. R. (2011). Crystal structure of cGMP-dependent protein kinase reveals novel site of interchain communication. *Structure*. 19(9), 1317–1327.

- Osborne, K. A., Robichon, A., Burgess, E., Butland, S., Shaw, R. A., Coulthard, A., Pereira, H. S., Greenspan, R. J. & Sokolowski, M. B. (1997). Natural behavior polymorphism due to a cGMP-dependent protein kinase of *Drosophila*. *Science*, 277: 834-836.
- Osborne, K. A., de Belle, J. S. & Sokolowski, M. B. (2001). Foraging behaviour in *Drosophila* larvae : Mushroom body ablation. *Chem. Senses*. 26, 223-230.
- Palumbi S. R. (2002) Molecular zoology. Wiley-Liss, New York
- Panhuis, T. M. et al. (2001) Sexual selection and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16, 364–371
- Pereira, H. S. & Sokolowski, M. B. (1993). Mutations in the larval *foraging* gene affect adult locomotory behavior after feeding in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 5044-5046.
- Piertney S. B. & Oliver M. J. (2006) The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex (MHC). *Heredity*. 96:7–21
- Piertney S. B. & Webster, L. M. I. (2010). Characterising functionally important and ecologically meaningful genetic diversity using a candidate gene approach. *Genetica*. 138:419–432
- Pilz, R. B. & Casteel, D. E. (2003). Regulation of Gene Expression by Cyclic GMP. *Circ. Res.* 93;1034-1046.
- Polaszek, A. (1998) African cereal stem borers; economic importance taxonomy, natural enemies and control. 530 pp. CAB International in association with the ACP-EU Technical Centre for Agricultural and Rural Co-operation (CTA).
- Powell, J. A., Mitter, C., and Farrell, B. (1999). Evolution of larval feeding preferences in Lepidoptera. In : Kristensen, N. (ed.), *Lepidoptera Vol. 1. Traité de Zoologie* (new series). Pp 403–422.
- Raizen, D. M., Cullison, K. M., Pack, A. I. & Sundaram, M. V. (2006). A novel gain-of-function mutant of the cyclic GMP-dependent protein kinase *egl-4* affects multiple physiological processes in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 173, 177-187.
- Reaume, C. J. & Sokolowski, M. B. (2006). Natural history and ecology of *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 16, R623–R628.
- Reaume, C. J., Sokolowski, M. B. & Mery, F. (2011). A natural genetic polymorphism affects retroactive interference in *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc.* 278, 91-98.
- Rebaudo, F. (2012). Modélisation de la dynamique spatio-temporelle d'insectes ravageurs des cultures dans des systèmes socio-écologique. *Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie* (Paris 6).
- Robinson, G.E. (2004). Beyond nature and nurture. *Science*. 304, 397–399
- Ruth, P., Landgraf, W., Keilbach, A., May, B., Egleme, C., and Hofmann, F. (1991). The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. *Eur. J. Biochem.* 202, 1339–1344.
- Ryner, L. C. et al. (1996). Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the *fruitless* gene. *Cell*. 87, 1079–1089.
- Schaefer, B.C. (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* 227, 255–273
- Schafer, W. R., 2002. PKG and the neural basis for behavioral phenotypes. *Neuron*, 36: 991– 993.
- Scheiner, R., Sokolowski, M. B. and Erber, J. (2004). Activity of cGMP-dependent protein kinase (PKG) affects sucrose responsiveness and habituation in *Drosophila melanogaster*. *Learning Memory*. 11, 303-311.
- Schoonhoven, L. M., Jermy, T. and Van Loon, J. J. A. (1998). Insect-Plant Biology (London: Chapman and Hall), pp.121-154.
- Shaver, S. A., Varnam, C. J., Hilliker, A. J. & Sokolowski, M. B. (1998). The *foraging* gene affects adult but not larval olfactory-related behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behavioural Brain Research*. 95: 23-29.
- Sokolowski, M. B. (1980). Foraging strategies of *Drosophila melanogaster*: a chromosomal analysis. *Behavior Genetics*. 10 : 291–302.
- Sokolowski, M. B. & Hansell, K. P. (1992). The *foraging* locus: behavioral tests for normal muscle movement in rover and sitter *Drosophila melanogaster* larvae. *Genetica*. 85, 205-209

- Sokolowski, M. B., Pereira, H. S. and Hughes, K. (1997). Evolution of foraging behavior in *Drosophila* by density-dependent selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 7373-7377.
- Sokolowski, M. B. (1998). Genes for normal behavioral variation: recent clues from flies and worms. *Neuron*. 21, 1-4.
- Sokolowski, M. B. & Riedl, C. (1999) in *Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behaviour* (eds Gerlai, R. & Crusio, W.) pp 517-532 (Elsevier, Amsterdam, 1999).
- Sokolowski, M. B. (2001). *Drosophila*: genetics meets behavior. *Nat. Rev. Genet.* 2, 879-890.
- Sokolowski, M. B. (2002). Social eating for stress. *Nature neurobiology*. 419, 893-894
- Sokolowski, M. B. & Fitzpatrick, M. J. (2008). Behavioural genetics: worms seek that old beetle smell. *Current Biology*. 18(11).
- Talts, J. F., Pfeifer, A., Hofmann, F., Hunziker, E. B., Zhou, X. H., Aszodi, A. & Fassler, R. (1998) Endochondral ossification is dependent on the mechanical properties of cartilage tissue and on intracellular signals in chondrocytes. *Ann. N Y Acad. Sci.* 857:74-85
- Thompson, R. F. & Spencer, W. A. (1966). Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol. Rev.* 73: 16-43.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R. & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*. 418, 671-677.
- Timmerman, C. & Sanyal, S. (2013). Behavioral and electrophysiological outcomes of tissue-specific *Smn* knockdown in *Drosophila melanogaster*. *Brain Research*. 1489, 66-80.
- Tobback, J., Heylen, K., Gobin, B., Wenseleers, T., Billen, J., Arckens, L. & Huybrechts, R. (2008). Cloning and expression of PKG, a candidate foraging regulating gene in *Vespula vulgaris*. *Anim Biol*. 58:341-351.
- Tobback, J., Mommaerts, V., Vandersmissen, H. P., Smagghe, G. & Huybrechts, R. (2011). Age- and task-dependent *foraging* gene expression in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Arch. Insect. Bioch.* 76(1), 30-42.
- Tully, T. et al. (2003). Targeting the CREB pathway for memory enhancers. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 267-277
- Stearns S. C., Magwene P. (2003). The naturalist in a world of genomics. *Am Nat*. 161:171-180.
- Vasemagi A. & Primmer C. (2005). Challenges for identifying functionally important genetic variation: the promise of combining complementary research strategies. *Mol. Ecol.* 14:3623-3642.
- Vet, L. E. M., & van Alphen, J. J. M. (1985). A comparative functional approach to the host detection behaviour of parasitic wasps. 1. A qualitative study on Eucilidae and Alysiinae. *Oikos*. 44: 478-486.
- Wang, X. & Robinson, P. J. (1997). Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase and Cellular Signaling in the Nervous System. *Journal of Neurochemistry*. 68, 443-456.
- Wang, Z., Pan, Y., Li, W., et al. (2008). Visual pattern memory requires foraging function in the central complex of *Drosophila*. *Learn. Mem.* 15, 133-142.
- Werner, C., Raivich, G., Cowen, M., Strekalova, T., Sillaber, I., Buters, J. T., Spanagel, R. & Hofmann, F. (2004). Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol. *Eur. J. Neurosci.* 20:3498-3506
- Wilson, E. O. (1971). *The Insect Societies*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Wilson, E. O. (1984). The relation between caste ratios and division of labor in the ant genus *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 16:89-98.
- Wingrove, J. A. & O'Farrell, P. H. (1999). Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila*. *Cell*. 98, 105-114.
- Young, L. J. et al. (1999) Increased affiliative response to vasopressin in mice expressing the V1a receptor from a monogamous vole. *Nature*. 400, 766-768
- Zavaleta, E. S. and Hulvey, K. B. (2004). Realistic species losses disproportionately reduce grassland resistance to biological invaders. *Science*. 306, 1175-1177.
- Zhang, B.-C. (1994). Index of economically important Lepidoptera (Wallingford: CAB International). *Nature Neurobiology*. 419, 893-894.

DEUXIEME PARTIE

Approche expérimentale

I – Modèle biologique : *Sesamia nonagrioides*

1/ Classification

La noctuelle du maïs *Sesamia nonagrioides* Lefèbvre (Lepidoptera : noctuidae, voir tableau 2) est une espèce phytophage et un ravageur important des céréales cultivées en Afrique et dans les pays riverains de la méditerranée (Moyal et al. 2011).

Tableau 2 : Position systématique de *S. nonagrioides*

Classe	Insectes
Ordre	Lépidoptères
Sous-ordre	<i>Heteroneura</i>
Division	<i>Ditrysia</i>
Sous-division	<i>Heterocera</i>
Super-famille	<i>Noctuoidea</i>
Famille	<i>Noctuidae</i>
Sous-famille	<i>Amphipyridae</i>
Genre	<i>Sesamia</i>
Espèce	<i>nonagrioides</i> (Lefèbvre, 1827)

Chez cette espèce foreuse de poacées, les larves creusent des galeries dans les tiges des plantes consommées et provoquent de lourds dommages à l'organisme hôte (figure 15). Dans les champs de maïs français par exemple, la sésamie peut causer de 30% à 70% de perte de la récolte (Rousseau - Arvalis 2009) en provoquant :

- une destruction complète des jeunes pieds de maïs
- une mauvaise alimentation de la plante en raison des galeries creusées dans la tige empêchant la circulation de la sève
- une fragilisation des tiges, pouvant entraîner leur rupture en cas de coups de vents, de fortes pluies ou de grêles
- une perte des épis de maïs par consommation directe
- une dépréciation de la qualité et de l'abondance de la récolte



Figure 15. Exemple de dégâts causés par les larves de *S. nonagrioides* sur des pieds de maïs (©Graham Wenman, ©2013 DuPont)

2/ Répartition géographique et structure génétique des populations

L'aire de répartition de *S. nonagrioides* englobe l'Afrique tropicale, de la Côte d'Ivoire (nord-ouest) jusqu'en Tanzanie (sud-est) et l'ensemble des pays du bassin méditerranéen (Anglade 1972, Cordero et al. 1998). Au nord, et notamment en France, l'espèce ne dépasse pas le 45^{ème} parallèle. Cette noctuelle inféodée au climat de type méditerranéen paraît limitée aux régions où les hivers sont doux (températures hivernales clémentes) et les étés chauds (températures estivales élevées).

La structuration génétique des différentes populations géographiques de *S. nonagrioides* est aujourd'hui encore soumise à controverse. En fonction des marqueurs moléculaires étudiés, les niveaux de différenciation estimés entre les populations récoltées sur plantes cultivées demeurent variables. L'analyse des allozymes suggèrent l'existence de deux populations situées au nord-ouest (incluant le nord de l'Espagne et le sud de la France) pour l'une et au sud est (sud-est de l'Espagne et de la France, et le Maroc) pour l'autre (Buès et al. 1996). Par la méthode des RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) les populations de Grèce et d'Espagne étaient subdivisées en 2 sous populations : au nord-ouest de la Grèce, et au sud-est, incluant le sud de la Grèce et l'Espagne (Kourti et al. 2006). L'analyse des AFLP (*Amplified Fragment-Length Polymorphism*) révéla une distinction entre une population nord, comprenant l'Espagne, la France, l'Italie et le nord de la Grèce, et une population sud composée des individus du Sud de la Grèce (Margaritopoulos et al. 2007). En revanche, l'utilisation de la méthode RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) montra une ségrégation longitudinale entre une population ouest (Espagne et France) et une population est

(Italie, Grèce et Turquie) (De la Poza et al. 2008). Enfin, Moyal et al. (2011) montrèrent par l'analyse de gènes nucléaire et mitochondriaux l'existence de 3 populations génétiquement différenciées : une population paléarctique et deux populations Africaines, la première à l'ouest et la seconde à l'est (figure 16).

Bien que ces différentes analyses ne s'accordent pas sur la répartition des différentes populations, il semble exister une structuration génétique spatiale relativement forte suggérant une sédentarité de l'espèce *S. nonagrioides*. Pour autant, cette structuration n'est pas synonyme d'un phénomène de spéciation entre les différentes populations allopatriques de l'espèce. Les distances génétiques estimées entre la population paléarctique et la population d'Afrique de l'est sont particulièrement faibles (0,19% pour la distance mitochondriale ; 0,6% pour les allèles nucléaires), indiquant l'appartenance des deux populations à la même espèce (Moyal et al. 2011).

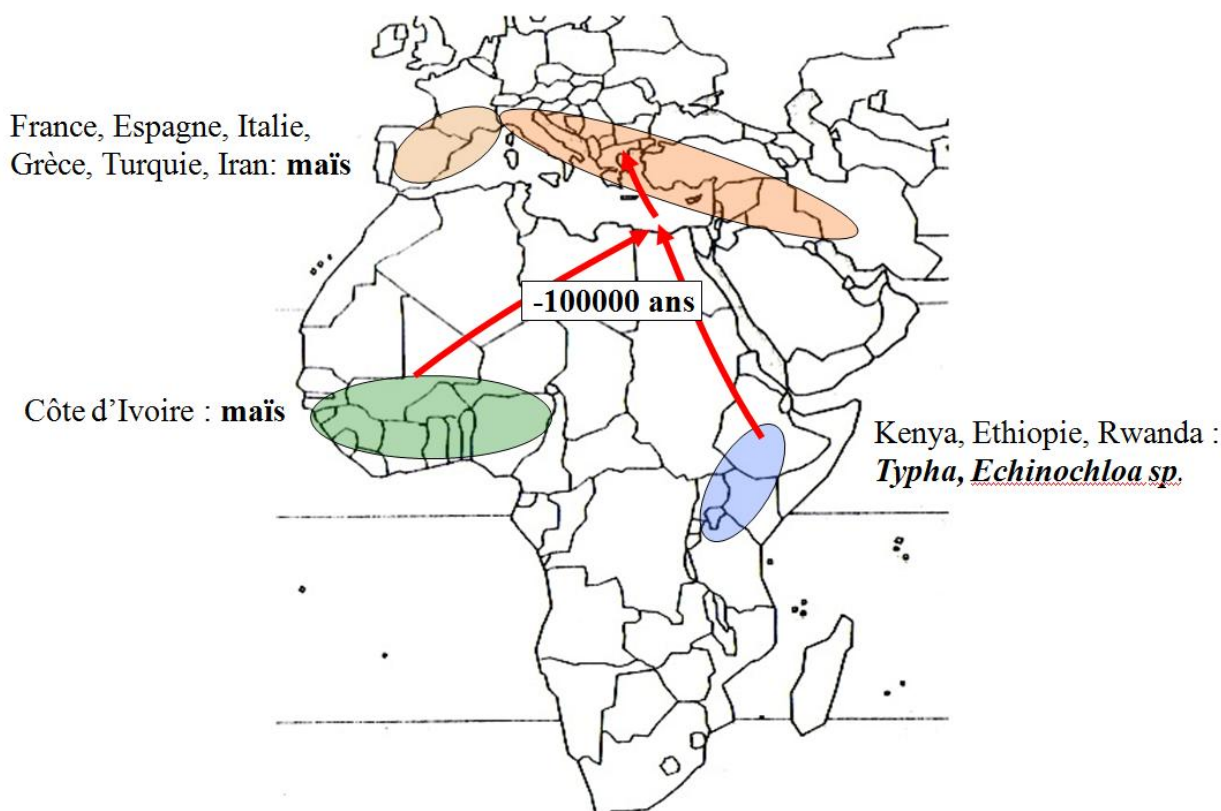


Figure 16. L'espèce *S. nonagrioides* présente 3 populations séparées : la population paléarctique, de l'Afrique de l'ouest et de l'Afrique de l'est. La population paléarctique semble résulter d'un mélange des populations de l'Afrique de l'ouest et de l'est (origine géographique multiple) par le biais d'une colonisation naturelle s'étendant vers le nord (flèches rouges). Cette étape de colonisation eu probablement lieu lors de l'avant-dernière période interglaciaire du Quaternaire (l'Eémien) il y a environ 100000 à 130000 ans (d'après Moyal et al. 2011).

Les résultats obtenus au laboratoire par l'analyse de marqueurs mitochondriaux et nucléaires ont permis de préciser la structuration génétique de l'espèce, notamment en Afrique (Naino-Jika, Le Rü, Dupas et coll, en préparation). *Sesamia nonagrioides* présenterait au total 4 populations distinctes, dont 3 en Afrique (et non 2, comme indiqué par Moyal et al. 2011, en raison d'un échantillonnage non exhaustif) : une population Paléarctique, une en Afrique de l'ouest et centrale, une localisée entre les deux branches du rift est africain, et une dernière à l'est du rift oriental. Ces résultats suggèrent que les vallées du rift africain ont constitué une force principale de structuration de l'espèce en Afrique (figure 17).

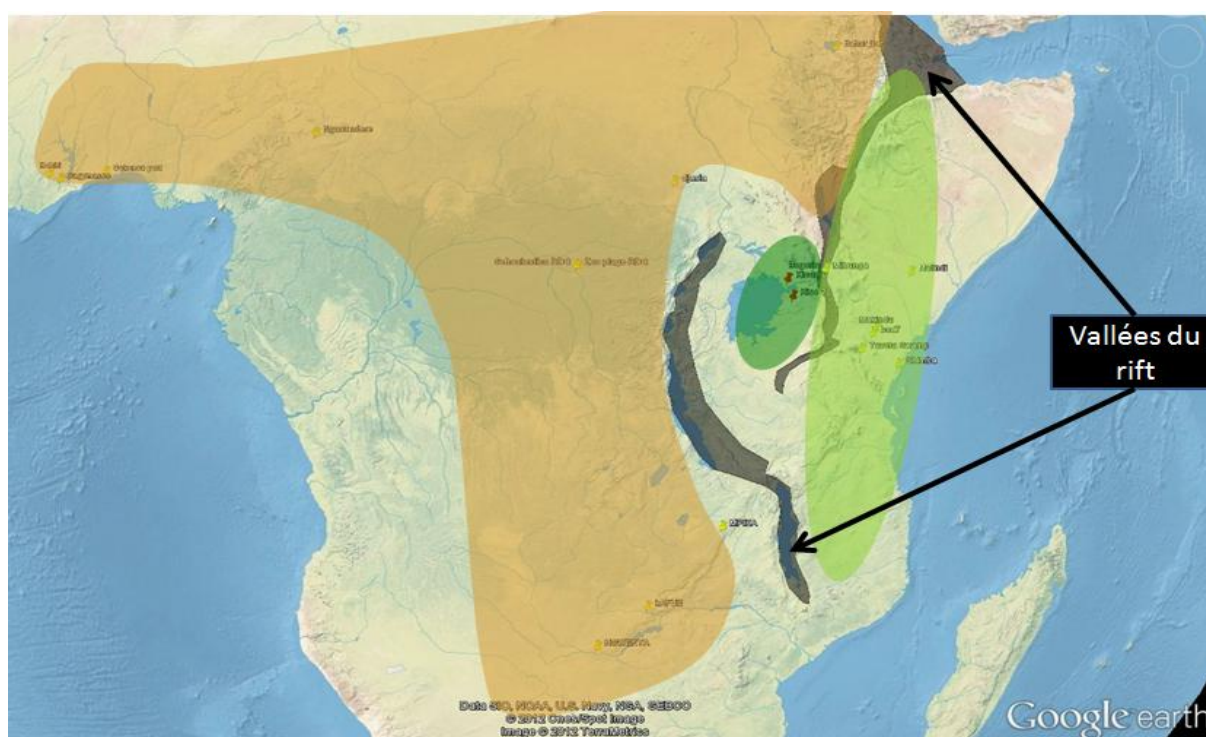


Figure 17. Structure du paysage en Afrique en fonction des barrières topographiques potentielles (Naino-Jika, Le Rü, Dupas et coll, en préparation). Zone grise : Vallées du rift est africain. Zone beige : population ouest-sud (d'ouest en est du Ghana à l'Éthiopie et au sud jusqu'en Zambie). Zone verte foncée : population de l'ouest du Kenya (ouest Kenya et Ouganda). Zone verte claires : population à l'est du rift (de l'est tanzanien à l'est éthiopien)

Si l'origine Africaine de l'espèce semble être claire, l'origine de la population ravageuse paléarctique demeure incertaine. L'analyse des marqueurs mitochondriaux et nucléaire suggèrent que la population paléarctique serait issue d'un croisement entre les populations d'Afrique de l'ouest et de l'est, qui après avoir migré et s'être mélangées au nord du continent, aurait colonisé la région paléarctique à partir d'un point unique d'introduction en Europe de l'est (origine géographique multiple). D'après Moyal et al. (2011), ce phénomène

d'expansion de l'espèce vers le nord, antérieur à l'agriculture, serait plus probablement le résultat d'une colonisation naturelle plutôt que d'une introduction humaine.

La désertification du Sahara, qui débuta il y a plus de 7 million d'années, créa une barrière drastique au processus de colonisation en Afrique. Certaines périodes furent toutefois plus clémentes, avec une humidité élevée permettant une végétalisation de la savane. Ce fut notamment le cas de la dernière période interglaciaire (l'Eémien, de -131000 et -114000 ans), dont les conditions climatiques étaient plus propices à l'expansion des populations Africaines (de l'ouest et de l'est) de *S. nonagrioides* vers le nord du continent. C'est durant cette période qu'aurait ainsi eu lieu l'expansion de l'espèce en direction du nord (Moyal et al. 2011).

3/ Plantes-hôtes

S. nonagrioides est une espèce polyphage capable de se développer sur plusieurs espèces de céréales cultivées. Selon la région colonisée, cette noctuelle ravageuse attaque les cultures de maïs (*Zea mays* sp.), de sorgho (*Sorghum bicolor*), de riz (*Oriza* sp.), de blé (*Triticum* sp.), d'orge (*Hordeum* sp.), d'avoine (*Avena sativa*) et de canne à sucre (*Saccarum officinalis*). En milieu sauvage, elle est également recensée sur un grand nombre d'espèce-hôtes, appartenant pour la plupart au genre *Echinochloa*, *Phragmites*, *Cyperus* et *Typha* (Figure 18).

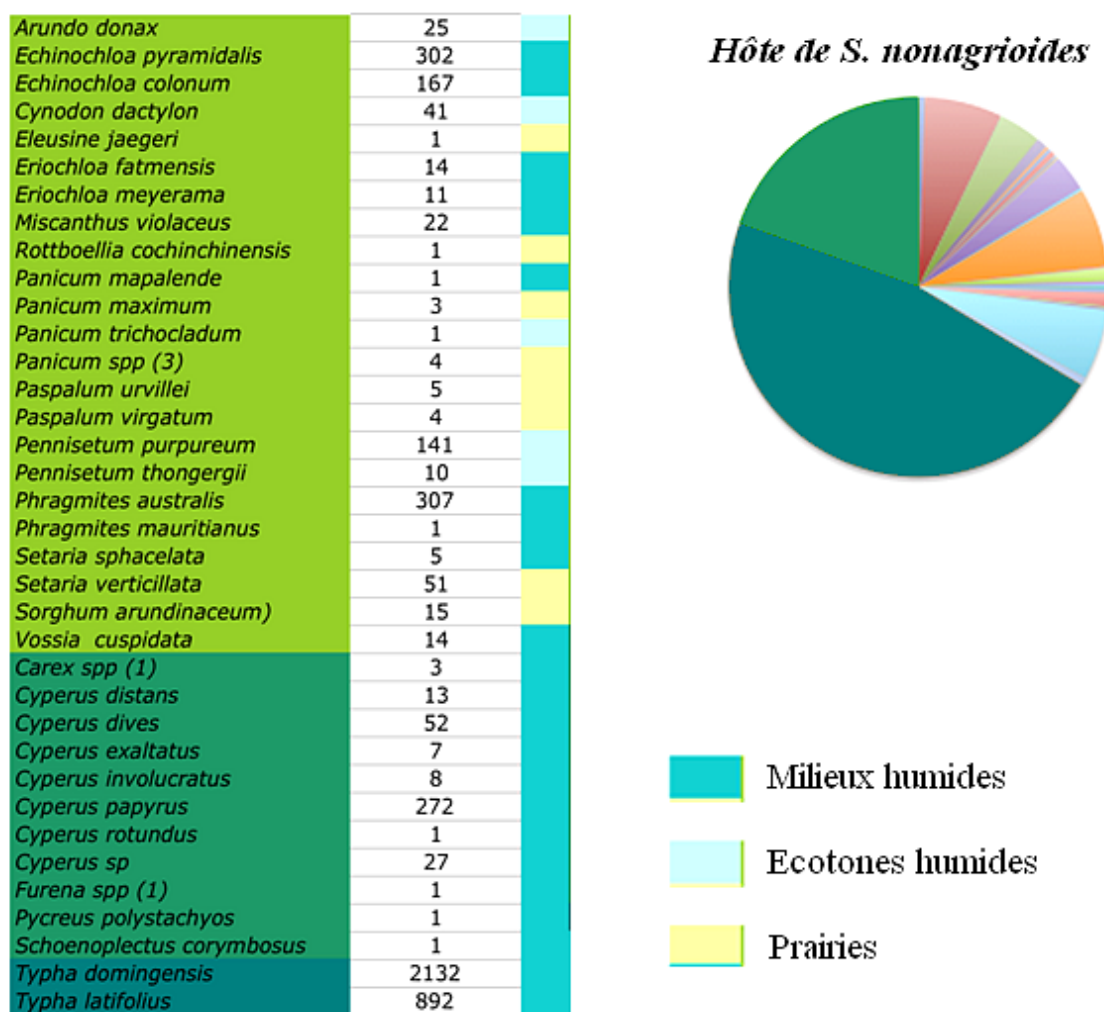


Figure 18. Echantillonnage de *S. nonagrioides* sur herbacées sauvages en Afrique Sub-saharienne. L'espèce est présente sur de nombreuses espèces, bien que certains hôtes soient majoritairement représentés tels que *Typha domingensis*, *T. latifolius*, *Cyperus papyrus*, *Phragmites australis*, et *Echinochloa pyramidalis* (D'après le Ru, com. Pers.).

4/ Biologie de l'insecte

a) Morphologie des différents stades

Sesamia nonagrioides est un lépidoptère holométabole dont le développement s'effectue en quatre phases sur une période approximative de 45 jours (à 26°C).

- L'œuf (figure 19) : pondu en « grappe » par la femelle sous la gaine foliaire de la plante hôte, chacun d'eux mesure environ 0,5 mm de diamètre. De forme sphérique et aplatie aux pôles, ils présentent de nombreuses stries longitudinales. Initialement blanc-nacrés après la ponte, les œufs deviennent plus foncés, puis rosissent après quelques jours de

développement. Environ 24 heures avant l'éclosion, les œufs se colorent en noir en raison d'une modification de la couleur de la capsule céphalique de la jeune larve, perceptible en transparence de la paroi de l'œuf.

Figure 19 : ponte d'une femelle de *S. nonagrioides* au niveau de la gaine foliaire de la plant-hôte (©Philippe Mothiron).



- La larve (figure 20) : le corps des chenilles est glabre et de couleur blanc crème. La capsule céphalique est de couleur brun foncée. Dépourvues d'ailes (endoptérygotes), les larves grandissent et effectuent jusqu'à 7 changements de stade larvaire, identifiables par les dimensions de la capsule céphalique (Lepes et Jourdan, 1939 in ameline). Au dernier stade, la chenille peut atteindre une longueur de 50 mm et une largeur de 3 mm (Rousseau – Arvalis 2009).
- La nymphe (stade pré-imaginal, figure 20) : au dernier stade larvaire, la chenille s'immobilise et se transforme en chrysalide. Elle mesure entre 13 et 30 mm de long. Acajou clair au cours des premiers jours, sa couleur s'assombrit à l'approche de l'éclosion. C'est le stade préparatoire de la métamorphose en adulte pour laquelle une nouvelle organogénèse est nécessaire. Les mâles émergent généralement 1 à 2 jours avant les femelles.
- L'imago (figure 20) : les papillons adultes ont une envergure moyenne de 35 à 40 mm. Le mâle est généralement plus petit que la femelle. Les ailes sont de couleur beige avec un liseré brun le long des bords externes des ailes antérieures. Le thorax a un aspect duveteux. Les antennes des mâles sont bipectinées sur toute leur longueur alors que celles des femelles sont filiformes.



Figure 20. Illustration des différents stades de développement de *Sesamia nonagrioides*.

En haut de gauche à droite: Mâle adulte présentant des antennes bipectinées, femelle adulte aux antennes lisses, chrysalides mâle et femelle. La couleur de la cuticule de l'individu mâle indique que celui-ci est plus âgé que la femelle.

En bas : chenille de dernier stade larvaire.

b) Cycle de développement

En France, le cycle évolutif de *S. nonagrioides* comporte généralement deux générations par an dans les latitudes nord (figure 21). Lorsque les conditions climatiques de l'arrière-saison sont favorables, une troisième génération partielle peut émerger, bien que celle-ci ne survivra pas aux conditions climatiques hivernales (Courtieux 1984). Dans les pays plus chauds, le développement des générations successives s'effectue de manière continue. Au Maroc par exemple, l'espèce comprend 4 générations par an, et 3 en Espagne.

En France, les chenilles de derniers stades larvaires (issues de la 2^{ème} génération de l'année précédente) entrent en oligopause au début de l'automne en réponse au raccourcissement de la durée du jour et à la chute des températures (Hilal 1978). L'activité de l'animal devient alors minimale, assurant uniquement ses besoins en eau. Leur survie à la cette hivernale est dépendante de l'intensité du froid et de la pluviométrie (température létale de -7 °C). La levée de cette diapause est induite par une augmentation des températures et de la durée du jour au printemps. Les larves nymphosent vers la mi-avril, permettant un premier vol des adultes entre la mi-mai et la fin juin.

Les adultes de *S. nonagrioides* présentent une activité nocturne. Plus précisément, l'activité sexuelle est généralement restreinte entre la 4^{ème} et la 8^{ème} heure après le début de la scotophase (deuxième partie de la nuit), ainsi qu'à l'aube (Sreng 1984). L'âge optimal pour

l'accouplement est de 48 heures après l'émergence pour les femelles, et de 72 heures environ pour les mâles (Babilis & Mazomenos 1992). La parade sexuelle de cette espèce suit une séquence comportementale stéréotypée. La femelle sexuellement réceptive se positionne sur un support vertical et exprime un comportement d'appel par l'émission d'une phéromone sexuelle afin d'attirer le mâle à distance. Les antennes bipectinées du mâle lui permettent de localiser l'origine de la source phéromonale et de s'approcher de la femelle. L'accouplement s'initie en position latérale par torsion de l'abdomen, puis une rotation permet d'atteindre la position finale en tête-bêche (Sreng 1984). La nuit suivant l'accouplement, la femelle fécondée sélectionne un pied de maïs comme site d'oviposition. Celle-ci pond ensuite ses œufs de façon groupée sur la face interne de la gaine de la tige, au niveau des entre-nœuds (Sreng 1984). Les pontes déposées sur les jeunes plants de maïs donnent naissance aux larves de première génération.

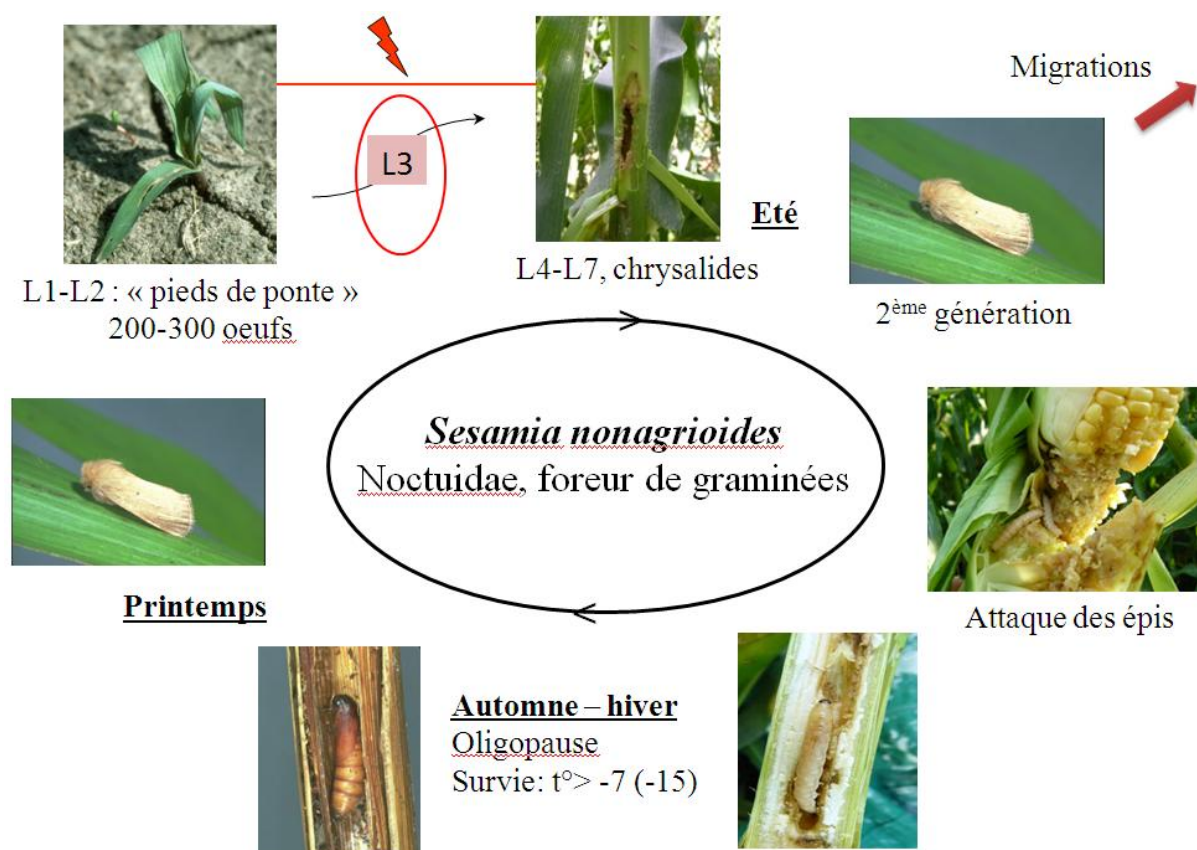


Figure 21. Cycle annuel de *S. nonagrioides*. L1-L2 : les 2 premiers stades larvaires restent s'alimenter sur le pied de ponte. Au troisième stade (L3) les chenilles commencent à disperser. C'est à cette étape que peut être appliqué efficacement un traitement insecticide. Aux stades larvaires L4 à L7 les individus de la première génération achèvent leur développement au sein des tiges. La seconde génération de chenilles s'alimente dans les tiges et les épis de maïs. Les larves en dernier stade de développement à l'arrivée de l'automne entreront en oligopause pour survivre à la période hivernale.

A l'émergence, les jeunes larves s'alimentent d'abord du parenchyme de la gaine foliaire. Ce n'est qu'au troisième stade larvaire que les chenilles forent la tige à hauteur d'un nœud et pénètrent à l'intérieur en creusant des galeries (Hilal 1978). Le pied de ponte hôte se dégradant rapidement après l'émergence des larves (Arvalis 2009), une phase de dispersion vers les pieds voisins est amorcée à partir du 3^{ème} stade larvaire (stade baladeur). Du 4^{ème} au 7^{ème} stade larvaire les chenilles se développent dans les tiges et nymphosent à l'intérieur des galeries après s'être tissées un abri de soie. En Aquitaine, les adultes de la première génération apparaissent à la mi-juillet, permettant un second vol et la production des individus de la seconde génération jusqu'au début du mois de septembre. Les larves de seconde génération s'attaquent aux tiges ainsi qu'aux épis de maïs en fin de développement, causant de lourdes pertes dans les récoltes (Naïbo et al. 1982). Les larves de derniers stades qui survivront à l'hiver permettront d'assurer le maintien de l'espèce l'année suivante.

5/ Moyens de lutte contre l'espèce

Les attaques de *S. nonagrioides* sur les plantes cultivées ont deux conséquences majeures (Arvalis 2007). D'une part, elles entraînent une perte de rendements bruts par consommation directe des épis ou un affaiblissement de la plante qui sera alors moins productive et plus sensible à la verse (casse des tiges). D'autre part, les dommages causés aux tissus végétaux par la chenille provoquent une dégradation de la qualité sanitaire des plants et favorise l'installation de champignons du genre *Fusarium*, responsables de la maladie fusariose. Ces dommages causés par les attaques de la sésamie sont directement liés au taux d'infestation larvaire (densité) dans les parcelles cultivées. Il est donc nécessaire pour les agriculteurs de développer une lutte active contre ces ravageurs afin de préserver leur récolte. Plusieurs méthodes de protection intégrée contre *S. nonagrioides* sont aujourd'hui connues et peuvent être appliquées de façon complémentaire. Ces différentes mesures doivent toutefois être réalisées collectivement à l'échelle d'un bassin de production pour être plus efficace.

- **Les méthodes de lutte prophylactiques** : l'arrachage et le broyage des résidus de récoltes permettent un dessouchage des collets et un déchiquetage des tiges en fragments très fins. Ce procédé permet une élimination mécanique directe d'une partie des chenilles et

soumet les individus survivants à la prédation des oiseaux, au parasitisme naturel, et au froid (Arvalis 2007). L'enfouissement des résidus est également un moyen de lutte efficace contre les *Fusarium sp.* La modulation de la date des semis, avec par exemple une utilisation de semis précoce, constitue un autre moyen de limiter l'impact de ce ravageur (Tsitsipis & Alexandri 1989). Enfin, une rotation des cultures avec des plantes non-hôtes ou peu sensibles à *S. nonagrioides* permet de limiter le développement de l'espèce l'année suivante.

- **La lutte chimique** : le caractère endophyte des larves de *S. nonagrioides* rend cette méthode difficile d'emploi, mais toutefois réalisable si la biologie de l'insecte est prise en compte. Un traitement des semences à l'imidaclopride, qui se diffuse dans tout l'organisme de la plante (néonicotinoïdes), pouvait être utilisé pour lutter contre les larves de la première génération (Naïbo et al. 1999). Cependant, cet insecticide systémique est interdit en France depuis l'année 2004, notamment à cause de sa forte toxicité sur les abeilles (problème de spécificité du traitement). Les traitements chimiques par pulvérisation d'insecticides qui ne pénètrent pas à l'intérieur des plantes doivent impérativement être appliqués sur les adultes ou sur les larves au stade baladeur (Faure et al. 1999). Par exemple le diflubenzuron (Dimilin Flo, par pulvérisation) peut être appliqué tôt et assure une bonne protection contre la sésamie de 1ère génération. Une bonne protection des cultures contre la première génération permet de diminuer efficacement l'intensité des attaques de la seconde génération.

- **L'utilisation du maïs transgénique** : le maïs Bt est un organisme OGM exprimant une protéine insecticide (toxine) naturellement sécrétée par la bactérie *Bacillus thuringiensis*. Le recours à ces variétés résistantes permet une lutte efficace contre *S. nonagrioides*. Cependant, sa culture n'est pas autorisée en France et le développement d'une résistance à cet OGM additionné à ses effets potentiellement néfastes sur l'environnement pourrait fortement compromettre l'efficacité de cette méthode sur le long terme.

- **La lutte par confusion sexuelle** : cette méthode consiste à employer des phéromones synthétiques, reproduisant l'appel sexuel phéromonal des papillons femelles. Une fois le secteur agricole saturé en phéromone, les mâles ne sont plus aptes à localiser les femelles dans l'environnement (Ameline 1999). Le taux d'accouplement de l'espèce chute ainsi drastiquement, réduisant le développement de l'espèce dans la zone traitée. Chez *S. nonagrioides*, l'efficacité de cette méthode équivaut à celle obtenue lors de l'emploi d'un traitement insecticide chimique (Albajes et al. 2002).

- **La lutte biologique** : cette méthode de lutte contre les ravageurs consiste à employer un antagoniste naturel de l'espèce tel que les parasitoïdes. Ce contrôle biologique d'une espèce par une autre est considéré comme un service écosystémique. Les insectes parasitoïdes peuvent appartenir à l'ordre des diptères ou des coléoptères, mais sont principalement représentés par l'ordre des hyménoptères (80%). A l'heure actuelle, peu d'informations sont disponibles sur la sensibilité de *S. nonagrioides* aux parasitoïdes en europe (Monetti et al. 2003), et cette méthode n'est pas encore efficacement développée pour lutter contre cette espèce. Toutefois, l'espèce *Cotesia sesamiae* (Braconidae, complexe *flavipes*, figure 22), Hyménoptère africain parasite de noctuelles foreurs de céréales, pourrait être un bon candidat en temps qu'agent potentiel de lutte biologique contre la sésamie du maïs (Obonyo et al. 2008).



Figure 22. A gauche, *C. sesamiae* adulte posé sur la chenille hôte de *S. nonagrioides* (©Pascal Goetgeluck). A droite, cocons formés par les larves de *C. sesamia* après leur sortie de la chenille une fois le développement larvaire achevé (©Laur Kaiser-Arnault)

6/ Méthodes d'élevage en laboratoire

Afin de pouvoir subvenir au besoin en individus nécessaires aux expérimentations réalisées au laboratoire, un élevage de *S. nonagrioides* a été développé au LEGS du CNRS de Gif-sur-Yvette. Les différentes souches utilisées sont réapprovisionnées chaque année à partir d'individus récoltés dans la nature afin de conserver une diversité génétique suffisamment proche des conditions naturelles. En condition d'élevage, le cycle total d'une génération s'effectue sur 7 à 8 semaines (figure 23). L'élevage de cette noctuelle est délicat en raison d'un risque élevé de contamination fongique (essentiellement du genre *Aspergillus* et *Penicillium*) et bactériologique des milieux de développement, additionné aux contraintes de manipulation compte tenue du caractère ravageur et invasif de l'espèce.

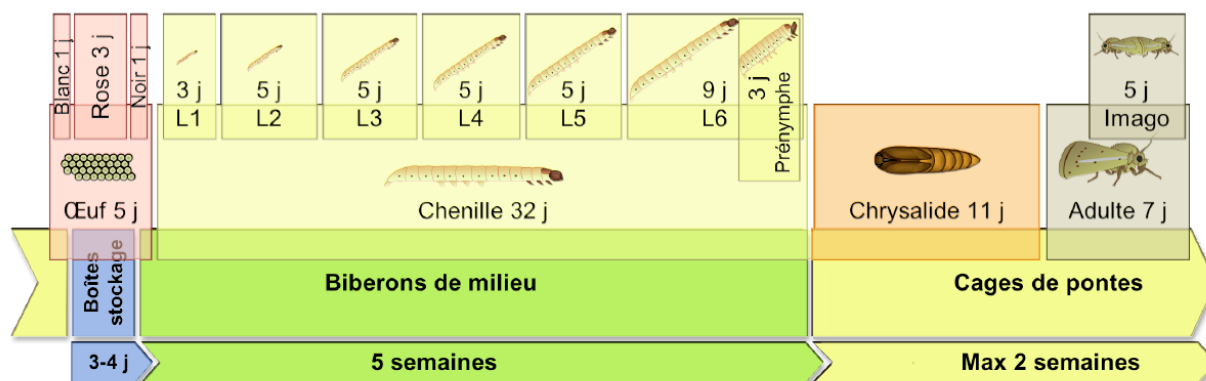


Figure 23. Cycle de développement d'une génération complète de *S. nonagrioides* en condition de laboratoire (Chouquet, protocole d'élevage au LEGS).

a) Elevage des stades larvaires

S. nonagrioides est une espèce d'origine tropicale qui nécessite des conditions de développement chaude et humide. L'élevage des larves s'effectue en enceinte climatisée permettant de conserver une température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, une humidité relative de $60 \pm 10\%$, et une photopériode de 16 heures de jour pour 8 heures de nuit.

A 24 heures de l'éclosion (identifiable par la coloration noire des œufs), les pontes sont nettoyées avec une solution antiseptique douce (Daquin®) sous hôte bactériologique, puis placées dans les bouteilles contenant du milieu nutritif artificiel (figure 24, tableau 3). 30 œufs sont inoculés par bouteille d'une contenance de 90-100 ml de milieu. De l'éclosion à la nymphose (i. e. 5 semaines environ) les bouteilles sont placées dans les enceintes climatisées sans manipulations supplémentaires jusqu'à la récolte des chrysalides. Cette réduction importante de la manipulation des larves jusqu'à la nymphose comparé aux protocoles habituellement en vigueur dans l'élevage des noctuelles est permis par l'ajout d'une faible quantité de formol au milieu de développement (respect des normes d'hygiène et sécurité). Grâce à ce composé, le taux de contamination des bouteilles est grandement réduit et le milieu nutritif conserve alors une qualité suffisante pour permettre le développement larvaire complet.

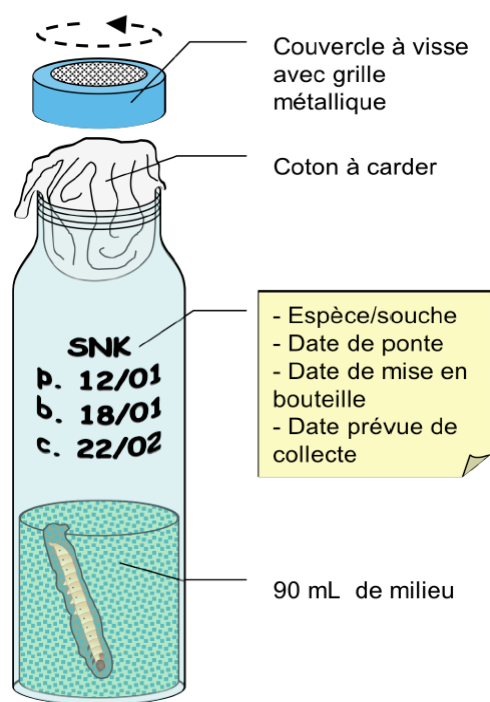


Figure 24. Bouteille de développement des stades larvaires de *S. nonagrioides* jusqu'à la nymphose. Les informations concernant les individus inoculés sont notées sur les parois à l'aide d'un marqueur indélébile. Chaque bouteille contient 90 à 100 ml de milieu artificiel sur lequel sont déposées les pontes (environ 30 œufs).

Celles-ci sont fermées à l'aide de coton à carder et d'un bouchon à grille. Ce dispositif permet la circulation de l'air dans la bouteille tout en empêchant les évasions des chenilles et en limitant l'introduction de micro-organismes.

Le coton constitue également un refuge adéquat pour les chenilles de derniers stades en voie de nymphose.
(Chouquet, protocole d'élevage au LEGS)

Tableau 3. Composition du milieu nutritif artificiel utilisé pour le développement larvaire de *S. nonagrioides*, adapté des protocoles établis par Onyango & Ochieng'-Odero (1994) et Giacometti et al. (1995).

Ingrédients	Quantité pour 10
Eau distillée	8 l
Agar	125 g
Tourteau de soja	885 g
Poudre de feuille de maïs	255 g
Levure	230 g
Sucre	350 g
Mix vitamine	21 g
Sorbate de potassium	14 g
Acide ascorbique	25 g
Nipagine (Mehyl-4-hydrobenzoate)	20 g
Tétracycline	2g
Formaldéhyde 30 %	26 mL

b) Récupération et traitement des chrysalides

Après 5 semaines de développement larvaire, les chrysalides sont extraites des bouteilles d'élevage sous sorbonne. La plus grande majorité des individus se trouvent dans le coton qui doit être délicatement manipulé. En moyenne une quinzaine de chrysalides sont récupérées par bouteille, indiquant un taux de survie des stades larvaires d'environ 50%. Une fois

récupérées, les nymphes sont nettoyées à l'aide d'un antiseptique doux (Daquin®), puis sexées et comptées. Le sexage s'effectue sous loupe binoculaire. Les caractéristiques morphologiques de l'extrémité ventrale de l'abdomen des chrysalides permettent d'en déterminer le genre (figure 25).

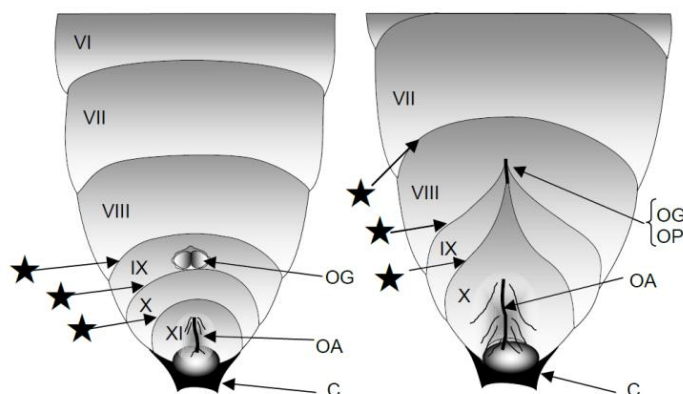
c) Cages de ponte

70 chrysalides de chaque sexe sont placées dans une cage de ponte (40 x 30 x 30 cm, figure 26). Les nymphes sont déposées sur un lit de vermiculite humidifiée (solution d'eau nipaginée) contenu dans une boîte de pétri ouverte. Les cages contiennent des tiges de ponte artificielles (feuilles de papier sulfurisé enroulées sur elles-mêmes) ainsi qu'un abreuvoir constitué d'une boule de papier absorbant mouillé. Les cages sont maintenues en enceinte climatisée réglée à une température de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, une humidité relative de $60 \pm 10\%$, et une photopériode de 16 heures de jour pour 8 heures de nuit. Dans ces conditions, la durée de vie maximale des adultes est d'environ 10 jours. Les pontes sont récoltées et pesées tous les 2 jours et maintenues dans les mêmes conditions environnementales que les adultes jusqu'elles soient inoculées en bouteille 24h avant leur émergence.



Figure 25. Sexage des chrysalides de *S. nonagrioides*. Représentation de l'extrémité ventrale de l'abdomen de chrysalides mâles et femelles. (Chouquet, protocole d'élevage au LEGS)

C : Crémaster
OA : Orifice Anal
OG : Orifice Génital
OP : Orifice de Ponte



Dimorphisme :

- 11 segments abdominaux chez le ♂, 10 chez la ♀
- OG avec 2 valves chez le ♂, OG/ OP sans valve chez la ♀.
- bords des segments IX, X et XI sont parallèles chez le ♂; bords des segments VII, IX et X se rejoignent presque chez la ♀ (symbole étoile).
- espace entre le pore anal et le pore génital plus grand chez la ♀ que chez le ♂.

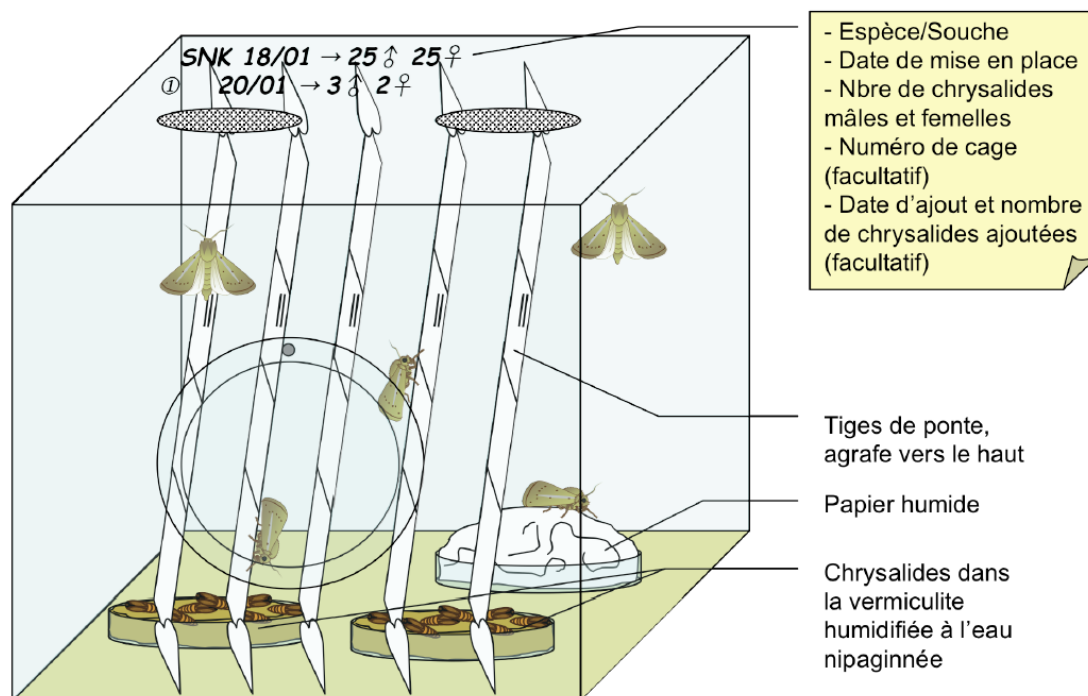


Figure 26. Cage de ponte de *S. nonagrioides* (Chouquet, protocole d'élevage au LEGS).

7/ Références

- Albajes, R., Konstantopoulou, M., Etchepare, O., Eizaguirre, M., Frérot, B., Sans, A., Krokos, F., Améline, A. & Mazomenos, B. (2002). Mating disruption of the corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) using sprayable formulations of pheromone. *Crop Protection*. 21, 217–225
- Ameline, A. (1999). Identification de la phéromone sexuelle de *Sesamia nonagrioides* (Lep., Noctuidae) et contribution à la compréhension des mécanismes de la confusion sexuelle. *Thèse, doctorat de l'université Paris XII*.
- Anglade, P. (1972). Les *Sesamia*. Entomologie Appliquée à l'Agriculture. II, Lépidoptères (Masson et Cie, Paris, France, ed. by A S Balachowsky), pp. 1389-1400.
- Arvalis. (2007). Maîtrise des foreurs avec un objectif de qualité de la récolte. Qualité sanitaire maïs grain, Arvalis info janvier. Pp 21-23
- Babilis, N. A., & Mazomenos, B. E. (1992). Pheromone production in *Sesamia nonagrioides*: diel periodicity and effect of age and mating. *J. Insect Physiol.* 38, 561-564.
- Bues, R., Eizaguirre, M., Toubon, J.F. & Albages, R. (1996). Différences enzymatiques et écophysiologiques entre populations de *Sesamia nonagrioides* Lefèvre (Lépidoptère: Noctuidae) originaires de l'ouest du bassin méditerranéen. *Canadian Entomologist*. 128, 849–858.
- Cordero, A., Malvar, M. A., Butrón, A., Revilla, P., Velasco, P. and Ordás, A. (1998). Population dynamics and life-cycle of corn borers in south Atlantic European coast. *Maydica*. 43, 5-12.
- Courtieux, E. (1984). Etude de la nuisibilité de *Sesamia nonagrioides* (Lef) et autres lépidoptères (*Ostrinia nubilalis* Hbn et *Helicoverpa armigera* Hbn) vivant sur le maïs en basse Provence. Recherche d'une méthode de lutte raisonnée. *Mémoire de fin d'étude ESITPA* (Ecole Supérieure d'Ingénieurs et de Techniciens pour l'Agriculture).

- De La Poza, M., Farinos, G. P., Beroiz, B., Ortego, F., Hernandez-Crespo, B., Castanera, P. (2008). Genetic structure of *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) populations in the Mediterranean area. *Environmental Entomology*. 37, 1354–1360.
- Faure, A., Bize, J. M., Lemaitre, C., Guéry, B., Larue, P., Rey, M., Eychenne, N., Delos, M., Moinard, J., Frérot, B., Guillon, M., Dufretay, G., Leconte, F., Quenin, H., Etchepare, O. et Charayron, B. (1999). Lutte contre la Sésamie en deuxième génération. *Phytoma – La défense des végétaux*. 518, 23-28.
- Giacometti, R. (1995) Rearing of *Sesamia nonagrioides* Lefebvre on a meridic diet (Lepidoptera Noctuidae). *Redia*, LXXVIII, 1,19-27.
- Hilal, A. (1978). Etude expérimentale du développement et de la reproduction de *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera, Noctuidae). Application à l'étude des populations dans les cultures de cannes à sucre au Maroc. *Thèse, docteur-ingénieur*, Université de Bordeaux I, 146p.
- Kourti, A. (2006). Mitochondrial DNA Restriction Map and Cytochrome c Oxidase Subunits I and II Sequence Divergence of Corn Stalk Borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biochemical Genetics*, Vol. 44, Nos. 7/8
- Margaritopoulos, J. T., Gotosopoulos, B., Mamuris, Z., Skouras, P.J., Voudouris, K. C., Bacandritsos, N., Fantinou, A.A., Tsitsipis, J. A. (2007). Genetic variation among Mediterranean populations of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) as revealed by RFLP mtDNA analysis. *Bulletin of Entomological Research*. 97, 299–308.
- Monetti, L. Malvar, R. A., Ordas, A. & Cordero-Rivera, A. (2003). Parasitoid incidence and diversity on maize stem borers *Sesamia nonagrioides* Lefèbvre and *Ostrinia nubilalis* Hübner in nw spain. *Maydica*. 48, 133-139.
- Moyal, P., Tokro, P., Bayram, A., Savopoulou-Soultani, M., Conti, E., Eizaguirre, M., Le Ru, B., Avand-Faghih, A., Frérot, B. and Andreadis, S. (2011) Origin and taxonomic status of the Palearctic population of the stem borer *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 103, 904–922.
- Naïbo B., Calvelli, R. & Dumartin E. (1982). La Sésamie du maïs: recherche d'une méthode de lutte raisonnée. *Perspectives agricoles*. 56, 52-56.
- Naïbo, B., Guéry, B., Larue, P., Rey, M., Lemaitre, C., Faure, A., Bize, J. M., Eychenne, N., Delos, M., Moinard, J., Vieudrin, J. P., et Grimpert, C. (1999). Lutte contre la Sésamie en première génération. *Phytoma - la défense des végétaux*. 518, 20-22.
- Obonyo, M., Schulthess, F., Gerald, J., Wanyama, O., le Ru, B. & Calatayud, P.-A. (2008). Location, acceptance and suitability of lepidopteran stemborers feeding on a cultivated and wild host-plant to the endoparasitoid *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae). *Biological control*. 45(1), 36-47.
- Onyango, F. O. & Ochieng'-Odero, J. P. R. (1994). Continuous rearing of the maize stem borer *Busseola fusca* on an artificial diet. *Entomol. Exp. Appl.* 73, 139-144.
- Rousseau, D. (2009). Maïs : la sésamie progresse du cap au nord, dans l'air marin et a douceur angevine. ARVALIS. *Phytoma – La défense des végétaux*. N°622-623.
- Sreng, I. (1984). La phéromone sexuelle de *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera, Noctuidae) : système glandulaire, comportement sexuel, composition chimique. *Thèse, Docteur de 3ieme cycle*. Université de Dijon, 120p.
- Tsitsipis, J., A. et Alexandri, M. (1989). The corn stalk borer, *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera, Noctuidae) : population fluctuation and plant infestation relationship. *Act. Phyto. Ent. Hung.* 24: 213-217.

II- Article 1, dispositif expérimental d'analyse des comportements

1/ Introduction

Au commencement de mon travail de thèse, le choix du modèle biologique n'était pas encore arrêté entre *Sesamia nonagrioides* et *S. calamistis*, deux espèces phylogénétiquement proches de sésamies foreuses de Poacées sauvages et cultivées. *S. calamistis* Hampton (Lepidoptera : Noctuidae) est un ravageur important associé au maïs et au sorgho en Afrique (Ong'amo et al 2008). Au Kenya, cette noctuelle se développe à la fois sur plantes sauvages et sur plantes cultivées. L'écologie, la morphologie et le cycle biologique de *S. calamistis* étant grandement comparable à celui de *S. nonagrioides*, une analyse moléculaire (séquençage) est souvent nécessaire afin de les distinguer. Au Kenya, *S. calamistis* présente des populations génétiquement différenciées (clade mitochondriaux I et II) colonisant des régions distinctes, excepté à Mtito Andei où elles coexistent (figure 27). Dans cette zone de sympatrie, la fréquence des clades I et II varie en fonction de la plante hôte exploitée (Ong'amo et al 2008).

Les individus du clade I se développent essentiellement sur maïs et sorgho cultivés (87,6%), alors que ceux du clade II colonisent préférentiellement des plantes sauvages de la famille des Poacées (63,6%). En raison de cette différenciation génétique et écologique de ces populations sympatriques *S. calamistis*, et de la disponibilité des individus grâce à un élevage développé au laboratoire, nous avons choisi d'effectuer les premières analyses comportementales à partir de cette espèce.

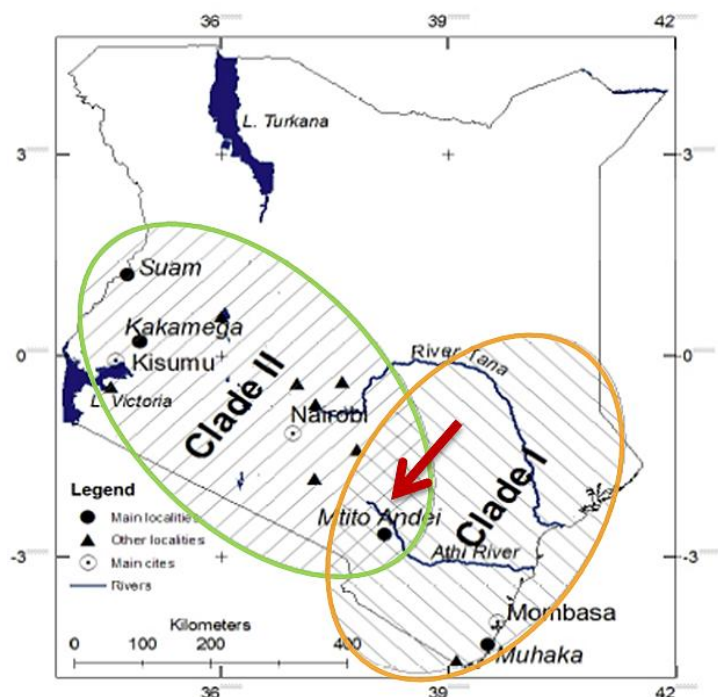


Figure 27. Carte du Kenya montrant la distribution géographique estimée des clades mitochondriaux I et II de *Sesamia calamistis* (Ong'amo et al 2008).

Les ravageurs de cultures causant d'importants dégâts agronomiques et économiques, il est essentiel de comprendre leur mode de développement afin de limiter au mieux leur impact

négatif. La connaissance des caractéristiques comportementales de ces espèces est un élément essentiel dans l'établissement de stratégies de lutte efficace. Cependant, peu d'études ont jusqu'alors été menées sur les espèces foreuses de tiges compte tenu de la difficulté à observer leur comportement, inhérente à leur nature endophyte. Bien que de nombreuses méthodes d'observation des comportements soient disponibles dans la littérature, aucune d'entre elles ne convenait véritablement à l'étude de *S. calamistis*. Par exemple, le vidéo-tracking (Martin 2004), qui permet en enregistrement des déplacements des individus localisés et le calcul de nombreux paramètres comportementaux (vitesse linéaire, vitesse angulaire...), nécessite une prise de vue en 2 dimensions en surface d'un substrat (figure 28). Cette méthode est donc contre indiquée pour l'étude des sésamies compte tenu de leur écologie. Placées dans un milieu « ouvert », les chenilles endophytes tendent à fuir par déplacement ou par tentative d'enfouissement dans le substrat. De façon similaire, le radio-tracking (figure 29) ou le collage d'élément d'identification sur les individus est à exclure, car ces dispositifs ne résisteraient pas lors du forage et du déplacement dans les galeries. Les compensateurs de locomotion sont des dispositifs efficaces lorsqu'il s'agit de mesurer les comportements d'orientation (figure 30) ou les performances locomotrices (Becher & Guerin 2009). Cependant, la nécessité d'une observation directe et individuelle des individus rend cette méthode particulièrement contraignante car très couteuse en temps, et limitante lorsqu'un grand nombre d'individus est nécessaire à l'expérimentation.

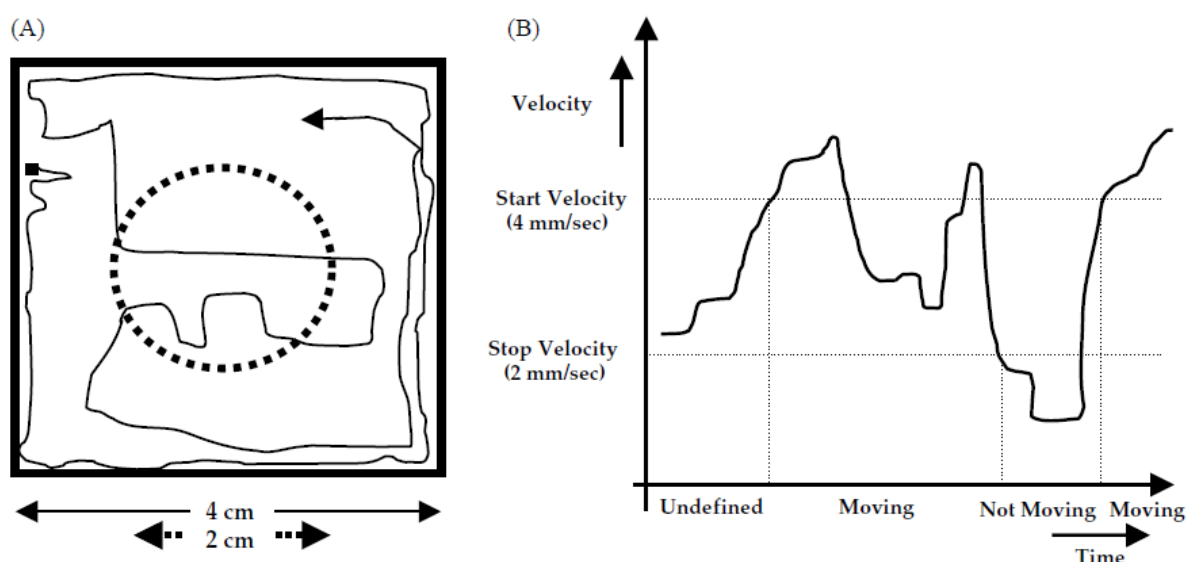
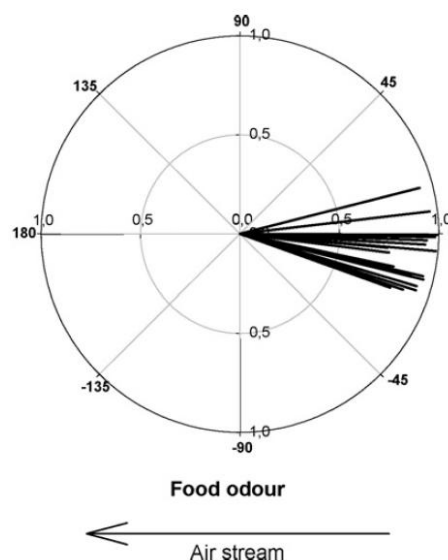


Figure 28. Analyse des comportements locomoteurs par vidéo-tracking. (A) Schéma d'une arène, surmonté d'une caméra, dans laquelle sont placés les individus à analyser. (B) Représentation graphique des caractéristiques comportementales mesurable par cette méthode, telles que la variation des patterns de déplacement dans le temps, la vitesse moyenne...



Figure 29. (À gauche) Abeille équipée d'un transpondeur permettant sa localisation et le suivi de ses déplacements (Riley et al. 2007)

Figure 30. (À droite). Résultats obtenus à partir d'un compensateur de locomotion représentant le comportement locomoteur orienté d'une larve de *Lobesia botrana* en réponse à une odeur alimentaire (Becher & Guerin 2009)



Si l'ensemble de ces méthodes sont efficaces dans leur paradigme d'étude, elles ne peuvent être transférées à l'analyse des comportements des sésamies. Les chenilles étant capables de s'attaquer à plusieurs pieds de plantes (Rousseau 2009), il est pourtant essentiel de pouvoir quantifier leur activité locomotrice associée à un comportement de changement de site alimentaire. Ces occurrences comportementales étant vraisemblablement peu fréquentes, il était nécessaire de développer un système permettant une observation en continue et sur le long terme d'un grand nombre d'individu (point indispensable pour les analyses statistiques permettant d'estimer le lien entre un génotype et un phénotype). C'est pourquoi, nous avons mis au point une méthode originale d'analyse des déplacements alimentaires des sésamies, appelée « l'actimètre », adapté du « DAMsystem » (Drosophila Activity Monitoring System®, DAM2; Trikinetics, Waltham, MA, USA) initialement développé pour le modèle *Drosophila*. Ce dispositif d'enregistrement automatique des comportements est un système constitué d'unités tubulaires, chacune munie de détecteurs photoélectriques permettant le comptage des déplacements des chenilles entre deux sites de nourriture.

Par ce moyen, nous avons pu analyser les comportements locomoteurs nocturnes et diurnes (activité nyctémérale) de larves de *S. calamistis* de 3^{ème} stade, en présence de milieu alimentaire de qualité nutritive variable. Dans un contexte de privation alimentaire exacerbant les comportements de recherche de nourriture, nous avons tout d'abord montré que les larves avaient d'avantage tendance à se déplacer durant la nuit que durant le jour. Ces données sont cohérentes avec le rythme biologique d'une espèce de noctuelle. Grâce à l'acquisition d'une information directionnelle via notre dispositif expérimental, nous avons ensuite pu quantifier

le nombre de changement de site alimentaire effectué pas les chenilles sur une durée de plusieurs jours. Lorsque la ressource alimentaire était de faible qualité (i.e. insuffisante pour permettre un développement normale des individus), les larves modulaient leurs comportements en augmentant le nombre de changement de site alimentaires effectués (augmentation de l'activité de recherche de nourriture). L'ensemble de ces résultats ont ainsi permis de valider le dispositif expérimental développé, permettant pour la première fois d'analyser les comportements locomoteurs associés à l'alimentation chez une espèce de Lépidoptère endophyte.

2/ Article

DOI: 10.1111/j.1570-7458.2011.01212.x

TECHNICAL NOTE

An actimeter system for automated recording of foraging activity in stem borer caterpillars

F. Chardonnet¹, P. Martínez Takegami¹, B. Chouquet¹, J.-F. Silvain¹ & L. Kaiser^{1,2*}

¹Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, CNRS UPR 9034, IRD UR72 et Université Paris-Sud Orsay, 1 Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France, and ²Physiologie de l'Insecte, Signalisation et Communication, INRA, Centre de Versailles-Grignon, Route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex, France

Accepted: 23 November 2011

Key words: *Sesamia calamistis*, Lepidoptera, Noctuidae, locomotion, monitoring, behaviour, pest, food patches

© 2012 The Authors *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142: 175–180, 2012

Entomologia Experimentalis et Applicata © 2012 The Netherlands Entomological Society

a) Introduction

Pest insects generate significant agronomical and economic problems. It is therefore essential to study pest insect ecology and behaviour to generate the knowledge necessary to limit their negative impact. Few studies have focused on food-related behaviour in stem borer caterpillars, partly because it is extremely challenging to directly observe the feeding

behaviour of these endophytic insects. We have designed a methodology to overcome this challenge using the species *Sesamia calamistis* Hampton (Lepidoptera: Noctuidae), a major pest of maize (*Zea mays* L.) and sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] (both Poaceae) in Africa (Ong'amo et al., 2008). Larvae of this species can feed on several stems during their development from the third instar onwards (Rousseau, 2009). This foraging behaviour is an important component of crop losses and needs to be quantified.

Many methods are currently available for studying locomotor activity of arthropod larvae (Reynolds & Riley, 2002), such as direct visual observation (Wyatt, 1997), video tracking (Berrigan & Pepin, 1995; Brackenbury, 2000; Martin, 2004; Charabidze et al., 2008), passive acoustic detection (Mankin, 1994), X-ray radiography (Villani & Gould, 1986; Harrison et al., 1993), and locomotion- compensator devices (Becher & Guerin, 2009; Piesik et al., 2009). These methods, although effective for studying the behaviour of the biological models tested so far, either require sophisticated equipment or that larvae be placed on a flat surface, which may not be suitable to study caterpillar stem borer foraging behaviour. Given the inherent constraints of the available methodologies, we have adapted a tubular apparatus for the purposes of our study, the DAM system (Drosophila Activity Monitoring System®, DAM2; Trikinetics, Waltham, MA, USA), which was initially developed for the fruit fly model (Hirsch et al., 2009; Huang et al., 2009; Freeman et al., 2010).

We used the DAM system to characterize the day and night locomotor activity (i.e., the nycthemeral activity) of *S. calamistis* caterpillars with and without food. Then, we set up an original behavioural analysis system: the actimeter, adapted from the DAM system, which allowed us to record movement between two food patches by measuring direction. We were able to characterize caterpillar response to variations in food quality – a major environmental parameter – by manipulating the quality of the food provided to the caterpillars in the device.

b) Materials and methods

b.1. Insect sampling

The third instar *S. calamistis* used for these experiments came from the Laboratoire Evolution Génome et Spéciation (LEGS, France). The strain was originally collected in a maize field in Mbita (Kenya) by ICIPE (International Centre of Insect Physiology and Ecology, Nairobi,

Kenya) technical assistants. The caterpillars were reared on artificial diet in incubators kept at 26 °C, 70% r.h., and a L12:D12 cycle. The artificial diet consisted of agar, maize leaf powder, soybean, dried yeast, and a mixture of vitamins and antibiotics. Environmental conditions were identical for all behavioural tests. We determined the instar from the size of the head capsule.

b.2. Experimental design: the DAM system

The DAM2® actimeter is a monitor made up of a grid pierced with 32 holes. A 65 x 7 mm polycarbonate tube (5 mm i.d.) is inserted into each hole, and each hole is equipped with an infrared photoelectric detector. This configuration allows for automatic, continuous, and simultaneous recording of the displacements of 32 individuals. The tubes create a stem-like confined structure that more closely mimics the natural environment of stem borer larvae than do most of the experimental devices presented above. Displacement of individual caterpillars trapped in the tubular unit (the units are closed with perforated plastic corks at both ends to allow for air circulation) is detected, each time the insect breaks an infrared beam. The detections perceived by each cell are transmitted to a computer, equipped with the DAMSystem collection® software (TriKinetics) that allows a choice of time intervals over which to pool the recorded activity (bin). On the basis of previous observations of locomotion of *S. calamistis* larvae, we set this interval to 5 min to record activity over 24 h or longer. All cells are also equipped with a light sensor that gives a specific state of brightness ('light' vs. 'dark') for each locomotor activity recorded.

b.3. Behavioural assays

We tested different behavioural protocols using the device described above. First, we analysed the locomotor activity of insects in the presence or absence of food using a single monitor. Then, we linked three monitors and created a new method of recording movements between two food patches.

- **Single monitor to record locomotor activity:** Tubes were inserted into the grid at their centre-point. We tested two experimental conditions: third instars were introduced into (1) empty tubes (without food; n = 8) or (2) tubes containing 1.5 cm of artificial diet inserted at one end (n = 10). The shape and volume of food inside tubes was appropriate to allow caterpillars to bore into the food. Four tubes per monitor were left empty to control for possible spurious counts attributable to the device. We recorded caterpillar activity for 22

consecutive hours. Each experiment was repeated three times, for a total of 54 individuals tested (24 without food and 30 with food).

- **Linking three monitors to track foraging activity between food patches (the ‘actimeter’)**: To study the foraging behaviour of third instar, *S. calamistis* moving between two food patches, we needed to increase the length of the test tubes and generate directional information to locate caterpillars. One solution to overcome the lack of directional data provided by a single monitor was to insert longer tubes into three parallel monitors (Figure 1). The location of the monitors allowed us to record two distinct behaviours (Figure 2): (1) the patch change, detected as an insect crosses each monitor successively when moving from one patch to the next, and (2) return to the initial patch, detected when the individual is located close to one food patch, then in the middle of the tube, and back again at the initial food patch.

The long tubes (about 190 mm long x 7 mm i.d.) were made of three short tubes (65 mm long) joined by silicone couplings (Figure 1). One and a half centimetres of artificial diet was inserted at each end of the long tube, forming two food patches. Two monitors were placed at the edge of each food patch, and the third monitor was placed in the centre of the tubular unit. This design allowed us to simultaneously record the foraging behaviour of 32 caterpillars (one per long tube).

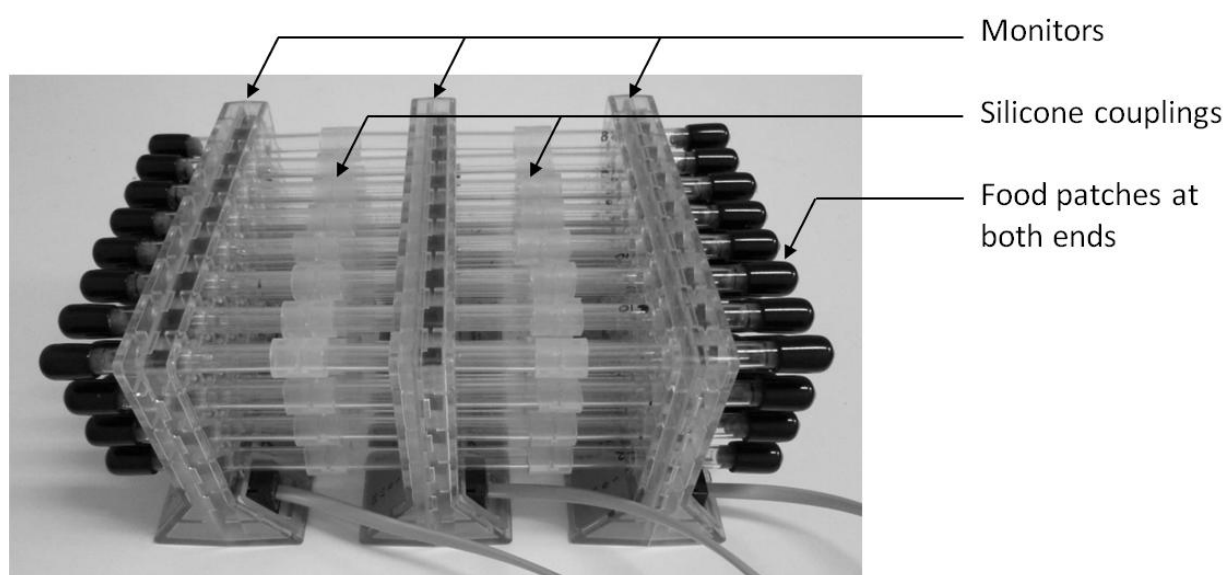


Figure 1. The actimeter: experimental device for automatic and individual recording of foraging behaviour of *Sesamia calamistis* caterpillars. Displacement of each larva was recorded by three infrared-beams situated along the tube containing the caterpillars.

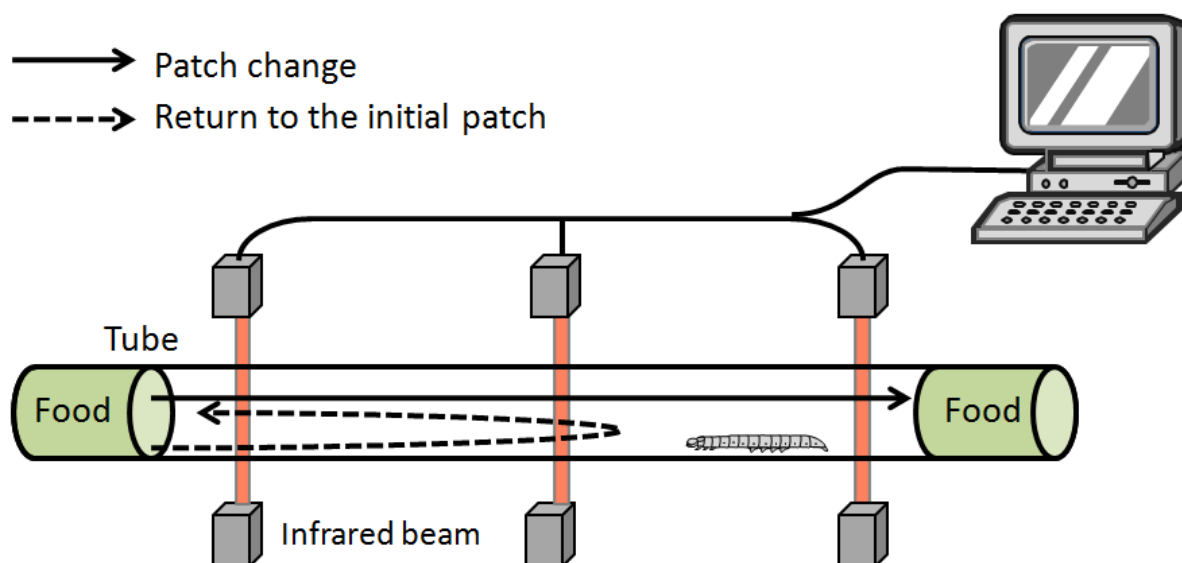


Figure 2. Schematic illustration of one tubular unit (about 190 mm in length x 7 mm i.d.) and the two kinds of recordable behaviour. Caterpillar length was about 10 mm. ‘Patch change’: movement from one patch to another is detected by sequential activity in the three monitors. ‘Return to the initial patch’: the caterpillar does not reach the opposite patch and comes back to the initial one after breaking the beam of the middle monitor.

- **Food quality manipulation:** To test whether movements recorded by this system were food-related, we analysed the behavioural response to reduced food quality by diluting the diet placed in the actimeter. Half of the caterpillars were tested on the standard diet, whereas the other half were tested on a diet diluted to 20% of the nutritional value of the standard diet (Kaun et al., 2007) (while keeping the same percentage of agar to maintain diet consistency). This experiment was replicated to test 24 individuals per condition, over three consecutive days (72 h). As a result of a bacterial contamination of the diet on the 3rd day, we only present our results for the first 48 h (2 days). Each individual was weighed before the beginning of the test and 72 h after, to estimate the impact of the experiment on growth.

b.4. Statistical analysis

In the first experiment, using a single monitor, we transformed data gathered by the DAMSystem collection software into binary data. Thus, for every 5-min bin, we obtained a score of 0 passage (no detection during a 5-min bin) or 1 passage (detections were recorded during a 5-min bin, meaning that we assigned a score of 1 regardless of how many detections were recorded in the interval). We used visual observation to confirm that one passage generated several successive detections. For each individual, we estimated locomotor activity as the number of passages per hour. We compared activity with or without food, separately

for light and dark periods, using the Wilcoxon Mann–Whitney test, because this variable was not normally distributed.

In the experiment in which we used the three linked monitors, the effect of food quality on the number of moving insects (those that made at least one passage in 24 h) was assessed using a χ^2 test. As the quantitative behavioural variables were not normally distributed, we analysed them using non-parametric tests. We used the Wilcoxon Mann–Whitney test to assess the effect of food quality on these individual variables, analysed separately for each day: (1) the number of times individuals changed patches or returned to the original patch, and (2) the latency of the first patch change. The evolution of activity over the 2-day experiment was assessed using a Wilcoxon test on the number of movements counted in 24 h [here significance level was corrected with the Dunn–Sidak correction $\alpha' = 1/(1 + \alpha)^{1/2} = 0.025$ for $\alpha = 0.05$ and for two comparisons realized on a same data sample]. Growth was estimated as the relative weight gain between the beginning and the end of the experiment. The Student's T test was used to compare larval weight for standard and reduced food quality. All statistical analyses were performed using the software XLStat V. 2010.3.01 (Addinsoft, Paris, France).

c) Results

c.1. General locomotor activity with and without food (single monitor)

During the photophase, groups with and without food showed similar levels of locomotor activity ($U = 415.5$, $P > 0.05$). However, during the scotophase, locomotor activity was higher in the absence of food ($U = 478$, $P = 0.04$) (Table 1, Figure 3). No ‘noise’ activity was detected in the cells that did not contain insects.

Table 1. Mean ($\pm$ SE) patch changes for the groups of *Sesamia calamistis* larvae with food ($n = 30$) and without food ($n = 24$), for light and dark periods separately

Condition	Occurrences per h	P-value (Wilcoxon- Mann-Whitney test)
No food/photophase	1.91 ± 0.33	0.34
Food/photophase	1.62 ± 0.34	
No food/scotophase	2.49 ± 0.40	0.04
Food/scotophase	1.36 ± 0.34	

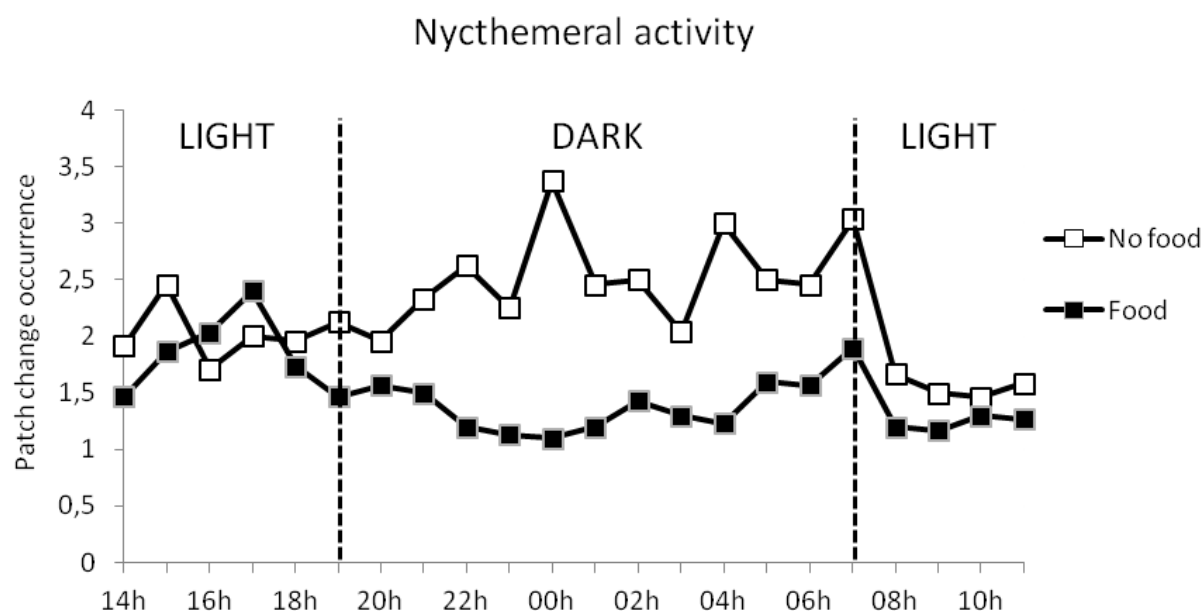


Figure 3. Average hourly activity of third instar *Sesamia calamistis* during the light phase and the dark phase, in the presence (Food) or absence (No food) of food. Results are from tests in short tubes (65 mm long) inserted through a single monitor. See Table 1 for statistical analysis.

c.2. Effect of food quality manipulation (three monitors)

- Effect on the locomotor activity (test in long tubes inserted through three parallel monitors):

(1) *Number of moving caterpillars:* Dilution of the diet increased the number of individuals making at least one patch change during the first 24 h of the test (moving caterpillars: 47.8% in standard group vs. 79.2% in diluted group; $\chi^2 = 4.997$, d.f. = 1, $P = 0.025$; Figure 4A). This difference was no longer significant on the 2nd day (moving caterpillars: 73.9% in standard group vs. 91.7% in diluted group; $\chi^2 = 2.621$, d.f. = 1, $P > 0.05$). Dilution of the diet did not influence the number of insects that returned to the initial patch at least once (moving caterpillars; day 1: 69.6% with the standard diet vs. 50% with the diluted diet; $\chi^2 = 1.86$, d.f. = 1, $P > 0.05$; day 2: 73.9% with the standard diet vs. 75% with the diluted diet; $\chi^2 = 0.007$, d.f. = 1, $P > 0.05$).

(2) *Latency of the first move:* Dilution of the diet significantly reduced the latency of the first patch change for those individuals that moved (average latency: 1 127 min = 18 h 47 min on standard diet vs. 670 min = 11 h 10 min on diluted diet; $U = 293.5$, $P = 0.023$; Figure 4B). The latency of the first return to the initial patch was not significantly influenced by diet

dilution (average latency: 848 min = 14 h 08 min on standard diet vs. 1 073 min = 17 h 53 min on diluted diet; $U = 135.5$, $P = 0.281$).

(3) *Average number of moves*: Despite the previous results showing that more individuals in the group with lower food quality moved than the group with the standard diet [see above (1) and (2)], the average number of movements overall did not vary with the food quality (patch change: day 1: $U = 240$, day 2: $U = 274.5$, $P > 0.05$; return to the initial patch: day 1: $U = 309$, day 2: $U = 243$, $P > 0.05$; or global activity: day 1: $U = 263.5$, day 2: $U = 277$, $P > 0.05$; Figure 4C). Variability was higher in the group with the standard diet ($SD = 3.8$) than in the group with the diluted diet ($SD = 2.6$), which could explain the lack of intergroup differences. The number of moves increased between days 1 and 2: from 2.7 to 7.3 patch changes per day for the insects kept on standard diet, and 2.4–6.2 for the insects kept on the diluted diet ($P < 0.0001$).

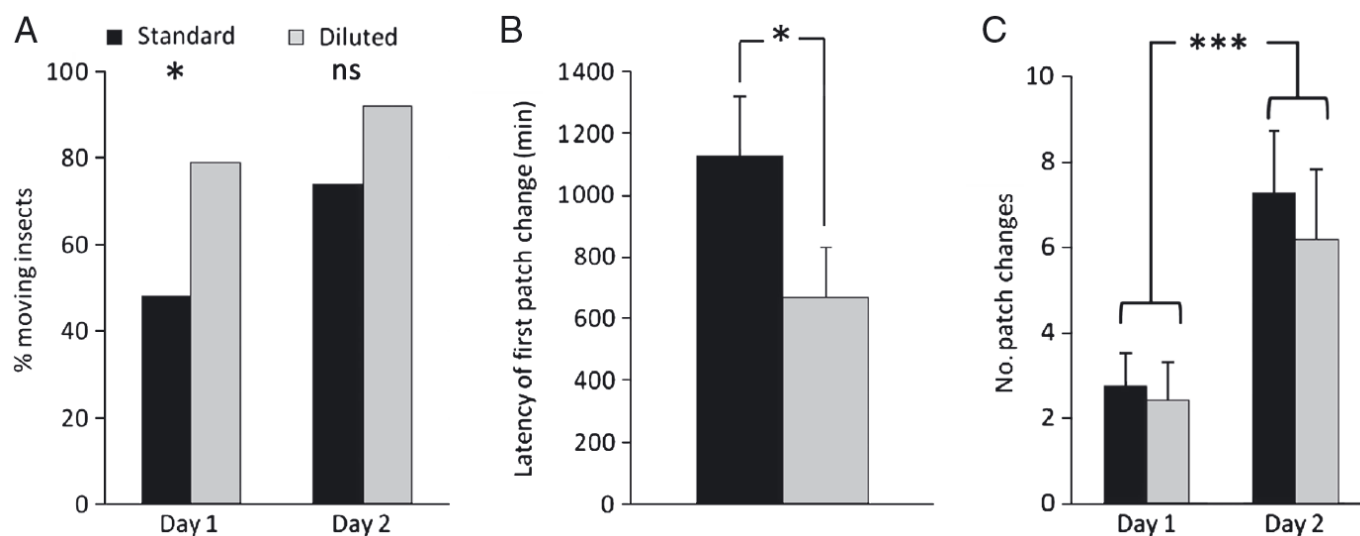


Figure 4. Effect of food quality manipulation on locomotor activity (tested in long tubes inserted through three parallel monitors) of *Sesamia calamistis*. (A) Percentage of insects making at least one patch change during the 1st day. The number of mobile individuals was significantly higher on the diluted diet than on the standard diet ($n = 24$) ($v_2 = 4.997$, d.f. = 1, $*P < 0.05$). (B) Average (+ SE) latency of the first patch change (in min). Individuals on the diluted diet moved between food patches earlier than those on the standard diet (Wilcoxon Mann–Whitney: $U = 293.5$, $*P < 0.05$). (C) Average (+ SE) number of patch changes per day. There is an increase in locomotor activity between the 2 days of the experiment for both standard diet and diluted diet group (Wilcoxon: $V = 86$, $***P < 0.0001$).

- **Effect on weight gain:** There was a significant effect of food quality on weight gain ($t = 3.605$, $P = 0.008$) over the 72 h following the start of the diet quality test. Caterpillars tested on standard diet gained 2.5 times their starting weight vs. twice their starting weight for those tested on diluted diet.

d) Discussion

This study was designed to develop an effective method for analysing the foraging activity of a Lepidopteran stem borer species. The relatively low activity levels recorded by the actimeter (between 0 and 3.5 moves per hour) suggest that 5-min bins were a relevant time scale for generating a thorough movement record. This observation underscores the necessity for long-term and continuous recording. Overall, the automatic device used in our experiment seems to be an accurate method for studying the influence of environmental factors on foraging activity of stemborer caterpillars.

The first experiment allowed us to characterize the nycthemeral rhythm of a larval stage of *S. calamistis*. We showed that *S. calamistis* caterpillars forage more during the dark phase when they lack food. The daily feeding pattern is highly variable between caterpillar species, and depends on exposure to natural predators and / or unfavourable abiotic conditions (Slansky, 1993). The feeding pattern of *S. calamistis* is consistent with the cryptic phenotype of the larvae and the nocturnal activity of the imago. It may be an adaptive strategy to reduce the risk of predation (Montllor & Bernays, 1993) or exposure to elevated temperature (Barbosa, 1993).

Linking three monitors, as in the second experiment, provided directional information on movements from one food patch to another. This technique is an original adaptation of the *Drosophila* Activity Monitoring System. Until now, the DAM system has been used primarily to monitor adult *Drosophila* activity rhythms. To our knowledge, this is the first time it has been developed to study foraging activity of a crawling insect. The caterpillar behaviours revealed by the linked-monitor system can be interpreted as food-related, because these movements were influenced by food quality and by the absence or presence of food. Increased locomotor activity in response to poor food quality can be interpreted as a way to improve the insect's capacity to discover new food (Colasurdo et al., 2007). Here, the effect of poor food

quality was confirmed by the limited growth in the group fed a diluted diet. Therefore, the ability to respond to food quality, as demonstrated here, would provide a fitness benefit to the insect.

Independent of food quality, locomotor activity increased between the first and the second day spent in the actimeter. This is likely because progressive consumption of food by the *S. calamistis* larvae caused a reduction in patch quality.

Return to the initial patch was much less frequent than patch change, and was not influenced by any of the experimental conditions. The behaviour might have been more prevalent if the insect had a choice between food patches that differed in quality, but under the conditions of this experiment, in which an individual was given the choice of two patches of equal quality, we observed that once a caterpillar initiated a move, it tended to continue to the other side of the tube rather than turn back.

Thus, this study presents a device suitable to study the foraging behaviour of third instar *S. calamistis*. There are numerous other untested uses for this apparatus. For example, we could use different sizes of monitors to test insects of different sizes (i.e., younger or older instars), and in this way study the evolution and maturation of stem borer caterpillars' locomotor activity. There are also many potential test paradigms: this device could be used to evaluate the influence of internal or external factors on foraging activity, with or without choice; the method has the advantage of being easy, efficient (32 automated individual recordings at a time) and allows for testing over an extended period of time. It is quite feasible to use this method to estimate patch time and patch leaving decisions in small walking or crawling insects: important parameters of optimal foraging rules in the context of behavioural ecology.

Acknowledgements

We are grateful to Bruno Le Rü (ICIPE, Nairobi, Kenya) for fruitful discussions and data on the ecology of *S. calamistis* and Gerphas Ogola (ICIPE) for providing the biological material. We thank Frederic Mery for lending us the actimeters for trials, Amandine Fossoud, Magali Bonneau, and Sylvie Nortier for rearing the insects, and Jean- Luc Durand for advice on data analyses. English language editing was done by Clarity in Science, Sharilynn Wardrop, ON, Canada. This work was funded by the ANR (6th Extinction call, Adaptanthrop project) and by

INRA, IRD, and CNRS. F. Chardonnet was funded by a grant from the Ecole Doctorale Diversité du Vivant, University of Paris 6.

e) References

- Barbosa P (1993) Lepidopteran foraging on plants in agroecosystems: constraints and consequences. Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging (ed. by NE Stamp & TMCCasey), pp. 523–566. Chapman & Hall, London, UK.
- Becher PG & Guerin PM (2009) Oriented responses of grapevine moth larvae *Lobesia botrana* to volatiles from host plants and an artificial diet on a locomotion compensator. *Journal of Insect Physiology* 55: 384–393.
- Berrigan D & Pepin DJ (1995) How maggots move: allometry and kinematics of crawling in larval Diptera. *Journal of Insect Physiology* 41: 329–337.
- Brackenbury J (2000) Locomotory modes in the larva and pupa of *Chironomus plumosus* (Diptera, Chironomidae). *Journal of Insect Physiology* 46: 1517–1527.
- Charabidze D, Bourel B, Leblanc H, Hedouin V & Gosset D (2008) Effect of body length and temperature on the crawling speed of *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera Calliphoridae). *Journal of Insect Physiology* 54: 529–533.
- Colasurdo N, Dussutour A & Despland E (2007) Do food protein and carbohydrate content influence the pattern of feeding and the tendency to explore of forest tent caterpillars? *Journal of Insect Physiology* 53: 1160–1168.
- Freeman A, Bowers M, Vrailas Mortimer A, Timmerman C, Roux S et al. (2010) A new genetic model of activity-induced Ras signalling dependent pre-synaptic plasticity in *Drosophila*. *Brain Research* 1326: 15–29.
- Harrison RD, Gardner WA, Tollner WE & Kinard DJ (1993) X-ray computed tomography studies of the burrowing behaviour of fourth-instar pecan weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology* 86: 1714–1719.
- Hirsch HBV, Possidente D, Averill S, Palmetto Despain T, Buytjens J et al. (2009) Variations at a quantitative trait locus (QTL) affect development of behavior in lead-exposed *Drosophila melanogaster*. *NeuroToxicology* 30: 305–311.
- Huang Y, Howlett E, Stern C & Jackson FR (2009) Altered LARK expression perturbs development and physiology of the *Drosophila* PDF clock neurons. *Molecular and Cellular Neurosciences* 41: 196–205.
- Kaun KR, Riedl CAL, Chakaborty-Chatterjee M, Belay AT, Douglas SJ et al. (2007) Natural variation in food acquisition mediated via a *Drosophila* GMPc-dependent protein kinase. *Journal of Experimental Biology* 210: 3547–3558.
- Mankin RW (1994) Acoustical detection of *Aedes taeniorhynchus* swarms and emergence exoduses in remote salt marshes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 10: 302–308.
- Martin JR (2004) A portrait of locomotor behavior in *Drosophila* determined by a video-tracking paradigm. *Behavioural Processes* 67: 207–219.
- Montllor CB & Bernays EA (1993) Invertebrate predators and caterpillar foraging. Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging (ed. by NE Stamp & TM Casey), pp. 170–202. Chapman & Hall, London, UK.
- Ong'amo GO, Le Ru BP, Moyal P, Calatayud PA, Le Gall P et al. (2008) Host-plant diversity of *Sesamia calamistis*: cytochrome b gene sequences reveal local genetic differentiation. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 128: 154–161.
- Piesik D, Rochat D, van der Pers J & Marion-Poll F (2009) Pulsed odors from maize or spinach elicit orientation in European corn borer neonate larvae. *Journal of Chemical Ecology* 35: 1032–1042.

- Reynolds DR & Riley JR (2002) Remote-sensing, telemetric and computer-based technologies for investigating insect movement: a survey of existing and potential techniques. *Computer and Electronics in Agriculture* 35(2–3): 271–307.
- Rousseau D (2009) Maïs : la sésamie progresse cap au nord, dans l'air marin et la douceur angevine. *Phytoma, la Défense des Végétaux* 622–23: 38–41.
- Slansky F (1993) Nutritional ecology: the fundamental quest of nutrients. *Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging* (ed. by NE Stamp & TM Casey), pp. 29–91. Chapman & Hall, London, UK.
- Villani MG & Gould F (1986) Use of radiographs for movement analysis of the corn wireworm, *Melanotus communis* (Coleoptera: Elateridae). *Environmental Entomology* 15: 462–464.
- Wyatt TD (1997) Methods in studying insect behaviour. *Methods in Ecological and Agricultural Entomology* (ed. By DR Dent & MP Walton), pp. 27–56. CAB International, Wallingford, UK.

3/ Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons démontré l'efficacité de la méthode élaborée permettant pour la première fois d'analyser l'activité locomotrice associée à l'alimentation chez les larves de 3^{ème} stade d'une espèce de sésamie. Les principaux résultats de cette étude indiquent chez *S. calamistis* des taux de déplacement relativement faibles, une activité de recherche alimentaire plus élevée durant la scotophase, et une augmentation des comportements locomoteurs lorsque la nourriture est peu nutritive ou absente. « L'actimètre » présente plusieurs avantages majeurs. Premièrement, il permet un enregistrement automatique et sur le long terme des déplacements individuels. Cet atout est particulièrement intéressant pour étudier sur le long terme des comportements dont les occurrences sont peu fréquentes. Deuxièmement, il permet d'enregistrer de façon simultanée l'activité de 32 individus, permettant d'acquérir rapidement une quantité d'information nécessaire aux analyses statistiques. Enfin, la structure confinée du dispositif associée à la possibilité qu'ont les chenilles d'exprimer un comportement de forage, permet d'utiliser cette méthode pour tester l'influence des facteurs environnementaux dans un contexte écologiquement pertinent pour l'espèce étudiée. La principale contrainte de l'actimètre réside dans l'impossibilité à manipuler les tubes (changement du milieu nutritif, additionnement d'un traitement...) ou les individus (pesée...) sans devoir interrompre complètement l'expérience.

En termes de perspectives, il serait particulièrement intéressant d'étendre l'étude des comportements locomoteurs aux autres stades de développement des sésamies foreuses de tiges. La taille du dispositif peut en effet être modulée à volonté afin de convenir au gabarit

des stades larvaires testés, et permettre ainsi d'étudier la maturation des comportements au cours de l'ontogénèse.

Dans une étude parallèle, nous avons testé au laboratoire les comportements locomoteurs à l'émergence des larves L1 de *S. nonagrioides* (Möeller 2011). Pour ce faire, nous avons utilisé des tubes de circonférence plus réduite de 5 mm de diamètre externe pour 3 mm de diamètre interne. En raison de la petite taille des jeunes chenilles (supposant une capacité de déplacement plus réduite), un seul tube de 65 mm de long est inséré dans une grille de détecteur photoélectrique (figure 31). Cette méthode est comparable à l'emploi plus classique du DAMsystem dans la littérature (mesure de l'activité brute à partir d'un seul moniteur, sans information directionnelle). Dans l'expérience réalisée, les comportements des larves ont été testés dans deux conditions alimentaires distinctes durant 24h : avec (tube avec du milieu nutritif) et sans nourriture (tube vide).

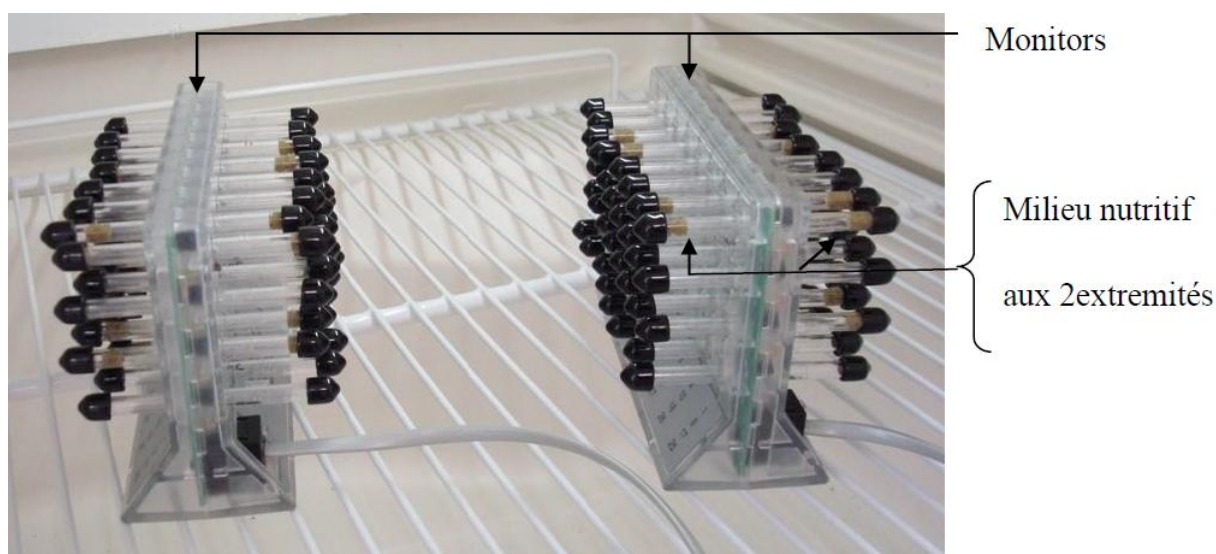


Figure 31. L'actimètre à un seul moniteur : variante plus classique du dispositif expérimental d'enregistrement automatique individuel des comportements de déplacement des chenilles de sésamies.

De façon similaire aux résultats obtenus sur les 3^{èmes} stades larvaires, les jeunes larves venant d'émerger se déplacent d'avantage en absence de milieu ($n = 64$ par groupe). Le nombre moyen de détections en 24h d'expérimentation était de 3,5 avec milieu contre 11,2 sans milieu (ANOVA, $F_{3,123} = 5,543$, $P < 0,001$). Ainsi, l'effet de l'environnement nutritif semble être persistant entre différents stades larvaires et différentes espèces de sésamies dont l'écologie est similaire. Cette modulation des comportements en fonction de l'environnement peut être interprétée comme un mécanisme adaptatif. Une augmentation des comportements

locomoteurs permettrait d'accroître les chances de localiser de nouvelles ressources alimentaires (Colasurdo et al. 2007), tandis qu'un comportement plus sédentaire une fois la ressource trouvée permettrait de réduire les pressions de prédation et les fortes dépenses énergétiques (Marchand et al. 2003, Slansky 1993).

D'autres méthodes sont disponibles pour étudier les comportements locomoteurs des sésamies. Les premiers stades larvaires de *S. nonagrioides* n'exprimant pas immédiatement un comportement de forage des tiges (Hilal 1978), le système de vidéo tracking par observation visuelle en 2 dimensions (boîte de pétri surmontée d'une caméra reliée à un ordinateur) pourrait s'avérer intéressant pour tester d'autre hypothèses, telles que l'effet de la densité sur la dispersion des larves à l'émergence (niveau de tolérance des congénères). Si la taille de l'actimètre peut être réduite pour s'adapter aux expérimentations sur les jeunes stades larvaires, elle peut aussi être augmentée pour tester des chenilles plus âgées du stade L4 à L6-L7. Quelques difficultés techniques restent toutefois à résoudre. En effet, l'agrandissement des cellules photo-électriques provoque une augmentation des détections parasites en raison d'une perturbation des capteurs par la lumière extérieure. Enfin, les comportements locomoteurs des adultes pourraient être testés à partir d'une méthode de type « tunnel de vol » (figure 32). Cette méthode permet d'estimer plusieurs paramètres de performances de l'espèce, tels que la durée et la distance maximale de vol/ de dispersion (Chafiol et al. 2005), qui sont des données essentielles pour la gestion des ravageurs.

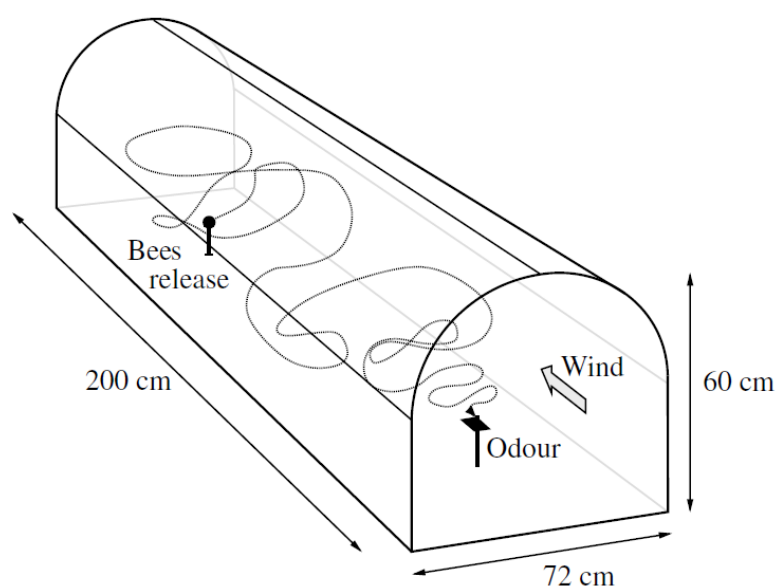


Figure 32.
Caractéristiques générales
d'un tunnel de vol, ici
adapté au modèle Abeille
(Chafiol et al. 2005).

III – Article 2, le gène *for* associé aux comportements de recherche alimentaire chez *S. nonagrioides*

1/ Introduction

L'expansion des aires dévolues à l'agriculture en réponse à l'augmentation des besoins alimentaires d'une population mondiale croissante, expose les espèces à une réduction drastique de la diversité et de la disponibilité de leurs ressources naturelles (Foley et al. 2011, Zavaleta & Hulvey, 2004). Les plantes cultivées représentant une nouvelle ressource riche et abondante, le risque d'apparition et d'expansion des ravageurs augmente. Curieusement, relativement peu d'espèces d'arthropodes ont été capables d'effectuer cette transition et d'exploiter les poacées cultivées (Kristensen 1999, Toussaint et al. 2012, Zhang 1994). Cette observation suppose l'existence de mécanismes évolutifs spécifiques permettant une adaptation à un changement de ressource et l'acquisition du statut de ravageur chez les phytophages.

Dans son ouvrage « *The Origin of Species* », Darwin décrit la théorie de l'évolution comme une lutte des individus pour la survie face aux conditions environnementales et écologiques (Darwin 1859). Les mécanismes adaptatifs exprimés en réponse à ces pressions de sélection naturelle, associés aux principes de variations et d'héritabilité des caractères, sont à l'origine de l'évolution des espèces. Dans un contexte d'analyse de l'évolution des stratégies alimentaires, les insectes phytophages sont un parfait exemple de l'adaptation et la diversification évolutive des espèces. Leurs régimes alimentaires peuvent être caractérisés de monophage, oligophage ou polyphage, et sont généralement spécialisés sur un nombre restreint de structures végétales (feuilles, tiges, graines, racines...) (Shoonhoven et al. 2005). Cette complexité évolutive suppose l'implication de nombreux traits physiologiques et comportementaux dans l'adaptation d'une espèce à une ressource alimentaire spécifique. En raison de la nécessité de limiter le développement des ravageurs de cultures par le biais de différentes méthodes de contrôle, l'analyse des facteurs de transition et d'adaptation d'une espèce d'insecte phytophage aux plantes cultivées s'est jusqu'alors essentiellement concentrée sur l'étude de la résistance aux pesticides utilisés en agriculture (Gassman et al. 2009). Ainsi, de nombreuses recherches se sont portées sur la capacité de résistance de *S. nonagrioides* à la toxine Cry1Ac (codée par un gène de *Bacillus thuringiensis*) exprimé par

les organismes OGM Bt (Andreadis et al. 2007, Farinós et al. 2004, Gassman et al. 2009, González-Núñez et al. 2000).

Pourtant, le milieu « sauvage » et le milieu « cultivé » présentent des caractéristiques bien distinctes et impliquent nécessairement de multiples pressions de sélections différentes (figure 33). En plus de la résistance aux pesticides, les insectes doivent aussi s'adapter aux variations dans la disponibilité, la morphologie (défenses physiques des plantes) et la qualité nutritive de la plante-hôte.



Figure 33. A gauche, l'environnement sauvage avec ici quelques pied de Typhacées au bord d'un cours d'eau (©Royer Daniel). A droite, l'environnement cultivé représenté par un champ de maïs (©fredhoogervorst).

La disponibilité des ressources est un élément essentiel dans l'établissement d'une espèce sur un nouvel hôte. Leur abondance, leur distribution spatiale et temporelle vont directement influencer le risque d'apparition d'une espèce prédatrice. De façon générale, ce sont les plantes les plus abondantes qui présentent la plus grande diversité d'insectes phytophages (Gassman et al. 2009). C'est également dans les systèmes agricoles monocultureux où la diversité végétale est volontairement réduite que les pertes dues aux ravageurs sont les plus fortes, bien qu'elles soient attribuables à un plus petit nombre d'espèces (Matson et al. 1997).

Dans un contexte d'intensification des cultures, la qualité nutritive des plantes cultivées est supérieure à celle des plantes sauvages car celles-ci sont sélectionnées pour leur productivité et bénéficient des systèmes de fertilisation et d'irrigation des sols (Shoonhoven et al. 1998). L'agriculture intensive employée dans l'optique d'obtenir les rendements agraires optimaux nécessite l'adjonction d'engrais, et plus précisément d'azote synthétique produit à partir des

combustibles fossiles (Matson et al. 1997). La consommation de taux élevés d'azote par les plantes cultivées permet en effet d'augmenter la quantité et la qualité des grains produits. Particulièrement soluble, le milieu liquide de la plante présente de plus hautes concentrations en azote ce qui influence le développement des espèces se nourrissant de sève (par exemple les pucerons, les delphacidae). Dans les cultures, ces espèces présenteraient un accroissement démographique en lien avec les méthodes de fertilisation. C'est par exemple le cas de la cicadelle *Nilaparvata lugens* infestant systématiquement les rizières de l'Asie du sud-est lors d'une utilisation en forte quantité d'azote dans les champs (Reissig et al. 1986).

La noctuelle *Sesamia nonagrioides* Lefèbvre (Lepidoptera : noctuidae) est l'une des espèces ayant été capable de s'adapter aux céréales cultivées. De façon intéressante, cette espèce présente différentes populations caractérisables en fonction de leur préférence écologique. En Europe, celle-ci est un ravageur principal du maïs et cause d'importants dommages aux cultures (Anglade 1972, Cordero et al. 1998). A l'Est de la Rift Valley (Afrique de l'Est) en revanche, l'espèce demeure strictement inféodée aux plantes herbacées sauvages (par exemple, Typhaceae) (Nye 1960, Ong'Amo et al. 2013) malgré la présence de champ de maïs et de sorgho dans l'environnement. Les individus exploitant les plantes sauvages, moins riches en nutriments que les plantes cultivées, devraient parcourir de plus grandes distances et changer de plantes hôtes plus fréquemment afin d'acquérir les ressources nécessaires à leur développement complet.

Si l'environnement représente un défi adaptatif pour les espèces phytophages, d'autres facteurs inhérents à la biologie de l'insecte sont tout autant essentiels dans les mécanismes d'adaptation à la plante hôte. Par exemple, les contraintes génétiques et les compromis évolutifs associés aux stratégies alimentaires exprimées par l'espèce phytophage (modulant la fitness des individus en fonction de la ressource exploitée), modulent la probabilité qu'elle puisse s'adapter aux ressources cultivées (Gassman et al. 2009). Le gène *foraging* (*for*), qui code pour une protéine kinase dépendante de la guanosine monophosphate cyclique (la PKG), est un gène candidat pour l'étude des bases moléculaires, cellulaires et évolutives des comportements alimentaires (Fitzpatrick et al 2005, Fitzpatrick & Sokolowski 2004). Impliqué dans la modulation des stratégies alimentaires chez de nombreux insectes, la structure et la fonction de ce gène sont en effet grandement conservées parmi les arthropodes. Dans ce contexte, nous avons développé l'hypothèse que le gène *for* serait un facteur impliqué

dans l'expression de stratégies alimentaires spécifiques en fonction de la plante hôte consommée chez *S. nonagrioides*.

Dans cette étude, nous supposons que l'orthologue du gène *for* chez *S. nonagrioides* (*Snfor*) présenterait une variation de séquence et/ou d'expression du gène, en corrélation avec des comportements de recherche alimentaire distincts en fonction de la plante hôte exploitée. Les larves issues des plantes sauvages devraient exprimer une plus haute activité locomotrice associée à l'alimentation que les chenilles provenant des champs cultivés. Pour tester ces hypothèses, nous avons développé une approche intégrative regroupant les analyses moléculaire, comportementale et pharmacologique, permettant de comparer sur différents niveaux les larves des deux populations écologiques de *S. nonagrioides*. En démontrant un lien causal entre le génotype *for* et le phénotype associé à l'écologie spécifique des populations, cette étude permettrait de discuter des facteurs génétiques et comportementaux prédisposant au changement de ressource alimentaire et à l'adaptation aux plantes cultivées.

2/ Article

Food searching behaviour of a Lepidoptera pest species modulated by the *foraging* gene polymorphism

Floriane CHARDONNET¹, Claire CAPDEVIELLE-DULAC¹, Bastien CHOUQUET¹, Nicolas JOLY¹, Myriam HARRY¹, Bruno LE RU^{1,2}, Jean-François SILVAIN¹ and Laure KAISER^{1,3}.

1. Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, CNRS UPR 9034, IRD UR72 et Université Paris-Sud Orsay, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France
2. ICIPE - African Insect Science for Food and Health, Duduville Campus, Kasarani, P.O. Box 30772 - 00100, Nairobi, Kenya
3. Physiologie de l'Insecte, Signalisation et Communication, INRA, Centre de Versailles-Grignon, Route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex, France

Summary

Background: In the *Sesamia nonagrioides* pest species (Lepidoptera: Noctuidae), some populations have been able to cope with changes in land use and have shifted to cultivated host plants (crop population), while others are non-pest and found exclusively on wild herbaceous plants (wild population). This ecological divergence could be associated to differences in food-search strategies because of qualitative differences between these two types of resources. As the *foraging* gene (*for*), which encodes a PKG, has an evolutionary conserved function in feeding strategies, it is a good candidate to study the genetic basis of *S. nonagrioides* food searching behaviour associated to its ecological divergence.

Results: The full sequencing of *for* cDNA in *S. nonagrioides* revealed a high conservation with other insect taxa. One non-synonymous allelic variation was found, defining two allelic variants. One was most common in the crop population and the other was the only one in the wild population. These populations differed in their foraging behaviour, measured by how frequently they moved between food patches. Crop larvae were significantly more sedentary. Specific activation of the encoded PKG by a cGMP analogue increased their foraging activity, while cAMP had no significant effect, indicating a causal link between *for* and the identified behavioural phenotypes. Using this polymorphic population, we demonstrated a genotype-phenotype correlation, potentially associated with specific gene expression levels.

Conclusions: Together, our results suggest that the *foraging* gene is involved in the modulation of the foraging strategies of *S. nonagrioides*. It could be one of the mechanisms involved in its adaptation to a cultivated host plant.

Highlights

- *Snfor* gene polymorphism in pest and non-pest populations of *S. nonagrioides*
- Ecological populations expressed different levels of larval locomotor activity
- Artificial activation of PKG activity modulated foraging activity in larvae
- Too high variability of the *Snfor* expression level to allow a correlation with the two alleles

a) Introduction

The *foraging* gene (*for*), which encodes a cGMP-dependent protein kinase (PKG), has been described in the literature as a candidate gene for studies of genetic and phenotypic associations because of its involvement in the modulation of foraging strategies in a variety of invertebrate species (Ben-Shahar, 2005; Fitzpatrick and Sokolowski, 2004; Kaun and Sokolowski, 2009; Lucas et al., 2010). The phylogenetic analysis of this gene among metazoan taxa shows a high conservation of its structure and suggests a strong evolutionarily conserved link between PKG and food-related behaviours (Fitzpatrick et al., 2005). In the fruit fly *Drosophila melanogaster* (Sokolowski 2001) and the nematode *Caenorhabditis elegans* (Fujiwara 2002), this gene has two natural allelic variants associated with the expression of two specific behavioural phenotypes. In other species, and more particularly in eusocial hymenoptera such as the honeybees *Apis mellifera* (Ben-Shahar 2005) and the ants *Pheidole pallidula* (Lucas and Sokolowski 2009) or *Pogonomyrmex barbatus* (Ingram 2005), the modulation of food searching behaviours results from a variation of the *for* gene activity along the ontogenesis of behavioural tasks.

In *D. melanogaster* L., the *for* gene has two natural alleles that are associated with two specific foraging strategies (phenotypes) (Sokolowski, 2001): rovers and sitters. Rover flies and larvae move farther than do sitters when they forage, and rovers assimilate nutrients more efficiently to compensate for higher energy use linked to increased locomotion (Kaun et al., 2007). These characteristics confer to rovers an adaptive advantage when food is scarce as the variant is better at finding new food patches. However, the high energetic cost of the rover strategy means that sitters—which use less energy for foraging—have higher fitness when food is abundant, thus maintaining a natural polymorphism (Sokolowski et al., 1997; Kent et al., 2009). This polymorphism illustrates the importance of considering how genetic variation can explain the adaptive potential of a population in the face of environmental changes.

The expansion of global agricultural areas in response to rising food demand expose species to a drastic decrease in the diversity and availability of their native food resources (Foley et al., 2011). Because cultivated plants represent a new and abundant food source, there is increased risk that new pest species will emerge (Zavaleta and Hulvey, 2004). Interestingly, within phytophagous arthropods, several pest species have taxonomically closely-related species or even populations of the same species that have not shifted to cultivated plants

(Kristensen, 1997; Zhang, 1994). This raises the question of what particular evolutionary mechanisms are driving such an adaptation. The evolution of resistance to pesticides used in agriculture is currently the only documented mechanism that could explain such a shift (Andreadis et al., 2007; Farinós et al., 2004; Gassman et al., 2009; González-Núñez et al., 2000), but many physiological or behavioural traits could be involved. Indeed, because of soil irrigation and fertilization practices that are used to improve crop yields, cultivated host plants are richer than wild host plants in the nutrients and water required for the development of Lepidoptera larvae (Shoonhoven et al., 1998). These nutritional quality differences between wild and crop plants involved necessarily different selection pressures on the foraging activity. In this context, we could make the hypothesis that the *foraging* gene would be a factor involved in the expression of specific foraging strategies depending on the consumed host-plant.

The moth *Sesamia nonagrioides* Lefèbvre (Lepidoptera, Noctuidae) is an example of an insect species that has shifted to cultivated plants. The range of the species extends from Africa where it is considered as a secondary pest, to the whole Mediterranean perimeter (Moyal et al., 2011) where it is a major pest with an important economic impact on maize (Anglade, 1972; Cordero et al., 1998). Interestingly, some populations of this stem borer are still found exclusively on wild herbaceous host plants (for instance, Typhaceae) in the eastern part of the Rift Valley in East Africa (Nye, 1960, Ong'Amo et al., 2013), (area thought to be the potential region of origin; Moyal 2011) despite the presence of maize and sorghum fields in the area (Le Ru, pers. Comm.).

Considering these ecological divergences between the “crop” and “wild” populations (so practically named although they are also geographically divergent), both belonging to the *S. nonagrioides* species (Moyal et al. 2011), this species is an original candidate to study the conservation and the polymorphism of the *for* gene in a Lepidoptera, in relationship with behavioural variations and ecological differentiation. We conducted this study with an integrative experimental approach including analyses of sequence conservation and polymorphism, of allelic frequencies, of foraging activity, and pharmacology experiments. By linking phenotype to genotype and population ecology, this study illustrates how a single nucleotide polymorphism (SNP) can modulate a major behavioural function.

b) Results

b.1. The gene is well conserved in the Lepidoptera and wild and crop populations present contrasted frequencies of allelic variants

In several species, such as *D. melanogaster* (Sokolowski, 2001) or the nematod *Caenorhabditis elegans* Maupas (Fujiwara et al., 2002; Hao et al., 2011), an allelic variation in the *foraging* gene underlies the expression of different foraging phenotypes. In the two populations of *S. nonagrioides*, the question was if a similar *Snfor* sequence polymorphism exists.

Primers based on *foraging* sequences of other Lepidoptera allowed sequencing the full-length transcript in *S. nonagrioides*. The gene cDNA was 2235 bp in length, encoding 745 aa, and we did not find evidence of the presence of multiple transcripts. The protein sequence was compared to the homologous *Drosophila* sequence for which the protein domains are mapped (Fig. 1). The gene was thus identified as an orthologue of the *Drosophila dg2* gene (i.e. *foraging*) coding for the PKG-I (Osborne et al., 2011). We labelled the gene *Snfor*. The secondary structure of the protein was similar to that described in other species (for example, see Osborne et al. 2011). The regulatory domain is encoded by the first 185 aa residues, followed by the two cGMP1 (186-302 residues) and cGMP2 (303-418 residues) binding domains. The catalytic domain is located between the 434 and the 693 residues. By comparing the *Snfor* protein sequence with *foraging* sequences from other Lepidoptera species (*Bombyx mori* L, AF465600; *Lobesia botrana* Denis et Schiffermüller, DQ666642; *Sesamia calamistis* Hampson, obtained at our laboratory), we showed a high genetic identity to other orthologous genes in this order (>85%).

We compared whole *Snfor* sequences obtained from cDNA of 15 individuals from each population. There were several synonymous SNPs, but only one was fixed between the two populations. Only one non-synonymous SNP was found in the complete *Snfor* gene sequence at the 1699 base position: an A/G nucleotide change that induces a codon change. All individuals from the wild population had adenine at the first position of the codon, which codes for serine in the protein sequence. Individuals from the crop population had either adenine—like the wild population—or guanosine at this codon position; this substitution changes the code to one that produces glycine instead of serine. From the mapping with *Drosophila* sequence, this non-synonymous mutation was located in the catalytic domain of

the protein (Fig. 1). By the comparison with *for* sequences from other Lepidoptera species, it appeared that these other sequences had a serine at the polymorphic *Snfor* position. The Genbank accession numbers of the two variants are KC310497 (*SnFor*^{Gly}) and KC310498 (*SnFor*^{Ser}).

The next step was to quantify allelic and genotypic frequencies, using DNA. Field-collected insects were genotyped using the ARMS (amplification refractory mutation system) technique (Newton et al., 1989). In the crop population, 10 % were *SnFor*^{Ser/Ser} homozygotes, 39 % were *SnFor*^{Gly/Gly} homozygotes, and the remaining 51 % were *SnFor*^{Gly/Ser} heterozygotes for the 2012 sampling (N = 94). A second collect was made in 2013 with 18 % were *SnFor*^{Ser/Ser} homozygotes, 39 % were *SnFor*^{Gly/Gly} homozygotes, and the remaining 43 % were *SnFor*^{Gly/Ser} heterozygotes (N = 49). There was no significant difference in the genotypic frequencies between 2012 and 2013 (2 df, $P > 0.05$, Chi-square test). All individuals from the wild population were *SnFor*^{Ser/Ser} homozygotes (2012 sampling, N = 32; 2013 sampling, N=16). In conclusion, allele frequencies differed significantly between the two ecological populations (1 df, $P < 0.001$, Chi-square test).

Figure 1. Alignments of amino acid sequence of *Sesamia nonagrioides* and *Drosophila melanogaster* using Bioedit and Blast (Kim et al., 2011; Osborne et al., 2011). While the beginning of the *S. nonagrioides* sequence is to divergent from that of *D. melanogaster*, the alignment shown here starts à the 132th position for *S. nonagrioides* and 449th for *D. melanogaster*. The different domains of the PKG are shown for *D. melanoaster* using UniProtKB database. The amino-acid polymorphism in *S. nonagrioides* is indicated in gray at the 567th position. From this mapping we were able to identified the *Snfor* gene as an orthologue of the *Drosophila dg2* gene (i.e. *foraging*) coding for the PKG-I (Osborne et al 97).

Sn (crop)		132	QRAQG	ISAEPTSSS	LQDLTHQTFP
Sn (wild)		132	QRAQG	ISAEPTSSS	LQDLTHQTFP
Dmel	Q03034,KGP24_DOME	476	QRALG	ISAEPTSESS	LL-LEHVSPF
Sn (crop)	157	TFDKSEVSRE	LIKSAILDND	FMKNLEMTQI	REIVDCMYPV EYAAGSLIIK
Sn (wild)	157	TFDKSEVSRE	LIKSAILDND	FMKNLEMTQI	REIVDCMYPV EYAAGSLIIK
Dmel	500	KYDKDERSRE	LIKAAILDND	FMKNLDTQI	REIVDCMYPV KYPAKNLIK
Sn (crop)	207	EGDVGSIVYV	MEEGRVEVSR	ENKYLSTMAP	GKVFGEAIL YNCKRTATIK
Sn (wild)	207	EGDVGSIVYV	MEEGRVEVSR	ENKYLSTMAP	GKVFGEAIL YNCKRTATIK
Dmel	550	EGDVGSIVYV	MEDGRVEVSR	EGKYLSTLSG	AKVLGEAIL YNCQRTATIT
Sn (crop)	257	AATDCRLWAI	ERQCFQTIMM	RTGLIRQAEY	TDFLKSVPPIF KDLPEDTLIK
Sn (wild)	257	AATDCRLWAI	ERQCFQTIMM	RTGLIRQAEY	TDFLKSVPPIF KDLPEDTLIK
Dmel	600	AITECNLWAI	ERQCFQTIMM	RTGLIRQAEY	SDFLKSVPPIF KDLAEDTLIK
Sn (crop)	307	ISDVLEETHY	QNGDYIIRQG	ARGDTFFIIS	KGQVKVTQKP PNSNDEKFIR
Sn (wild)	307	ISDVLEETHY	QNGDYIIRQG	ARGDTFFIIS	KGQVKVTQKP PNSNDEKFIR
Dmel	650	ISDVLEETHY	QRGDYIVRQG	ARGDTFFIIS	KGKVRVTIKQ QDTQEEKFIR
Sn (crop)	357	TLTKGDDFFGE	KALQGDDLRT	ANIICDSPEG	TTCLVIDRET FNQLISALDE
Sn (wild)	357	TLTKGDDFFGE	KALQGDDLRT	ANIICDSPEG	TTCLVIDRET FNQLISALDE
Dmel	700	MLGKGDDFFGE	KALQGDDLRT	ANIICESADG	VSCLVIDRET FNQLISNLDE
Sn (crop)	407	IRTKYKDEGD	S-RQRLNEEF	ANLRLSDLRI	IATLGIGGFG RVELVQIQSD
Sn (wild)	407	IRTKYKDEGD	S-RQRLNEEF	ANLRLSDLRI	IATLGIGGFG RVELVQIQSD
Dmel	750	IKHRYDDEGA	MERRKINEEF	RDINLTDLRV	IATLGVGFG RVELVQTNGD
Sn (crop)	457	SSRSFALKQM	KKAQIVETRO	QQHIMSEKEI	MSEMNCEFIV KLYKTFKDRK
Sn (wild)	457	SSRSFALKQM	KKAQIVETRO	QQHIMSEKEI	MSEMNCEFIV KLYKTFKDRK
Dmel	800	SSRSFALKQM	KKSQIVETRO	QQHIMSEKEI	MGEANCQFIV KLFKTFKDKK
Sn (crop)	507	YLYMLMETCL	GGELWTILRD	RGQFDDATTR	FYTACVVEAF HYLHSRNIY
Sn (wild)	507	YLYMLMETCL	GGELWTILRD	RGQFDDATTR	FYTACVVEAF HYLHSRNIY
Dmel	850	YLYMLMESCL	GGELWTILRD	KNFDDSTTR	FYTACVVEAF DYLSRNIY
Sn (crop)	557	RDLKPENLLL	DCKGYVKLVD	FGFSKKLQAS	RKTWTFCGTP EYVAPEVIMN
Sn (wild)	557	RDLKPENLLL	DSKGYVKLVD	FGFSKKLQAS	RKTWTFCGTP EYVAPEVIMN
Dmel	900	RDLKPENLLL	NERGYVKLVD	FGFAKKLQTG	RKTWTFCGTP EYVAPEVILN
Sn (crop)	607	RGHDISADYW	SLGVLMFELL	TGSPFFTGTG	PMKTYNKILK GIDAVEFPRC
Sn (wild)	607	RGHDISADYW	SLGVLMFELL	TGSPFFTGTG	PMKTYNKILK GIDAVEFPRC
Dmel	950	RGHDISADYW	SLGVLMFELL	TGTPFFTGS	PMRTYNIILK GIDAIEFPRN
Sn (crop)	657	ITRNAANLIK	KLCRDNPAER	LGYQRRGITE	IQKHKWFDFG NWEGLAQRSL
Sn (wild)	657	ITRNAANLIK	KLCRDNPAER	LGYQRRGITE	IQKHKWFDFG NWEGLAQRSL
Dmel	1000	ITRNASNLIK	KLCRDNPAER	LGYQRRGISE	IQKHKWFDFG YWWGLQNCTL
Sn (crop)	707	EPPITPVVKS	PVDTHNFDQY	PPDGDEPPPD	DLSGWDSNF 745
Sn (wild)	707	EPPITPVVKS	PVDTHNFDQY	PPDGDEPPPD	DLSGWDSNF 745
Dmel	1050	EPPIKPAVKS	VVDTTNFDY	PPDPEGPPPD	DVTGWKDFE 1088

Regulatory region ...-528

cGMP1 529-645

cGMP2 646-761

ATP nucleotide binding 783-791

Protein Kinase 777-1036

AGC Kinase terminal 1037-1088

Proton acceptor, active site 901

ATP binding site 808

Sn polymorphism at the 568 position

b.2. Wild and crop populations present contrasting foraging behavioural phenotypes

Here, the question was whether behavioural phenotypes linked to distinct ecological preferences exist and, if so, whether they are correlated with the *Snfor* sequence polymorphism identified.

We compared a foraging-related locomotor activity between the wild population (wild larvae) and the crop population (crop larvae) in an actimeter device (Fig. 2). Studying food-related behaviour in stem borer caterpillars is challenging because it is difficult to directly observe the feeding behaviour of these endophytic insects. To monitor foraging activity that would correspond to a change of stem, we used an original tubular actimeter where individual larva could move between two distant food patches located to each extremity of a tube (Chardonnet et al., 2012). In this system, we performed the actimeter tests on third-instar larvae, when the insects begin to leave the hatching plant and forage for new stems in their natural environment (Jepson, 1954).

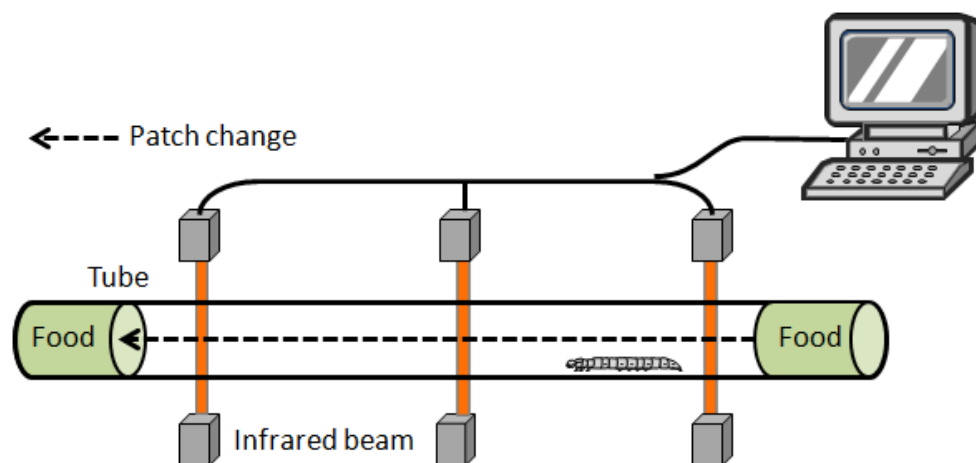


Figure 2. Schematic illustration of one tubular unit of the actimeter, used to automatically record individual larval foraging behaviour. Displacement of each larva between distant identical food patches was recorded by three infrared-beams situated along the tube (200 x 7 mm i.d.)(from Chardonnet et al., 2012). A “leaving the patch” event was counted when at least two successive beams were crossed, at which point most larvae walked to the next patch (82% patch change) while some returned to the initial patch. Both behaviours were pooled for the analysis of foraging activity.

The results showed that wild caterpillars had a greater locomotor activity between opposite identical patches of rearing diet than the crop caterpillars (Fig. 3). Indeed, during each of the three consecutive recording days, the wild larvae changed patches significantly more often than did the crop larvae (1 df, $P < 0.001$). There was also a general increase in the rate of

patch changes recorded over the three days in both populations (in both populations: 2 df, $P < 0.001$, Friedman test, $n = 48$ per population), maybe as a consequence of the decrease of the food quality in the apparatus rather than food quantity, because only one food patch is enough to feed a caterpillar during the whole experiment. Thus, these results allowed us to identify two behavioural phenotypes: more mobile (the wild population) and more sedentary (the crop population).

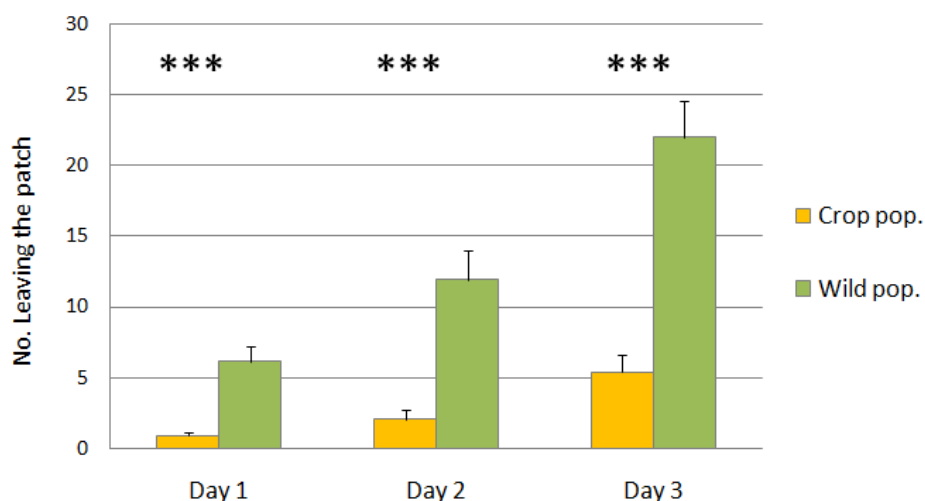


Figure 3. Tendency for wild and crop populations to leave a food patch, recorded in the actimeter. This graphic represents the average number of patch change recording per 24 hours of test (no cumulative data). Wild population larvae changed patches more often than crop population larvae over the three consecutive recording days. $n = 48$ per population; mean $\pm$ SE; ***: $p < 0.001$, Wilcoxon-Mann-Whitney test.

In order to verify whether the phenotypic differences between crop and wild population larvae depended on the presence of food and thus corresponded to foraging activity, we tested the locomotor activity of third-instar larvae in the actimeter without food for 24 hours. There was no significant difference between the two populations, suggesting that both have similar locomotor capacity (no figure, $n = 64$ per population; average number of patch changes: crop insects = 12.53 ± 1.64 (s.e.), wild insects = 13.86 ± 1.56 ; $P > 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney test).

A second control was conducted to test whether the composition of the artificial diet could have an effect on the behaviours. The artificial rearing diet contained maize leaves, which may be more appealing to the crop population that was collected from maize than to the wild population that was collected from a Typhaceae. Thus, the food preference of the wild caterpillar was estimated. The third-instar larvae were tested in the presence of two different

food patches in the actimeter: one containing maize powder and the other containing *Typha* powder. The results showed that larvae spent more than 90% of the experimental period close to the food patch on which they had been placed at the beginning of the test (no figure, $n = 32$, $P < 0.001$, Wilcoxon-Mann-Whitney test), regardless of the food composition of the patch. We observed no effect of diet composition on the number of patch changes over the 72 hours of the test ($n = 32$, $P > 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney test). For more details see the data in the “Supplementary information” section.

b.3. Pharmacological treatment

- **Activation of the cGMP-dependant protein kinase increases the foraging behaviour activity:** To establish a causal link between the behavioural phenotypes and *Snfor* activity, we used a pharmacological approach that allowed us to artificially manipulate the activity level of the encoded cGMP-dependent protein kinase. Using a pharmacological agent to modulate specific characters is commonly employed, especially in non-model species because transgenic studies are not possible (Fitzpatrick 2005). In the literature, the 8-Br-cGMP (an analogue of endogenous cGMP, the second messenger of the protein) has been described as a specific activator of the PKG of the fruit fly *D. melanogaster* (Dawson-Scully et al., 2010), the honeybee *Apis mellifera* L. (Ben-Shahar et al., 2002), and the ant *Pheidole pallidula* Nylander (Lucas and Sokolowski, 2009). Here, a non-invasive oral chronic treatment of the PKG activator was applied to larvae from the *S. nonagrioides* crop population. At the end of the treatment, the larvae were individually tested in the actimeter.

Foraging activity was significantly influenced by the treatment over the first day of recording (Fig. 4A. ANOVA, $F_{3, 124} = 5.138$, $P = 0.002$). Indeed, we observed an increase of the number of patch changes in the group treated at 500 μM (multiple comparison test $P[500 \mu\text{M}, 1000 \mu\text{M}] = 0.018$, $P[500 \mu\text{M}, 0 \mu\text{M}] = 0.012$; other pair-wise comparison $P > 0.05$, Fisher test). A smaller activation was seen in the 250 μM group, and the effect was lost at 1000 μM . On the second day, no effect of the treatment was observed, suggesting a rapid decrease of the efficiency of the drug once it is no longer being administered (ANOVA, $F_{3, 124} = 1.011$, $P > 0.05$). The treatment had no effect on larval growth (each caterpillar was weighed every day during the treatment and at the end of the behavioural test) excluding an indirect size-related effect on behaviour. Together these data show that activation of the PKG increases the foraging activity observed in *S. nonagrioides* larvae in the actimeter.

- **Activation of the cAMP-dependant protein kinase has no significant effect on the foraging behaviour activity:** If PKGs are the principal target of cGMP (Hofmann 2009), the great similarity between PKA (cAMP-dependant protein kinase) and PGK makes possible the parallel activation of PKA by cGMP, particularly when cGMP is present in high concentration (Pilz 2003, Hofmann 2009). It was thus necessary to check if PKA activation influenced the foraging behaviour of *S. nonagrioides*. We treated caterpillars from the crop population with an activator of the PKA, the 8-Br-cAMP (Ben-Shahar et al., 2003). The same protocol of non-invasive oral chronic treatment was applied on crop larvae, using the PKA activator instead of the PKG activator (n = 40 per concentration tested). At the end of the treatment, larvae were individually tested in the actimeter. The foraging activity was not significantly influenced by the treatment over the whole experiment (Fig. 4B, ANOVA, day 1: $F_{3, 158} = 0.348$, $P > 0.05$; day 2: $F_{3, 158} = 0.582$, $P > 0.05$). The treatment had no effect on larval size, excluding an indirect size-related effect on behaviour. These results show that PKA activation does not seem to modulate the foraging activity of *S. nonagrioides* larvae in the actimeter.

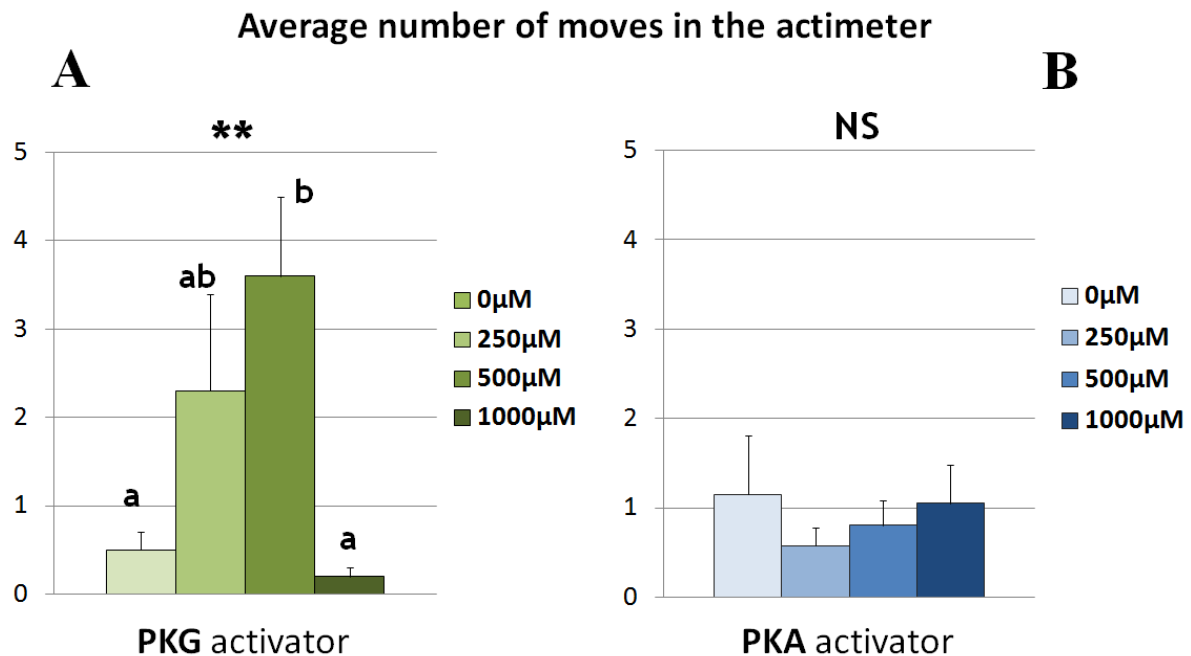


Figure 4. Effect of a pharmacological treatment with: (A) Specific PKG activator on the tendency to leave a food patch in the crop population third-instar larvae. Mean $\pm$ s.e.; ** : ANOVA, $p < 0.01$; followed by a post-hoc Fisher test: letters indicate significant difference at $P < 0.05$. $n_{0\mu M} = 40$, $n_{250\mu M} = 24$, $n_{500\mu M} = 40$, $n_{1000\mu M} = 24$. (B) Specific PKA activator on the tendency to leave a food patch in the crop population third-instar larvae. Mean $\pm$ s.e.; ANOVA, $p > 0.5$. $n = 40$ for each tested concentration.

b.4. Gene-behaviour correlation

The presence of a *Snfor* polymorphism in the crop population allowed testing the correlation between genotypes and foraging phenotypes without interfering with genetic distance that may be an important factor differentiating allopatric populations. We thus tested the foraging activity of larvae from the crop population and genotyped them afterward.

179 third-instar larvae were tested in the actimeter for three days (72 hours). In this lab-reared sample, 59 *SnFor*^{Gly/Gly} homozygotes, 46 *SnFor*^{Ser/Ser} homozygotes, and 74 *SnFor*^{Gly/Ser} heterozygotes were identified. A significant effect of the genotype on foraging activity was observed (Kruskall-Wallis test, $K = 13.387$, 2 df, $P = 0.001$; Fig. 5), revealing that *SnFor*^{Ser/Ser} larvae left a food patch more frequently than *SnFor*^{Gly/Gly} individuals, while *SnFor*^{Gly/Ser} individuals were intermediate between the two homozygotes (post hoc Steel-Dwass-Critchlow-Fligner test: $P[\text{Ser, Gly}] = 0.001$; $P[\text{Ser, Het}]$ and $P[\text{Het, Gly}] > 0.05$).

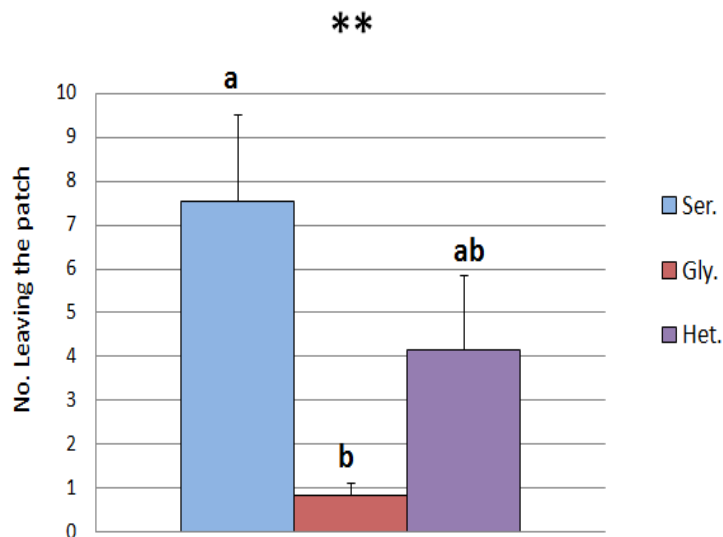


Figure 5. Effect of the *foraging* genotype on foraging activity of third-instar crop population larvae. Three-day recording in the actimeter. **: Kruskal-Wallis, $p < 0.01$, followed by a post hoc Steel-Dwass-Critchlow-Fligner test: letters indicate significant difference at $P < 0.05$. Ser : *SnFor*^{Ser}, Gly : *SnFor*^{Gly} = 0.83 ± 0.28 , Het : *SnFor*^{Ser/Gly}. $n_{\text{Ser.}} = 46$, $n_{\text{Gly.}} = 59$, $n_{\text{Het.}} = 74$.

b.5. *SnFor*^{Ser/Ser} and *SnFor*^{Gly/Gly} homozygotes have different levels of *Snfor* gene expression

Variation in the level of *for* expression is known to have a major effect on the behaviour of several insect species. In social Hymenoptera, changes in the expression rates accompany the shift between nursing and foraging behaviours (Ben-Shahar 2003, Ingram 2005, Heylen 2008, Ingram 2011, Tobback 2011), and constitute one of the explicative elements of the division of labour within the colony.

- **Expression level in the whole body:** We compared the *Snfor* whole body expression between the natural wild and crop populations and the *SnFor*^{Ser/Ser} and *SnFor*^{Gly/Gly} homozygotes strains (founded from the polymorphic crop population) of *S. nonagrioides* from our rearing (fourth-instar larvae). *Snfor* expression was significantly higher in the brain of *SnFor*^{Ser/Ser} larvae than in the *SnFor*^{Gly/Gly} larvae (Figure 6A, n = 30 per strains, $P < 0.001$, REST 2009 software, Pfaffl 2001). There was no significant difference between the two natural crop and wild population when we compared their expression level from a whole body extract. (Figure 6A, n = 29 per population, $P = 0.69$, REST 2009 software). The natural wild population had a lower *Snfor* gene expression lower than the *SnFor*^{Ser/Ser} larvae, in spite of their identical *Snfor* genotype ($P < 0.001$, REST 2009 software).

- **Expression level in the brain:** We compared the *Snfor* brain expression between the natural wild and crop populations and the *SnFor*^{Ser/Ser} and *SnFor*^{Gly/Gly} homozygotes strains of *S. nonagrioides* from our rearing (fourth-instar larvae). The *Snfor* expression tended to be higher in the brain of *SnFor*^{Ser/Ser} larvae than in the *SnFor*^{Gly/Gly} larvae (Figure 6B, n = 32 larvae pooled per 8 per population, i.e. 4 replicates, $P = 0.052$, REST 2009 software). The *Snfor* expression was higher in crop larval brains than in wild larval brains (Figure 6B, $n_{\text{crop pop.}} = 32$ larvae pooled per 8, $n_{\text{wild pop.}} = 24$ larvae pooled per 8, $P < 0.001$, REST 2009 software). As for a whole body extract, the *Snfor* gene expression was lower in the larval brain from the wild population than in the the larval brain from the *SnFor*^{Ser/Ser} strain ($P < 0.05$, REST 2009 software).

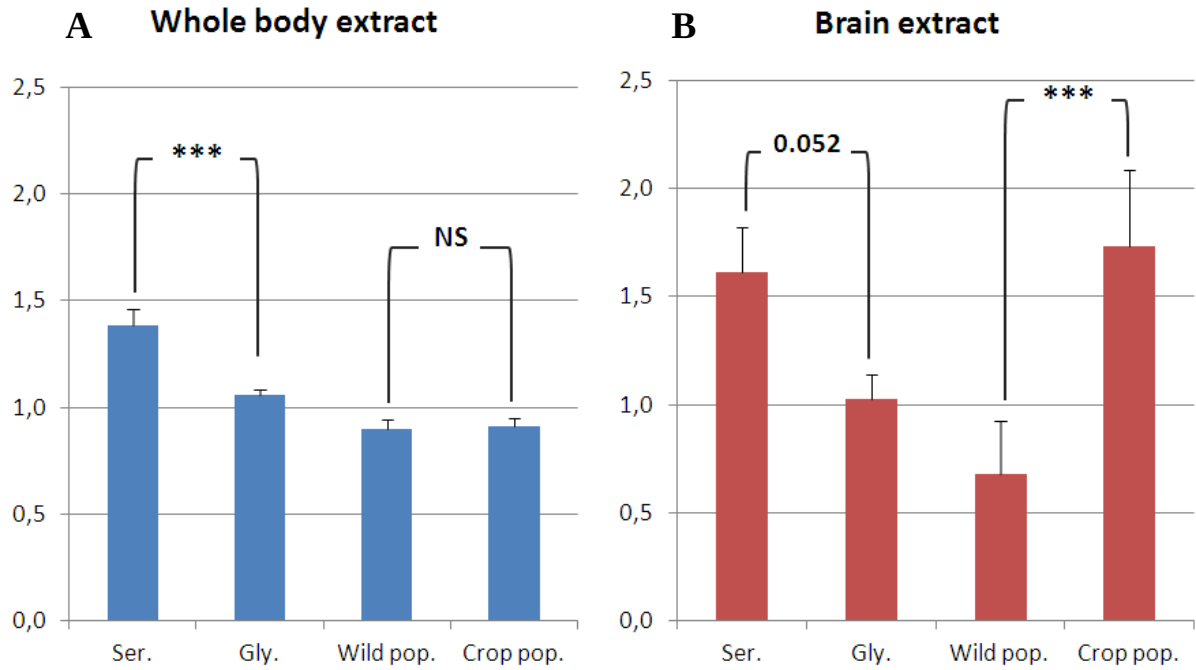


Figure 6. Differential gene expression between the natural wild and crop populations and the *SnFor*^{Ser/Ser} and *SnFor*^{Gly/Gly} homozygotes strains of *Sesamia nonagrioides*. (A) *SnFor*^{Ser/Ser} fourth-instar larvae head extracts show significantly higher gene expression than did extracts from and *SnFor*^{Gly/Gly} larvae. *SnFor*^{Ser/Ser} = 1.38 ± 0.08 and *SnFor*^{Gly/Gly} = 1.06 ± 0.03 ; *** : $P < 0.001$, $n = 30$ per strains, REST 2009 software. There was no significant difference between the two natural populations. Wild pop. = 0.9 ± 0.04 and crop pop. = 0.91 ± 0.04 ; NS : $P > 0.05$, $n = 29$ per population. (B) The *Snfor* expression was marginally higher in the brain of *SnFor*^{Ser/Ser} larvae than in the *SnFor*^{Gly/Gly} larvae. *SnFor*^{Ser/Ser} = 1.6 ± 0.21 and *SnFor*^{Gly/Gly} = 1.02 ± 0.12 ; $P = 0.052$, $n = 32$ larvae pooled per 8 per population. The *Snfor* expression was higher in crop larvae's brains than in wild larvae's brains. Wild pop. = 0.7 ± 0.25 and crop pop. = 1.73 ± 0.35 ; *** : $P < 0.001$, $n_{\text{crop}} = 32$ larvae pooled per 8, $n_{\text{wild}} = 24$ larvae pooled per 8.

c) Discussion

The results gained from molecular, behavioural and pharmacological analyses suggest that the *foraging* gene is directly involved in the modulation of the foraging behaviour of *S. nonagrioides*, and that the observed variation between the studied populations may be correlated with their respective ecological preferences.

First we sequenced the whole coding region of the *foraging* gene in *S. nonagrioides*. This gene was a *foraging* ortholog because it showed a strong conservation of its sequence and domains structure, illustrated by a high genetic identity to other orthologous genes in various Lepidoptera genus, such as *Bombyx*, *Lobesia*, and *Sesamia* (>85%). It was labeled *Snfor*. We then determined if *Snfor* presented a sequence polymorphism, like in *D. melanogaster* (de Belle et al., 1989) and the nematode *C. elegans* (Fujiwara et al., 2002). Two alleles where

identified in *S. nonagrioides*, resulting from one non-synonymous mutation that induces an amino acid change in the protein sequence: *SnFor*^{Gly} and *SnFor*^{Ser}. Because the mutation is putatively located in the active site of the protein, it may affect enzymatic activity. Functional consequences of single nucleotide changes have already been reported (for example, see Lenormand et al., 1999; Rottschaefer et al., 2011). It may be possible to predict the effect of the amino acid change once the 3D structure of this part of the protein has been described (Osborne et al., 2011).

The frequencies of the *Snfor* alleles vary between the studied populations. The wild *S. nonagrioides* population is composed of exclusively *SnFor*^{Ser/Ser} homozygotes, while the crop one includes three genotypes with a higher frequency of the *SnFor*^{Gly} allele (0.63). The non-significant variation of the genotype ratios in the crop population between 2012 and 2013 suggests the existence of a mechanism allowing the maintenance of the polymorphism. Moyal et al. (2011) analysed phylogenetically mitochondrial and nuclear genes and concluded on the African origin of the species and the absence of speciation between the geographically isolated Palearctic population and the African populations. This information can be correlated with the comparison of the *Snfor* protein sequence to other Lepidoptera species (*B. mori*, *L. botrana* and *S. calamistis*), where it appeared that all of these other sequences had a serine at the polymorphic *Snfor* position. This is coherent with the hypothesis that *SnFor*^{Ser} could be the ancestral form of the gene. The different allelic frequencies between the populations can result from differences in selective pressure on the alleles, or from a neutral genetic drift between isolated populations. Further analysis of neutral markers and of *Snfor* polymorphism over the geographic and ecological range of the species, especially from several populations with similar ecology, are currently undertaken to examine this point (Naino-Jika & Le Ru, pers. comm.).

Another step of this study was to identify a behavioural phenotype linked to the insects' habitat of origin. We showed that wild larvae (collected from wild host plants), changed patches more often than crop larvae (collected from maize fields). Wild plants are less nutritive due to lack of fertilisation (Shoonhoven et al., 1998), so higher foraging activity would increase an individual's chance of discovering new food patches and thus optimising larval development (Colasurdo et al., 2007). However, there are important energetic costs linked to locomotion (Casey, 1991), and increased activity also increases exposure to predators and to unfavourable environmental conditions (such as desiccation, as described in

Slansky, 1993). This would disadvantage individuals exploiting the highly nutritive cultivated plants that presumably require less frequent changes of stems. To confirm this link between the locomotor activity and the ecological environment, it would be interesting to analyse these behaviour in natural or semi-natural conditions.

In addition, we showed that differences in activity levels between the two studied populations were only expressed in a food context (Sokolowski, 2001). In the absence of food, there was no difference in the frequency of moves, suggesting that locomotor ability is similar in both crop and wild populations. In the presence of food, higher foraging activity of the wild population was not due to avoidance of the experimental maize diet, because wild larvae did not avoid maize diet when given a choice between maize and *Typha* diet. Finally, we conclude that a genetic basis seems to underlie the expression of the two behavioural types, because the phenotypes were observed when all larvae were reared under similar environmental conditions (same rearing and experimental conditions, and same number of generation in lab rearing for each experiment).

In several species such as *D. melanogaster* (Dawson-Scully et al., 2010), honeybees (Ben-Shahar et al., 2002), ants (Lucas and Sokolowski, 2009), the activity level of the PKG influences the foraging activity of the individuals. To explore that possibility, we used a pharmacological approach. By treating with an analogue of the endogenous cGMP (second messenger of the PKG) administered to the sedentary crop larvae, we were able to increase foraging activity. Only one of the tested concentrations had a significant effect, suggesting that this phenomenon is very sensitive. In contrast, a treatment with an analogue of the endogenous cAMP did not influence the foraging activity of the larvae. This result showed that a potential activation of PKA during a cGMP treatment (possible when cGMP has a high intracellular concentration; Hofmann 2009) would have no significant effect on the increase of the foraging activity observed. Overall, by modulating foraging behaviour induced by artificially manipulating PKG activity, a causal link between the enzyme and the behaviour was identified. This finding showed that the foraging function of the *for* gene is also conserved in a Lepidoptera.

The polymorphism of the French population is a great asset because it allows circumventing the problem of the differential geographic origin of the two studied populations. The relationship between *Snfor* and the level of locomotor activity in a foraging context was

confirmed from the behavioural analysis of the polymorphous crop population. The *SnFor*^{Ser/Ser} homozygote larvae were more likely to change food patches than were *SnFor*^{Gly/Gly} homozygotes; activity of *SnFor*^{Ser/Gly} heterozygote larvae was intermediate between the two heterozygote groups. *SnFor*^{Ser/Ser} crop larvae did not reach the same level of foraging activity as wild larvae. This suggests that *Snfor* gene has a role, but it is not the only factor influencing expression of the foraging phenotype. A number of genes may differ between the crop and the wild population and several could contribute to the behavioural differences. A transcriptome analysis, currently in progress, will give more information about additional genes possibly involved in foraging task, as it was for instance made for the honey bee (Whitfield et al. 2002).

The next step of this study was to quantify the gene expression level between the different genotypes, given that variation in *for* expression in the brain can also be correlated with the expression of specific foraging phenotypes (Ben-Shahar, 2005; Lucas and Sokolowski, 2009; Lucas et al., 2010). We characterised the *Snfor* gene expression pattern for each homozygote genotypes (*SnFor*^{Ser/Ser} and *SnFor*^{Gly/Gly}) isolated from the polymorphic crop population, and for the two natural crop and wild population. The results showed that the lab reared *SnFor*^{Ser/Ser} larvae had a significant higher gene expression in their whole body than the *SnFor*^{Gly/Gly} homozygotes. Although it was marginal ($P = 0.052$), the same gene expression pattern was observed from the brain extracts. This lower statistical power in the brain extracts condition could be due to the higher variability of the results, arising from a reduced number of samples because of the need to pool several brains in one tube. These results suggest the existence of linkage disequilibrium between the coding part of the gene and the regulatory regions. Linked to the behavioural results, these relatively stable observations may indicate a positive correlation between levels of foraging activity and *Snfor* gene expression. This regulation pattern is similar to the “rover” / “sitter” phenotype and genotype system documented in the fruit fly, *D. melanogaster* (Sokolowski 2001). Making a cautious analogy between the species *S. nonagrioides* and *D. melanogaster*, *SnFor*^{Ser/Ser} individuals, which have a greater propensity to leave a food patch and a higher level of gene expression, could be defined as “rover-like” while *SnFor*^{Gly/Gly} insects, which are more sedentary and have a lower level of gene expression, could be defined as “sitter-like”. Nevertheless, this observed correlation between allele, level of gene expression and of foraging activity was not verified with the wild and crop populations.

If no difference was found between these two natural populations from the whole body extract method, the *Snfor* expression in the brain was higher in the crop population than in the wild population. In addition, wild larvae had a lower gene expression level than *SnFor*^{Ser/Ser} larvae for both extract types (whole body, brain). Two main concerns arise from these observations. Firstly, the *Snfor* expression pattern depended on the type of tissue used for the RNA extraction. Although it was shown in several studies that the *for* gene was largely expressed in specific brain structures with behavioural consequences (Belay et al., 2007; Lucas et al., 2009; Lucas et al., 2010), it is known that the PKG has numerous substrates distributed in the whole organism (Hofmann et al. 2009, Pilz & Casteel 2003). This could explain why the results obtained from two types of tissues were variable. Secondly, it is difficult to understand why the *Snfor* brain expression level was higher in the crop population than in the wild population. From the relationship found between genotype, level of expression and behaviour in the homozygotes strains, we expected that *Snfor* expression would be higher in the wild larvae that are all *SnFor*^{Ser/Ser} than in the crop larvae, but we observed the opposite pattern. In addition, the gene expression level was higher in the *SnFor*^{Ser/Ser} larvae from the homozygote line than in the wild larvae in both extract types (whole body, brain). This observation suggests a potential effect of the genetic background that may much differ between populations isolated long ago. Other mechanisms may be involved in the lack of conservation of the relationship between gene expression, genotype and behaviour. Indeed, it has been shown that the *Snfor* gene expression level can be influenced by several internal and external factors, such as the type of activity expressed by the individuals when they were collected (Ingram et al. 2005), the time of the day (Ingram et al. 2011), or the state of satiation (Kent et al. 2009). In any case, it is delicate to correlate a level of transcription with a specific physiological or behavioural effect, as the level of RNA does not correspond to the level of active enzyme. Put together, these results suggest that other mechanisms than the *Snfor* gene expression are involved in the regulation of food searching behaviours.

If the ecological differences between the crop and the wild population involved necessarily different selection pressures, we yet do not know which one are influencing the *Snfor* allelic frequencies observed. Mechanisms of the polymorphism maintenance in natural populations can be multiple. For example, the polymorphism can be understood as a mechanism allowing species to maintain their fitness in a changing environment, as it was described about the *for* gene polymorphism in the *Drosophila* model (Sokolowski et al., 1997). In this species, the *for* gene modulates assimilation and storage of metabolites in *Drosophila* (Kaun et al., 2007;

Kaun et al., 2008; Kent et al., 2009), as well as the response to food deprivation (Donlea et al., 2012). This explains how individuals can have a specific fitness that results from gene-environment interaction (GEI) between food resources and genome, and how the fitness of each genotype can change depending on environment (Burns et al., 2012). PKG has pleiotropic effects and is also known to influence food odour learning (Mery et al., 2007) and olfactory and taste sensitivity, key components in evaluating food quality (Scheiner et al., 2004). These results open up new research avenues, many more traits than foraging may be governed by polymorphism in *Snfor* sequence, and may contribute to the adaptation to plant resources or other environmental components. Thus, in a GEI context, allelic variation of the *Snfor* gene could be an adaptive mechanism in response to rapid environmental fluctuations, facilitating the survival of *S. nonagrioides*.

To conclude, here we have shown conservation of *Snfor* ortholog function in a Lepidoptera and discovered a polymorphism of the *Snfor* orthologue as a genetic mechanism that may play a role in the expression of specific foraging strategies. We illustrated how variation in this single gene could predict phenotype. This study could be the first step to understand if a SNP with behavioural correlate may possibly predispose populations to a shift of habitat toward cultivated plants and toward new status as crop pests.

d) Experimental procedures

d.1. Insect populations and rearing

The crop population was initiated from larvae collected in maize stems in fields located in a 10 km² area in Haute-Garonne, France, GPS coordinates of the central point of the collection area N: 43°22.171', E: 001°11.413'. In this area, successive generations of *S. nonagrioides* can complete their cycle on maize over years because of the permanent cultivation of maize without crop rotation in these fields. Otherwise, *S. nonagrioides* are known to shift opportunistically between wild and cultivated herbaceous plants (ref ?). The wild population was initiated from insects collected in *Typha domingensis* stems at Makindu, Kenya, GPS coordinates S: 02°26.880', E: 37°80.69'. In this unique area encompassing the east part of the rift valley, the species is strictly found on wild herbaceous host-plant although maize field are reachable. In both cases, about 300 caterpillars were collected yearly. For this reason, we chose our experimental populations in distinct geographical places. These

populations are phylogenetically positioned in *S. nonagrioides* species (Moyal et al. 2011). Both strains were reared on an artificial diet for one to four generations before being included in the experiments, at the Laboratory Evolution, Génomes et Spéciation (LEGS, France), in incubators (26 °C, 70% r.h., and a L16:D8 cycle). The diet was composed of dried maize leaf powder (13.2% dry matter), soybean powder (45.9% dry matter), saccharose (18.2% dry matter), dead pulverulent baker's yeast (11.9% dry matter), a mix of vitamins, antibiotics, antifungal and preservative (4.3% dry matter) (adapted from Onyango and Ochieng'-Odero, 1994).

d.2. Sequencing the *Snfor* gene

In order to sequence the orthologue *Snfor*, we extracted total RNA of *S. nonagrioides* from whole larvae with TRI Reagent (Sigma). Reverse Transcription was performed on these RNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad). Primers were designed based on *foraging* sequences of other Lepidoptera (*B. mori*, AF465600; *L. botrana*, DQ666642; *Mythimna separata*, GQ844298; *Spodoptera littoralis*, Jacquin-Joly personal com.). These primers are D14B (ACTCTCAGTGCTCGGTAGCC), D2 (GGCAATCYTGTACAACCTSCAAGCG), R1 (GGCCCAWAGYCKGCAGTCMG), R3 (GCGCTAGRCCTTCCCAGTTTRAARCC) and R13 (AWSACWCCGAWMAMCAMT). D14B was designed in the 5' UTR region and R13 in the 3' UTR region. These primers allowed us to sequence the full-length transcript in *S. nonagrioides* (Fig. 1).

d.3. Comparison the *Snfor* sequence

Once the complete cDNA sequence of the *Snfor* gene had been obtained, new primers were designed in order to sequence the whole gene in 15 individuals from each population, directly from field collections. cDNA from each individual was amplified using three different primer combinations: D14B (see before)/ R11 (GAAGAAATCGCCTTTTGTGAG); D10 (CAAGCCGAATACACCGACT) / R10 (TCCGGTAAGCAACTCAAACA) and D12 (GGGATCTCAAACCTGAGAACTT) / R15 (AATTACAAATGGCGTTAAATCT). Verification by agarose gel electrophoresis showed that only one product was amplified by each primer pair. The sequences were clean and did not show the presence of multiple transcripts.

d.4. Determination of the frequency of the two *Snfor* alleles and their related genotypes in the two populations

To detect heterozygotes and to target the observed SNP, large-scale genotyping of field-collected individuals of both populations was performed on DNA using the ARMS technique (Kim et al., 2011). Genomic DNA was extracted from larvae or from adult thoraxes using a Dneasy Blood and Tissue kit (Qiagen). Two PCRs were performed on each individual. Each PCR contained two primers that bind to either side of the SNP and amplify a fragment that is always present (Arms-GenF: CGACGATGCCACAACACTAGA and R12: AGTCTGCACTAATATCATGACCTC). Each PCR also contained a third allele-specific primer that allowed the amplification of a smaller fragment, provided the individual concerned had a copy of the corresponding allele. These primers are Arms-Gly-RT (TAGTTTCACATAGCCTTTTCC) and Arms-Ser-RC (TAGTTTCACATAGCCTTTCCT). According to the presence or absence of the smaller fragment in the two different PCR, we could deduce whether the individuals were homozygotes for the *SnFor*^{Gly} allele, homozygotes for the *SnFor*^{Ser} allele, or heterozygotes. Thus in 2 years of collect (2012 and 2013), 143 individuals from the crop population were genotyped and only 48 individuals from the wild population because they were all *SnFor*^{Ser} homozygotes.

d.5. The “actimeter”, system for the automated recording of the foraging activity of larvae

This system was designed by Chardonnet et al. (2012) from a device initially developed for the fruit fly, the DAM system (Drosophila Activity Monitoring System, DAM2®; Trikinetics, Waltham, MA, USA). For example, see Freeman et al., 2010; Hirsh et al., 2009; Huang et al., 2009. The actimeter apparatus is made of tubular units (200 x 7 mm i.d.), each provided with three infrared photoelectric detectors that automatically count and record larval movement between two food patches (Fig. 2). The tubular configuration reproduces a stem-like confined structure, and the artificial diet inserted at both tube ends creates two food patches. The food patches were made of rearing diet; one patch is enough to feed a caterpillar during the whole experiment (i.e. the food patch was not entirely consumed when an immobile larva stayed in a unique patch for the 3 days of the experiment). To compare locomotor activity between the crop and wild third-instar larvae, a “leaving the patch” event was recorded each time a larvae crossed at least two of the three consecutive infrared beams. The device allows testing up to 32 larvae simultaneously. The data were collected from the DAMSystem collection® software (TriKinetics).

Foraging behavioural phenotypes: We compare locomotor activity linked to foraging behaviour between the crop and wild larvae by testing 96 individuals (3 replicates), i.e. 48 per population for 72 hours in the DAM system device. The order of the larvae from the different populations in the actimeter was systematically alternated to avoid a position effect. The tests were performed in the same environmental conditions as for rearing (26 °C, 70% r.h., and a L14:D10 cycle). The third-instar larvae used were collected from several egg masses to reduce the probability of siblings, and individuals with homogeneous size were chosen preferentially (caterpillars were individually weighed before and after the experiment).

Food preferences and their potential effect on foraging activity: The wild third-instar larvae were tested in the actimeter, offering a choice between maize-based rearing diet and *Typha*-based diet (same composition as the rearing diet, but the powder of maize leaf was replaced by a powder of *T. domingensis* leaves – the original host plant of the wild population – which represents 13.2 % of the dry weight of the artificial diet). In the actimeter, half of the caterpillars were put on the maize food patch and with a reachable *Typha* food patch at the other side of the actimeter tube. The other half of the caterpillars was placed on the *Typha* food patch with a maize food patch within reachable distance. We recorded the time that each larva spent close to both kind of patch (i.e. the larvae is located to the left or right of the central optic cell), and their locomotor activity between the 2 patches (leaving the patch event). The experiment was repeated in parallel with caterpillars reared on the *Typha*-based diet. Since rearing diet had no effect on food choice behaviour and locomotor activity in the actimeter, data from both rearing groups were pooled for the analyses.

d.6. Pharmacological treatment

- **Activation of the encoded PKG:** Crop larvae, characterized by their low propensity to change food patches, were treated with the PKG activator (8-Bromo-cyclic Guanosine Monophosphate, Fluka Chemie AG, Swiss), by ingestion. This molecule crosses cellular membranes and is relatively resistant to deterioration by the enzymes responsible for the deterioration of the endogenous cGMP (phosphodiesterases; Ben-Shahar et al., 2002). Second instar larvae were chosen for homogeneous size and isolated in 2 ml Eppendorf tubes. Every tube contained rearing diet added with 8-Br-cGMP at a given concentration, and was changed every day. A range of concentrations was chosen from the literature to estimate a possible dose effect: 0 μ M (control), 250 μ M, 500 μ M and 1000 μ M. (Honeybees: Ben-Shahar et al.,

2002; ants: Lucas and Sokolowski, 2009). The treatment was applied for three days, and caterpillars were weighed every $24 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ in order to control for a possible toxic effect. At the end of the treatment, insects (then third-instar) were individually tested in the actimeter for two days (48 hours).

- **Activation of the encoded PKA:** Crop population larvae were treated with the PKA activator (8-Bromo-cyclic Adenosine Monophosphate, Sigma-Aldrich) by ingestion. We applied the same procedure of non-invasive oral chronic treatment as described above in the “ α . Activation of the encoded PKG” section. The following concentrations were tested: $0 \text{ }\mu\text{M}$ (control), $250 \text{ }\mu\text{M}$, $500 \text{ }\mu\text{M}$ and $1000 \text{ }\mu\text{M}$; $n = 40$ per group (Ben-Shahar et al. 2002). At the end of the treatment, the larvae were individually tested in the actimeter according to the protocol described above.

d.7. Gene-behaviour correlation

In order to test for a correlation between *Snfor* genotypes and foraging phenotypes we used the polymorphous crop population of *S. nonagrioides*. The foraging activity of 179 third-instar larvae was tested in the actimeter for three days (72 hours) according to the protocol described above. At the end of the behavioural test, the larvae were frozen in liquid nitrogen then sequenced from the ARMs technique. 59 homozygote *SnFor*^{Gly}, 46 homozygote *SnFor*^{Ser} larvae, and 74 heterozygotes were identified. These allelic frequencies did not correspond to those observed in the analysis of field-collected larvae. This could be due to the higher probability of using siblings in lab-reared insects.

d.8. Comparison of the *Snfor* gene expression

To have a wider view of a potential link between the behavioural phenotypes and the *Snfor* gene, we proceeded to the comparison of the gene expression level in the whole body and in the brain between the *SnFor*^{Ser/Ser} and *SnFor*^{Gly/Gly} larvae from the polymorphic crop population, and between the two natural populations. For the whole body analysis, 30 fourth-instar larvae of each homozygote strains (isolated from the lab-reared polymorphic population) and 29 fourth-instar larvae of each natural population were tested. For the brain analysis, 32 fourth-instar larvae of the crop population and of the two homozygote strains, as well as 24 fourth-instar larvae of the wild populations, were tested. In this condition, the brains were pooled per 8 (i. e. 4 replicates for each population except the wild one, where

only 3 replicates were made). The live larvae were retrieved from the artificial diet and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction.

Total RNA was extracted from whole larvae using TRI Reagent (Sigma). The brains were dissected in the RA1 buffer and total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA XS kit (Macherey Nagel). In both conditions, a DNase treatment (DNase I recombinant, Roche) was also performed. The integrity of each RNA sample was verified with Experion Bio-Analyzer (Biorad). All the samples showed a clear peak, without any sign of RNA degradation. One microgram of RNA extracted from the whole body was used to synthesize 20 µL cDNA for each sample using the iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad). In the brain extracts analysis, 400ng was used to synthesize cDNA. A 203bp fragment of the *Snfor* gene was amplified with the primers QFORF (CATCGACCGGGAGACCTT) and QFORR (TCCTGCTTGAGTCGCTCTG). Three reference genes were used to normalize the samples: *rpL13* (170 bp; QRPL13F3-TACCGCAGAAAACAAAACAGGAT / QRPL13R3-GCGGGGTTAAGACCAGATGC); *rpS3* (121 bp; QRPS3F3-GCTGAATCGCTCAGATACAACT / QRPS3R3-GCTTGCCAGAGACTACCACCT); and *rpL17* (171 bp; QRPL17F3-TTTGGCACCACACAAGGTC / QRPL17R3-GGCACGGTATGTGCGTCTG). The PCR efficiency was calculated for each gene by creating a calibration curve with four dilution points using a pool of cDNA samples. In the whole body extracts analysis, the efficiencies were 92% for *Snfor*, 96% for *rpL13*, 99% for *rpS3*, and 95% for *rpL17*. In the brain extracts analysis, the efficiencies were 107% for *Snfor*, 99% for *rpL13*, 96% for *rpS3* and 91% for *rpL17*.

The PCR was done in 10 µL, with 1X FastStart Universal SYBR Green Master (Roche), 0.3 µM of each primer, and 2 µL of 10-fold diluted cDNA for the whole body extracts. The same mix was used for the PCR on brain extract but using a 5-fold cDNA. All samples were amplified in duplicate, in order to check the consistency; a negative control was also included for each gene. The gene-specific primers were designed to span an intron, in order to avoid genomic DNA contamination in the analysis. For *Snfor* and *rpL17*, genomic DNA could not be amplified with the primers and amplification protocol we used; for *rpS3* and *rpL13*, the fragment amplified with genomic DNA was around 900 bp and so any contamination would be revealed by the melting curve analysis. Therefore non-reverse transcript controls were not included in our experiment.

The PCR were run on a CFX96 (BioRad)—the amplification protocol was 95°C for 10 min then 45 cycles of 95°C for 10 sec and 60°C for 30 sec—followed by a melting curve. All melting curves showed a single peak, suggesting specificity and homogeneity of the amplifications. The C_q values were determined based on the single threshold mode. All negative controls had a C_q of 0. The maximum C_q standard deviation observed between duplicates was 0.452 and the mean across all samples was 0.101.

The stability of the reference genes was checked with Bestkeeper software (Pfaffl et al. 2004). The differences between the *Snfor* transcript concentrations were determined using the $\Delta\Delta C_q$ method. The statistical significance of the difference in *Snfor* expression observed between the two populations was tested using REST 2009 software.

Acknowledgments

We are grateful to Gerphas Ogola (ICIZE, Nairobi, Kenya) for providing the biological material from Makindu and the ICIZE (Material Transfer Agreement IRD/ICIZE Kaiser/Le Ru). We thank Frederic Mery for lending us the actimeters for trials, F  rial Kaoula, Magalie Bonneau, and Sylvie Nortier for rearing the insects. We thank Isabelle Clavereau and David Ogereau for their advice in qPCR. We thank Jean-Christophe Sandoz and Antoine Couto for their help in the dissection method of the *S. nonagrioides* larval brain. English language editing was done by Sharilynn Wardrop. This work was funded by the ANR (6th Extinction call, Adaptanthrop project) and by INRA, IRD, and CNRS. F. Chardonnet was funded by a grant from the Ecole Doctorale Diversité du Vivant, University of Paris 6 (UPMC).

e) References

- Andreadis, S. S., Alvarez-Alfageme, F., Sánchez-Ramos, I., Stodola, T. J., Andow, D. A., Milonas, P. G., M. Savopoulou-Soultani, M. and Castañera, P. (2007). Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 100(1), 195-201.
- Anglade, P. (1972). Les Sesamia. Entomologie Appliquée à l'Agriculture. II, Lépidoptères (Masson et Cie, Paris, France, ed. by A S Balachowsky), pp. 1389-1400.
- Belay, A. T., Scheiner, R., So, A. K.-C., Douglas, S. J., Chakaborty-Chatterjee, M., Levine, J. D. & Sokolowski M. B. (2007). The *foraging* gene of *Drosophila melanogaster*: spatial-expression analysis and sucrose responsiveness. *J. Comp. Neuro.* 504, 570-582.

- Ben-Shahar, Y., Robichon, A., Sokolowski, M. B. and Robison G. E. (2002). Influence of gene action across different times scales on behavior. *Science*. 296, 741-744.
- Ben-Shahar, Y., Leung, H.-T., Pak, W. L., Sokolowski, M. B. and Robinson G. E. (2003). cGMP-dependent changes in phototaxis: a possible role for the *foraging* gene in honey bee division of labor. *J. Exp. Biol.* 206, 2507-2515.
- Ben-Shahar, Y. (2005). The *foraging* gene, behavioral plasticity, and honeybee division of labor. *J. Comp. Physiol.* 1991, 987-994.
- Burns, J. G., Svetec, N., Rowe, L., Mery, F., Dolan, M. J., W. Boyce, T. and Sokolowski, M. B. (2012). Gene–environment interplay in *Drosophila melanogaster*: Chronic food deprivation in early life affects adult exploratory and fitness traits. *PNAS Early Edition*, 1-6.
- Casey, T. (1991). Energetics of caterpillar locomotion: biomechanical constraints of a hydraulic skeleton. *Science*. 252, 112-114.
- Chardonnet, F., Martínez Takegami, P., Chouquet, B., Silvain, J.-F. and Kaiser, L. (2012). An actimeter system for automated recording of foraging activity in stem borer caterpillars. *Entomol. Exp. Appl.* 142, 175-180.
- Colasurdo, N., Dussutour, A. and Despland, E. (2007). Do food protein and carbohydrate content influence the pattern of feeding and the tendency to explore of forest tent caterpillars? *J. Insect. Physiol.* 53, 1160-1168.
- Cordero, A., Malvar, M. A., Butrón, A., Revilla, P., Velasco, P. and Ordás, A. (1998). Population dynamics and life-cycle of corn borers in south Atlantic European coast. *Maydica*. 43, 5-12.
- Dawson-Scully, K., Bukvic, D., Chakabarty-Chatterjee, M., Ferreira, R., Milton, S. L. and Sokolowski M. B. (2010). Controlling anoxic tolerance in adult *Drosophila* via the cGMP–PKG pathway. *J. Exp. Biol.* 213, 2410-2416.
- de Belle, J. S., Hilliker, A. J. and Sokolowski, M. B. (1989). Genetic localization of *foraging(for)*: a major gene for larval behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 123, 157-164.
- Donlea, J., Leahy, A., Thimman, M. S., Suzuki, Y., Hughson, B. N., Sokolowski, M. B. and Shaw, P. J. (2012). *Foraging* alters resilience/vulnerability to sleep disruption and starvation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(7), 2613-2618.
- Farinós, G. P., De la Poza, M., Hernández-Crespo, P., Ortego, F. and Castañera, P. (2004). Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomol. Exp. Appl.* 110, 23–30.
- Fitzpatrick, M. J. and Sokolowski, M. B. (2004). In search of food: exploring the evolutionary link between cGMP-dependent protein kinase (PKG) and behavior. *Integr. Comp. Biol.* 44, 28–36.
- Fitzpatrick, M. J., Ben-Shahar, Y., Smid, H. M., Vet, L. E. M., Robinson, G. E. and Sokolowski, M. B. (2005). Candidate genes for behavioural ecology. *Trends Ecol. Evol.* 20(2), 96-104.
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., Mueller, N. D., O’Connell, C., Ray, D. K., West, P. C., *et al.* (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*. 337(478), 337-342.
- Freeman, A., Bowers, M., Vrailas Mortimer, A., Timmerman, C., Roux, S. Ramaswami, M. and Sanyal, S. (2010). A new genetic model of activity-induced Ras signaling dependent pre-synaptic plasticity in *Drosophila*. *Brain. Res.* 1326, 15–29.
- Fujiwara, M., Sengupta, P. and McIntire, S. L. (2002). Regulation of body size and behavioural state of *C. elegans* by sensory perception and the EGL-4 cGMPdependent protein kinase. *Neuron*. 36, 1091–1102.
- Gassmann, A. J., Onstad, D. W. and Pittendrigh, B. R. (2009). Evolutionary analysis of herbivorous insects in natural and agricultural environments. *Pest Manag. Sci.* 65, 1174-1181.
- González-Núñez, M., Ortego, F. and Castañera, P. (2000). Susceptibility of Spanish populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to a *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *J. Econ. Entomol.* 93(2), 459-463.
- Hao, Y., Xu, N., Box, A. C., Schaefer, L., Kannan, K., Zhang, Y., Florens, L., Seidel, C., Washburn, M. P., Wiegand, W., *et al* (2011). Nuclear cGMP-dependent kinase regulates gene expression via activity-dependent recruitment of a conserved histone deacetylase complex. *PLoS Genetics*. 5(7), 1-15.

- Hirsch, H. B. V., Possidente, D., Averill, S., Palmetto Despain, T., Buytkins, J. Thomas, V., Goebel, W. P., Shipp-Hilts, A., Wilson, D., Hollocher, K., *et al.* (2009). Variations at a quantitative trait locus (QTL) affect development of behavior in lead-exposed *Drosophila melanogaster*. *NeuroToxicology*. 30, 305–311.
- Huang, Y., Howlett, E., Stern, C. and Jackson, F. R. (2009). Altered LARK expression perturbs development and physiology of the *Drosophila* PDF clock neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 41, 196–205.
- Ingram, K. K., Oefner, P. & Gordon, D. M. (2005). Task-specific expression of the *foraging* gene in harvester ants. *Mol. Ecol.* 14: 813-818.
- Ingram, K. K., Kleeman, L. & Peteru, S. (2011). Differential regulation of the *foraging* gene associated with task behaviors in harvester ants. *BMC Ecology*. 11(19).
- Jepson, W. F. (1954). A critical review of the world literature on the lepidopterous stalk borers of tropical graminaceous crops. vi + 127pp. London. Commonw. Inst. Ent.
- Kaun, K. R., Riedl, C. A. L., Chakaborty-Chatterjee, M., Belay, A. T., Douglas, S. J., Gibbs, A. G. and Sokolowski, M. B. (2007). Natural variation in food acquisition mediated via a *Drosophila* cGMP-dependent protein kinase. *J. Exp. Biol.* 210, 3547-3558.
- Kaun, K. R. and Sokolowski, M. B. (2009). CGMP-dependent protein kinase: linking foraging to energy homeostasis. *Genome*. 52, 1-7.
- Kaun, K. R., Chakaborty-Chatterjee, M. and Sokolowski, M. B. (2008). Natural variation in plasticity of glucose homeostasis and food intake. *J. Exp. Biol.* 211, 3160-3166.
- Kent, C. F., Daskalchuk, T., Cook, L., Sokolowski, M. B. and Greenspan R. J. (2009). The *Drosophila foraging* gene mediates adult plasticity and gene–environment Interactions in behaviour, Metabolites, and gene expression in response to food deprivation. *PloS Genetics*. 5(8).
- Kim, J. J., Casteel, D. E., Huang, G., Kwon, T. H., Ren, R. H., Zwart, P., Headd, J. J., Brown, N. G., Chow, D.-C.; Palzkill, T., *et al.* (2011). Co-Crystal Structures of PKG Ib (92–227) with cGMP and cAMP Reveal the Molecular Details of Cyclic-Nucleotide Binding. *PLoS One*. 6(4), e18413.
- Kristensen, N. P. (1999). Lepidoptera, moth and butterflies, Volume 1: Evolution, systematic, and biogeography (Berlin, New York: Walter de Gruyter).
- Lenormand, T., Bourguet, D., Guillemaud, T. and Raymond, M. (1999). Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Nature*. 400, 861-864.
- Lucas, C. and Sokolowski, M. B. (2009). Molecular basis for changes in behavioral state in ant social behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106(15), 6351–6356.
- Lucas, C., Kornfein, R., Chakaborty-Chatterjee, M., Schonfeld, J., Geva, N., Sokolowski, M. B. and Ayali, A. (2010). The locust *foraging* gene. *Arch. Insect. Bioch.* 74(1), 52–66.
- Mery, F., Belay, A. T., So, A. K.-C., Sokolowski, M. B. and Kawecki, T. J. (2007). Natural polymorphism affecting learning and memory in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(32), 13051-13055.
- Moyal, P., Tokro, P., Bayram, A., Savopoulou-Soultani, M., Conti, E., Eizaguirre, M., Le Ru, B., Avand-Faghih, A., Frérot, B. and Andreadis, S. (2011) Origin and taxonomic status of the Palearctic population of the stem borer *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 103, 904–922.
- Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalshekerl, N., Smith, J. C. and Markham, A. F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic. Acids. Res.* 17(7), 2503-2516.
- Nye I. W. R. (1960). The insect pests of graminaceous crops in East Africa. *Colonial Research Studies*. 31, 1-48.
- Ong’amo G. O., Le Ru B., Calatayud P.-A., Ogol C. K. P. O. and Silvain J. F. (2013) Composition of stem borer communities in selected vegetation mosaics in Kenya, Arthropod-Plant Interactions. In press.
- Onyango, F. O. and Ochieng’-Odero, J. P. R. (1994) Continuous rearing of the maize stem borer *Busseola fusca* on an artificial diet. *Entomol. Exp. Appl.* 73, 139-144.
- Osborne, B. W., Wu, J., McFarland, C. J., Nickl, C. K., Sankaran, B., Casteel, D. E., Woods, V. L. Jr., Kornev, A. P., Taylor, S. S. and Dostmann, W. R. (2011). Crystal structure of cGMP-dependent protein kinase reveals novel site of interchain communication. *Structure*. 19(9), 1317-1327.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *NAR*. 29, e45

- Pfaffl, M.W., Tichopád, A., Prgomet, C. and Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509-515.
- Rottschaefer, S. M., Riehle, M. M., Coulibaly, B., Sacko, M., Niaré, O., Morlais, I., Traoré, S. F., Vernick, K. D., Lazzaro, B. P. (2011). Exceptional diversity, maintenance of polymorphism, and recent directional selection on the APL1 malaria resistance genes of *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol.* 9(3), e1000600.
- Scheiner, R., Sokolowski, M. B. and Erber, J. (2004). Activity of cGMP-dependent protein kinase (PKG) affects sucrose responsiveness and habituation in *Drosophila melanogaster*. *Learning Memory.* 11, 303-311.
- Schoonhoven, L. M., Jermy, T. and Van Loon, J. J. A. (1998). *Insect-Plant Biology* (London: Chapman and Hall), pp.121-154.
- Slansky, F. (1993). Nutritional Ecology: The fundamental quest of nutrients. In: *Caterpillars: Ecological and evolutionary constraints on foraging* (Ed. Stamp, N. E. & Casey, T. M.), pp.29-91. London: Chapman & Hall.
- Sokolowski, M. B., Pereira, H. S. and Hughes, K. (1997). Evolution of foraging behavior in *Drosophila* by density-dependent selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 7373-7377.
- Sokolowski, M. B. (2001). *Drosophila*: genetics meets behavior. *Nat. Rev. Genet.* 2, 879-890.
- Zavaleta, E. S. and Hulvey, K. B. (2004). Realistic species losses disproportionately reduce grassland resistance to biological invaders. *Science.* 306, 1175-1177.
- Zhang, B.-C. (1994). *Index of economically important Lepidoptera* (Wallingford: CAB International)

3/ Explorations complémentaires et discussion des résultats

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude indiquent que le gène *for* serait directement impliqué dans la régulation des stratégies alimentaires de *S. nonagrioides*. Les variations génétiques et comportementales, corrélées aux préférences écologiques des deux populations étudiées, suggèrent que ce gène pourrait constituer un facteur adaptatif aux ressources cultivées. Dans cette partie, nous discuterons des résultats comportementaux complémentaires renforçant les hypothèses développées dans cet article. Nous aborderons ensuite les différents facteurs potentiellement impliqués dans les difficultés d'interprétation des données d'expression du gène *Snfor* rencontrées. Pour finir, la perspective d'une quantification de l'activité enzymatique sera étudiée.

a) Etablissement du lien causal entre le gène Snfor et les comportements locomoteurs

Chez *S. nonagrioides*, deux phénotypes comportementaux distincts ont été identifiés et corrélés avec l'origine écologique des insectes. Les larves issues d'une population collectée sur *Typha* à l'Est du Kenya changent plus souvent de site alimentaire que les chenilles provenant des champs de maïs français. Ces variations dans le niveau d'activité locomotrice ne s'observent pas en absence de nourriture, indiquant des capacités motrices identiques entre les individus des deux populations et la nécessité d'un contexte alimentaire pour permettre l'expression de ces différences comportementales.

Il était également important de vérifier que la plus forte activité des individus de la population sauvage échantillonnée sur *Typha* n'était pas la conséquence d'un évitement du milieu alimentaire artificiel fait à base de feuille de maïs. Pour tester cette hypothèse, nous avons élevé des larves de la population sauvage sur deux milieux artificiels différents : l'un fait à base de feuilles de maïs (identique au milieu d'élevage standard), l'autre à base de feuilles de *Typha* (n = 32 chenilles par groupe). Lorsque les chenilles ont atteint le 3^{ème} stade larvaire, elles ont été testées 72 heures dans l'actimètre. Chaque tube du dispositif contenait du milieu *Typha* à une extrémité et du milieu maïs à l'autre. La structure du dispositif contraignant le dépôt des larves sur l'un des sites de nourriture au lancement de l'expérience, la moitié des

larves de chaque groupe a été déposée sur milieu maïs et l'autre moitié sur milieu typha (figure 34). Quatre groupes expérimentaux ont ainsi été testés (n = 16).

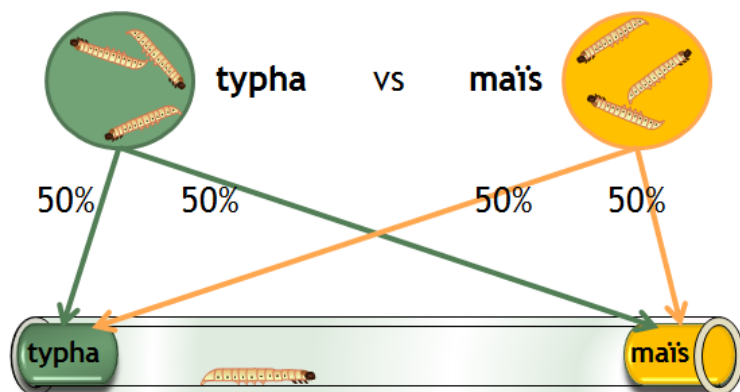
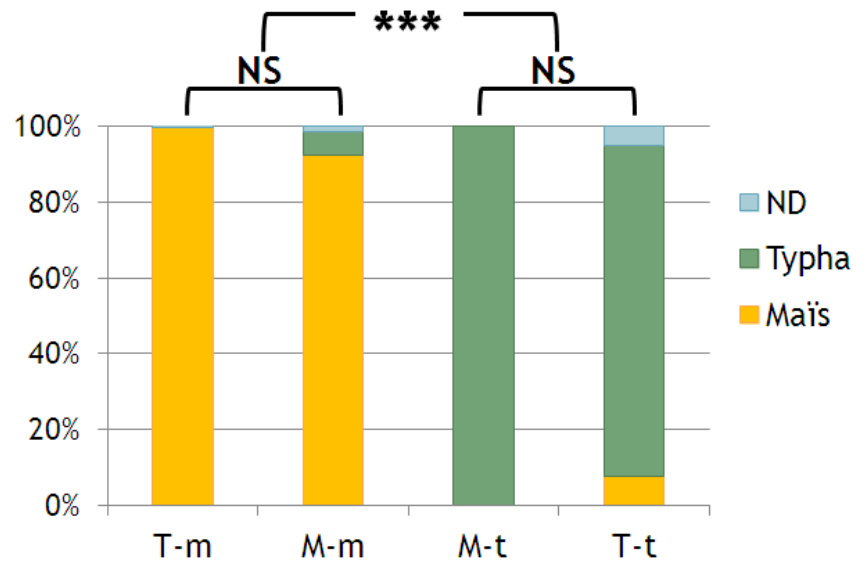


Figure 34. Protocole d'évaluation des préférences alimentaires de la population sauvage de *S. nonagrioides*. Les larves sont élevées sur milieu artificiel maïs ou typha jusqu'à leur 3^{ème} stade larvaire. A cet âge, les individus sont testés 72 heures en actimètre contenant les deux types de milieux artificiels. 4 groupes sont testés (n=16) : élevé sur typha et déposé sur site typha, élevé sur typha et déposé sur maïs, élevé sur maïs et déposé sur typha, élevé sur maïs et déposé sur maïs.

Les résultats obtenus ne révélèrent aucun signe d'une préférence alimentaire chez les chenilles de la population sauvage dans ces conditions expérimentales, quelque soit le milieu de développement initial. Pour les 4 groupes testés, les individus sont essentiellement restés à proximité, ou à l'intérieur du site alimentaire sur lequel ils ont été déposés au lancement de l'actimètre (plus de 90 % du temps, figure 35). La plante hôte d'origine de la population ainsi que l'expérience précoce des individus durant le développement larvaire (effet potentiel de l'apprentissage) n'aurait pas d'effet sur la préférence pour un milieu artificiel à base de feuille de maïs ou de feuille de Typha. Ainsi, la plus grande activité locomotrice des individus sauvages en actimètre ne peut être attribuée à un comportement d'évitement de la ressource alimentaire proposée, le milieu maïs. Cependant, cette expérience ne permet pas d'affirmer que les larves de cette population ne présente pas de préférence alimentaire particulière pour une plante hôte spécifique. En effet, les milieux artificiels d'élevage sont bien distincts des plantes-hôtes naturelles, bien qu'ils aient été développés pour répondre aux besoins nutritionnels des individus. De plus, la quantité de poudre de feuille de maïs ou de Typha ne représente qu'un petit pourcentage des ingrédients utilisés dans leurs fabrications (13,2% de la masse sèche du produit).

Figure 35. Proportion du temps passé par les chenilles de *S. nonagrioides* (population sauvage) de 3^{ème} stade larvaire à l'intérieur ou à proximité de chacun des sites alimentaires disponibles dans l'actimètre. La lettre majuscule représente le milieu de développement (T = *Typha*, M = maïs), et la lettre minuscule le milieu de dépôt. Par exemple, le groupe « T-m » correspond aux individus élevés sur milieu artificiel *Typha* jusqu'au 3^{ème} stade larvaire, puis déposés sur le site alimentaire maïs dans l'actimètre. ND (« Non Déterminée ») réfèrent aux périodes pour lesquelles il était impossible de déterminer de quel site alimentaire la chenille était le plus proche.



L'étape suivante de cette étude consistait à identifier un lien causal entre la variabilité génétique du gène *Snfor* et les phénotypes comportementaux exprimés par les chenilles de *S. nonagrioides*. Dans un premier temps, nous avons démontré à partir d'une approche pharmacologique qu'une augmentation artificielle de l'activité PKG par un traitement à la GMPc, permettait d'augmenter l'activité locomotrice des larves. Les sites de liaison à l'AMPc de l'enzyme PKA ont une affinité 50 fois plus grande pour l'AMPc que pour la GMPc (Alverdi et al. 2008). Lorsque la GMPc est présente en grande concentration dans les cellules de l'individu, il est donc possible que ce second messenger entraîne une activation parallèle de la PKA. Bien que la PKG et la PKA partagent des sites de phosphorylation de séquence similaire, ces deux enzymes sont impliquées dans la phosphorylation de substrats bien différents, probablement en raison de différences notables au niveau du domaine de liaison au substrat C-terminal (Alverdi et al. 2008). L'ensemble de ces observations indique qu'un traitement à la cGMP pourrait avoir des conséquences plus étendues qu'une simple activation de la PKG. Afin de vérifier cette éventualité, nous avons traité des larves de *S. nonagrioides* avec un analogue de l'AMPc pour estimer l'effet de la PKA sur les comportements locomoteurs des individus. Les résultats ne montrèrent aucun effet significatif de ce traitement sur les niveaux d'activité locomotrice, indiquant qu'une activation potentielle de la PKA par le traitement à la GMPc n'est pas responsable des variations comportementales observées. Ainsi, cette expérience permet de démontrer l'existence d'un lien causal entre les phénotypes comportementaux et l'enzyme codée par le gène *for*.

Cette conservation de la fonction du gène *for* chez un lépidoptère fut confirmée par l'étude des caractéristiques comportementales des différents génotypes de la population française. Les larves homozygotes *SnFor*^{Ser/Ser} avaient davantage tendance à quitter un site alimentaire que les chenilles homozygotes *SnFor*^{Gly/Gly}. Les individus hétérozygotes *SnFor*^{Ser/Gly} exprimaient un niveau d'activité locomotrice intermédiaire à celui des deux morphes homozygotes. Ces résultats pourraient être la conséquence d'une codominance des allèles de *Snfor*. Pour étudier cette question, il serait intéressant d'utiliser une approche plus classique en génétique mendélienne. Des croisements sur deux générations entre les lignées homozygotes pour le gène *for* permettraient de tester s'il y a dominance d'un allèle, et s'il y a un effet maternel dans la transmission du phénotype comportemental (estimation de la contribution génétique nucléaire et cytoplasmique des parents pour chacun des individus). L'utilisation de lignées homozygotes fondées à partir d'une population polymorphe nécessite toutefois d'être prudent lors de l'interprétation des résultats. En effet, un déséquilibre de liaison peut advenir (groupes de gènes préférentiellement transmis de façon conjointe) produisant des souches dont le background génétique varie.

Afin d'établir un lien causal entre un gène et un phénotype, les méthodes de mutagenèse sont particulièrement efficaces bien que leur utilisation soient souvent limitées aux espèces modèles. La méthode des RNAi (RNA-mediated interference, inhibant l'expression d'un gène par destruction de molécules d'ARNm spécifiques) est un autre moyen de déterminer l'influence d'un gène dans l'expression de traits spécifiques. Toutefois, les manipulations génétiques réalisées par de Belle et al. (1989) sur l'espèce *D. melanogaster* ont mis en évidence l'importance vitale de ce gène dans le développement des individus. La suppression de la production de PKG étant létale pour les individus, la méthode des RNAi ne semble pas être appropriée pour l'étude des différentes fonctions du gène *for*, à moins de limiter l'interférence au stade adulte, comme cela peut se faire chez la drosophile par induction de l'interférence par consommation de RU486 (e.g. Colomb et al. 2009).

b) Quantification du niveau d'expression du gène for

Afin de tester les niveaux d'expression du gène *Snfor* chez *S. nonagrioides*, nous avons réalisé une expérience de qPCR en temps réel sur des individus d'élevage issus des deux populations écologiques ainsi que des lignées homozygotes *SnFor*^{Ser/Ser} et *SnFor*^{Gly/Gly}, fondées à partir de la population polymorphe française (champs de maïs). Ces mesures ont été

effectuées à partir d'animaux entiers testés individuellement, ou à partir de cerveaux disséqués et poolés par groupe de 8. Nous avons mis en évidence un niveau d'expression du gène *Snfor* significativement supérieur chez les individus de la souche homozygote *SnFor*^{Ser/Ser} comparés aux individus *SnFor*^{Gly/Gly}, quelque soit la méthode d'extraction employée (larves entières ou cerveaux). La stabilité de ces résultats associée aux données comportementales obtenues en actimètre sur ces lignées, suggèrent l'existence d'une corrélation positive entre les niveaux d'activité locomotrice et les niveaux d'expression du gène. Cependant, les résultats obtenus à partir des populations naturelles de *S. nonagrioides* portent à controverse. Plusieurs facteurs peuvent être responsables du manque de cohérence apparent des résultats obtenus.

α. Facteurs potentiels de modulation des résultats obtenus en qPCR

- **Contraintes méthodologiques.** En premier lieu, il est important de considérer que les résultats obtenus par la méthode de qPCR en temps réel peuvent être difficilement exploitables en raison des contraintes méthodologiques inhérentes aux protocoles d'expérimentation. En effet, la nécessité d'employer systématiquement un calibrateur identique (i.e. cDNA issu d'un même échantillon, donc disponible en quantité limitée) dans toutes les expérimentations que l'on souhaite comparer (i.e. regroupement des données), réduit grandement la possibilité d'obtenir un nombre de répétitions suffisantes pour étudier la variabilité et la répétabilité des résultats.

- **Le type de tissus étudiés.** Dans notre expérience réalisée sur les populations naturelles de *S. nonagrioides*, aucune différence significative n'a été identifiée à partir des extractions réalisées sur les larves entières. En revanche, une plus forte expression du gène a été enregistrée dans les cerveaux des individus de la population ravageuse, comparé à ceux de la population sauvage. Il semble donc important d'effectuer une sélection des tissus à analyser en fonction de l'hypothèse posée. En génétique du comportement, la plupart des analyses se concentrent ainsi au niveau des structures cérébrales (Belay et al. 2007, Lucas et al. 2009, Lucas et al. 2010). Cette précaution méthodologique a notamment été démontrée par Belay et al. (2007), qui montra que les différences d'activité intracérébrale de la PKG existantes entre les génotypes *for* de la drosophile *D. melanogaster* ne sont plus perceptibles lorsque les analyses sont effectuées sur les animaux entiers (figure 36).

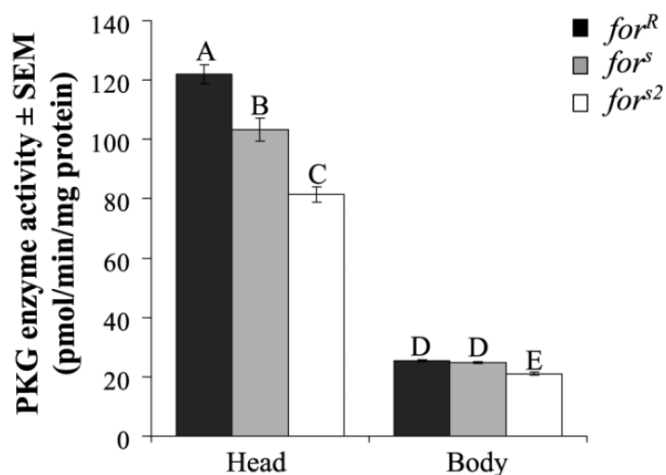


Figure 36. Niveaux de l'activité PKG chez les mouches *rovers* et *sitters* de la drosophile *D. melanogaster* (Belay et al. 2007). Les variations intergroupes mesurées à partir des têtes ne sont plus observables lorsque les analyses sont réalisées sur les corps entiers.

- **Le type d'activité effectuée.** Chez la fourmi *Pogonomyrmex barbatus*, toutes les ouvrières ont une morphologie similaire (absence de caste morphologique) et la maturation des comportements s'effectue au cours de l'ontogénèse (polyéthisme d'âge). Selon le type de d'activité effectuée, l'expression intracérébrale de l'orthologue du gène *foraging* (*Pbfor*) varie : les niveaux d'ARNm sont significativement supérieurs dans le cerveau des jeunes ouvrières restreignant leur activité à l'intérieur du nid (i. e. soins aux couvains) que dans celui des fourrageuses expérimentées. De façon intéressante, les ouvrières plus âgées effectuant des activités à l'extérieur du nid peuvent exprimer un comportement de défense du nid (patrouille) ou un comportement de recherche alimentaire. Bien qu'elles effectuent toutes deux des tâches à l'extérieur du nid et qu'elles aient un âge relativement similaire, leur niveau d'expression du gène varie en fonction de l'activité effectuée. Un comportement de défense du nid est associé à un haut niveau d'expression du gène tandis qu'un comportement de fourragement entraîne une diminution de cette expression (Ingram et al. 2005). De façon similaire, les niveaux d'expression du gène *for* varient en fonction du type d'activité effectué par les abeilles (Ben-Shahar et al. 2002). Quel que soit l'âge des ouvrières (âgées, pour les individus dont les changements comportementaux s'effectuent en fonction de l'âge ; ou jeunes, lorsqu'une adaptation comportementale est nécessaire à la survie de la colonie), les ouvrières exprimant un comportement de fourragement ont des niveaux d'expression du gène *for* plus élevée que celui des ouvrière effectuant des tâches à l'intérieur du nid. Ainsi, le niveau d'expression du gène *for* mesuré sera directement dépendant du type de tâche effectué par l'individu au moment précis de l'échantillonnage.

- **L'heure de la journée.** Chez la fourmi *Pogonomyrmex occidentalis*, le niveau d'expression intracérébrale du gène *for* varie en fonction de l'heure de la journée et du type d'activité effectué (Ingram et al. 2011). Les ouvrières fourrageuses présentent en effet une fluctuation circadienne de leur niveau d'expression, avec un pic maximal aux alentours de midi (Figure 37). En revanche les ouvrières effectuant des tâches à l'intérieur du nid, qui ont un niveau d'expression inférieur aux fourrageuses, ne présentent pas de variation significative de leur niveau d'expression au cours de la journée. L'heure de la journée à laquelle sont récupérés les échantillons utilisés en qPCR pourrait ainsi grandement influencer les niveaux d'expression du gène *for* de ces individus. Dans notre expérience, les individus ont été systématiquement récupérés entre 14 et 18 heures. Bien que relativement restreinte, cette période de 4 heures pourrait avoir eu des conséquences sur les niveaux d'expression du gène *Snfor*. De plus, chez la fourmi *P. occidentalis* le pic d'expression se situe approximativement à la moitié de sa période d'activité diurne (en milieu naturel, l'activité de fourrage débute tôt le matin et s'interrompt en milieu d'après-midi). *S. nonagrioides* étant un lépidoptère nocturne, ses larves sont davantage actives la nuit que le jour. Une récupération des échantillons durant la journée lorsque les animaux sont moins actifs pourrait ainsi influencer les résultats obtenus.

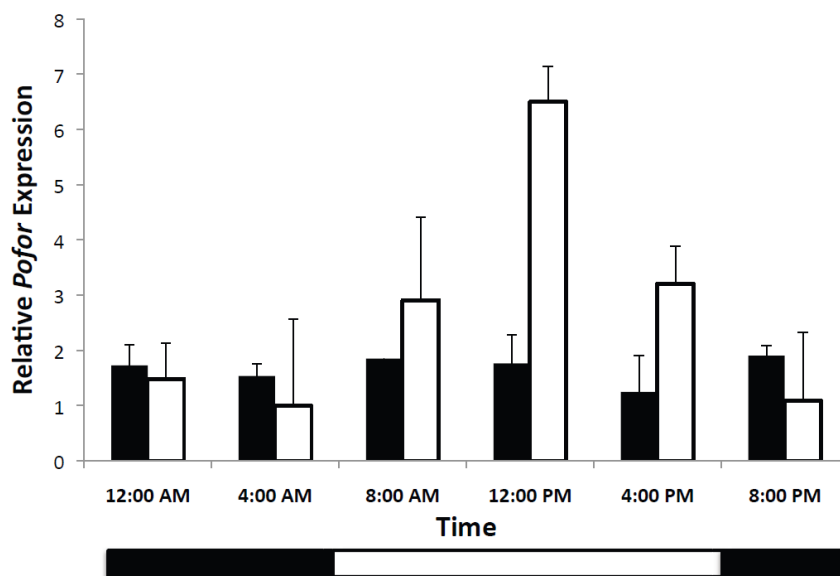


Figure 37. Expression relative des ARNm du gène *for* chez les ouvrières de *Pogonomyrmex occidentalis* au cours de la journée (Ingram et al. 2011). Les barres noires verticales représentent les niveaux d'expression intracérébrale des ouvrières effectuant des tâches à l'intérieur du nid. Les barres blanches représentent les niveaux d'expression du gène chez les fourrageuses. Les colonies sont élevées sous un cycle lumière obscurité 12 :12, représenté par une barre horizontale le long de l'axe des heures (en noir la scotophase, en blanc la photophase).

- **Le niveau de satiété.** Les études effectuées sur la drosophile *D. melanogaster* ont montré une corrélation claire entre le niveau d'expression du gène *for* et les réponses comportementales exprimées dans un environnement nutritionnel variable. Par exemple, les larves et les adultes rovers expriment un comportement de type sitter après une courte période de privation alimentaire (Graf & Sokolowski 1989). Nous pouvons donc supposer qu'en fonction de leur niveau de satiété, les individus vont avoir tendance à se comporter différemment, modulant ainsi leur niveau d'expression du gène. De plus, le gène *for* est associé à l'expression de stratégies de consommation et d'assimilation des nutriments différentes (Kaun et al 2007, Kent et al. 2009). Cette implication du gène *for* dans le métabolisme énergétique pourrait avoir des conséquences importantes sur les niveaux d'expression du gène en fonction de l'état alimentaire de chaque individu.

β. Mécanismes régulateurs de l'expression des gènes

L'expression des gènes est modulée par de nombreux mécanismes de régulation. Toutes les étapes menant d'une information génétique incluse dans l'ADN à un produit final fonctionnel (ARN ou protéine) sont régulées au sein des organismes. Cette régulation, positive ou négative, peut intervenir au niveau de l'accessibilité de la séquence génique (conformation de l'ADN), de l'initiation de la transcription, de la maturation du transcrit, du transport de l'ARNm vers le cytoplasme, ou encore de la traduction de l'ARNm (Harry 2008). Sans une étroite régulation, l'expression anarchique des gènes compromettrait le développement et la survie de l'organisme (Lamoureux et al. 2012).

- **L'organisation de l'ADN :** Dans le noyau, l'ADN est condensé sous forme de chromatine, correspondant à l'association de l'ADN, d'ARN et de protéines histones et non-histones. Pour être transcrit, il est indispensable qu'un gène inactif sous forme d'hétérochromatine, soit activé par le biais d'un changement dans la structure chromatinienne en euchromatine. Cette activation nécessite que la chromatine soit décondensée par des protéines qui peuvent être de deux types : les protéines altérant l'organisation spatiale des nucléosomes, et les protéines modifiant chimiquement la structure des histones en affaiblissant ses liaisons physiques avec l'ADN. La méthylation d'une histone aura un effet inhibiteur tandis qu'une acétylation aura un effet activateur associé à sa décondensation. Cette modification des histones est de type épigénétique (i.e. changement héréditaire impliqué dans la régulation génique mais qui n'affecte pas la séquence d'ADN).

- **Les facteurs de transcription** : Ce sont des protéines constituées d'un certain nombre de sous unités avec des domaines aux fonctions spécifiques. Ils interviennent dans la modulation de la transcription en se liant à des séquences régulatrices particulières en amont des gènes (figure 38). Il existe deux domaines principaux, un domaine de fixation de l'ADN et un domaine d'activation de la transcription. Ils peuvent ainsi agir sur la condensation de la chromatine, l'initiation de la transcription et l'élongation du transcrit.

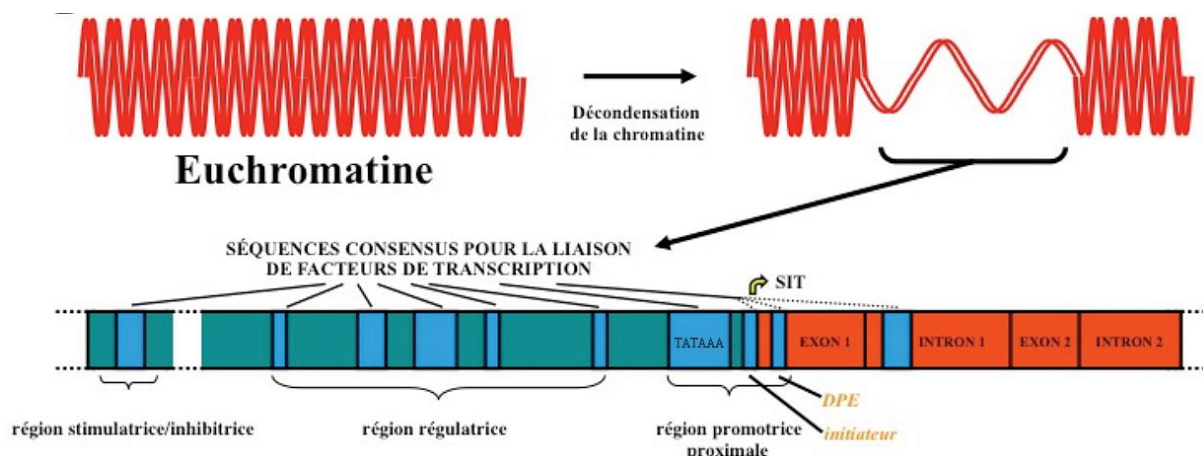


Figure 38. Structure d'un gène classique. Les différents éléments de contrôle de l'initiation de la transcription sont identifiés sur le promoteur (TATAAA : boîte TATA, SIT : site d'initiation de la transcription, DPE : Downstream core Promoter Element) (Lamoureux et al. 2012).

- **Les promoteurs (séquences promotrices)** : Les gènes sont constitués de deux parties distinctes : une séquence transcrite composée d'exons et d'introns contenant l'information génétique nécessaire à la production d'une protéine, et la séquence promotrice située à proximité et en amont de la séquence codante qui contrôle la production du messenger (figure 41, Lamoureux et al. 2012). Cette séquence promotrice est indispensable à la transcription de l'ADN en ARN. Le promoteur, qui peut être de taille importante (plusieurs milliers de paires de bases), est divisé en trois parties distinctes : la région promotrice proximale, les séquences initiatrices et les DPE (Downstream core Promoter Element). L'ensemble de ces régions permettent de lier l'ARN polymérase II (ainsi que des co-facteurs) au site d'initiation de la transcription (SIT). La région promotrice proximale contient la séquence conservée TATAAA (boîte TATA, séquence consensus), localisé 10 nucléotides en amont du SIT. Certains facteurs favorisent la transcription (la fixation de la protéine régulatrice permet l'augmentation du taux de transcription), tandis que d'autres l'inhibent. Les

répresseurs sont des protéines régulant négativement un gène en empêchant la transcription des ARNm par l'ARN polymérase II. L'action des répresseurs et la perte d'activateurs peuvent induire une re-condensation de la chromatine ou un affaiblissement de la liaison de l'ARN polymérase II au SIT, entraînant l'arrêt de la transcription.

- **Les *enhancers* et les *silencers*** : Certaines séquences situées loin en amont ou en aval des promoteurs permettent de réguler leur activité. Ces séquences n'ont pas de positions fixes et peuvent se situer à des distances variables des promoteurs. Il en existe 2 catégories, appelées les *enhancers* et les *silencers*. Les *enhancers* (ou amplificateur) stimulent l'activité des promoteurs par l'intermédiaire de facteurs de transcriptions spécifiques interagissant avec ceux du promoteur. Les *silencers*, ou « éléments bloqueurs » sont des séquences ADN aux propriétés inverses inhibant la transcription. Les *enhancers* et les *silencers* influencent également la structure de la chromatine par un recrutement de protéines qui acétylent ou désacétylent les histones à proximité des promoteurs.

- **L'épissage alternatif** : L'épissage alternatif est mécanisme de régulation post-transcriptionnelle qui permet d'obtenir plusieurs ARN à partir d'un seul gène, via une combinaison différentielle des exons. Un exon peut être éliminé, quelque-fois en raison d'une exclusion mutuelle avec un autre exon (la présence d'un exon implique l'absence de l'autre) ; un intron peut être conservé, devenant ainsi un exon ; ou encore des bornes d'épissage alternatif en 3' ou en 5' peuvent être impliquées dans l'allongement ou le raccourcissement des exons. Ces différents mécanismes permettent à un organisme de produire un plus grand nombre de protéines sans augmenter le nombre de gènes initial (stockage « économique » de l'information). Il existe deux conséquences majeures de l'épissage alternatif sur les processus de régulation de l'expression des gènes. Premièrement, un phénomène de NMD (Nonsense mediated decay) peut réduire le nombre de protéines traduites. L'ajout, le retrait, ou la modification de la longueur des exons, peut entraîner un décalage du cadre de lecture et causer l'apparition prématurée d'un codon STOP (mutation non-sens). Les ARNm ainsi formés sont dégradés avant que la traduction ne puisse s'opérer. Ce processus de contrôle permet ainsi de diminuer le nombre de protéines traduites lors d'une augmentation des taux d'épissages alternatifs producteurs de codons STOP prématurés. Deuxièmement, un changement dans la séquence de l'ARNm peut se répercuter sur celle de la protéine, entraînant une modification potentielle de ses capacités physico-chimiques.

- **ARN interférant (ARNi)** : Les ARN interférants sont de petits ARN impliqués dans la destruction de l'ARNm. Ils constituent un mécanisme supplémentaire de régulation post-transcriptionnelle. Ces courts ARNi simple ou double brin produits de clivage d'ARN plus longs par la protéine *Dicer*, sont utilisés par les cellules comme moyen de défense contre les génomes étrangers (attaque virale...). Les RNAi, qui sont aujourd'hui considérés comme des outils puissants pour étudier la fonction des gènes, sont des régulateurs importants de l'expression du génome.

L'ensemble de ces éléments suggèrent que l'étude de la relation entre le gène *Snfor* et les phénotypes comportementaux associés à un environnement écologique donné, constitue un système particulièrement complexe. Les résultats obtenus grâce aux approches moléculaires, comportementales et pharmacologiques, démontrent l'implication du gène *Snfor* dans l'établissement de stratégies alimentaires distinctes. Cependant, l'ambiguïté de certains résultats (notamment ceux obtenus lors du dosage de l'expression du gène) ainsi que la complexité du système étudié, indiquent l'existence de facteurs complémentaires de modulation des phénotypes comportementaux associés à l'alimentation chez *S. nonagrioides*.

Sur la base de ces connaissances, une perspective intéressante serait de séquencer la partie proximale de la zone régulatrice et d'en comparer les séquences entre les différentes populations naturelles de *S. nonagrioides* et ses lignées homozygotes pour *Snfor*. Conjointement, une étude approfondie des niveaux d'activité de la protéine (dosage par intégration de phosphore radioactif, ou encore méthode du Western Blot) apporterait de nouvelles données pour discuter du lien existant entre le gène *Snfor* et les comportements de recherche alimentaire chez cette noctuelle.

c) Essai de quantification des niveaux d'activité de la PKG

Chez *S. nonagrioides*, deux allèles du gène *Snfor* ont été identifiés (*SnFor^{Gly}* et *SnFor^{Ser}*), résultant d'une mutation non-synonyme au niveau du site actif de l'enzyme. En raison de la localisation de cette mutation, le niveau d'activité enzymatique pourrait être variable en fonction de l'allèle porté. A partir des protocoles développés par Kaun et al. (2007) et Lucas et al. (2010), nous avons tenté de doser l'activité de la PKG chez les individus issus des deux populations écologiques de *S. nonagrioides* (Collaboration R. Melki, LEBS). Cette méthode consiste à mesurer la quantité d'enzymes présentes sous forme active (i.e. phosphorylée)

participant réellement aux réactions physiologiques de l'organisme étudié. Après passage en actimètre, des chenilles de 4^{ème} stade larvaire des populations sauvage et cultivée ont été congelées à l'azote liquide. Deux méthodes d'extraction ont été testées : soit les individus étaient conservés entiers et testés individuellement (une chenille entière par tube), soit les animaux étaient décapités (section au niveau du premier segment localisé à l'arrière de la capsule céphalique) dans le tampon d'extraction pour protéine, et poolés par lot de 5 têtes par tube. Dans les deux cas, les échantillons sont homogénéisés sur glace dans le mix suivant : 25mM de Tris (pH 7,4), 1mM d'EDTA, 2mM d'EGTA, 0.05% de Triton X-100, 5mM de β -mercaptoethanol (Sigma Aldrich) ; auquel est ajouté un cocktail inhibiteur de protéase (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Les échantillons sont soniqués 3 fois pendant 30 secondes, et systématiquement refroidis dans la glace durant 5 secondes entre les différents passages. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 minutes à 10000 RPM à 4°C avant de récupérer le surnageant et de doser la concentration totale en protéine par spectrophotométrie (données nécessaires au calibrage des résultats qui seront obtenus). La concentration finale du mix utilisé pour le dosage de l'activité PKG contenait : 40mM de Tris-HCl (pH 7,4), 20mM d'acétate de magnésium, 0,2mM de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (500–1000 cpm/pmol), 13 $\mu\text{g/ml}$ de l'héptapeptide substrat hautement spécifique de la PKG (RKRSRAE) (Promega, Burlington, ON, Canada), 3 μM de c-GMP (Promega), et 4,6nM d'inhibiteur hautement spécifique de la PKA (cAMP-dependent protein kinase, $\text{Ki}50\% = 2.3 \text{ nM}$) (Calbiochem, San Diego, CA). Un contrôle est réalisé en ajoutant 468 nM d'un inhibiteur de la PKG aux échantillons témoins (K-5823, Clabiochem). Le mélange réactionnel est incubé à 30°C pendant 10 minutes, puis la réaction est finalisée en déposant 70 μl de la solution sur un papier filtre Wathman P-81 imbibé de 75 mL de H_3PO_4 (acide phosphorique) pendant 5 minutes, avant d'être rincé 3 fois pour supprimer l'ATP radioactif non fixé. Pour finir, les filtres sont rincés à l'éthanol 100% et séché à l'air libre avant l'étape de quantification. La mesure de l'activité PKG s'effectue à partir d'un compteur à scintillation (Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada) et l'utilisation d'un mix de scintillation universel (ICN).

Pour chacune des populations écologiques, le niveau d'activité PKG a été mesuré sur 7 animaux entiers (2 répétitions, $n = 4$, puis $n = 3$) et 10 têtes (en 2 répétitions). Les résultats, exprimés en ^{32}P fixé au substrat par Mg de protéine par minute, n'ont pu être interprétés pour différentes raisons. Tout d'abord, aucun des résultats obtenus entre les différentes répétitions n'a pu être répété (tableau 4), quelque soit le type d'échantillon analysé (individus entiers ou têtes).

Tableau 4 : Résultats obtenus lors de la quantification de l'activité PKG entre les deux populations écologiques de *S. nonagrioides*, en fonction de la méthode employée. Les résultats sont exprimés en CPM (valeurs fournies par le compteur de scintillation).

	Population sauvage (Kenya)	Population cultivée (France)
Expérience 1 corps entiers	801,6 ± 953,9	1322,9 ± 1699,5
Expérience 2 corps entiers	382,2 ± 181,1	359,1 ± 111,2
Expérience 1 têtes poolées	7512,1	10868,5
Expérience 2 têtes poolées	2701,4	1561,2

Cette forte variation au niveau inter et intra groupe pourrait être le résultat d'une activité PKG hypervariable au sein de l'espèce *S. nonagrioides*, ou pourrait provenir d'un artefact méthodologique. Compte tenu des différents contrôles effectués, il semble plus probable que cet échec de quantification de l'activité enzymatique soit dû à un défaut méthodologique. D'une part, le niveau d'activité mesuré dans les échantillons témoins négatifs (contenant un inhibiteur de la PKG) était similaire aux échantillons tests. Cela suggère que les détectations enregistrées par le compteur à scintillation ne sont pas spécifiquement représentatives d'une activité PKG. D'autre part, l'analyse des produits de la phosphorylation sur un gel TRIS Glycine 12% (figure 39) n'a montré aucun signe de fixation de l'ATP radioactif sur le substrat peptidique (aucune bande n'est détectable sur le gel). Le protocole utilisé ne permet donc pas de mesurer les niveaux d'activité de la PKG, peut-être en raison de l'emploi d'un heptapeptide substrat inadapté (non spécifique) aux analyses sur *S. nonagrioides* (sa mise au point ayant été effectuée à partir du modèle *D. melanogaster*).

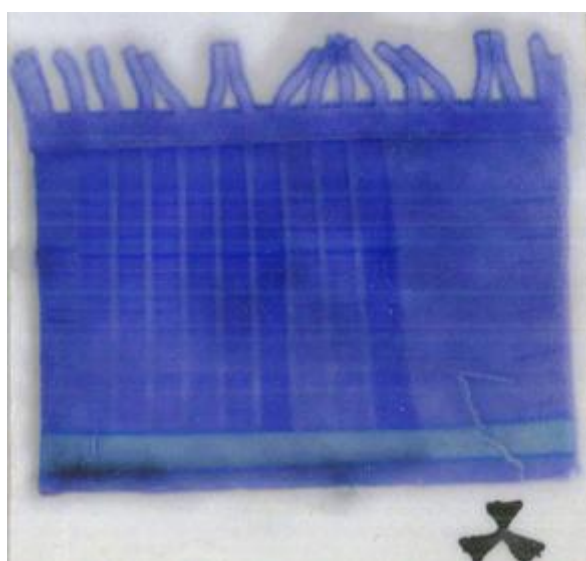


Figure 39. Gel TRIS Glycine 12% sur lequel ont été déposés les produits de la phosphorylation des échantillons de *S. nonagrioides* issus de la population sauvage et cultivée.

Aucune bande n'est détectée, indiquant l'absence d'une fixation de l'ATP radioactif.

d) *Perspective : méthode alternative de quantification du niveau d'activité enzymatique*

D'autres méthodes de quantification sont disponibles afin d'étudier les niveaux de production enzymatique, telles que la méthode du *western blot*. Le *western blot*, aussi appelé « transfert de protéine » permet de séparer les protéines d'intérêts selon leur masse via une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ensuite transférées sur une membrane et exposées à un anticorps spécifique, il est possible d'en mesurer la concentration (figure 40).

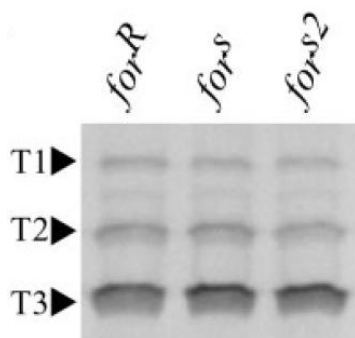


Figure 40. Immuno-détection des différentes isoformes (T1, T2, and T3) de la PKG par la méthode de western blot, exprimées dans le cerveau d'individus rovers, sitters naturels et sitters mutants de *D. melanogaster* (Belay et al. 2007).

IV – Article 3, facteurs potentiels du maintien du polymorphisme du gène *Snfor* dans les populations naturelles de *S. nonagrioides*

1/ Introduction

La survie des espèces se développant dans un environnement fluctuant (stochasticité environnementale) nécessite l'existence de mécanismes leur permettant de s'adapter aux changements de leurs conditions de vie (Biro & Stamps 2008, Sih et al. 2006). De nombreux facteurs peuvent varier tels que la température, la luminosité, l'hygrométrie, la disponibilité des ressources alimentaires et les relations inter et intraspécifiques. La plasticité d'un système biologique, défini comme la capacité des organismes à modifier leurs réponses en fonction des variations de l'environnement, constitue l'un des mécanismes adaptatif à ces fluctuations environnementales. Ces réponses peuvent être moléculaires, cellulaires, physiologiques, ou encore comportementales. Parmi celles-ci, la diversité phénotypique est une propriété conférant aux individus d'une même espèce des caractères différents, en partie due à une diversité génétique sous-jacente (polymorphisme génétique).

Le polymorphisme génétique d'une espèce revêt ainsi une importance vitale pour le maintien des populations naturelles. Lors d'un changement environnemental important, une population constituée d'individus identiques risquerait de s'éteindre, tandis qu'une population polymorphe présentant des variations alléliques avantageuses dans ce nouveau milieu (taux de survie et de reproduction supérieure) pourra se maintenir. Certaines de ces modifications environnementales sont notamment dues aux activités humaines (pression anthropique). L'exemple célèbre du mélanisme industriel chez la Phalène du boulot *Biston betularia*, permet d'illustrer ce phénomène (Mallet 2004). Cette espèce de Lépidoptère présente deux morphes de coloration distincte, déterminés par la variation allélique d'un gène unique (figure 41) : l'un présente une coloration crème clair, mouchetée de marron (forme *typica*) ; l'autre est de couleur unie et sombre marron-noire (forme mélanique *carbonaria*). Dans les années 1940-1950, la forme mélanique est devenue plus fréquente, voir largement prédominante (plus de 98 % de la population étudiée dans la région de Manchester) à proximité des villes industrielles d'Angleterre. Cet accroissement de fréquence fut la résultante d'une pression de sélection naturelle associée à l'augmentation de la pollution atmosphérique rendant les troncs

et les branches des arbres plus sombres (dépôts de fumée et disparition des lichens clairs les recouvrant). Cette noctuelle se posant en journée sur les branches des arbres, la survie des papillons ainsi exposés aux prédateurs dépend en grande partie de l'efficacité de leur camouflage dans l'environnement (cryptisme). Les individus de type *carbonaria* ont donc un meilleur taux de survie que la forme *typica* lorsque les arbres sont plus sombres. Vers la fin des années 1960, les efforts mis en place pour diminuer les niveaux de pollution et améliorer la qualité de l'air en Grande-Bretagne, entraîna une inversion du phénomène avec une régression de la forme mélanique en faveur de la forme *typica*. Cet exemple illustre ainsi comment la sélection naturelle des différents phénotypes peut permettre une évolution rapide des espèces dans un environnement fluctuant.



Figure 41. Forme claire (à gauche) et forme mélanique (à droite) de la Phalène du bouleau, *Biston betularia* (©Wikipédia)

Lorsqu'un phénotype régulé par un gène donné est affecté par l'environnement dans lequel il est exprimé (i.e. plasticité phénotypique), ce phénomène est identifié comme le produit d'une « interaction gène-environnement » (GEI) (Burns et al. 2012, Kent et al. 2009). Ce type d'interaction peut notamment être exploité par les agriculteurs lors de la sélection de lignées de plantes cultivées, par exemple tolérantes pour certaines conditions environnementales telles que la faible disponibilité en eau. Les GEIs peuvent ainsi être comprises comme des mécanismes modulateurs de la fitness des individus en fonction des conditions environnementales (Gillespie 1989, Hedrick 1986).

Le gène *foraging* (*for*), qui code pour une protéine kinase dépendante de la guanosine monophosphate cyclique (PKG), est un gène candidat associé à la régulation des stratégies alimentaires chez de nombreuses espèces d'invertébrés. Chez l'espèce *Sesamia nonagrioides* Lefèbvre (Lepidoptera, Noctuidae), ce gène présente deux variants alléliques naturels : *SnFor^{Gly}* et *SnFor^{Ser}*, corrélés avec l'expression de deux phénotypes comportementaux de recherche alimentaire distincts. Cette noctuelle ravageuse est également caractérisée par différentes populations écologiques, trouvées sur herbacées sauvages telles que les *Typhaceae* (population « sauvage ») ou dans les champs de *Poaceae* cultivées (population « ravageuse »). Ces différences écologiques impliquant nécessairement des pressions de sélection distinctes,

nous pouvons supposer que l'existence d'une GEI conférant aux individus une fitness spécifique en fonction de leur génotype et du type de plantes hôte exploitée, pourrait être un facteur du maintien du polymorphisme du gène *for* dans les populations naturelles de *S. nonagrioides*.

Dans l'étude suivante, nous avons étudié les réponses des deux populations naturelles et celles des variants alléliques *SnFor^{Gly}* et *SnFor^{Ser}* à une variation de la ressource nutritive afin de comparer les plasticités en fonction du milieu d'origine des populations, sauvage ou cultivé, et pour rechercher le rôle du gène *for* dans la plasticité et l'adaptabilité des stratégies alimentaires exprimées par les individus de *S. nonagrioides*. Premièrement nous avons estimé le caractère adaptatif des 2 phénotypes en évaluant leur croissance (gain de poids) et leur tendance à fuir des milieux nutritifs de qualité différentes (standard, appauvri, maïs, *Typha*). Nous avons ensuite concentré les analyses comportementales sur l'activité de recherche alimentaire par la quantification du nombre de changements de sites alimentaires effectués entre deux sites de nourriture de bonne ou de mauvaise qualité. Deuxièmement, nous avons évalué la fitness des individus de la population sauvage et de la population ravageuse dans des conditions d'élevage semblables afin d'identifier des traits d'histoire de vie spécifiques à chacun des phénotypes permettant de discuter d'un éventuel trade-off entre les niveaux de recherche alimentaire et le taux de fécondité. L'ensemble de ces résultats, mis dans la perspective de l'habitat écologique des différentes populations naturelles de l'espèce, permettront d'appréhender des traits d'histoire de vie potentiellement impliqués dans le passage sur milieu cultivé, et le rôle du gène *for* dans la plasticité comportementale en réponse à la qualité des ressources alimentaires exploitées dans le cadre d'une GEI.

Plastic behavioural and developmental responses to diet quality in a Lepidoptera and relationship with the *foraging* gene polymorphism

Floriane CHARDONNET¹, Claire CAPDEVIELLE-DULAC¹, Nicolas JOLY¹, Bruno LE RU^{1,2}, Florence MOUGEL¹, Jean-François SILVAIN¹ and Laure KAISER^{1,3}.

4. Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, CNRS UPR 9034, IRD UR72 et Université Paris-Sud Orsay, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

5. ICIPE - African Insect Science for Food and Health, Duduville Campus, Kasarani, P.O. Box 30772 - 00100, Nairobi, Kenya

6. Physiologie de l'Insecte, Signalisation et Communication, INRA, Centre de Versailles-Grignon, Route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex, France

Abstract

Because nutritional conditions can be fluctuant, individuals of a same species may exhibit adaptive polymorphic and plastic responses adjusted to their environment. The *foraging* gene (*for*), which encodes a PKG, is a candidate gene modulating the foraging strategies in a variety of invertebrate species. In the stem borer *Sesamia nonagrioides* Lefèbvre (Lepidoptera, Noctuidae), this gene presents two natural allelic variants: *SnFor*^{Gly} and *SnFor*^{Ser}, correlated with the expression of two foraging phenotypes. This moth has different ecological populations found on wild herbaceous plants such as *Typhaceae* (wild population) or on cultivated *Poaceae* (crop population). The *Snfor* polymorphism could explain how the species is able to survive in environments where the quality and the spatiotemporal availability of the host-plants are variable.

In this study, we used the ecological populations of *S. nonagrioides* and *SnFor* allelic variants to investigate the link between plasticity and adaptability of specific foraging strategies, and the existence of a Gene by Environment Interaction (GEI) in the expression of *for* phenotypes. Firstly, larval growth rate and escape rate in responses to rich and to poor diets were measured in the wild and crop populations. Lower growth rate and higher escape rate were observed in the food deprived condition in both populations, but to a lesser extent in the crop population, thus characterized by a better tolerance to the lack of nutriment. The larval growth rate depended also on the plant components present in the diet. The wild population gained more weight when fed on Typha based diet than the crop population, but their growth was equal on maize-based diet. Secondly, the plasticity of the foraging activity of the natural populations and of the *Snfor* allelic variants (homozygous strains) in response to the rich or poor diets was monitored in an actimeter. A higher number of moves between food patches was observed in the food deprived condition in all populations tested (natural and homozygote strains), although their level of locomotor activity in a same nutritional condition were different. If a significant GEI was identified between the natural populations, this effect was not found between the homozygote strains, preventing to conclude that there was a GEI effect between *SnFor* and the nutritional environment. The expression of *Snfor* was quantified afterwards, and showed a drastic drop of the gene expression in the food restricted condition, regardless of the population. Finally, we estimated the fitness of crop and wild populations and of the

allelic variants in similar rearing condition and found different larval survival according to the population origin, revealing a potential trade off between foraging strategies and life-history traits. The overall results confirm the involvement of the *Snfor* gene in the expression of specific phenotypes in different nutritional conditions, and suggest the existence of a tradeoff between foraging activity and life history traits.

Keywords: *Sesamia nonagrioides*; *Foraging* gene; Lepidoptera; Plasticity; Diet quality; Adaptation; Life history traits

Highlights:

- Food restriction reduced the growth and increased the dispersion rate
- Crop larvae had a better development and a lower escape rate in food deprived condition
- Crop larvae expressed a more plastic behavioural response to diet qualities, but no GEI effect was confirmed
- A food deprived condition induced a decrease of the *for* gene expression
- The fitness of the most active population was lower under laboratory conditions
- Possible existence of a tradeoff between foraging activity and life history traits

a) Introduction

The environment is constantly fluctuant, far different from a static state. In an adaptive way to suit current conditions, individuals of a same species may exhibit inter individual polymorphic responses consistent across time, and intra individual plastic response adjusted with the environment fluctuations (Biro & Stamps 2008, Sih et al. 2006). Both mechanisms are involved in the survival of species. A principal interest of the evolutionary biology is to understand how individual differences arise and how they participate to the adaptation to heterogeneous environments (Gordon et al. 2005, Roff 2002).

Plasticity of biological systems is described as the ability of organisms to change and adapt their responses according to environmental variation. These responses can occur to any level of complexity: molecular, cellular, organism and behaviour. When phenotypes associated to a specific gene are affected by the environment in which they are expressed (i.e. phenotypic plasticity), a Genotype-Environment Interaction is identified (GEI) (Bradshaw 1965, Burns et

al. 2012, Falconer & Mackay 1996, Guttelling et al. 2007, Kent et al. 2009, Sambandan et al.; 2008). So GEIs can be understood as fitness modulators across environmental conditions (Gillespie 1989, Hedrick 1986).

Plasticity and GEI can be studied through responses to fluctuations in the nutritional environment. In such paradigm, different phenotypes will have a specific fitness according to the characteristics of the nutritional conditions. Such observations have been made from the analysis of the response to food deprivation associated with the *foraging* genotype in *Drosophila* (Kent et al. 2009, Burns et al. 2012). The *foraging* gene (*for*), which encodes a cGMP-dependent protein kinase (PKG), is a candidate gene involved in the modulation of foraging strategies in a variety of invertebrate species (Fitzpatrick & Sokolowski 2004, Ben-Shahar et al. 2005, Kaun et al. 2009, Lucas et al. 2010, Osborne et al. 1997). Its structure and its function are well conserved among invertebrate taxa (Fitzpatrick 2004) and it is known for its implication in behavioural and physiological plasticity in a food related context (Kaun et al. 2007a, Scheiner et al. 2004, Engel et al. 2000, Kaun et al. 2007b, Mery et al. 2007, Kaun et al. 2008)

Recently, the role of the *foraging* gene on behavioural phenotype has been discovered also in the stem borer *Sesamia nonagrioides* Lefèbvre (Lepidoptera, Noctuidae). The species presents two natural allelic variants: *SnFor^{Gly}* and *SnFor^{Ser}*, correlated with the expression of two behavioural phenotypes measured by how frequently they move between food patches. *SnFor^{Gly}* are more sedentary than *SnFor^{Ser}* which have a higher tendency to leave a valuable food patch (Chardonnet et al. in prep). An interesting characteristic of the *S. nonagrioides* model is that these *for* alleles are differentially represented in natural populations. The individuals from a population found exclusively on a wild herbaceous host plant (*Typha domingensis*) in East Africa (Nye 1960, Ong'Amo et al. 2013) are only carrier of the *SnFor^{Ser}* allele (wild population), while another population found on maize in the South of France is polymorphic with a predominance of the *SnFor^{Gly}* allele (crop population) (Chardonnet et al. in prep). At the species level (i.e. interpopulational level), this polymorphism could contribute to the maintenance of *S. nonagrioides* in environments where the quality and the spatiotemporal availability of the host-plants are variable. At an intra-populational level, the presence of the two *Snfor* alleles in the polymorphic population may have an impact on the crop losses. Indeed, the ability of the larvae to move from one plant to another and thus attack several stems is an important factor of the level of damage caused to the crop. These damages

can be direct, by consumption of the plant tissue, or indirect, by altering the resistance of the plants to climatic conditions and by increasing fungal attack and dispersion (such as a fusarium infection by *F. moniliforme*) (Arvalis 2007).

Life history tradeoffs are also a mechanism of the maintenance of inter individual variations in species (Roff 2002, Roff 2007, Biro & Stamps 2008). In this context, the relationship between foraging activity of *S. nonagrioides* variants and life history traits (for instance productivity, i.e. intrinsic growth and female fecundity) can be investigated to evaluate their respective fitness.

Here, *S. nonagrioides* ecological differentiation and *SnFor*^{Gly}/*SnFor*^{Ser} polymorphism was used to investigate the link between plasticity and adaptability of specific foraging strategies, and the existence of a Gene by Environment Interaction in the expression of *for* phenotypes. Firstly we estimated the plasticity of the wild and crop populations by testing larval escape rate and growth rate in responses to diets varying in plant composition (Typha vs maize-based diets) and in richness (plain vs diluted diet). Secondly, foraging activity was monitored in an actimeter in the presence of either rich or poor diet, in the natural populations and in the *Snfor* allelic variants (homozygous strains), and expression of *Snfor* was quantified afterwards. Thirdly, we estimated the fitness of crop and wild populations and of the allelic variants in similar rearing condition in order to search for a trade off between foraging strategies and other life-history traits like growth rate and fecundity.

b) Materials and methods

b.1. Insect populations and rearing

On the four distinct populations used in the next studies, two were natural populations. The natural crop population was initiated from insects collected in maize stems in fields located in Haute-Garonne, France, GPS coordinates N: 43°22.171', E: 001°11.413'. This population is polymorphic for the *for* gene. Between 2012 and 2013, a predominance of the *SnFor*^{Gly} allele was observed: 39 % were *SnFor*^{Gly/Gly} homozygotes, 51 % were *SnFor*^{Gly/Ser} heterozygotes, and 10 % were *SnFor*^{Ser/Ser} homozygotes (Chardonnet et al. in prep.). The natural wild population was initiated from insects collected in *Typha domingensis* stems at Makindu, Kenya, GPS coordinates S: 02°26.880', E: 37°80.69'. The whole population is

strictly composed of *SnFor*^{Ser/Ser} homozygotes. In both cases, about 300 caterpillars were collected yearly and mixed to the reared populations. The remaining two populations were founded from the polymorph crop population. We selected couples of *S. nonagrioides* adults from the sequencing of their *foraging* genotype, in order to select homozygote offspring and produced 2 homozygote strains for the *Snfor* gene: *SnFor*^{Gly/Gly} and *SnFor*^{Ser/Ser}. Each strain was founded from 15 initial homozygote couples selected from the crop population.

All strains were reared on an artificial diet at the Laboratory Evolution, Génomes et Spéciation (LEGS, France), in incubators (26 °C, 70% r.h., and a L14:D10 cycle). The diet was composed of dried maize leaf powder, soybean powder, saccharose, dead pulverulent baker's yeast, a mix of vitamins and antibiotics, and water (Onyango 1994). Before the emergence, pupae were placed in mating cages and kept at 21 °C, 70% r.h., and a L14:D10 cycle. They were supplied with water and paper stems for eggs deposition. 80 pupae of each sex were put per cage and eggs were collected and weighted every 2 days. The fecundity of the eggs was estimated 8±1 days after collection by the observation of the eggs coloration as an indicator of the successful development (eggs not developing remained yellow; embryonic development was indicated by pink, to black before hatching, as larval melanized head capsule become visible through the chorion). Finally, the sex ratio was calculated from the number of pupae of each sex.

b.2. Growth and evasion from diets of different qualities in the natural populations

In order to estimate the adaptive response of the crop and the wild natural populations to different diet qualities, we tested their growth rate and their tendency to escape from two nutritional conditions: well-fed on standard artificial diet, and food deprived on artificial diet diluted at 50%. The diluted diet were made from the standard maize-based rearing diet by adding water mixed with agar to divide per 2 the nutritional value while keeping the same percentage of agar to maintain the same consistency (allowing gallery boring).

At the emergence, neonate larvae of each population were raised in Petri dishes with standard or diluted artificial diet. Three replicates with 25 larvae per Petri dish were made. Thus, four conditions were tested: crop population on standard diet (n = 75), and on diluted diet (n = 75), wild population on standard diet (n = 75), and on diluted diet (n = 75). Every 2 or 3 days, larvae were weighted and the number of individuals that escaped and that remained per Petri

dish were counted. As a result of a bacterial contamination of the diet, we stopped the measures at 17 days (at the last or the penultimate instar larvae).

To test an eventual effect of the composition of the artificial diet, this experiment was replicated by replacing the maize leaves powder contained in the artificial diet by a *Typha domingensis* leaves powder (in both types of diet, dried leaves powder represented 13.2 % of the dry weight of the artificial diet). As the first experiment was made with a maize-based diet, it might have been more appealing to the crop population that was collected from maize than to the wild population that was collected from *T. domingensis*. Thus, it was necessary to control this potential experimental artefact by using both respective original host-plants of the wild and crop population.

All the tests were performed in the same environmental conditions as for rearing (26 °C, 70% r.h., and a L14:D10 cycle). Growth was estimated as the relative weight gain since the first weight measure of the experiment. The values of the relative weight gain were square-root transformed before using a linear regression, applied on each weight gain curve. The comparison of the different experimental groups was made by a Student t-test on estimated mean values of the slope. The dispersion rate was also tested by a linear regression analysis followed by a Student t-test in order to compare the different experimental groups. Since same data were used in two comparisons, the significance level $\alpha = 0.025$ was used, after application of the Dunn-Sidak correction (Zarr, 1999). The data were analysed using the software XLStat V. 2010.3.01 (Addinsoft, Paris, France).

b.3. Effect of the diet quality on the foraging activity pattern

In order to characterize the foraging activity of the different populations in the presence of rich or poor diet, we used an “actimeter”, an automatic system recording the foraging activity of larvae. This system devised by Chardonnet et al. (2012), was developed from a device commercialized for the study of fruit flies, the DAM system (Drosophila Activity Monitoring System, DAM2®; Trikinetics, Waltham, MA, USA) (Hirsch 2009, Huang 2009, Freeman 2010). It was designed to analyse the locomotor activity of endophyte species, and previously used to identify the behavioural phenotypes of *S. nonagrioides* associated with the *Snfor* polymorphism (Chardonnet et al. in prep). The actimeter apparatus is made of tubular units (200 x 7 mm i.d.), each provided with three infrared photoelectric detectors that automatically count and record larval movement between two food patches

inserted at both tube ends. A “leaving the patch” event was recorded each time a larva crossed at least two of the three consecutive infrared beams. The data were collected from the DAMSystem collection® software (TriKinetics).

To estimate the effect of the *Snfor* gene on the behavioural responses to diet richness, the larvae were tested in the well-fed and food deprived nutritional conditions. As described in the previous experiment (2.2), the two food patches inserted at both tube ends were made of either standard artificial maize diet, or of artificial diet diluted at 50%. In the well-fed condition (standard artificial diet), one patch is enough to feed a caterpillar during the whole experiment. In this study, third-instar larvae from the four populations (the natural wild and crop populations, and the *SnFor*^{Gly/Gly} and *SnFor*^{Ser/Ser} homozygote strains) were tested in the actimeter device in each nutritional condition. Each individual was weighted before the beginning of the test and 72 h after, to estimate the impact of the experiment and the exposition to different diet quality on growth. Tests were initiated with individuals of homogeneous size and lasted for 48 hours in the DAM system device, in the same environmental conditions as for rearing (26 °C, 70% r.h., and a L14:D10 cycle). A total number of 32 individuals were tested in each of the 8 experimental groups (4 populations x 2 nutritional conditions). To reach this number, 4 replicates were made, each with simultaneous recording of 64 individuals equally distributed in the 8 experimental groups.

To test the effect of the population and the effect of the diet richness on the locomotor activity, the data were analysed with generalized linear model (GLM) model for R-3.0.1 (family=Poisson). Because an “over-dispersion” was observed in the data, the negative binomial model was used as it covers the Poisson distribution plus "over-dispersion" factors. We also compared the activity separately for light and dark periods, using the Wilcoxon Mann–Whitney test (software XLStat), because this variable was not normally distributed.

b.4. Comparison of the *Snfor* gene expression between populations and nutritional conditions

The expression of the *Snfor* gene was compared between the two natural population and the two homozygote strains of 4th instar larvae of *S. nonagrioides* at the end of the behavioural testing on different diet qualities. 32 individuals of each population previously tested on standard diet in the actimeter were tested. 26 *SnFor*^{Ser/Ser} larvae, 32 *SnFor*^{Gly/Gly} larvae, 27 wild larvae and 30 crop larvae from the food deprived condition were tested. See detailed procedure in Chardonnet et al. (in prep.).

The live larvae were retrieved from the actimeter and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until the RNA extraction. Total RNA was extracted from whole larvae using TRI Reagent (Sigma). The PCR efficiency was calculated for each gene by realizing a calibration curve with 4 dilution points using a pool of cDNA samples. The efficiencies were 103% for *Snfor* ($r^2 = 0.998$), 102% for *rpL13* ($r^2 = 0.999$), 96% for *rpS3* ($r^2 = 1$), and 97% for *rpL17* ($r^2 = 0.998$). All the melting curves showed a single peak, suggesting the specificity and homogeneity of the amplifications. The C_q values were determined based on the single threshold mode. All the negative controls had a C_q of 0. The maximum C_q standard deviation observed between duplicates was 0,452 and the mean across all samples was 0,101.

The stability of the reference genes was checked with Bestkeeper software. The differences between the *Snfor* transcript concentrations were determined using the $\Delta\Delta C_q$ method. As the data were normally distributed, the statistical significance of the difference of *Snfor* expression observed between the 4 populations exposed to different nutritional conditions was tested by an analysis of variance (ANOVA; instead of a GLM model), using the software XLStat V. 2010.3.01 (Addinsoft, Paris, France).

b.5. Developmental and reproduction traits of the *S. nonagrioides* strains

They were measured during one year in the rearing conditions. Overlapping generations allowed weekly production of eggs and pupae.

Rearing method: The four strains studied (the natural wild and crop populations, and the *SnFor*^{Gly/Gly} and *SnFor*^{Ser/Ser} homozygote strains) were raised in the same environmental conditions in separated incubators (26 °C, 70% r.h., and a L14:D10 cycle). The eggs are placed per 35 units on 100 ml artificial diet conditioned in glass bottles closed with cotton wool for ventilation and with a metal grid maintained by a ring on top. The individuals make their complete larval development in the same bottle, and they are extracted just after their pupation. The sex-ratio was determined by external morphology of the pupae (Giacometti 1995). Before the emergence, pupae are placed in mating cages in same conditions as described in the “b.1. Insect populations and rearing” part. The fecundity of the collected eggs was estimated 8±1 days after collection by the observation of the eggs coloration as an indicator of the successful development.

Fitness estimation: several life history traits were measured to estimate intrinsic fitness of the four strains in laboratory condition: larval survival rate and development time, fecundity rate (ratio between the mass of fertilized eggs and the number of reproductive females in the cage), sex ratio. The population effect on the larval survival rate was analyzed with analysis of variance (ANOVA) as the data were normally distributed. The female fecundity rate was analyzed with the Kruskal-Wallis test followed by a post hoc Steel-Dwass-Critchlow-Fligner test (non-normal distribution of the data). All the statistical analyses were performed using the software XLStat V. 2010.3.01 (Addinsoft, Paris, France).

c) Results

c.1. Growth rate of the natural population is affected by the diet quality

- **On maize-based diet**, an effect of the diet richness and an effect of the population in the food-deprived condition were observed on the growth rate (Figure 1, Table 1).

The food deprived condition decreased significantly the relative weight gain in both populations (Table 1). Over the 17 days of the experiment, crop larvae from France tested on standard diet gained 204 times their starting weight versus 117 times for those tested on diluted diet. These results indicated that larvae grew up 1.7 times faster in well-fed condition than the food-deprived condition. In the wild population from Kenya, larvae tested on standard diet gained 221 times their starting weight versus 84 times for those tested on diluted diet, indicating that they grew up 2.6 times faster on standard diet.

In the well-fed condition, these growth rates of the crop and the wild population did not differ. However, in the food-deprived condition, an effect of the population was noticed with a higher growth rate in the crop larvae than in the wild larvae.

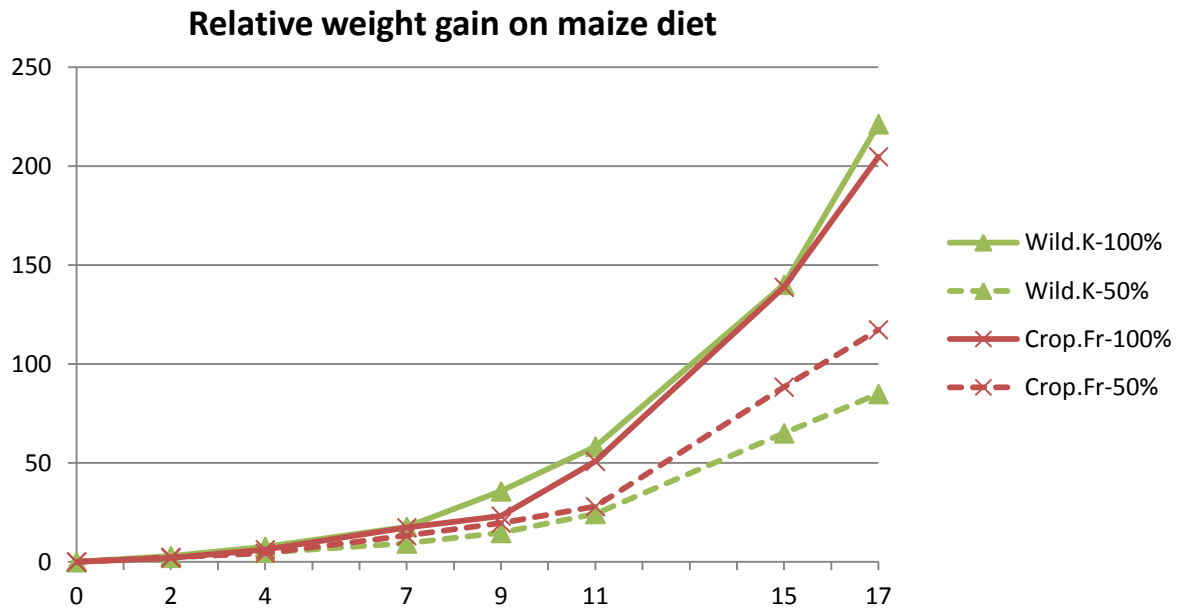


Figure 1. Relative weight gain of the crop and wild larvae in the well-fed and food deprived conditions on maize-based diet. The wild larvae from Kenya (Wild.K) and the crop larvae from France (Crop.Fr) were respectively tested in a well-fed condition on standard diet (100%) and in a food deprived condition on diluted diet (50%) ($n = 75$ per population at the beginning of the test). The food deprived condition decreased the relative weight gain in both populations (crop population: Student t-test, $t = 3.834$; $P < 0.0004$; wild population: Student t-test, $t = 9.962$; $P < 0.0001$). In the well-fed condition (100%), the growth rate of the crop and the wild population did not differ (Student t-test, $t = 0.305$; $P > 0.05$). In the food deprived condition (50%), the growth rate of the crop larvae was higher than in the wild larvae (Student t-test, $t = 4.198$; $P < 0.0002$).

Table 1. Statistical analysis of the relative weight gain of the crop and wild larvae in the well-fed and food deprived conditions on maize-based diet. R^2 : coefficient of the linear regression. Slope of the linear regression: mean value $\pm$ standard deviation. Student t-test is applied to compare two mean slopes.

On maize	Standard diet (100%)	Diluted diet (50%)	student
Wild Kenyane larvae	$R^2 = 0.956$; $P < 0.0001$ Slope : 0.78 ± 0.022	$R^2 = 0.933$; $P < 0.0001$ Slope : 0.50 ± 0.016	$t = 9.962$; $P < 0.0001$
Crop French larvae	$R^2 = 0.956$; $P < 0.0001$ Slope : 0.74 ± 0.023	$R^2 = 0.912$; $P < 0.0001$ Slope : 0.58 ± 0.023	$t = 3.834$; $P < 0.0004$
Student	$t = 0.305$; $P > 0.05$	$t = 4.198$; $P < 0.0002$	

- **On *Typha*-based diet**, an effect of the diet and an effect of the population in both nutritional conditions were observed on the growth rate (Figure 2, Table 2).

As observed on the maize diet, the food deprived condition decreased significantly the relative weight gain in both populations. Over the 17 days of the experiment, crop larvae from France tested on standard diet gained 251 times their starting weight versus 139 times for those tested on diluted diet. These results indicated that larvae grew up 1.8 times faster in well

feed condition than in food deprived condition. In the wild population from Kenya, larvae tested on standard diet gained 430 times their starting weight versus 58 times for those tested on diluted diet, indicating that they grew up 7.4 times faster on standard diet.

In the well-fed condition, the growth rate of the wild larvae was higher than the growth rate of the crop larvae, which was close to that observed on the maize-based diet. In the food deprived condition, an opposite effect of the population was observed with a higher growth rate in the crop larvae than in the wild larvae.

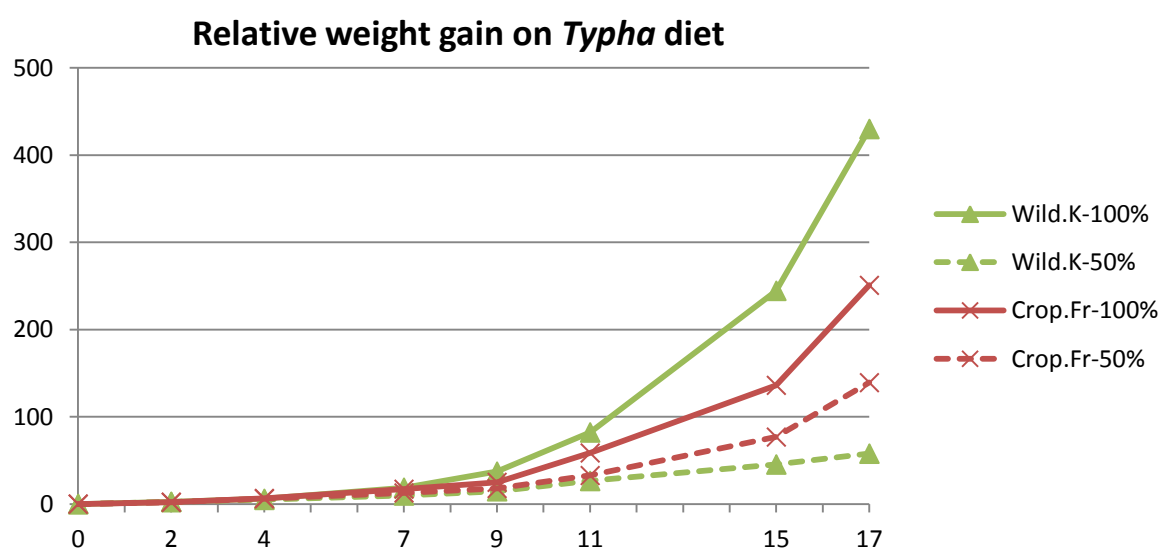


Figure 2. Relative weight gain of the crop and wild larvae in the well-fed and food deprived conditions on *Typha*-based diet. The wild larvae from Kenya (Wild.K) and the crop larvae from France (Crop.Fr) were respectively tested in a well-fed condition on standard diet (100%) and in a food deprived condition on diluted diet (50%) ($n = 75$ per population at the beginning of the test). The food deprived condition decreased the relative weight gain in both populations (crop population: Student t-test, $t = 3.968$; $P < 0.0002$; wild population: Student t-test, $t = 10.42$; $P < 0.0001$). In the well-fed condition (100%), the growth rate of the wild larvae was higher than the growth rate of the crop larvae (Student t-test: $t = 3.477$; $P < 0.001$). In the food deprived condition (50%), an opposite effect of the population was observed with a higher growth rate in the crop larvae than in the wild larvae (Student t-test: $t = 5.760$; $P < 0.0001$).

Table 2. Statistical analysis of the relative weight gain of the crop and wild larvae in the well-fed and food deprived conditions on *Typha*-based diet.

On <i>Typha</i>	Standard diet (100%)	Diluted diet (50%)	student
Wild Kenyane larvae	$R^2=0.928$; $P < 0.0001$ Slope : 0.99 ± 0.045	$R^2=0.974$; $P < 0.0001$ Slope : 0.45 ± 0.001	$t = 10.42$ $P < 0.0001$
Crop French larvae	$R^2=0.932$; $P < 0.0001$ Slope : 0.78 ± 0.030	$R^2=0.946$; $P < 0.0001$ Slope : 0.59 ± 0.02	$t = 3.968$; $P < 0.0002$
Student	$t = 3.477$; $P < 0.001$	$t = 5.760$; $P < 0.0001$	

Taken together, these results indicate an effective reduction of the nutritive value in the diluted diet as it effectively modulated the larval growth rate. They may also suggest a better tolerance of the crop larvae to the lack of nutrients in both maize and *Typha* conditions, and a better development of the wild larvae only on *Typha* diet in well-fed condition.

c.2. Diet quality affects the escape rate of the natural populations

- **On the maize-based diet**, an effect of the diet richness and an effect of the population in the food-deprived conditions were observed on the tendency to leave the food patch (Figure 3, Table 3). The food deprived condition increased significantly the escape rate in both populations, and it was higher in the wild than in the crop population. In the well-fed condition, the escape rate of the crop and the wild population did not differ.

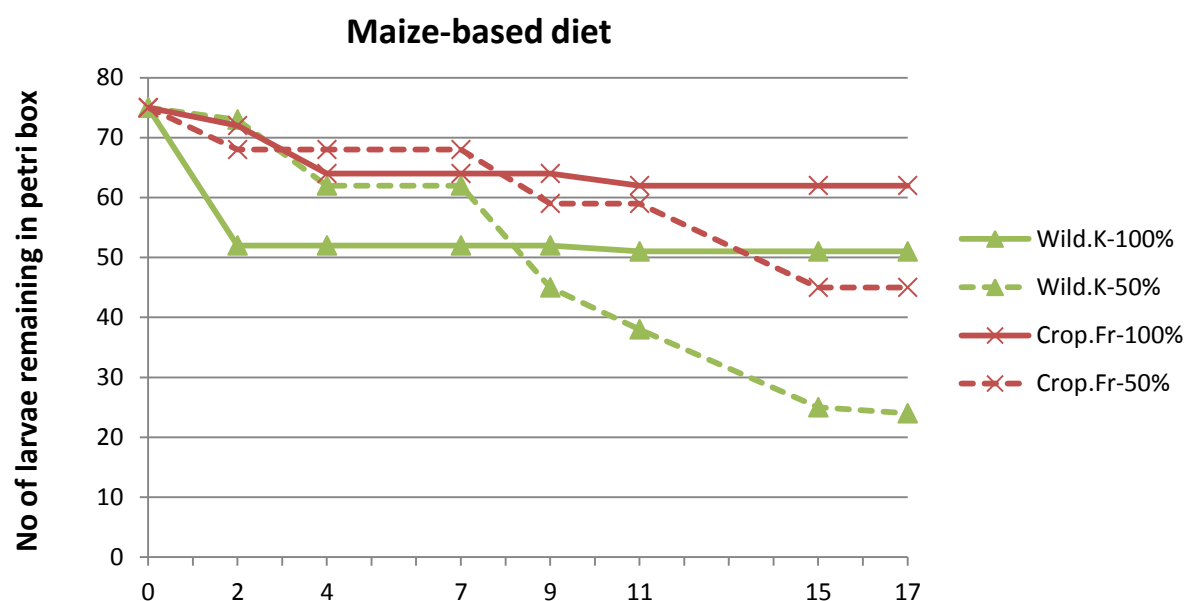


Figure 3. Escape rate of the crop and wild larvae in the well-fed and food deprived conditions on maize-based diet evaluated from the number of larvae remaining per petri dish. The wild larvae from Kenya (Wild.K) and the crop larvae from France (Crop.Fr) were respectively tested in a well-fed condition on standard diet (100%) and in a food deprived condition on diluted diet (50%) ($n = 75$ per population at the beginning of the test). The food deprived condition increased the escape rate in both populations (crop population: Student t-test, $t = 2.835$; $P < 0.015$; wild population: Student t-test, $t = 4.606$; $P < 0.001$). In the well-fed condition (100%), the escape rate of the crop and the wild population did not differ (Student t-test: $t = 0.164$; $P > 0.05$). In the food deprived condition (50%), the escape rate was higher in the wild population than in the crop population (Student t-test: $t = 2.607$; $P < 0.025$).

Table 3. Statistical analysis of the escape rate of the crop and wild larvae in the well-fed and food deprived conditions on maize-based diet.

On maize	Standard diet (100%)	Diluted diet (50%)	student
Wild Kenyane larvae	$R^2=0.339$; $P < 0.002$ Slope : -1.86 ± 0.37	$R^2=0.946$; $P < 0.0001$ Slope : -3.08 ± 0.18	$t = 4.606$; $P < 0.001$
Crop French larvae	$R^2=0.712$; $P < 0.0001$ Slope : -0.94 ± 0.12	$R^2=0.796$; $P < 0.0003$ Slope : -1.62 ± 0.23	$t = 2.835$; $P < 0.015$
Student	$t = 0.164$; $P > 0.05$	$t = 2.607$; $P < 0.025$	

- On the *Typha*-based diet, larvae behaved like on maize-based diet. An effect of the diet quality and an effect of the population in the food-deprived condition were observed on the tendency to leave the food patch (Table 4). The food-deprived condition increased significantly the escape rate in both populations, and it was higher in the wild than in the crop population. In the well-fed condition, the escape rate of the crop and the wild population did not differ.

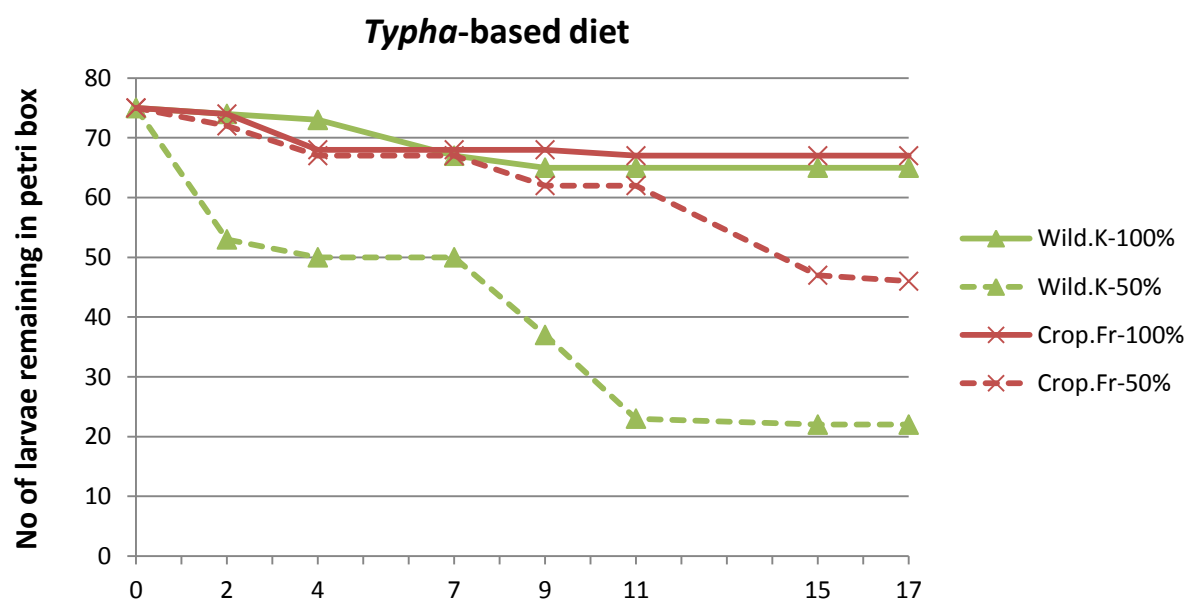


Figure 4. Escape rate of the crop and wild larvae in the well-fed and food deprived conditions on *Typha*-based diet evaluated from the number of larvae remaining per petri dish. The wild larvae from Kenya (Wild.K) and the crop larvae from France (Crop.Fr) were respectively tested in a well-fed condition on standard diet (100%) and in a food deprived condition on diluted diet (50%) ($n = 75$ per population at the beginning of the test). The food deprived condition increased the tendency the escape rate in both populations (crop population: Student t-test, $t = 3.5$; $P < 0.005$; wild population: Student t-test, $t = 4.798$; $P < 0.0005$). In the well-fed condition (100%), the escape rate of the crop and the wild population did not differ (Student t-test: $t = 0.92$; $P > 0.05$). In the food deprived condition (50%), the escape rate was higher in the wild population than in the crop population (Student t-test: $t = 2.321$; $P < 0.05$).

Table 4. Statistical analysis of the escape rate of the crop and wild larvae in the well-fed and food deprived conditions on *Typha*-based diet.

On <i>Typha</i>	Standard diet (100%)	Diluted diet (50%)	student
Wild Kenyane larvae	$R^2=0.806$; $P < 0.0001$ Slope : -0.718 ± 0.071	$R^2=0.872$; $P < 0.0001$ Slope : -3.73 ± 0.032	$t = 4.789$; $P < 0.0005$
Crop French larvae	$R^2=0.184$; $P < 0.01$ Slope : -0.61 ± 0.173	$R^2=0.885$; $P < 0.0001$ Slope : -1.56 ± 0.14	$t = 3.5$; $P < 0.005$
Student	$t = 0.92$; $P > 0.05$	$t = 2.321$; $P < 0.025$	

c.3. Foraging activity pattern are modulated by the diet quality in the natural populations and the homozygote strains

As behaviours are complex traits resulting of the interaction between genetic background and environmental condition, we studied here in detail the locomotor activity associated with the foraging behaviour in both nutritional conditions: well fed (standard diet) and food deprived (diluted diet at 50%), using maize-based diet.

- **Natural crop and wild populations** (figure 5A): By the study of the natural population, we showed an effect of the population origin and of the diet richness on the locomotor activity linked to foraging behaviour (GLM, $z = 21.747$, $P < 0.001$). Indeed, during the 2 days of the experiment, wild larvae moved more between the food patches than the crop ones in both nutritional conditions (GLM, $z = 4.049$, $P < 0.001$). In both populations, the food deprived condition induced an increase of the locomotor activity linked to foraging behaviour (GLM, $z = -4.489$, $P < 0.001$). Finally there was a significant interaction between the population and nutritional conditions (GLM, $z = 8.344$, $P < 0.001$).

- **Homozygote strains** (figure 5B): To investigate the role of the *foraging* gene in the expression of these behavioural differences, the *SnFor*^{Gly/Gly} and *SnFor*^{Ser/Ser} homozygotes strains were tested in the same actimeter device. Again, an effect of the diet richness and of the population origin was observed on the locomotor activity linked to foraging behaviour (GLM, $z = 11.135$, $P < 0.001$). the *SnFor*^{Ser/Ser} strains, which expressed the same *for* genotype than the wild population, moved more between food patches than the *SnFor*^{Gly/Gly} strains in both nutritional conditions (GLM, $z = 8.626$, $P < 0.001$). As observed in the natural populations, the locomotor activity linked to foraging behaviour increased with the reduction of the diet quality (GLM, $z = -7.473$, $P < 0.001$). No significant interaction was found between the genotype and nutritional conditions (GLM, $z = -0.517$, $P > 0.05$).

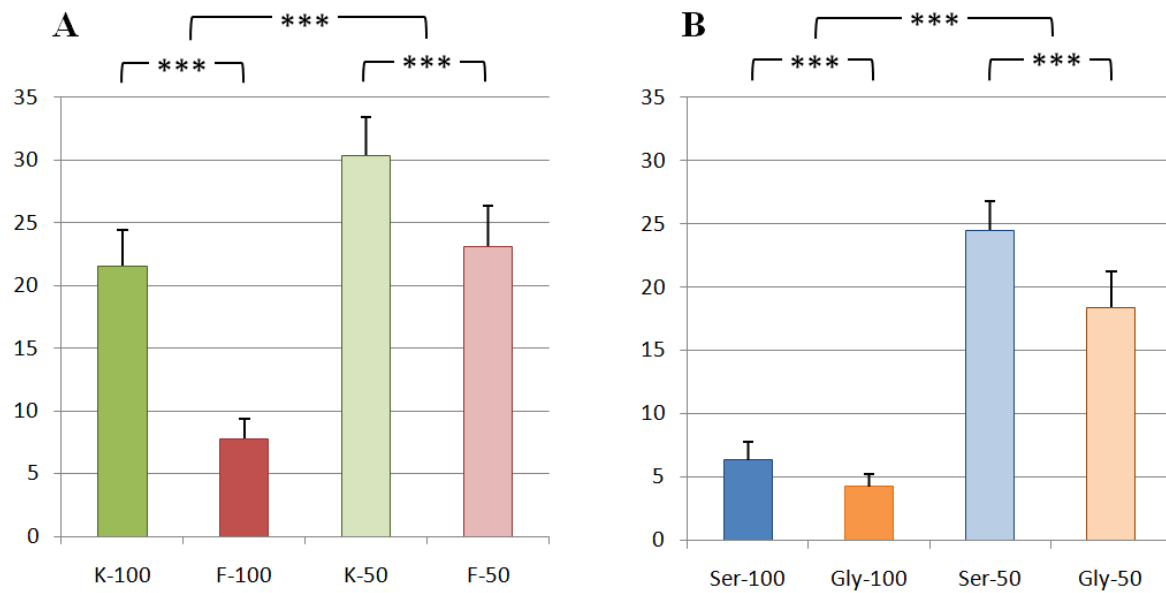


Figure 5. Tendency to leave a food patch (maize biased-diet), recorded in the actimeter. These graphics represent the average number of patch change recorded during 48 hours in a well-fed condition with standard maize diet (100), and in a food deprived condition (50). N = 32 per population tested. (A) Wild larvae (K) moved more between the food patches than the crop (F) ones in both nutritional conditions (GLM, $z = 4.049$, $P < 0.001$). In the crop population as in the wild population, the food deprived condition induced an increase of the locomotor activity linked to foraging behaviour (GLM, $z = -4.489$, $P < 0.001$). (B) *SnFor^{Ser/Ser}* strains (Ser) moved more between food patches than the *SnFor^{Gly/Gly}* strains (Gly) in both nutritional conditions (GLM, $z = 8.626$, $P < 0.001$). The locomotor activity increased with the reduction of the diet quality (GLM, $z = -7.473$, $P < 0.001$).

c.4. Levels of *Snfor* gene expression modulated by the diet quality and the population origin

As the level of *for* expression is known to have a major effect on the behaviour of several insect species, we compared the *Snfor* expression between the two *S. nonagrioides* natural populations and the two homozygote strains at the end of the behavioural testing in the actimeter (fourth-instar larvae).

- **Natural crop and wild populations** (figure 6A): In both natural populations, the food deprived condition decreased the *Snfor* expression (ANOVA, $F_{3, 118} = 69.954$, $P < 0.001$; multiple post-hoc comparisons using the Bonferroni correction: crop population: $P < 0.001$; wild population: $P < 0.001$). There was no significant difference between the populations in both well-fed and food deprived conditions (ANOVA, Bonferroni correction: well-fed condition: $P > 0.05$; food deprived condition: $P > 0.05$).

- **Homozygote strains** (figure 6B): In both homozygote strains, the food deprived condition decreased the *Snfor* expression (ANOVA, $F_{3, 120} = 92.273$, $P < 0.001$; multiple post-hoc

comparisons using the Bonferroni correction: crop population: $P < 0.001$; wild population: $P < 0.001$). There was no significant difference between the strains in both well-fed and food deprived conditions (ANOVA, Bonferroni correction: well-fed condition: $P > 0.05$; food deprived condition: $P > 0.05$).

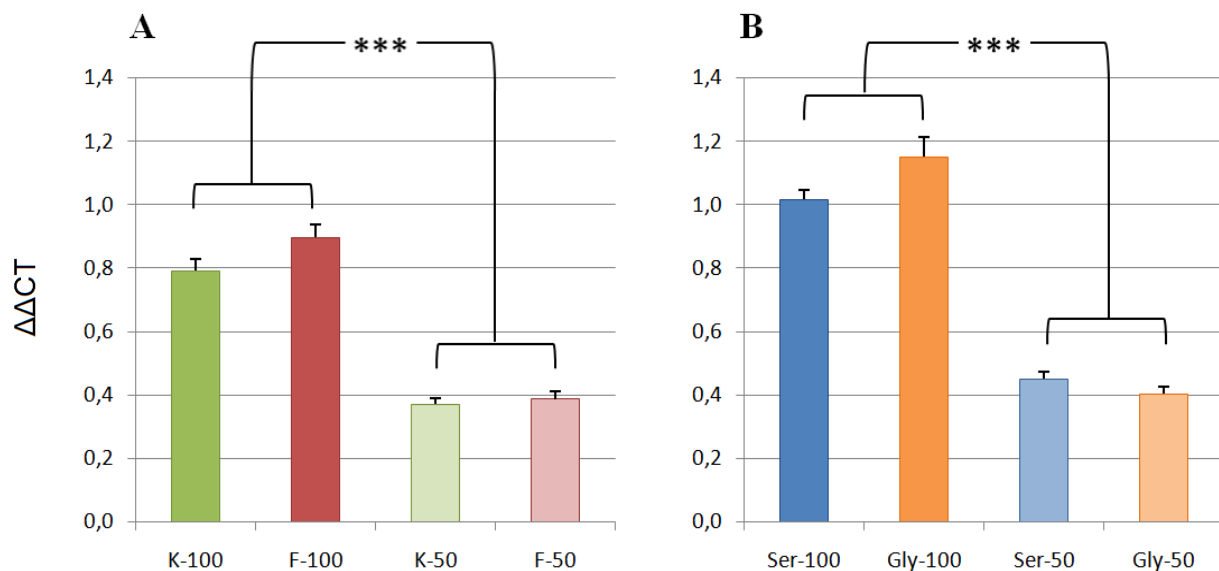


Figure 6. Differential *Snfor* expression between the fourth-instar larvae whole body extracts from the four populations of *Sesamia nonagrioides*. All the measures were made at the same time and were expressed in comparison to a group for which the average $\Delta\Delta CT$ was arbitrarily set to 1 (here, Ser-100). All populations were tested in a well-fed condition with standard diet (100), and in a food deprived condition (50). Well-fed groups : $n = 32$ for each population; Food deprived groups : $n_{Crop} = 30$, $n_{Wild} = 27$, $n_{Gly} = 32$, $n_{Ser} = 26$. (A) The food deprived condition decreased the *Snfor* expression in both natural populations (***: $P < 0.001$ calculated by ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons). There was no significant difference between the populations in both well-fed and food deprived conditions (ANOVA, $P > 0.05$). (B) The food deprived condition decreased the *Snfor* expression in both homozygote strains (ANOVA, ***: $P < 0.001$). There was no significant difference between the strains in both well-fed and food deprived conditions (ANOVA, $P > 0.05$).

c.5. Difference of fitness between the natural populations and the homozygote strains in laboratory rearing conditions

- **Larval survival and development:** The two *Snfor* homozygotes strains did not differ from their parental crop population but wild larvae have a lower survival rate than crop larvae and *Snfor* homozygotes strains under laboratory condition (figure 7; ANOVA, $F_{3, 454} = 12.928$, $P < 0.001$). These results suggest that the *foraging* gene does not seem to be directly involved in the larval survival rate on artificial rearing environment. When looking at the development time between hatching and pupation, there was no significant differences between the four

strains, with a larval development time of 33.2 ± 0.1 days (ANOVA, $F_{3, 456} = 0.239$, $P = 0.869$).

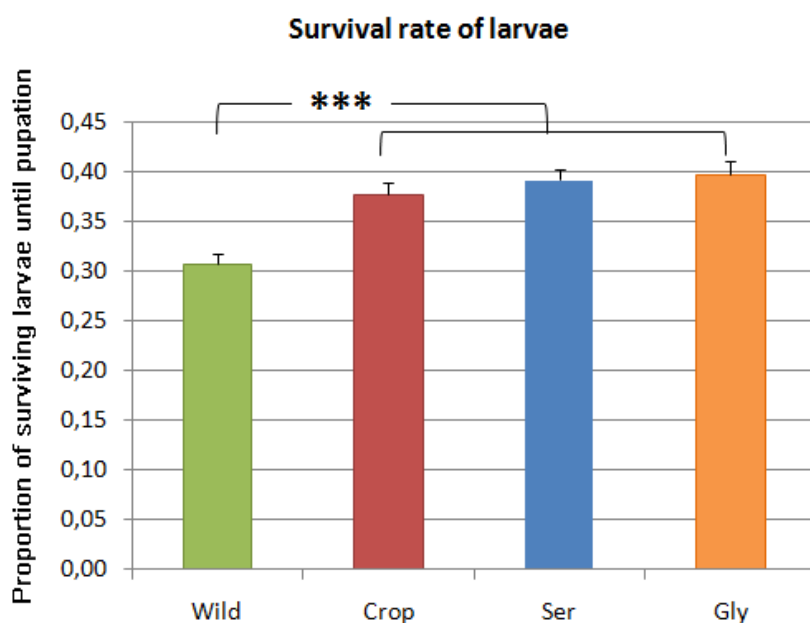


Figure 7. Larvae survival rate in percentage measured from the four populations in lab-rearing condition. Wild larvae had a lower survival rate than crop larvae. (ANOVA, ***: $P < 0.001$).

- **Fecundity:** The wild females produced a significant lower mass of fertilized eggs than the crop females, while the fertility of the two homozygotes strains did not differ from either natural populations (Kruskal-Wallis test, $K = 7.859$, 3 df, $P < 0.05$; post hoc Steel-Dwass-Critchlow-Fligner test: $P[\text{Wild, Crop}] < 0.05$; the other paired comparison had a $P < 0.5$) (figure 8).

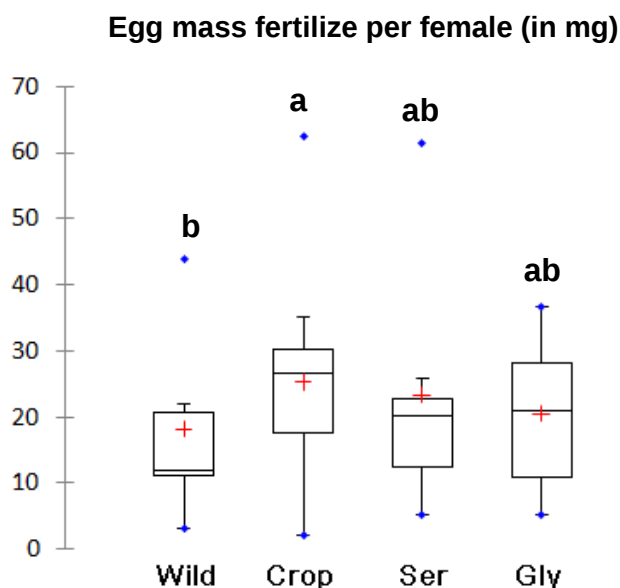


Figure 8. Fecundity rate (ratio between the mass of fertilized egg and the number of reproductive females in the cage). $n_{\text{Crop}} = 19$, $n_{\text{Wild}} = 20$, $n_{\text{Gly}} = 19$, $n_{\text{Ser}} = 18$. The wild females produced a significant lower mass of fertilized eggs than the crop females. The fertility of the homozygotes strains did not differ from either natural populations (Kruskal-Wallis test, $K = 7.859$, 3 df, $P < 0.05$; post hoc Steel-Dwass-Critchlow-Fligner test: $P[\text{Wild, Crop}] < 0.05$; the other paired comparison had a $P < 0.5$).

- **Sex-ratio:** natural population produced more males than females (respectively 61% and 56% of male in the wild and crop populations; Chi² test: d.f. = 3; $P < 0.001$), while the homozygotes *Snfor* produced an equivalent number of males and females.

d) Discussion

First we showed that a reduction of the diet richness induced a significant decrease of the growth rate in both populations from the wild and crop environment, regardless of the type of plant leaves used in the artificial diet (i. e. maize or *Typha*), but to a lesser extent in the crop population. Thus, this population seems to have a better tolerance to the lack of nutriment, as they showed a better development than the wild larvae. The diet type had however an influence on the growth rate when the larvae were reared in the well-fed nutritional condition. On the maize-based diet, the two natural populations did not differ, while the wild larvae had a better growth rate than the crop larvae on the *Typha*-based diet. Because the wild population was originally collected on *Typha* host-plants, this result could be understood as a better adaptation of the wild larvae to *Typha*. The higher fitness of this population on its natural food resources might also explain why the species is still preferentially found on *Typha* in Kenya in spite of the presence of cultivated *Poaceae* in the environment. These differences of growth rate could be due to several mechanisms such as a higher consumption rate (higher food preference for the *Typha* diet) or a better assimilation and storage of particular nutriments (metabolic rate) contained in *Typha* leaves. The last point seems unlikely in this experiment because of the low proportion of the *Typha* or maize leaves in the diet (13.2%), suggesting that the two diets have similar energetic value. However, these results could highlight a potential capacity of the wild larvae to use specific nutriments from the *Typha* plant with a probiotic effect. Dependency of phytophagous insects on specific plant molecules has been reported in many cases, reflecting plant-insect co-evolution, and in Noctuidae, the diversification of the specialist or oligophagous species correlated occurred together with the diversification of their host-plants through the evolution (Toussaint et al. 2012). The fact that the growth rate of the wild and crop populations on maize well-fed condition did not differ (no preferential adaptation), might be the consequence of the recent introduction of cultivated maize in Africa and Europe (16th century). However, these assumptions remain to be tested.

We then estimated the adaptive response to nutritional environment of the natural crop and wild populations by testing their tendency to disperse from plain or diluted diets, using both maize and *Typha*-based diets. In a general way, it was clear that the dispersion rate increased when the food resources were not sufficient to allow a development at a normal rate for both populations, regardless of the plant species used in the artificial diet. Kenyan larvae from the wild environment dispersed more from the diluted diets than French larvae. Put into perspective with the growth rate results, we could make a correlation between the higher growth rate and the lower escape rate of the crop population. If the larvae from this population are more likely to survive in the environment where the food is scarce, they may have a lesser need to search for a new food patch. By this way, they could avoid the extra cost of a higher foraging activity (energetic cost, predation, exposure to cold, to drought...). Inversely, the higher tendency to disperse of the wild population could be interpreted as an adaptive behaviour to cope with the exploitation of wild host-plants. Interestingly, the rover *D. melanogaster* variant which expresses a higher tendency to leave a food patch (Sokolowski 2001), is advantaged when the food resources are dispersed and scant, because they are more likely to discover new food patches (Sokolowski et al. 1997). Alternatively, the higher growth rate and the lower escape rate of the crop larvae in food deprived condition might be understood as an adaptive mechanism linked to the diapause phenomenon. Indeed, larvae living in paleartic regions have to go into diapause to survive to the cold season (Eizaguirre et al. 1998). Thus, by stocking more energy and by moving less, these individuals would be able to survive in this environment (unlike the Kenyan larvae which have not been observed diapausing, Le Rü comm. pers.).

The second experiment was designed to record the locomotor activity of the two natural populations and the two *Snfor* homozygote strains (founded from the polymorph crop population) of *S. nonagrioides* in response to different nutritional conditions. As expected from escape rates observed in the previous experiment, the moves between food patches are more numerous in the poor-food condition in all populations tested (naturals and homozygote strains). In both nutritional conditions, the crop population moved less between food patches than the wild population, confirming the observations made on plain maize diet by Chardonnet et al. (in prep). If the higher sedentary of the crop larvae is constant, we can identify that the range of their behavioural response to the nutritional conditions is higher than in wild larvae. Because the larvae from the wild population expressed already a high level of locomotor activity in the well feed condition, they proportionally increased less their

activity rate once in a food deprived condition than the crop larvae. This indicates that the crop population expressed a higher food-related plasticity in response to the environmental changes than the wild larvae. As these results seem to be contradictory with those obtained from the escape rate test, is it also possible that the actimeter device limits the behavioural response of the wild larvae. Because the wild larvae express a high basic level of locomotor activity and that escape behaviour is impossible in this apparatus, the wild larvae may not have had the possibility to express a more plastic response.

By using the *SnFor*^{Gly/Gly} and *SnFor*^{Ser/Ser} homozygotes strains, we were able to test a correlation between the *foraging* gene and the expression of different behavioural phenotypes. As both laboratory strains were made from the same geographical population (the French crop one), they allowed studying the effect of the *Snfor* alleles expressed in a close genetic background. In addition, since the wild larvae have only the *SnFor*^{Ser} allele (Chardonnet et al. in prep), they can be used to evaluate the effect of the genetic background relatively to *foraging* allele. Interestingly, we observed the same differences between the locomotor activity pattern of *SnFor*^{Gly/Gly} and *SnFor*^{Ser/Ser} than between the locomotor activity pattern of the crop and the wild population. Indeed, the *SnFor*^{Ser/Ser} larvae kept a higher locomotor activity than the *SnFor*^{Gly/Gly} ones in the well feed and food deprived conditions. These results indicate a correlation between the *Snfor* genotype and the level of foraging activity, confirming the results got by Chardonnet et al. (in prep). However, other genes are at play in the activity of *S. nonagrioides*, because both *for* allelic variants displayed behaviour close to the crop population they originated from, and larvae with the *Snfor*^{Ser/Ser} genotype were more active when they belonged to the wild population than to the homozygote strain derived from the crop population. No significant interaction was found between the genotype and the nutritional conditions.

To go deeper in our analysis of the *Snfor* gene involvement in the expression of specific foraging phenotype in response to environmental changes, we tested its expression level from the larvae tested in the actimeter device. The food deprived condition was clearly correlated with a drastic drop of the mRNA level in the four populations, and with a reduction of inter-individual variability. This important decrease of the *Snfor* expression may be the result of the higher locomotor activity, or the consequence of a physiological change in starving larvae. Such correlation between the nutritional condition and the *for* gene activity corresponds to results observed in *D. melanogaster* rover and sitter larvae which express reduced PKG

(whole body extract) in nutrient-poor environments (Kaun et al. 2007a). This similarity suggests that the function of the foraging gene in metabolism (glucose homeostasis, storage and use of metabolites) would be conserved in the moth. No variation of the *Snfor* expression level was noticed between the different populations of *S. nonagrioides*, so there was no evidence of an effect of the allelic variant or of the genetic background on the gene expression in the experimental environment, whereas rovers have higher PKG enzyme activity than sitters in nutrient-rich environments (Osborne et al. 1997; de Belle 1989), using the same dilution rate of the food to obtain a nutrient-poor environment. These results do not correspond to the previous analysis of the *Snfor* expression in *S. nonagrioides* (Chardonnet et al. in prep) where variability was found between these four populations. This apparent discrepancy could be explained by tissue-specific expression of the foraging gene because in the present study the RT-qPCR was made from the whole body of larvae, whereas Chardonnet et al. quantified variability in the level of expression of larval brains.

S. nonagrioides strains displayed differences in their investment in foraging activity which has an energetic cost and may be linked to predation risk. Life history tradeoffs being factors of the maintenance of inter individual variation within species (Roff 2002, Roff 2007, Biro & Stamps 2008), fitness traits of the four strains were estimated in the lab-rearing environment to investigate a possible relationship with their level of foraging activity, tolerance to reduced diet quality and genotype. The major result of this experiment was to highlight the higher larval survival rate and fecundity in the natural crop population compared to the wild one. In holometabola, the storage of energy assigned to the reproduction is entirely made during the larval stage; which is coherent with the correlation between larval survival rate and fecundity. These observations are coherent with the better development of the crop larvae versus wild larvae in food deprived condition shown in the first experiment. In this context, it could be assumed that individuals with higher growth or fecundity would consume or have a better assimilation of nutriment than those with lower productivity (Muller et al. 2006, Kaun et al. 2007a, Biro & Stamps 2006). Metabolism traits remain to be explored to understand how the crop population is more adapted to laboratory conditions and possibly to cultivated host-plant. For example, it has been shown in the *Drosophila melanogaster* model that rover larvae tend to eat less than sitter but express a better assimilation of nutriment. These higher metabolic performances associated with an increase of their consumption rate when the food resources are scarce, are fostering the survival of the rover individuals in food deprived conditions (Kaun et al. 2007, Kaun et al. 2008, Kent et al. 2009).

Here, we can make the highly speculative hypothesis that in laboratory conditions (where the food is abundant and the population density high), the more sedentary larvae adapted to the highly nutritive cultivated resource will expressed a more favourable foraging strategy (high growth rate and low locomotor activity saving energy) than the larvae from wild environment. Sedentarity in stemborer larvae may be also associated to better tolerance to the alteration of confined environment like increasing microbial contamination, associated toxins, accumulation of larval dejections, decreasing oxygen content. Lower fitness of the wild population in lab-rearing conditions may result either from its lower tolerance to diet alteration, which necessarily occurs during the 4-5 week larval development, or from the lack of specific nutriments naturally found in their original *Typha* host plant. Finally, the homozygote strains had the same larval survival rate as the crop population, and their female fecundity rate was intermediate compared to the natural populations, so there was no evidence for a correlation between these life history traits and the *foraging* gene.

The lower level of productivity noticed in the wild population compared to the crop one can be explained in two ways. Firstly, higher growth rate in *Typha* diet suggested that maize diet may lack important nutrients for the wild larvae. Secondly, a trade off might be selected between the acquisition and the storage of energy allowed by the food intake (life history traits), and the inevitably associated exposure to predators, desiccation and toxins (Kaun et al. 2007a). Foraging is an indispensable mechanism for the survival of individuals. Whereas this is an intuitive observation, it is less obvious to perceive the delicate balance of benefits and costs involved in the expression of an adaptive mechanism. In most of studied species, there is a positive correlation between the activity, the food intake rates and the productivity (i.e. growth and fecundity) (Biro & Stamps 2008). These observations do not fit with *S. nonagrioides* wild larvae having a higher foraging activity but a lower fitness in laboratory conditions. However, few exceptions have been reported. For example, in the codling moth *Cydia pomonella*, activity rates are negatively correlated to female productivity (Gu et al. 2006). These results are interpreted as the existence of a trade off between adult dispersal and fecundity, because the dispersing female move further, are smaller and produced a lower mass of fertilized eggs, whereas sedentary females are larger and more fecund. Such trade-off might exist between larval foraging activity and larval survival and fecundity in *S. nonagrioides*, and may explain why the wild population expresses an higher locomotor activity and a lower productivity than the crop population.

Acknowledgements

We are grateful to Gerphas Ogola (ICIZE, Nairobi, Kenya) for providing the biological material from Makindu and the ICIZE (Material Transfer Agreement IRD/ICIZE Kaiser/Le Ru). We thank F  rial Kaoula, Magalie Bonneau, and Sylvie Nortier for rearing the insects, Isabelle Clavereau and David Ogereau for their advice in qPCR. English language editing was done by Sharilynn Wardrop. This work was funded by the ANR (6th Extinction call, Adaptanthrop project coordinated by M. Harry) and by INRA (Department Santé des Plantes et Environnement), IRD, and CNRS. F. Chardonnet was funded by a grant from the Ecole Doctorale Diversité du Vivant, University of Paris 6 (UPMC).

d) References

- Ben-Shahar, Y., Robichon, A., Sokolowski, M.B. and Robinson G.E. (2002). Influence of gene action across different times scales on behavior. *Science* 296, 741-744.
- Ben-Shahar, Y., Leung, H.-T., Pak, W.L., Sokolowski, M.B. and Robinson G.E. (2003). cGMP-dependent changes in phototaxis: a possible role for the *foraging* gene in honey bee division of labor. *J. Exp. Biol.* 206, 2507-2515.
- Ben-Shahar, Y. (2005). The *foraging* gene, behavioral plasticity, and honeybee division of labor. *J. Comp. Physiol.* 1991, 987-994.
- Biro, P.A., and Stamps, J.A. (2008). Are animal personality traits linked to life-history productivity? *Trends in Ecology and Evolution*, 23(7), 361-368.
- Bradshaw AD (1965). Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Adv Genet* 13: 115–155.
- Burns, J.G., Svetec, N., Rowe, L., Mery, F., Dolan, M.J., W. Boyce, T., and Sokolowski, M.B. (2012). Gene–environment interplay in *Drosophila melanogaster*: Chronic food deprivation in early life affects adult exploratory and fitness traits. *PNAS Early Edition*, 1-6.
- Chardonnet, F., Martínez Takegami, P., Chouquet, B., Silvain, J.-F. and Kaiser, L. (2012). An actimeter system for automated recording of foraging activity in stem borer caterpillars. *Entomol. Exp. Appl.* 142, 175-180.
- Chardonnet, F., Capdevielle-Dulac, C., Chouquet, B., Joly, N., Harry, M., Le Ru, B., Silvain, J.-F. and Kaiser, L. (2013). Foraging behaviour of a *Lepidoptera* pest species modulated by a single gene polymorphism. *En preparation*.
- de Belle, J.S., Hilliker, A.J. and Sokolowski, M. B. (1989). Genetic localization of *foraging(for)*: a major gene for larval behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 123, 157-164.
- Engel, J. E., Xie, X.-J., Sokolowski, M. B. & Wu C.-F. 2000. A cGMP-dependent protein kinase gene, *foraging*, modifies habituation-like response decrement of the giant fiber escape circuit in *Drosophila*. *Learning Memory*, 7: 341-352.
- Eizaguirre, M., Prats, J., Abellana, M., Lopez, C., Llovera, M. & Canela, R. (1998). Juvenile hormone and diapause in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *Journal of Insect Physiology*. 44 (1998) 419–425.
- Falconer, D. S., and Mackay, T. F. C. (1996). Introduction to Quantitative Genetics, Ed. 4. Addison-Wesley Longman, Harlow, UK.
- Fitzpatrick, M.J. and Sokolowski, M.B. (2004). In search of food: exploring the evolutionary link between cGMP-dependent protein kinase (PKG) and behavior. *Integr. Comp. Biol.* 44, 28–36.

- Fitzpatrick, M.F., Feder, E., Rowe, Locke, and Sokolowski, M.B. (2007). Maintaining a behaviour polymorphism by frequency-dependent selection on a single gene. *Nature*, 447, 210-213.
- Freeman, A., Bowers, M., Vrailas Mortimer, A., Timmerman, C., Roux, S. Ramaswami, M. and Sanyal, S. (2010). A new genetic model of activity-induced Ras signaling dependent pre-synaptic plasticity in *Drosophila*. *Brain. Res.* 1326, 15–29.
- Fujiwara, M., Sengupta, P. and McIntire, S.L. (2002). Regulation of body size and behavioural state of *C. elegans* by sensory perception and the EGL-4 cGMPdependent protein kinase. *Neuron* 36, 1091–1102.
- Giacometti, R. (1995) Rearing of *Sesamia nonagrioides* Lefebvre on a meridic diet (Lepidoptera Noctuidae). *Redia*, LXXVIII, 1,19-27.
- Gillespie JH, Turelli M (1989) Genotype-environment interactions and the maintenance of polygenic variation. *Genetics* 121:129–138.
- Gordon, E, Cooper, N, Rennie, C, Hermens, D, Williams, L.M. (2005). Integrative neuroscience: The role of a standardized database. *Clin EEG Neurosci* 36:64–75.
- Graf, S. A. & Sokolowski, M. B. 1989. The rover/sitter *Drosophila* foraging polymorphism as a function of larval development, food patch quality and starvation. *Journal of Insect Behavior*, 2: 301–313.
- Gu, H. et al. (2006) Trade-off between mobility and fitness in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Ecol. Entomol.* 31, 68–74
- Gutteling, E.W., Riksen, J.A.G., Bakker, J. and Kammenga, J.E. (2007). Mapping phenotypic plasticity and genotype–environment interactions affecting life-history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Heredity* (2007) 98, 28–37.
- Hedrick PW (1986) Genetic polymorphism in heterogeneous environments: A decade later. *Annu Rev Ecol Syst* 17:535–566.
- Heylen, K., Gobin, B., Billen, J., Hua, T.-T., Arckens, L. and Huybrechts R. (2008). Amfor expression in the honeybee brain: A trigger mechanism for nurse–forager transition. *J. Insect. Physiol.* 54, 1400–1403.
- Hirsch, H.B.V., Possidente, D., Averill, S., Palmetto Despain, T., Buytkins, J. Thomas, V., Goebel, W.P., Shipp-Hilts, A., Wilson, D., Hollocher, K., et al. (2009). Variations at a quantitative trait locus (QTL) affect development of behavior in lead-exposed *Drosophila melanogaster*. *NeuroToxicology* 30, 305–311.
- Huang, Y., Howlett, E., Stern, C. and Jackson, F.R. (2009). Altered LARK expression perturbs development and physiology of the *Drosophila* PDF clock neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 41, 196–205.
- Ingram, K.K., Oefner, P. and Gordon, D.M. (2005). Task-specific expression of the *foraging* gene in harvester ants. *Mol. Ecol.* 14, 813-818.
- Ingram, K.K., Kleeman, L. and Peteru, S. (2011). Differential regulation of the *foraging* gene associated with task behaviors in harvester ants. *BMC Ecology*. 11(19), 1-9.
- Kaun, K.R., Riedl, C.A.L., Chakabarty-Chatterjee, M., Belay, A.T., Douglas, S.J., Gibbs, A.G. and Sokolowski, M.B. (2007a). Natural variation in food acquisition mediated via a *Drosophila* cGMPdependent protein kinase. *J. Exp. Biol.* 210, 3547-3558.
- Kaun, K. R., Hendel, T., Gerber, B. & Sokolowski, M. B. 2007b. Natural variation in *Drosophila* larval reward learning and memory due to a cGMP-dependent protein kinase. *Learning Memory*, 14: 342-349.
- Kaun, K.R, Chakabarty-Chatterjee, M. and Sokolowski, M.B. (2008). Natural variation in plasticity of glucose homeostasis and food intake. *J. Exp. Biol.* 211, 3160-3166.
- Kaun, K.R. and Sokolowski, M.B. (2009). CGMP-dependent protein kinase: linking foraging to energy homeostasis. *Genome* 52, 1-7.
- Kent, C. F., Daskal chuk, T., Cook, L., Sokolowski, M. B. & Greenspan, R. J. 2009. The *Drosophila* foraging gene mediates adult plasticity and gene-environment interactions in behavior, metabolites, and gene expression in response to food deprivation. *PLoS Genetics*, 5(8): 1-13.
- Lucas, C. & Sokolowski, M. B. (2009). Molecular basis for changes in behavioral state in ant social behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(15): 6351-6356.
- Lucas, C., Kornfein, R., Chakabarty-Chatterjee, M., Schonfeld, J., Geva, N., Sokolowski, M. B. and Ayali, A. (2010). The locust *foraging* gene. *Arch. Insect. Bioch.* 74 (1), 52–66.

- Mery, F., Belay, A.T., So, A.K.-C., Sokolowski, M.B. and Kawecki, T.J. (2007). Natural polymorphism affecting learning and memory in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(32), 13051-13055.
- Muller, R. and von Keyserlingk, M.A.G. (2006). Consistency of flight speed and its correlation to productivity and personality in *Bos Taurus* beef cattle. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 99, 193–204
- Nye I.W.R. (1960). The insect pests of graminaceous crops in East Africa. *Colonial Research Studies* 31: 1-48.
- Ong'amo G.O., Le Ru B., Calatayud P.-A., Ogot C.K.P.O. and Silvain J.F. (2013) Composition of stem borer communities in selected vegetation mosaics in Kenya, *Arthropod-Plant Interactions*. In press.
- Onyango, F.O. and Ochieng'-Odero, J.P.R. (1994) Continuous rearing of the maize stem borer *Busseola fusca* on an artificial diet. *Entomol. Exp. Appl.* 73, 139-144.
- Osborne, K. A., Robichon, A., Burgess, E., Butland, S., Shaw, R. A., Coulthard, A., Pereira, H. S., Greenspan, R. J. & Sokolowski, M. B. (1997). Natural behavior polymorphism due to a cGMP-dependent protein kinase of *Drosophila*. *Science*, 277: 834-836.
- Pereira, H. S. & Sokolowski, M. B. 1993. Mutations in the larval foraging gene affect adult locomotory behavior after feeding in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 5044-5046.
- Roff, D.A. (2002) *Life History Evolution*, Sinauer
- Roff, D.A. and Fairbairn, D.J. (2007) The evolution of trade-offs: where are we? *J. Evol. Biol.* 20, 433–447
- Rousseau, D. (2009) Maïs : la sésamie progresse cap au nord, dans l'air marin et la douceur angevine. *Phytoma, la Défense des Végétaux* 622–23: 38–41.
- Sambandan, D., Carbone, M.A., Anholt, R.R.H., and Mackay, T.F.C. (2008). Phenotypic Plasticity and Genotype by Environment Interaction for Olfactory Behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 179: 1079–1088.
- Scheiner, R., Sokolowski, M.B. and Erber, J. (2004). Activity of cGMP-dependent protein kinase (PKG) affects sucrose responsiveness and habituation in *Drosophila melanogaster*. *Learning Memory* 11, 303-311.
- Schoonhoven, L.M., Jermy, T. and Van Loon, J.J.A. (1998). *Insect-Plant Biology* (London: Chapman and Hall), pp.121-154.
- Sih, A., Bell, A & Johnson, J.C. (2006). Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 19(7), 372-378.
- Sokolowski, M. B. (1980). Foraging strategies of *Drosophila melanogaster*: a chromosomal analysis. *Behavior Genetics*. 10: 291-302.
- Sokolowski, M.B., Pereira, H.S. and Hughes, K. (1997). Evolution of foraging behavior in *Drosophila* by density-dependent selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 7373-7377.
- Sokolowski, M.B. (2001). *Drosophila*: genetics meets behavior. *Nat. Rev. Genet.* 2, 879-890.
- Tobback, J., Mommaerts, V., Vandersmissen, H.P., Smagghe, G. and Huybrechts, R. (2011). Age- and task-dependent *foraging* gene expression in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Arch. Insect. Biochem.* 76(1), 30-42.
- Zar, Z. H. (1999). *Biostatistical Analysis, Fourth Edition* (Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall).

3/ Explorations complémentaires

Les résultats obtenus dans cette étude n'ont pu mettre en évidence l'existence d'une GEI, émergeant de la modulation conjointe des réponses comportementales et physiologiques par le génotype *Snfor* et l'environnement nutritionnel, et la question des mécanismes associés au maintien du polymorphisme de ce gène reste ouverte. De nombreux facteurs modulant la valeur adaptative des différents variants en fonction de l'environnement pourraient en effet permettre de maintenir la diversité génétique au sein d'une population naturelle (voir Partie 1, III - 2/ Pressions de sélection associées au maintien du polymorphisme, pp 53-60 de ce manuscrit). Différentes hypothèses seront ainsi abordées dans cette partie afin de discuter des mécanismes du maintien du polymorphisme du gène *Snfor* dans les populations naturelles de *S. nonagrioides*.

a) Traits d'histoire de vie et fitness des individus selon la ressource exploitée

Si les différences écologiques existantes entre la population sauvage et la population ravageuse de *S. nonagrioides* impliquent nécessairement des pressions de sélection différentes, les mécanismes impliqués dans la variation des fréquences alléliques du gène *Snfor* demeurent encore incertains. Chez la drosophile *D. melanogaster*, le polymorphisme du gène *for* est compris comme un facteur du maintien de l'espèce dans un environnement variable (Sokolowski et al. 1997). Par exemple, chez cette espèce le gène *for* est impliqué dans les capacités d'assimilation et de stockage des métabolites (Kaun et al. 2007, Kaun et al. 2008, Kent et al. 2009), modulant la fitness des individus en fonction de la disponibilité des ressources alimentaires. Dans un contexte de privation alimentaire, nous avons montré que les chenilles de *S. nonagrioides* issues du milieu cultivé se développent mieux que les individus de la population sauvage. De même, ces individus ravageurs présentent un meilleur taux de survie larvaire et une meilleure fécondité dans des conditions d'élevage en laboratoire. Il serait intéressant de compléter ces données par d'autres mesures telles que le poids des chrysalides (estimation d'une possible corrélation entre la taille des adultes, le taux de fécondité, et les distances de déplacement). Le calcul du taux d'accroissement brut de la population R_0 ($R_0 = l_x m_x$, où l_x correspond au taux de survie jusqu'au stade adulte, et m_x au nombre d'œufs produits par individu survivant) permettrait d'obtenir des informations

intéressantes sur l'accroissement et la fitness globale d'une population dans un environnement spécifique.

Le meilleur développement des larves issues des champs de maïs, mesuré à partir de différents traits, pourrait expliquer pourquoi ces individus tendent à moins se déplacer. Survivant plus facilement avec peu de ressources alimentaires, il leur serait moins nécessaire de se déplacer, améliorant de ce fait leur fitness en économisant l'énergie de la locomotion et en limitant leur exposition aux prédateurs et à des conditions abiotiques adverse. A l'inverse, les larves issues du milieu sauvage auraient d'avantage tendance à changer de site de nourriture afin de trouver de nouvelles ressources alimentaires nécessaires à leur développement. Le gène *Snfor* étant associé au niveau de recherche alimentaire chez cette espèce, il conviendrait de tester l'implication de ce gène dans les performances métaboliques des différents variants. Afin d'appréhender un tel mécanisme dans un contexte écologique, une étude de la valeur énergétique des différentes plante-hôtes de l'espèce (*Poaceae*, *Typhaceae*...) permettrait de discuter du maintien du polymorphisme du gène *Snfor* en tant que facteur d'adaptation de l'espèce à des ressources alimentaires différentes.

Par ailleurs nous avons montré une influence importante du background génétique et de la richesse du milieu alimentaire sur le déplacement des larves, indiquant que d'autres gènes interviennent dans ce comportement. Une comparaison du transcriptome est en cours sur les organes sensoriels larvaires et adultes des deux populations et pourra indiquer d'autres familles de gènes différenciellement exprimées entre populations

b) Rôle de la sélection sexuelle

La sélection sexuelle, définie par Charles Darwin en 1871 dans son livre *La descendance de l'Homme et la sélection sexuelle*, se divise en deux mécanismes majeurs : la sélection intra-sexuelle (compétition entre males pour l'accès aux femelles) et la sélection inter-sexuelle (choix du partenaire sexuel par les femelles). La sélection sexuelle peut ainsi être comprise comme une lutte entre les individus d'une même espèce pour la reproduction afin d'assurer leur participation génétique à la génération suivante. En interaction avec la sélection naturelle, la sélection sexuelle peut constituer un facteur du maintien du polymorphisme au sein d'une espèce. Par exemple chez le grillon *Gryllus integer*, deux stratégies d'accouplement alternatives coexistent chez les mâles de cette espèce (Cade 1979). Certains individus

émettent un appel sexuel sonore (stridulation) afin d'attirer les femelles réceptives à la reproduction, tandis que d'autres restent silencieux et « interceptent » les femelles s'approchant des mâles stridulant. La sélection préférentielle des femelles pour les mâles chanteurs devrait, sous l'effet de la sélection sexuelle, entraîner une extinction de la stratégie « silencieuse » dans les populations. Cependant, les signaux acoustiques émis par les mâles chanteurs sont également utilisés par les femelles du parasitoïde *Ormia ochracea* pour localiser leurs hôtes potentiels. Ce parasitisme étant létal, les mâles silencieux sont alors favorisés dans un environnement où le parasitoïde est présent en dépit de leur plus faible compétitivité sexuelle. Ainsi, la relation dynamique entre les pressions de sélection associées à la sélection naturelle et sexuelle permet le maintien des deux phénotypes au sein de l'espèce.

Pour estimer si la sélection sexuelle constitue un facteur du maintien des deux variants alléliques du gène *Snfor* dans les populations naturelles de *S. nonagrioides*, nous avons testé si la sélection du partenaire sexuel chez cette espèce pouvait être corrélée avec le génotype *Snfor* des imagos. Pour ce faire, nous avons employé les souches homozygotes *SnFor*^{Ser/Ser} et *SnFor*^{Gly/Gly}, fondées à partir de la population polymorphe française originellement récoltée en champ de maïs. Chez *S. nonagrioides* comme chez les autres noctuelles, l'accouplement se déroule uniquement durant la scotophase, et préférentiellement durant la deuxième partie de la nuit ainsi qu'à l'aube (Sreng 1984). Dès la première nuit suivant l'émergence, la femelle émet un appel sexuel phéromonal permettant d'attirer le mâle à distance (Lopez et al. 2003). L'accouplement est maintenu en position « tête-bêche » et dure plus de 45 minutes, facilitant les observations comportementales. De la deuxième à la sixième nuit après l'accouplement, la femelle pond plusieurs centaines d'œufs (environ 300) au niveau de la face interne de la gaine foliaire de la plante hôte (Ateyim et al. 2005).

Afin de pouvoir observer ces comportements nocturnes en laboratoire durant la journée, la photopériode des enceintes climatisées utilisées pour cette expérience a été inversée. Pour chacune des souches *SnFor*^{Ser/Ser} et *SnFor*^{Gly/Gly}, les chrysalides ont été triées et isolées par sexe jusqu'à l'émergence afin de pouvoir former des cages d'accouplement contenant un nombre d'individus de chaque sexe et de chaque génotype *Snfor* connus (non distinguables visuellement). La présence de tiges de papier sulfurisé dans les cages, reproduisant artificiellement les tiges des plantes hôtes naturelles, permet l'expression des comportements d'appel sexuel, de parade, et d'accouplement. Pour que le choix du partenaire sexuel ne soit

pas influencé par la disponibilité des individus des deux génotypes, un nombre égal d'individus de chaque souche et de chaque sexe ont été introduits dans la cage ($n \text{ ♂ } SnFor^{Gly/Gly} = n \text{ ♀ } SnFor^{Gly/Gly} = n \text{ ♂ } SnFor^{Ser/Ser} = n \text{ ♀ } SnFor^{Ser/Ser}$). L'accouplement durant plus de trois quarts d'heure chez cette noctuelle, les cages ont été observées (scannées) toutes les 45 minutes à partir du début de la scotophase. Les couples formés ont été récupérés et isolés du reste de la cage en lumière rouge artificielle (lampe torche recouverte d'un filtre monochrome), cette longueur d'onde n'étant pas ou peu perçue par les insectes. Les papillons récupérés ont été immédiatement euthanasiés au froid (-80°C), puis conservés en alcool. L'identification du génotype *Snfor* des deux individus formant le couple a été réalisée via la technique ARMS (Amplification Refractory Mutation System). Cette technique est basée sur l'amplification spécifique de l'allèle porteur du point de mutation et de sa mise en évidence par rapport à l'allèle non muté par la longueur de l'amplification générée (Harry 2008, voir détail de la méthode dans les articles 2 et 3 présentés dans ce manuscrit).

Suivant ce protocole, 22 couples ont été récupérés à partir de 9 cages d'accouplement formées. Les résultats, indiqués dans le tableau 5, n'ont pas révélé de sélection préférentielle des partenaires sexuels significative en fonction de l'allèle *Snfor* porté par les individus ($\chi^2 : 1 \text{ ddl}, P > 0,05$). Cependant, les faibles effectifs obtenus durant cette expérience interrompue faute de temps diminuent fortement la puissance des tests statistiques employés et suggèrent de rester prudent quant aux interprétations réalisées. En effet, l'analyse des fréquences des différents croisements possibles entre les mâles et les femelles des souches *SnFor*^{Ser/Ser} et *SnFor*^{Gly/Gly}, semble indiquer une préférence des femelles pour les mâles de leur propre souche. Une éventuelle homogamie associée au gène *Snfor* pourrait exister et ainsi constituer un facteur explicatif des différentes fréquences alléliques de ce gène chez *S. nonagrioides*. Des analyses complémentaires sont toutefois nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement fiables et permettre de conclure sur ce phénomène. De plus, les caractères sexuels secondaires utilisés par les adultes de cette espèce sont actuellement inconnus. Il nous est donc impossible de déterminer si les critères de sélection du partenaire sexuel peuvent être influencés par les différents variants alléliques du gène *Snfor*.

Tableau 5. Fréquence des différents types d'appariement obtenus lors d'un test de sélection sexuelle entre individus mâles et femelles des souches *SnFor*^{Ser/Ser} et *SnFor*^{Gly/Gly}.

	Ser ♂	Gly ♂
Ser ♀	23.8%	28.6%
Gly ♀	14.3%	33.3%

c) Valeur des hétérozygotes

α. Supériorité (surdominance) des hétérozygotes

Une surdominance (ou supériorité) des hétérozygotes d'une population est identifiée lorsque les individus hybrides présentent une valeur sélective supérieure à celle des deux homozygotes de la souche parentale. La plus grande viabilité des hétérozygotes dans un environnement donné est associée, d'une part, à une plus grande capacité d'adaptation des individus face aux variations environnementales (meilleure fitness), et d'autre part, aux mécanismes d'inhibition de l'expression des allèles délétères récessifs. Dans le deuxième cas, bien que l'individu hétérozygote porteur de l'allèle délétère ne soit pas atteint, il pourra toutefois transmettre la maladie à ses descendants. Un exemple bien connu est celui de l'anémie falciforme (la drépanocytose). Chez l'être humain, il existe deux allèles codant pour la chaîne β de l'hémoglobine : $Hb\beta^A$ (l'allèle normal) et $Hb\beta^S$ (l'allèle mutant chez lequel la substitution d'un acide aminé provoque l'anémie falciforme). Les individus $Hb\beta^{S/S}$ sont ainsi profondément anémiés en raison d'une altération de la structure de l'hémoglobine. Cette maladie est particulièrement fréquente dans les populations d'origine africaine subsaharienne, du Moyen-Orient, des Antilles, d'Inde, et du bassin méditerranéen. Cette distribution est corrélée avec celle d'une autre maladie, le paludisme, provoqué par le parasite *Plasmodium falciparum* transmis par la piqûre des moustiques femelles du genre *Anopheles*. Les personnes hétérozygotes $Hb\beta^{A/S}$ porteuses saines ou homozygotes $Hb\beta^{S/S}$ atteintes de la drépanocytose étant résistantes au paludisme, la sélection naturelle explique l'augmentation de l'allèle $Hb\beta^S$ dans les populations touchées par le paludisme telles qu'en Afrique. Cet exemple illustre parfaitement l'importance du polymorphisme dans l'adaptation des populations au milieu. Cependant, malgré l'apparente puissance de la surdominance en tant que facteur du maintien du polymorphisme dans les populations naturelles, elle n'a été mise en évidence que dans peu de cas.

β. L'infériorité des hétérozygotes

L'infériorité des hétérozygotes d'une population est identifiée lorsque les individus hybrides présentent une valeur sélective inférieure à celle des deux homozygotes de la souche parentale. Elle réfère donc à la situation inverse de la surdominance. Dans ce cas particulier, la fréquence des hétérozygotes dépend de la fréquence initiale de l'allèle, si elle est supérieure ou inférieure à la fréquence d'équilibre.

A la lumière de ces connaissances, une perspective intéressante serait de réaliser une série de croisements entre les individus des lignées homozygotes (mais aussi entre ceux des populations naturelles) afin d'estimer la part génétique de la variance des caractères observés. Chez la drosophile *D. melanogaster*, il existe une dominance de l'allèle *rover* sur l'allèle *sitter* (de Belle et al. 1989). Chez *S. nonagrioides*, nous avons pu montrer que les individus hétérozygotes *SnFor*^{Ser/Gly} de la population polymorphe française exprimaient un niveau d'activité locomotrice intermédiaire à celui des deux variants homozygotes *SnFor*^{Gly/Gly} et *SnFor*^{Ser/Ser}. Ces données suggèrent une éventuelle codominance des allèles du gène *Snfor* chez cette espèce, bien qu'une étude appropriée soit indispensable à l'établissement d'une conclusion fiable.

d) Rôle de la consanguinité et de la dérive

α. La consanguinité

Un certain nombre de facteurs influencent les fréquences alléliques d'un gène tels que les types de croisement (consanguinité) et différentes forces évolutives (la dérive génétique, la mutation, la migration et la sélection). La consanguinité, qui résulte d'un croisement entre deux individus apparentés, a pour conséquence principale une diminution des hétérozygotes au sein de la population. Au cours du temps, la fixation de certains allèles entraînera une perte de la diversité génétique de façon plus ou moins rapide selon le degré de consanguinité des individus. Cette diminution de l'hétérozygotie pour un locus peut également être observée dans le cas plus général de l'homogamie, qui réfère aux croisements entre individus se ressemblant pour un caractère donné (n'implique pas nécessairement un phénomène de consanguinité). Il est probable qu'une faible consanguinité participe au taux assez élevé d'hétérozygotes chez *S. nonagrioides* (entre 43 et 51% dans la population française). D'une part des réductions accidentelles du nombre de reproducteurs en élevage entraînent une baisse de fertilité des œufs, comme cela a pu être observé chez d'autres espèces de Lépidoptères en

élevage, laissant supposer une faible tolérance à la consanguinité. D'autre part l'étude de Naino-Jika et al. révèle par le génotypage de marqueurs microsatellites que la majorité des chenilles collectées soit au sein d'une même parcelle de maïs soit dans un rayon de quelques kilomètres ont un degré d'apparentement nul.

β. La dérive génétique

En l'absence de flux de gènes, la dérive génétique est une force principale pouvant à long terme conduire à une différenciation génétique des populations. La dérive génétique, qui correspond à la fluctuation aléatoire des fréquences alléliques dans les populations de taille finie et généralement réduite, est un facteur supplémentaire impliqué dans la diminution de la variabilité génétique. La fluctuation des différents allèles dans ce type de population s'effectue de manière aléatoire et est indépendante d'une adaptation de la population à un environnement donné. La dérive génétique constitue un facteur essentiel dans le cas de goulot d'étranglement, où l'effectif de la population se voit diminuer. De même, lors de la colonisation d'un nouvel habitat par une espèce, l'effectif initial de la population nouvellement implantée est initialement faible et donc porteur d'un échantillon restreint de la diversité génétique de l'espèce. Ce phénomène, favorisant l'action de la dérive génétique, est nommé « l'effet fondateur ». Cet effet est observé dans la population paléartique de la sésamie qui présente une moindre variabilité génétique qu'en Afrique, son continent d'origine (marqueurs microsatellites et COI, Naino-Jika et al. en préparation). Bien que pour le gène *foraging* nous n'ayons identifié que deux variants alléliques présents tant en Europe qu'en Afrique, il est possible que d'autres variants alléliques existent en Afrique, mais n'aient pas été détectés par la méthode ARMS qui limite le génotypage à une portion réduite de l'ADN portant le SNP correspondant aux allèles sérine et glycine étudiés.

DISCUSSION GENERALE

I - Synthèse des résultats

1/ Conservation de la structure du gène *for* chez un Lépidoptère

Dans cette étude, nous avons démontré pour la première fois la conservation de la séquence et de la structure des différents domaines du gène *foraging* chez un Lépidoptère ravageur de culture. Cette forte conservation parmi les lépidoptères est illustrée par taux d'identité génétique (homologie) entre les différents orthologues de plus de 85% (figure 42). Chez *Sesamia nonagrioides*, l'orthologue du gène *for* nommé *Snfor* mesure 2235 paires de bases encodant 775 acides aminés. Deux allèles ont été identifiés, *SnFor^{Gly}* et *SnFor^{Ser}*, résultant d'une mutation non-synonyme au niveau du site actif de l'enzyme. La fréquence des différents variants de *Snfor* varie en fonction de la population étudiée. Dans la population collectée en Afrique de l'Est sur plante-hôte *Typha* (milieu sauvage), les individus sont strictement homozygotes *SnFor^{Ser/Ser}*. La population française issue des cultures de maïs (milieu cultivé), est quant à elle polymorphe et présente les 3 génotypes connus du gène (*SnFor^{Ser/Ser}*, *SnFor^{Gly/Gly}*, et *SnFor^{Ser/Gly}*) avec une prédominance de l'allèle *SnFor^{Gly}* (63%).

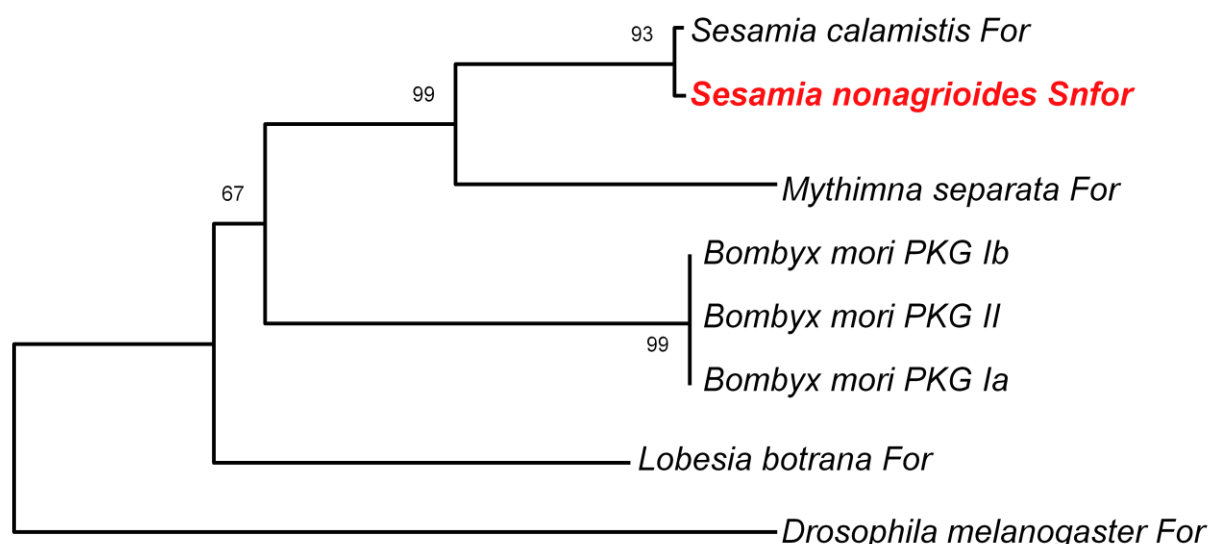


Figure 42. Analyse phylogénétique des séquences de la PKG chez différents lépidoptères (d'après Chouquet com. Pers.).

2/ Conservation de la fonction du gène *for* chez un Lépidoptère

a) Identification des phénotypes comportementaux des populations naturelles

Un avancement essentiel de nos recherches a été de développer la première méthode d'analyse des comportements locomoteurs associés à l'alimentation adaptée à des larves de sésamies. « L'actimètre » présente plusieurs avantages majeurs : il permet un enregistrement automatique, continu, simultané, et sur le long terme des déplacements individuels. Cette méthode est ainsi particulièrement adaptée à l'enregistrement sur une longue période de comportements peu fréquents et sur un grand nombre d'individus. De plus, la structure confinée du dispositif, associée à la possibilité qu'ont les chenilles d'exprimer un comportement de forage, permet d'utiliser cette méthode pour tester de façon pertinente l'influence des conditions nutritionnelles sur les larves de *S. nonagrioides*.

Chez cette espèce, deux phénotypes comportementaux distincts ont été identifiés en corrélation avec l'origine écologique des insectes. Les larves issues de la population collectée sur plantes sauvages (*Typha*) à l'Est du Kenya changent plus souvent de site alimentaire que les chenilles provenant des champs de maïs français. Ces variations dans le niveau d'activité locomotrice ne s'observent pas en absence de nourriture, indiquant des capacités motrices identiques entre les individus des deux populations et la nécessité d'un contexte alimentaire pour permettre l'expression de ces différences comportementales. En présence de nourriture, cette plus forte activité des larves issues du milieu sauvage n'était pas due à un évitement du milieu artificiel réalisé à base de feuilles maïs, car aucune préférence alimentaire pour un milieu artificiel maïs ou *Typha* n'a été détecté en actimètre en condition de choix. Etant donné l'influence de la plante rentrant dans la composition du milieu nutritif sur la croissance des chenilles, il conviendra toutefois de mieux appréhender cette influence sur le phénotype comportemental, en comparant l'activité locomotrice des chenilles observée en présence de milieu maïs, à celle observable en présence de milieu *Typha*, en l'absence de choix.

b) Etablissement du lien causal entre le gène Snfor et les phénotypes comportementaux

α. Approche pharmacologique

Une étape primordiale dans cette étude consistait à identifier un lien causal entre la variabilité génétique du gène *Snfor* et les phénotypes comportementaux exprimés par les chenilles de *S. nonagrioides*. À partir d'une approche pharmacologique, nous avons démontré qu'une augmentation artificielle de l'activité PKG par un traitement à la GMPc, permettait d'augmenter l'activité locomotrice des larves issues de la population française (les plus sédentaires). En revanche un traitement avec un analogue de l'AMPc endogène n'eut aucun effet significatif sur les niveaux d'activité locomotrice des individus. Ces résultats indiquent qu'une activation potentielle de PKA par un traitement à la cGMP (éventuellement possible lorsque la cGMP est présente en grande concentration au niveau intracellulaire) n'aurait pas eu d'effet significatif sur l'augmentation de l'activité de recherche alimentaire observée. Ainsi, il existerait un lien causal entre les phénotypes comportementaux et l'enzyme codée par le gène *Snfor*.

β. Corrélation gène comportement

Cette conservation de la fonction du gène *for* fut confirmée par l'étude des caractéristiques comportementales des différents génotypes de la population française. De façon avantageuse, ce polymorphisme permet en partie de s'affranchir des problèmes inhérents à la différence d'origine géographique rencontrés lors de la comparaison des populations Kenyane et Française. Les larves homozygotes *SnFor*^{Ser/Ser} avaient davantage tendance à quitter un site alimentaire que les chenilles homozygotes *SnFor*^{Gly/Gly}, tandis que les individus hétérozygotes *SnFor*^{Ser/Gly} exprimaient un niveau d'activité locomotrice intermédiaire à celui des deux morphes homozygotes. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'un lien causal entre les phénotypes comportementaux et l'enzyme codée par le gène *for*. Toutefois, les individus *SnFor*^{Ser/Ser} n'ont pas atteint des niveaux d'activité locomotrice aussi élevés que ceux exprimés par les larves de la population sauvage. Bien que le gène *Snfor* semble être clairement impliqué dans la régulation des comportements recherche alimentaire de *S. nonagrioides*, d'autres facteurs interviendraient dans l'expression des différences observées entre les deux populations naturelles de cette espèce.

c) Niveau d'expression du gène et niveau d'activité enzymatique

Afin de tester les niveaux d'expression du gène *Snfor* chez *S. nonagrioides*, nous avons réalisé des expériences de qPCR en temps réel sur des individus d'élevage issus des deux populations naturelles de cette espèce (française et kenyane), ainsi que sur les lignées homozygotes *SnFor*^{Ser/Ser} et *SnFor*^{Gly/Gly} fondées à partir de la population polymorphe française (champs de maïs). Ces mesures ont été effectuées à partir d'animaux entiers testés individuellement, ou à partir de cerveaux disséqués et poolés par groupe de 8. Nous avons mis en évidence un niveau d'expression du gène *Snfor* significativement supérieur chez les individus de la souche homozygote *SnFor*^{Ser/Ser} comparés aux individus *SnFor*^{Gly/Gly}, quelque soit la méthode d'extraction employée (larves entières ou cerveaux). Associés aux données comportementales obtenues en actimètre sur ces lignées, ces résultats suggèrent l'existence d'une corrélation positive entre les niveaux d'activité locomotrice et les niveaux d'expression du gène. Cependant, les résultats obtenus à partir des populations naturelles de *S. nonagrioides* divergent et ne permettent pas de conclure sur le lien existant entre le niveau d'expression du gène et les niveaux de recherche alimentaire. Premièrement, aucune différence significative n'a été observée entre ces populations à partir des extractions d'ARN réalisées sur les corps entiers des larves. Deuxièmement, les niveaux d'expression du gène *Snfor* étaient supérieurs dans le cerveau de chenilles de la population française comparés à ceux de la population kényane. Au vue des résultats obtenus à partir des lignées homozygotes, le pattern inverse était attendu. De plus, les larves sauvages avaient un niveau d'expression inférieur à celui des larves *SnFor*^{Ser/Ser} pour les deux types d'extrait (corps entiers et cerveaux), malgré leur génotype *Snfor* identique.

De nombreux facteurs peuvent être impliqués dans le manque de cohérence de la relation entre le niveau d'expression du gène, le génotype et les phénotypes comportementaux. D'une part, les résultats obtenus à partir des lignées homozygotes suggèrent l'existence d'un déséquilibre de liaison entre la partie codante du gène et ses régions régulatrices dans ces lignées. D'autre part, les différences de pattern d'expression enregistrées entre les données obtenues à partir des corps entiers des larves ou de leur cerveau, indiquent l'importance du type de tissu sélectionné pour la réalisation des mesures. En plus de ces différents éléments, plusieurs artefacts expérimentaux peuvent avoir modulé les niveaux d'expression obtenus dans cette expérience. Par exemple, les études publiées dans la littérature indiquent que les niveaux d'expression du gène *for* peuvent être influencés par le type d'activité effectué par les

individus lors de leur collecte (Ingram et al. 2005), par l'heure de la journée (Ingram et al. 2011), ou encore par le niveau de satiété des individus (Kent et al. 2009). Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes sont également complexes. Toutes les étapes menant d'une information génétique incluse dans l'ADN à un produit final fonctionnel (ARN ou protéine) sont susceptibles d'être régulées au sein des organismes. Cette régulation, positive ou négative, peut intervenir au niveau de l'accessibilité de la séquence génique (organisation et conformation de l'ADN), de l'initiation de la transcription (facteurs de transcription, promoteurs, *enhancers* et les *silencers*), de la maturation du transcrit (épissage alternatif), du transport de l'ARNm vers le cytoplasme, ou encore de la traduction de l'ARNm (Harry 2008).

Pour finir, il est admis que le niveau d'expression d'un gène n'est pas nécessairement représentatif du niveau de protéine sous forme active dans l'organisme. Il est donc délicat de pouvoir conclure sur un lien direct entre les niveaux d'expression d'un gène et la manifestation d'un caractère particulier. Chez *S. nonagrioides*, la localisation de la mutation non-synonyme identifiée au niveau du site actif de l'enzyme permettant l'existence des deux allèles de *Snfor* (*SnFor^{Gly}* et *SnFor^{Ser}*), pourrait entraîner une variation de l'activité enzymatique selon l'allèle porté. Bien que nous ayons tenté de doser l'activité de la PKG chez les individus issus des deux populations écologiques de *S. nonagrioides*, nous n'avons pu jusqu'alors obtenir de résultats exploitables à partir des protocoles disponibles dans la littérature. C'est pourquoi nous allons initier des expériences pour mesurer déjà la quantité de PKG présente dans les chenilles, par western blot ou par ELISA.

d) Approche écologique : variation des comportements en fonction de la qualité de la ressource alimentaire

Les analyses précédentes ayant permis d'établir une corrélation entre le génotype *Snfor*, le phénotype comportemental, et l'origine écologique des individus, nous avons ensuite étudié les réactions adaptatives des différentes populations de *S. nonagrioides* en réponse aux variations de l'environnement nutritionnel. Premièrement, nous avons montré qu'un appauvrissement de la ressource alimentaire entraînait chez l'ensemble des populations testées (les 2 populations naturelles et les 2 lignées homozygotes pour *Snfor*) une augmentation des comportements de recherche alimentaire. De façon intéressante, un environnement nutritionnel limitant provoque également une chute drastique du niveau d'expression du gène *Snfor*, bien que les raisons de cette modulation soit incertaines (augmentation de l'activité locomotrice ou conséquence des mécanismes physiologiques

associé à un déficit alimentaire). Quelque soit l'environnement alimentaire (riche ou appauvri), les larves issues de la population kenyane ont maintenu un niveau d'activité plus élevé que celui des individus français, eux-mêmes plus sédentaires.

En testant les lignées homozygotes *SnFor*^{Ser/Ser} et *SnFor*^{Gly/Gly}, une plus haute activité locomotrice des larves *SnFor*^{Ser/Ser} a été montrée dans les deux conditions nutritionnelles testées (riche vs appauvrie). Ces résultats, comparables à ceux obtenus entre les populations naturelles sauvage (de génotype *SnFor*^{Ser/Ser}) et ravageuse (prédominance de l'allèle *SnFor*^{Gly}), confirment l'existence d'une corrélation entre le génotype de *Snfor* et le niveau d'activité de recherche alimentaire. Cependant, bien que les deux variants homozygotes expriment des comportements distincts, ceux-ci demeurent davantage comparables aux individus de la population ravageuse dont ils sont issus. En effet, malgré la plus forte activité exprimée par les individus de la lignée homozygote *SnFor*^{Ser/Ser}, celle-ci demeure inférieure à celle exprimée par les individus de la population sauvage kenyane (pourtant de génotype *Snfor* identique). Ces résultats suggèrent donc l'existence d'autres gènes impliqués dans l'expression des phénotypes comportementaux de recherche alimentaire de *S. nonagrioides*.

Les différences de phénotypes comportementaux observées entre les populations naturelles peuvent être interpréter de différentes façons complémentaires.

- Premièrement, nous avons montré que les larves issues du milieu cultivé ont une croissance supérieure à celle des individus de la population sauvage lorsque les ressources alimentaires sont peu nutritives. Cette meilleure tolérance au manque de nourriture pourrait expliquer pourquoi ces individus tendent à moins se déplacer. Survivant plus facilement avec peu de ressources alimentaires, il leur serait moins nécessaire de se déplacer, améliorant de ce fait leur fitness en économisant l'énergie de la locomotion et en limitant leur exposition aux prédateurs et à des conditions abiotiques défavorables (Casey 1991, Slansky 1993). A l'inverse, les larves issues du milieu sauvage auraient d'avantage tendance à changer de site de nourriture afin de trouver de nouvelles ressources alimentaires nécessaires à leur développement (Colasurdo et al. 2007).

- Deuxièmement, nous avons identifié un effet de l'espèce végétale consommée sur le taux de croissance des individus dans un environnement alimentaire non limitant. Sur un milieu artificiel contenant des feuilles de maïs, les deux populations se développent de façon similaire, tandis qu'un milieu contenant des feuilles de *Typha* permet un développement plus

important des individus de la population sauvage. La meilleure fitness de ces individus sur un milieu plus proche de leur ressource naturelle pourrait constituer un indice d'une coévolution entre *S. nonagrioides* et la plant-hôte *Typha* (utilisation de nutriments spécifiques de cette ressource par les chenilles leur conférant un avantage adaptatif). L'absence de différence développementale sur milieu artificiel mais pourrait également expliquer pourquoi l'espèce demeure inféodée aux ressources sauvages dans certaines régions. Ces résultats suggèrent aussi d'être prudent quand aux déductions effectuées sur la qualité nutritives des plantes pour une espèce donnée. En effet, les ressources cultivées supposément plus nutritives que les plantes sauvages en raison de la fertilisation des sols dans un contexte agricole d'augmentation des rendements des parcelles cultivées (Shoonhoven et al. 1998), ne constitueraient pas nécessairement une ressource de meilleure qualité pour *S. nonagrioides*. L'adaptation écologique de cette noctuelle aux différentes espèces de plante-hôtes pourrait ainsi expliquer les phénotypes comportementaux observés entre les différentes populations.

Afin d'aborder la question des mécanismes impliqués dans la variation des fréquences alléliques du gène *Snfor* au sein des populations de *S. nonagrioides*, nous avons mesuré différents traits d'histoire de vie de cette espèce en condition d'élevage. Les individus ravageurs étaient caractérisés par un meilleur taux de survie larvaire et une meilleure fécondité que les individus de la population sauvage. En revanche, l'analyse des populations homozygotes, dont la fitness ne diffère pas de celle de la population française, ne permet pas d'établir de corrélation entre ces différents traits d'histoire de vie et le gène *Snfor*. Cette corrélation négative entre les niveaux d'activité locomotrice et la fécondité des femelles pourrait être interprétée comme l'existence d'un tradeoff associé au niveau d'investissement énergétique pour chacune de ces activités (fourragement vs reproduction). D'autres facteurs potentiels peuvent être impliqués dans la modulation des fréquences alléliques de *Snfor*, tels que la valeur des hétérozygotes (supériorité ou infériorité), le taux de consanguinité des populations, la dérive génétique.

L'ensemble des résultats obtenus grâce aux approches moléculaires, comportementales et pharmacologiques, démontrent l'implication du gène *Snfor* dans l'établissement de stratégies alimentaires distinctes chez *S. nonagrioides*. Cependant, plusieurs éléments indiquent que la relation entre ce gène et les phénotypes comportementaux associés à un environnement écologique donné, constitue un système particulièrement complexe. Ces observations

suggèrent ainsi l'existence de facteurs complémentaires déterminant dans l'adaptation de cette noctuelle aux ressources cultivées.

II - Facteurs potentiels de l'adaptation aux ressources cultivées

Dans cette partie, nous allons aborder un ensemble de points supplémentaires permettant de compléter les connaissances jusqu'alors discutées dans ce manuscrit. Dans une certaine mesure, ces données permettront d'étudier différents mécanismes potentiellement explicatifs de l'adaptation de *S. nonagrioides* à une espèce de plante –hôte spécifique.

1/ Influence de la plante et de la distance géographique sur les fréquences alléliques de *Snfor* (analyse des marqueurs *microsatellites*)

La variation des fréquences alléliques de *Snfor* entre les populations sauvage et cultivée de *S. nonagrioides* est un autre résultat important de cette étude. L'allèle *SnFor*^{Gly} est prédominant dans la population issue des champs cultivés, tandis que l'allèle *SnFor*^{Ser} est l'unique variant identifié dans la population inféodée aux plantes sauvages. Ces variations de fréquence pourraient être dues à des pressions de sélection différentes associées au type d'environnement, ou bien à une dérive génétique apparue entre des populations géographiquement isolées. Pour étudier cette question, une approche en génétique des populations basée sur l'étude des microsatellites a été développée au laboratoire LEGS afin d'analyser la structuration génétique de *S. nonagrioides* en fonction de la plante hôte et de la géographie (Naino-Jika et al. en préparation).

Les microsatellites sont des marqueurs nucléaires hypervariables formés par une répétition continue de motifs composés de 2 à 10 nucléotides. Ils sont abondants dans tout le génome nucléaire (plus particulièrement dans les régions non-codantes) et constituent donc des marqueurs neutres. Les microsatellites mutent fréquemment à partir d'erreurs qui surviennent lors de la réplication de l'ADN. De par leur haut niveau de variabilité et leur abondance dans le génome, les microsatellites constituent un matériel puissant pour étudier la structuration génétique des populations. A partir des microsatellites, un effet de la sélection naturelle sur un

gène peut en effet être détecté lorsque le pattern de variabilité de celui-ci est significativement différent de celui observé au niveau des marqueurs neutres.

A partir de ces marqueurs moléculaires mis au point chez *S. nonagrioides* (screening par Genoscreen, test et choix des marqueurs par C. Capdevielle-Dulac), Naino-Jika et al. ont recherché le rôle de la distance et de la plante hôte d'une part sur la structuration génétique neutre, et d'autre part sur les fréquences des variants alléliques de *Snfor*. Un effort d'échantillonnage important a été réalisé afin d'obtenir des échantillons issus d'un grand nombre de localités représentatives de l'aire de répartition de *S. nonagrioides*. (France, Espagne, Turquie, Iran, Kenya, Ethiopie, Cameroun, Tanzanie, Zambie, Ouganda, Bénin, Ghana, République Démocratique du Congo - certains étant déjà dans la collection du LEGS). Les tests de Mantel simple et partiel ont permis de déterminer les effets relatifs de l'isolement par la distance et par la plante hôte dans la différenciation des populations. Mis en perspective avec le génotype *foraging*, ces tests ont également permis de tester l'implication de ce gène dans l'adaptation au milieu cultivé.

Les données obtenues à partir des échantillons de *S. nonagrioides* récoltés en Europe et en Afrique sur trois familles de plantes de l'ordre des Poales (Typhaceae, Poaceae et Cyperaceae ; les Poaceae regroupant des plantes sauvages et cultivées) ont tout d'abord révélé un isolement significatif des populations par la distance, quel que soit le cluster microsatellite considéré (Paléartique, Afrique de l'Ouest et centrale, Est du rift Africain oriental, et entre les deux branches du rift. Voir partie 2, I-2/ Répartition géographique de l'espèce). L'analyse de la relation entre la famille de plante hôte et les fréquences alléliques du gène *for* semble dépendre de l'échelle d'analyse (voir le détail des résultats en annexe 1). En France, à l'échelle de la parcelle (différentes familles de plantes en sympatrie), de la région (770 km² au Sud-est), ou du pays, aucune structuration significative du gène *Snfor* en fonction de la plante hôte n'est observée (distances microsatellites en covariable, i.e. forces neutres de structuration génétique). En Afrique toutefois, une relation significative entre le gène *Snfor* et la plante hôte est observée au sein des deux clusters d'Afrique de l'Est (clusters situés entre les deux rifts et à l'Est du rift). Enfin, l'effet de la nature sauvage ou cultivée des plante-hôtes sur la différenciation des microsatellites et du gène *Snfor* ne s'observe que dans la population située entre les Rifts. Dans les deux cas, les effets sont observés à la fois sur la variabilité du gène *Snfor* et des marqueurs microsatellites. L'ensemble de ces résultats ne permet pas de conclure que le polymorphisme du gène *foraging* constituerait un caractère adaptatif en fonction de la

plante hôte consommée chez *S. nonagrioides*. De plus la relation entre plante et polymorphisme du gène n'étant pas observée dans l'ensemble des populations, ceci indique l'existence de facteurs supplémentaires impliqués dans les mécanismes adaptatifs de cette sésamie aux plantes cultivées. Par exemple, la sélection de la plante hôte de développement par les femelles adultes (sélection du site d'oviposition) pourrait être un mécanisme complémentaire de différenciation des populations. Il est également nécessaire de tenir compte du déséquilibre de fréquence des différentes familles de plantes hôtes présentes selon la région considérée, limitant ainsi les conclusions réalisables dans le cadre de cette étude.

2/ Race d'hôte : effet de la sélection de la plante par la femelle

Chez les insectes phytophages, la plante-hôte peut jouer un rôle déterminant dans l'isolement des populations. Chez plusieurs espèces exploitant plusieurs plante-hôtes, les individus se développant sur une espèce végétale précise tendent à se reproduire préférentiellement entre eux. Cette spécialisation en fonction de la plante-hôte entraîne la formation de "races d'hôtes" (Berlocher & Feder 2002, Drès & Mallet 2002) et les mécanismes en ont été particulièrement bien recherchés dans le cas du lépidoptère foreur de tige, *Ostrinia nubilalis* (Pyralidae), où l'on trouve en sympatrie en France deux espèces sœurs, l'une sur maïs et l'autre sur *Artemisia* (Malaus et al. 2005, Calcagno et al. 2007). Elle peut être due à plusieurs facteurs tels que les capacités de détoxification, les mécanismes de détection de l'hôte (écologie chimique), des préférences alimentaires apprises au cours du développement, et la synchronisation temporelle avec la ressource (Feder et al. 1999). Si la période de reproduction des adultes d'une même espèce est variable au sein des populations (en raison de différences physiologiques, d'adaptation aux conditions microclimatiques ou à la distribution temporelle d'une espèce hôte précise), seuls les imagos synchronisés pourront se reproduire entre eux. Une telle ségrégation écologique des individus au niveau intraspécifique a notamment été observée chez plusieurs espèces poly- ou oligophages, comme chez le complexe d'espèces *Rhagoletis pomonella* Walsh (Diptera: Tephritidae) (Xie et al. 2008), chez le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* (Peccoud et al. 2009), chez *Sesamia calamistis* Hampson (Ong'amo et al., 2008), ou encore chez *Ostrinia nubilalis* (Ethenod et al. 2003).

Naino-Jika et al. (en préparation) ont recherché le rôle de la plante hôte dans la structuration génétique de *S. nonagrioides* par le biais d'un échantillonnage important des larves sur *Typha domingensis* et sur *Sorghum halepense* (sorgho sauvage) dans une zone où les deux espèces d'hôtes coexistent en sympatrie (région d'Arles, figure 43). Dans ce cas-ci, une différenciation significative des deux populations due à la plante hôte (calcul du *Fst*) a été observée malgré la totale sympatrie des niches écologiques. De plus, les tests de Mantel réalisés à l'échelle de la population d'Arles et de la population française (échantillonnage important et équilibré des larves sur différentes familles de plantes hôte à faible distance géographique), montre une structuration neutre en fonction de la famille de plante hôte. Cette différenciation à une échelle géographique restreinte n'est donc pas explicable par la variation allélique du gène *Snfor* et de son implication dans l'élaboration de stratégie alimentaire spécifique.



Figure 43: zone de collecte des larves de *S. nonagrioides* sur *Typha domingensis* et sur *Sorghum halepense* (sorgho sauvage) en sympatrie dans la région d'Arles (Naino-Jika et al. en préparation).

Comme évoqué précédemment, de nombreux mécanismes d'ordre physiologique ou comportemental pourraient être impliqués dans la différenciation des populations de *S. nonagrioides*. Dans un contexte où les différentes espèces de plantes-hôtes sont sympatriques, la sélection de la plante par les insectes polyphages revêt une importance majeure. Ce mécanisme peut-être inné et relié à l'état physiologique de l'insecte (Singer et al. 2010), ou

dépendre de la disponibilité spatio-temporelle des plantes-hôtes (Fox & Morrow 1981). Il peut également être appris au cours du développement en fonction de l'expérience des individus. Par exemple, le choix du site de ponte par les femelles détermine l'espèce végétale à laquelle seront exposées les jeunes larves à l'émergence, et de façon générale, l'espèce sur laquelle se développeront les individus (Murphy 2007, Jeremy 1984, Futuyma 1986). Lorsque le choix de la femelle se répercute sur les préférences de sa descendance, et que cette préférence perdure jusqu'au stade adulte, un « effet Hopkins », dit aussi d'apprentissage natal (Davis & Stamps 2004), est identifié. Ainsi, les insectes pondraient préférentiellement sur la plante sur laquelle ils auraient effectué leur développement larvaire. De tels mécanismes (génétiques ou appris) de fidélité à la plante peuvent entraîner une structuration génétique des populations naturelles en fonction de la plante hôte. Ainsi, la différenciation génétique observée entre les individus de *S. nonagrioides* échantillonnés sur sorgho et sur maïs en sympatrie pourrait être expliquée par un développement et une sélection préférentielle de la plante maternelle (théorie de Hopkins).

3/ Dynamique de colonisation et potentiel de déplacement

La capacité de dispersion, qui désigne les processus par lesquels des êtres vivants se séparent géographiquement d'une population d'origine afin de coloniser (ou recoloniser) un nouveau territoire, revêt une grande importance pour la diversité génétique, l'adaptation, la sélection naturelle et la survie des espèces de manière générale. Ce mécanisme est également particulièrement important lorsque les paysages sont écologiquement fragmentés (par exemple, fragmentation des parcelles contenant la plante hôte d'une espèce). Les approches en génétique du paysage permettent ainsi d'étudier les flux de gènes dans un contexte où ceux-ci peuvent être contraints par des « barrières » naturelles ou artificielles, limitant le déplacement des individus ou des espèces. Pour comprendre l'évolution et la différenciation des populations naturelles et des espèces, il est important de connaître les facteurs limitant ou favorisant ces flux de gènes (Kerdelhué 2010).

A partir d'individus de *S. nonagrioides* collectés dans 3 champs de maïs de Haute-Garonne espacés de 2 à 10 km (figure 44), Naino-Jika et al. (en préparation) ont estimé leur taux d'apparentement intra-champ et inter-champ (Coancestry). Les résultats de l'analyse de

parenté montrent que le taux d'appariement inter-champs est similaire à l'appariement intra-champs. D'une part, il existe un faible niveau d'appariement entre les individus d'un même champ, suggérant que le territoire a été colonisé par de nombreuses femelles. D'autre part, des individus « plein frères/sœurs » sont identifiés dans les champs distants de 10 km, indiquant une importante capacité de dispersion des femelles adultes (supérieure ou égale à 10 km). Résultant de cette capacité de dispersion des adultes, les populations échantillonnées dans 3 champs distincts sont proches de la panmixie (i. e. proches de l'équilibre de Hardy Weinberg indiquant que ces 3 localités peuvent être considérées comme une seule entité). Connaissant le génotype de *Snfor* de chaque chenille échantillonnée et l'indication indirecte de la capacité de dispersion de sa mère (présence ou non de plein frères/sœurs dans des parcelles distantes), il va être possible d'avoir une estimation de la relation entre l'allèle de *Snfor* et la capacité de dispersion.

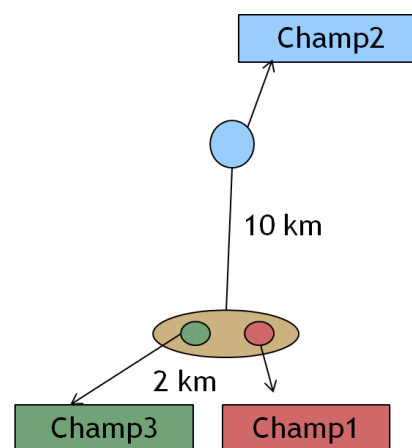


Figure 44. Répartition des champs de maïs de Haute-Garonne dans lesquels les individus de *S. nonagrioides* ont été collectés (d'après Naino-Jika et al.)

4/ Résistance aux conditions environnementales

a) Résistance au manque d'oxygène (stress anoxique)

La tolérance au manque d'oxygène permet la survie des individus dans un environnement anoxique sans déficits neuronaux pour une période de temps déterminée (Haddad 2006). La plus forte sédentarité des individus de *S. nonagrioides* de la population ravageuse pourrait être associée à une meilleure tolérance de l'altération de leur environnement confiné (galeries à l'intérieur des tiges) par les contaminations microbienne et l'accumulation des déjections des larves entraînant une diminution de la quantité d'oxygène disponible dans les galeries. À l'inverse, le plus haut niveau de déplacement observé chez les individus de la population kenyane sauvage pourrait être la conséquence d'une plus grande sensibilité au stress anoxique, les individus se déplaçant davantage afin d'atteindre des zones plus riches en oxygène. De façon intéressante, la tolérance au manque d'oxygène chez la drosophile *D. melanogaster* serait associée au niveau d'activité de la PKG codée par le gène *foraging*, et pourrait constituer un facteur de sélection différentielle des allèles naturels de ce gène chez

cette espèce (Dawson-Scully et al. 2010). Le polymorphisme naturel du gène *Snfor* identifié parmi les deux populations de *S. nonagrioides* étudiées pourrait ainsi être impliqué dans les seuils de tolérance au manque d'oxygène chez cette noctuelle.

b) Cytochrome P450 et résistance aux pesticides

L'adaptation de *S. nonagrioides* à des ressources alimentaires différentes pourrait dépendre de sa capacité de résistance à des toxines issues de pesticides ou de contaminations bactériennes et fongiques des plantes consommées. Par exemple, la plus forte sédentarité de la population française ravageuse pourrait être associée à une meilleure détoxification de ces composés organiques néfastes au développement des chenilles, leur permettant de rester plus longtemps à l'intérieur d'une tige contaminée. De par la littérature, ces performances semblent être pour une large part déterminées par la famille des cytochromes P450. Les cytochromes P450 (CYP) sont une importante famille d'enzymes dont la principale fonction est de catalyser l'oxydation d'un grand nombre de composés organiques tels que des métabolites intermédiaires ou des composés chimiques provenant de l'environnement (insecticides, médicaments...). Par exemple, l'évolution du régime alimentaire du genre *Papilio* semble avoir nécessité certaines substitutions d'acides aminés parmi les cytochromes P450 monooxygénase (Mao et al. 2007). Chez le moustique *Anopheles gambiae*, largement étudié en tant que vecteur principal de la malaria (paludisme), une résistance aux insecticides (employés massivement en perspective de réduire les populations de ce vecteur) a été démontrée. Le développement de cette résistance aux pesticides chez *A. gambiae* semble être directement associé à l'évolution de son métabolisme oxydatif et des cytochromes P450 impliqués (Felix & Silveira 2012). Chez *S. nonagrioides*, la comparaison des transcriptomes des organes sensoriels larvaires et adultes entre population kenyane et française indique des différences d'expression de plusieurs gènes de la famille des cytochromes P450, le sens de la différence dépendant du gène (Glaser et al. in prép ; programme ANR Adaptanthrop). Ces différences pourraient être précisées par qPCR, et recherchées également par comparaison de transcriptome d'autres tissus.

5/ Génétique du comportement : étude de systèmes complexes

Une difficulté majeure en génétique du comportement réside dans le fait qu'un comportement peut être modulé par une multitude de gènes, chacun d'eux pouvant fonctionner dans

différentes structures à différents moments de l'ontogénèse d'un organisme (Heisenberg 1997). Ces observations réfèrent à deux mécanismes importants en génétique : la pléiotropie et l'épistasie.

- La pléiotropie réfère à la caractéristique d'un gène à déterminer plusieurs caractères phénotypiques distincts. La plupart des gènes de l'organisme ont des effets pléiotropiques (Sokolowski 2001), et possèdent ainsi plusieurs fonctions impliquées dans les mécanismes de développement comme dans un ou plusieurs comportements. Dans les approches gène candidat, la pléiotropie a des conséquences importantes lorsqu'il s'agit de modifier l'expression de tel gène pour en observer les effets. Concernant le gène *foraging* par exemple, son importance vitale pour le développement des individus empêche notamment l'utilisation des méthodes de *knock-out* (inactivation du gène). Ces inconvénients peuvent toutefois être contournés grâce aux techniques de modulation spécifique de l'activité du gène dans le temps (pharmacologie) ou dans des tissus précis (RNAi) (Fitzpatrick et al. 2005).

- L'épistasie désigne l'interaction existante entre deux ou plusieurs gènes. Par exemple, un gène peut masquer ou empêcher l'expression d'autres loci, modulant de ce fait les phénotypes exprimés (Sokolowski 2001). Le fond génétique est donc un élément important à prendre en compte lors de l'étude d'un gène candidat d'intérêt (Fitzpatrick et al 2005). Par exemple, si des gènes présentant une interaction épistatique avec le gène candidat étudié ont des fréquences différentes entre les populations étudiées, il sera difficile de déterminer l'effet réel de ce gène candidat sur les phénotypes observés sans analyse génétique complémentaire (par exemple, croisements).

Actuellement se développent des approches en génomique comparative, qui, couplées à une connaissance encore limitée mais croissante des réseaux métaboliques fonctionnels de protéines, sont une voie prometteuse pour comprendre l'origine moléculaire des phénotypes, comme le montre l'étude de Wheat et al. (2011) sur le comportement de dispersion du papillon *Melitaea cinxia*, et pourraient être appliquées à la sésamie dans le futur

III – Autres perspectives

1/ Physiologie digestive

Chez la drosophile *D. melanogaster*, le gène *for* est impliqué dans les capacités d'assimilation et de stockage des nutriments (i. e. performance métabolique), modulant la fitness des individus *rover* et *sitter* en fonction de la disponibilité des ressources alimentaires (Kaun et al. 2007, Kaun et al. 2008, Kent et al. 2009). Ce polymorphisme est ainsi compris comme un facteur du maintien de l'espèce dans un environnement variable (Sokolowski et al. 1997). D'après les données acquises sur la drosophile, il serait intéressant de caractériser les phénotypes biochimiques des populations se développant sur les plantes sauvages ou cultivées.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence deux points essentiels concernant les capacités de développement des larves de *S. nonagrioides* en fonctions de la qualité du milieu nutritif. Premièrement, nous avons montré que les larves issues du milieu cultivé ont une croissance supérieure à celle des individus de la population sauvages lorsque les ressources alimentaires sont peu nutritives (meilleure tolérance au manque de nourriture). Deuxièmement, nous avons identifié un effet de l'espèce végétale consommée sur le taux de croissance des individus dans un environnement alimentaire non limitant. Un milieu artificiel contenant des feuilles de *Typha* permet un développement plus important des individus de la population sauvage.

L'ensemble de ses observations suggère la nécessité d'analyser plusieurs facteurs impliqués dans la physiologie digestive de cette espèce par la comparaison des réponses des différents génotypes *Snfor*. Premièrement, la mesure des taux de consommation permettrait d'estimer la quantité globale de nutriments ingérés par les larves des différentes populations. Deuxièmement, la quantification des niveaux d'assimilation des différents métabolites permettrait de mesurer la proportion de nutriments intégrés par rapport à la quantité consommée, et ainsi d'estimer les performances métaboliques des individus. Troisièmement, le dosage des différents métabolites (glucides, lipides et protéines) dans les tissus des individus apporterait une information sur la forme préférentielle du stockage des réserves énergétiques (davantage lipidique que glucidique par exemple). Enfin, il serait important de tester l'ensemble de ces mesures sur différents types de ressource alimentaire, en faisant

varier la richesse nutritive de la ressource alimentaire (riche vs pauvre) et l'espèce végétale utilisée (maïs vs *Typha*). Les résultats obtenus permettraient d'estimer si les populations possèdent des capacités d'adaptation différentes aux variations quantitatives et qualitatives des ressources alimentaires.

2/ Transgénèse chez la Drosophile *D. melanogaster*

Cette étude fait l'objet d'un projet collaboratif financé par l'IDEEV (Institut Diversité Ecologie et Evolution du Vivant), intitulé « Des drosophiles transgéniques pour mieux comprendre l'adaptation d'un Lépidoptère au maïs cultivé » (Porteur du projet : L. Kaiser-Arnauld ; Personnes impliquées : F. Chardonnet, C. Capdevielle-Dulac, C. Wicker-Thomas, F. Mery). Par la construction de lignées transgéniques exprimant chaque allèle du gène *Snfor* de *S. nonagrioides* dans un mutant nul de *D. melanogaster*, l'objectif de ce projet est d'accéder aux effets phénotypiques de la variation allélique du gène *Snfor* en s'affranchissant de l'influence du fond génétique des populations de l'espèce d'origine (Duffy 2002). Les phénotypes comportementaux et phéromonaux de ces lignées seront testés et comparés avec les lignées de référence *rover* et *sitter* de la drosophile aux travers de différentes expériences détaillées ci-dessous. Cette démarche devrait nous permettre de mieux comprendre le caractère adaptatif de la mutation observée chez *S. nonagrioides* en fonction des différentes espèces de plante-hôtes exploitées.

La construction de 2 lignées transgéniques de *D. melanogaster* exprimant les allèles *Snfor*^{Gly} et *Snfor*^{Ser} (équipe LEGS-GERAD) sont en cours de réalisation à partir de deux mutants hypomorphe ou amorphe du gène *foraging* (*Dmelfor*). Ces mutants amorphes étant létaux, la mutation sera conservée à l'état hétérozygote sur un balancier. Les deux allèles du gène *Snfor* seront dans un premier temps clonés afin de construire les lignées *UAS-Snfor*^{Ser} et *UAS-Snfor*^{Gly} chez la drosophile. L'*UAS* (*Upstream Activation Sequence*), qui constitue une partie du système *GAL4-UAS* particulièrement utilisé chez la drosophile pour étudier l'expression et la fonction des gènes dans l'organisme, est un amplificateur (*enhancer*) auquel Gal4 se lie spécifiquement pour activer la transcription du gène. D'autre part une lignée *tub-gal* (à expression ubiquitaire) sera associée à la mutation amorphe ou hypomorphe pour le gène *for* par construction d'une lignée *Dmelfor4 /balancier ; tub gal/tub-gal*. Par croisement avec les

lignées *Dmelfor*- /balanceur ; *UAS-Snfor/UAS-Snfor*, nous pourrions tester si le gène *Snfor* peut sauver un mutant nul de drosophile (viabilité des mutants). Dans le cas contraire une lignée hypomorphe ou une lignée *sitter* de drosophile pourra être utilisée.

A partir de ces lignées transgéniques, nous pourrions évaluer :

- le phénotype comportemental des larves des lignées de drosophiles transgéniques exprimant les allèles *Snfor^{Ser}* et *Snfor^{Gly}* (équipe IRD-DEEIT). Elles seront également comparées avec les lignées de références *sitter* et *rover*. Cette analyse des comportements de fourragement pourra s'effectuer avec le dispositif « actimètre » (DAMsystem ®TriKinetics), ou avec d'un dispositif plus traditionnel d'analyse des comportements alimentaires chez *D. melanogaster* en mesurant la distance parcourue par les individus sur un disque de milieu nutritif (video-tracking).

- Les performances cognitives de ces lignées à partir de tâches de mémoire réalisées individuellement et en groupe (équipe LEGS-EPCC). En utilisant des tests d'apprentissages variés (apprentissage spatial, social et Pavlovien), nous pourrions élargir l'étude comportementale au stade adulte (apprentissage spatial, social et Pavlovien) et comparer ces résultats aux observations déjà réalisées sur les lignées de références *sitter* et *rover* de *D. melanogaster* (Foucaud et al. 2010, Reaume et al. 2011).

- La composition des phéromones sexuelles de ces lignées transgéniques. Chez la Drosophile, les phéromones cuticulaires ont un rôle déterminant dans les comportements de parade sexuelle, et pourraient jouer un rôle important dans les phénomènes de spéciation. Dans une étude préliminaire, des profils phéromonaux légèrement différents (variation de la quantité des différents hydrocarbures) ont été observés entre les mouches *rover* et *sitter*. Il serait donc intéressant d'étudier les phénotypes résultant de l'expression de *Snfor* chez la drosophile et de les comparer aux profils des populations naturelles de l'espèce.

3/ Expérimentations en condition naturelle ou semi-naturelle

Afin d'obtenir de plus amples informations sur les capacités adaptatives des différentes populations de *S. nonagrioides* à des ressources alimentaires spécifiques, il semble nécessaire d'observer leurs comportements dans des conditions écologiquement plus pertinentes telles qu'en milieu naturel (ou semi naturel). Par exemple, une expérience de transplantation des

populations écologiques de cette noctuelle par une inversion des habitats des individus issus du milieu sauvages et du milieu cultivé permettrait d'estimer leurs fitness respective sur des espèces végétales différentes. Pour compléter l'étude du rôle du gène *Snfor* dans les comportements de recherche alimentaire de *S. nonagrioides*, il serait intéressant d'estimer les niveaux de dégât infligés aux cultures de maïs (niveau d'attaque) en fonction des différents variants alléliques au sein de la population française ravageuse et polymorphe. Différentes variables pourront être mesurées telles que le nombre de pieds infestés, la quantité de dommage sur un pied, le nombre de chenilles par pied, ou encore la distance maximale de dispersion des larves entre les plantes. Cette connaissance de l'incidence du polymorphisme du gène *Snfor* sur le caractère ravageur des individus pourrait permettre le développement de perspectives agronomiques. Par exemple, Naino-Jika et al. (en préparation) ont pu mettre en évidence une capacité de dispersion d'au minimum 10 km par les femelles de *S. nonagrioides* issus des champs de maïs français. Ces résultats suggèrent que des pratiques culturales visant à alterner la culture de maïs entre champs voisins (rotation des cultures) afin de limiter les taux d'infestation à la génération suivante ne seraient pas efficaces contre les sésamies.

REFERENCES

- Alverdi, V., Mazon, H., Versluis, C., Hemrika, W., Esposito, G., van den Heuvel, R., Scholten A. & Heck, A. J. R. (2008). cGMP-binding Prepares PKG for Substrate Binding by Disclosing the C-terminal Domain. *J. Mol. Biol.* 375, 1380–1393.
- Andreadis, S. S., Alvarez-Alfageme, F., Sánchez-Ramos, I., Stodola, T. J., Andow, D. A., Milonas, P. G., M. Savopoulou-Soultani, M. and Castañera, P. (2007). Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 100(1), 195-201.
- Anglade, P. (1972). Les *Sesamia*. Entomologie Appliquée à l'Agriculture. II, Lépidoptères (Masson et Cie, Paris, France, ed. by A S Balachowsky), pp. 1389-1400.
- Ateyim, S.T.S., Obeng-Ofori, D., Botchey, M.A., Owusu, E.O. (2005). Some Aspects of the Biology and Behavior of *Sesamia nonagrioides botanephaga* Tams and Bowden (Lepidoptera: Noctuidae), a Major Stem Borer Pest of Maize in Southern Ghana. *West African Journal of Applied Ecology*. Volume 8, n°1.
- Becher, P. G. & Guerin, P. M. (2009). Oriented responses of grapevine moth larvae *Lobesia botrana* to volatiles from host plants and an artificial diet on a locomotion compensator. *Journal of Insect Physiology*. 55: 384–393.
- Belay, A. T., Scheiner, R., So, A. K.-C., Douglas, S. J., Chakaborty-Chatterjee, M., Levine, J. D. & Sokolowski M. B. (2007). The *foraging* gene of *Drosophila melanogaster*: spatial-expression analysis and sucrose responsiveness. *J. Comp. Neuro.* 504, 570-582.
- Ben-Shahar, Y., Robichon, A., Sokolowski, M. B. and Robison G. E. (2002). Influence of gene action across different times scales on behavior. *Science*. 296, 741-744.
- Berlocher, S. H., & Feder, J. L. (2002). Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? *Annual review of entomology*, 47, 773–815.
- Biro, P.A., and Stamps, J.A. (2008). Are animal personality traits linked to life-history productivity? *Trends in Ecology and Evolution*, 23(7), 361-368.
- Burns, J.G., Svetec, N., Rowe, L., Mery, F., Dolan, M.J., W. Boyce, T., and Sokolowski, M.B. (2012). Gene–environment interplay in *Drosophila melanogaster*: Chronic food deprivation in early life affects adult exploratory and fitness traits. *PNAS Early Edition*, 1-6.
- Cade, W. (1979). The evolution of alternative male reproductive strategies in field cricket. *Sexual Selection and Reproductive Competition in Insects*. Page 343-380.
- Calcagno, V., Thomas, Y. & Bourguet, D. (2007). Sympatric host races of the European corn borer: adaptation to host plants and hybrid performance. *J. Evol. Biol.* 20, 1720–1729.
- Casey, T. (1991). Energetics of caterpillar locomotion: biomechanical constraints of a hydraulic skeleton. *Science*. 252, 112-114.
- Chaffiol, A., Laloï, D. & Pham-Delègue, M.-H. (2005). Prior classical olfactory conditioning improves odour-cued flight orientation of honey bees in a wind tunnel. *The Journal of Experimental Biology*. 208. 3731-3737.
- Colasurdo, N., Dussutour, A. & Despland, E. (2007). Do food protein and carbohydrate content influence the pattern of feeding and the tendency to explore of forest tent caterpillars? *Journal of Insect Physiology*. 53: 1160–1168.
- Colomb J., Kaiser L., Chabaud M. A. & Preat T. (2009). Parametric and genetic analysis of *Drosophila* appetitive long-term memory and sugar motivation. *Genes, Brain and Behavior*. 8: 407–415
- Cordero, A., Malvar, M. A., Butrón, A., Revilla, P., Velasco, P. and Ordás, A. (1998). Population dynamics and life-cycle of corn borers in south Atlantic European coast. *Maydica*. 43, 5-12.
- Darwin, C. (1859). *The Origin of Species by Means of Natural Selection or Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray, London, UK.
- Davis, J. M. & Stamps, J. A. (2004). The effect of natal experience on habitat preferences. *Trends in Ecology and Evolution*. 19: 411-416.

- Dawson-Scully, K., Bukvic, D., Chakaborty-Chatterjee, M., Ferreira, R., Milton, S. L. and Sokolowski M. B. (2010). Controlling anoxic tolerance in adult *Drosophila* via the cGMP–PKG pathway. *J. Exp. Biol.* 213, 2410–2416.
- de Belle, J. S., Hilliker, A. J. and Sokolowski, M. B. (1989). Genetic localization of *foraging(for)*: a major gene for larval behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 123, 157–164.
- 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. Series B, Biological sciences*, 357(1420), 471–92.
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*. 34: 1–15.
- Ethenod, S. E. B., Elozuelo, L. A. P., & Re, B. R. F. (2003). Genetic isolation between two sympatric host-plant races. I . Sex pheromone, european corn borer, *ostinia nubilalis* moth emergence timing, and parasitism. 57(2), 261–273.
- Farinós, G. P., De la Poza, M., Hernández-Crespo, P., Ortego, F. and Castañera, P. (2004). Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomol. Exp. Appl.* 110, 23–30.
- Feder, J. L., & Filchak, K. E. (1999). It's about time: the evidence for host plant-mediated selection in the apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella*, and its implications for fitness trade-offs in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 91(1) 211–225.
- Félix, R. & Silveira, H. (2012). The Role of *Anopheles gambiae* P450 Cytochrome in Insecticide Resistance and Infection. *Insecticides – Pest Engineering*. 23, 503–518.
- Fitzpatrick, M. J. and Sokolowski, M. B. (2004). In search of food: exploring the evolutionary link between cGMP-dependent protein kinase (PKG) and behavior. *Integr. Comp. Biol.* 44, 28–36.
- Fitzpatrick, M. J., Ben-Shahar, Y., Smid, H. M., Vet, L. E. M., Robinson, G. E and Sokolowski, M. B. (2005). Candidate genes for behavioural ecology. *Trends Ecol. Evol.* 20(2), 96–104.
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., Mueller, N. D., O'Connell, C., Ray, D. K., West, P. C., et al. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*. 337(478), 337–342.
- Foucaud, J., Burns, J. & Mery, F. (2010). Use of spatial information and search strategies in a water maze analog in *Drosophila melanogaster* *Plos One*. 5(10)
- Futuyma. (1986). The role of behavior in host-associated divergence in herbivorous insects. *Evolutionary Genetics of Invertebrate Behaviour*, 295–302.
- Gassmann, A. J., Onstad, D. W. and Pittendrigh, B. R. (2009). Evolutionary analysis of herbivorous insects in natural and agricultural environments. *Pest Manag. Sci.* 65, 1174–1181.
- Gillespie, J. H. & Turelli, M. (1989) Genotype-environment interactions and the maintenance of polygenic variation. *Genetics*. 121:129–138.
- González-Núñez, M., Ortego, F. and Castañera, P. (2000). Susceptibility of Spanish populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to a *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *J. Econ. Entomol.* 93(2), 459–463.
- Graph, S. A. & Sokolowski, M. B. (1989). Rover/sitter *Drosophila melanogaster* Larval Foraging Polymorphism as a Function of Larval Development, Food-Patch Quality, and Starvation. *Journal of Insect Behavior*. 2(3), 301–313.
- Haddad, G. G. (2006). Tolerance to low O₂: lessons from invertebrate genetic models. *Exp. Physiol.* 91, 277–282.
- Harry, M. (2008). Génétique moléculaire et évolutive. *Maloine* (Paris). 2^{ème} édition, Maloine. pp : 465.
- Hedrick, P. W. (1986). Genetic polymorphism in heterogeneous environments: A decade later. *Annu Rev Ecol Syst.* 17:535–566.
- Heisenberg, M. (1997). Genetic approach to neuroethology. *Bioessays*. 19, 1065–1073.
- Hilal, A. (1978). Etude expérimentale du développement et de la reproduction de *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera, Noctuidae). Application à l'étude des populations dans les cultures de cannes à sucre au Maroc. Thèse, docteur-ingénieur, Université de Bordeaux I, 146p.

- Ingram, K. K., Oefner, P. & Gordon, D. M. (2005). Task-specific expression of the *foraging* gene in harvester ants. *Mol. Ecol.* 14: 813-818.
- Ingram, K. K., Kleeman, L. & Peteru, S. (2011). Differential regulation of the *foraging* gene associated with task behaviors in harvester ants. *BMC Ecology.* 11(19).
- Jeremy. (1984). Evolution of insect/host plant relationships. *American Naturalist*, 124, 609 – 630.
- Kaun, K. R., Riedl, C. A. L., Chakaborty-Chatterjee, M., Belay, A. T., Douglas, S. J., Gibbs, A. G. and Sokolowski, M. B. (2007). Natural variation in food acquisition mediated via a *Drosophila* cGMPdependent protein kinase. *J. Exp. Biol.* 210, 3547-3558.
- Kaun, K. R., Chakaborty-Chatterjee, M. and Sokolowski, M. B. (2008). Natural variation in plasticity of glucose homeostasis and food intake. *J. Exp. Biol.* 211, 3160-3166.
- Kent, C. F., Daskalchuk, T., Cook, L., Sokolowski, M. B. and Greenspan R. J. (2009). The *Drosophila foraging* gene mediates adult plasticity and gene–environment Interactions in behaviour, Metabolites, and gene expression in response to food deprivation. *PLoS Genetics.* 5(8).
- Kristensen, N. P. (1999). *Lepidoptera, moth and butterflies, Volume 1: Evolution, systematic, and biogeography* (Berlin, New York: Walter de Gruyter).
- Lamoureux, J., Angers, M., Ouellet, S. & Drouin R. (2012). Étude de la régulation de l'expression des gènes par réaction de polymérisation en chaîne permise par un adaptateur Study of the regulation of gene expression by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Médecine Sciences Amérique.*
- López, C., Eizaguirre, M. & Albajes, R. (2003). Courtship and mating behaviour of the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Spanish journal of agriculture research.* Volume 1: 43-51.
- Lucas, C., Kornfein, R., Chakaborty-Chatterjee, M., Schonfeld, J., Geva, N., Sokolowski, M. B. and Ayali, A. (2010). The locust *foraging* gene. *Arch. Insect. Bioch.* 74(1), 52–66.
- Lucas, C. and Sokolowski, M. B. (2009). Molecular basis for changes in behavioral state in ant social behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106(15), 6351–6356.
- Malausa, T., Bethenod, M.-T., Bontemps, A., Bourguet, D., Cornuet, J.M. & Poonsard, S. (2005). Assortative mating in sympatric host races of the European Corn Borer. *Science* 308, 258-260.
- Mallet, J. (2004). The peppered moth: a black and white story after all. *Genetics Society News.* 50: 34-38
- Marchand, D. (2003). Chap V: Maximising foraging efficiency: distance, size and colour of fruit influence foraging behavior of cranberry fruitworm larvae, *Acrobasis vaccine* (Lepidoptera: Pyralidae). Stratégies de ponte et d'alimentation larvaire chez la pyrale de la canneberge, *Acrobasis vaccine*, (Lepidoptera: Pyralidae). Thèse présentée à la faculté des études supérieures de l'université Laval pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D). Département de biologie. Faculté de sciences et génie université Laval. Québec.
- Martin, J. R. (2004). A portrait of locomotor behavior in *Drosophila* determined by a video-tracking paradigm. *Behavioural Processes.* 67: 207–219.
- Mao, W., Schuler, M. A. & Berenbaum, M. R. (2007). Cytochrome P450s in *Papilio multicaudatus* and the transition from oligophagy to polyphagy in the *Papilionidae*. *InsMol. Biol.* 16:481–490.
- Matson, P. A., Parton, W. J., Power, A. G. and Swift, M. J. (1997). Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *Science.* 277, 504-509.
- Möeller, M. (2011). Etude du comportement de recherche alimentaire à l'éclosion chez *Sesamia nonagrioides* : Contribution à la comparaison d'une population anthropisée et d'une population sauvage. *Rapport de stage de Master 1 Ethologie*, Université Paris XIII.
- Murphy, S. M. (2007). Inconsistent use of host plants by the Alaskan swallowtail butterfly: adult preference experiments suggest labile oviposition strategy. *Ecological Entomology.* 32(2), 143–152.
- Naino Jika, K., Chardonnet, F., Capdevielle-Dulac, C., Le Ru, Sylvain, J.-F., Kaiser, L. & Dupas, S. The ecology and phylogeography of *S. nonagrioides* analyzed from molecular markers. En preparation.
- Nye I. W. R. (1960). The insect pests of graminaceous crops in East Africa. *Colonial Research Studies.* 31, 1-48.
- Ong'amo, G. O., Le Rü, B. P., Moyal, P., Calatayud, P.-A., Le Gall, P., Ogol, C. K. P. O., Kokwaro, E. D., Capdevielle-Dulac, C. & Silvain, J.-F. (2008). Host-plant diversity of *Sesamia calamistis* Hampson

- (Lepidoptera: Noctuidae): Cytochrome b gene sequences reveal local genetic differentiation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 128: 154-161.
- Ong'amo G. O., Le Ru B., Calatayud P.-A., Ogol C. K. P. O. and Silvain J. F. (2013) Composition of stem borer communities in selected vegetation mosaics in Kenya, Arthropod-Plant Interactions. In press.
- Peccoud, J., Ollivier, A., Plantegenest, M., & Simon, J.-C. (2009). A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7495–500.
- Reaume, C. J., Sokolowski, M. B. & Mery, F. (2011). A natural genetic polymorphism affects retroactive interference in *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc.* 278, 91-98.
- Reissig, W. H. et al. (1986). Illustrated Guide to Integrated Pest Management in Rice in Tropical Asia (International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines).
- Riley, J. R., Chapman, J. W., Reynolds, D. R. & Smith, A. D. (2007). Recent applications of radar to entomology. *Outlooks on Pest Management*.
- Rousseau, D. (2009). Maïs : la sésamie progresse du cap au nord, dans l'air marin et a douceur angevine. ARVALIS. *Phytoma – La défense des végétaux*. N°622-623.
- Schoonhoven, L. M., Jermy, T. and Van Loon, J. J. A. (1998). Insect-Plant Biology (London: Chapman and Hall), pp.121-154.
- Schoonhoven, L. M., van Loon, J. J. A. & Dicke, M. (2005). Insect–Plant Biology. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Sih, A., Bell, A & Johnson, J.C. (2006). Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 19(7), 372-378.
- Singer, M. C., & Parmesan, C. (2010). Phenological asynchrony between herbivorous insects and their hosts: signal of climate change or pre-existing adaptive strategy? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1555), 3161–76.
- Slansky, F. (1993). Nutritional ecology: the fundamental quest of nutrients. Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging (ed. by NE Stamp & TM Casey), pp. 29–91. *Chapman & Hall, London, UK*.
- Sokolowski, M. B., Pereira, H. S. and Hughes, K. (1997). Evolution of foraging behavior in *Drosophila* by density-dependent selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 7373-7377.
- Sokolowski, M. B. (2001). *Drosophila*: genetics meets behavior. *Nat. Rev. Genet.* 2, 879-890.
- Sreng, L. (1984). Morphology of the sternal and tergal glands producing the sexual pheromones and the aphrodisiacs among the cockroaches of the subfamily Oxyhaloinae. *J. Morphol. Volume* 182: 279-294.
- Toussaint, E. F. A., Condamine, F. L., Kergoat, G. J., Capdevielle-Dulac, C., Barbut, J., Silvain, J.-F. & Le Ru, B. P. (2012). Palaeoenvironmental Shifts Drove the Adaptive Radiation of a Noctuid Stem-borer Tribe (Lepidoptera, Noctuidae, Apameini) in the Miocene. *PLoS ONE*. 7(7) e41377.
- Wheat, C., Fescemyer, H.W., Kvist, J., Tas, E., Vera, J.C., Frilander, M.J., Hanski, I. & Marden, J.H. (2011). Functional genomics of life history variation in a butterfly metapopulation. *Mol. Ecol.* 20, 1813-1828.
- Xie, X., Michel, a P., Schwarz, D., Rull, J., Velez, S., Forbes, a a, Aluja, M., et al. (2008). Radiation and divergence in the *Rhagoletis pomonella* species complex: inferences from DNA sequence data. *Journal of evolutionary biology*. 21(3), 900–13.
- Zavaleta, E. S. and Hulvey, K. B. (2004). Realistic species losses disproportionately reduce grassland resistance to biological invaders. *Science*. 306, 1175-1177.
- Zhang, B.-C. (1994). Index of economically important Lepidoptera (Wallingford: CAB International). *Nature Neurobiology*. 419, 893-894.

ANNEXES

Annexe 1 : Extrait du rapport de stage Par Naino Jika A. Kader

« Étude écologique et phylogéographique de *Sesamia nonagrioides* Lef (Lepidoptera noctuidae) à partir de marqueurs moléculaires », master 2 « Génétique et gestion de la Biodiversité » (Université Paris 6) :

Analyses des données microsatellites à partir des tests de Mantel simple et partiel (Mantel, 1967)

1- Échantillonnage

Les échantillons du sud est de la France ont été collectés par N. Jika Abdel Kader et Bruno Le Rü, ceux du Sud Ouest de la France par Floriane Chardonnet, Nicolas Joly, Nicolas Glaser et Eric Campan, Ceux d'Afrique par Bruno Le Rü, ceux d'Iran, d'Espagne et de Turquie par les partenaires du groupe DEEIT du LEGS présents dans ces pays.

Les individus proviennent de plusieurs pays recouvrant la majeure partie de l'aire de distribution de l'espèce notamment : la France, l'Espagne, la Turquie, l'Iran, le Kenya, l'Éthiopie, le Cameroun, la Tanzanie, la Zambie, l'Ouganda, le Bénin, le Ghana, et la République Démocratique du Congo. Les individus collectés dans chaque pays appartiennent souvent à des populations différentes. Ils ont été collectés sur maïs cultivé et sur plantes sauvages (le nombre d'individus par pays, les plantes hôtes ainsi que les coordonnées géographiques sont indiqués en annexe).

Avant l'extraction de l'ADN, les individus ont été conservés en éthanol. L'ADN de tous les individus étudiés (voir annexe) a été extrait à partir d'adultes et de chenilles. Pour le choix des individus étudiés, le sexe n'a pas été pris en compte.

2- METHODE : Tests de Mantel simple et partiel (Mantel, 1967)

La Bibliothèque R *ecodist* a été utilisée pour examiner si la différenciation génétique entre individus pourrait être expliquée par la distance géographique seule comme dans un modèle « d'isolement par la distance » (Rousset 2001) ou par une combinaison de variables géographiques et écologiques (Riginos *et al.* 2001) (plante hôtes de familles différentes, milieu sauvage ou cultivé).

Les tests de Mantel simples visent à tester une relation entre deux distances, d'une part la distance génétique entre individus sur les marqueurs microsatellites (estimée par la a value,

Rousset 2001) ou sur des marqueurs sélectionnés (différence du nombre d'allèles glycine) et d'autre part la distance géographique, ou la distance plante hôte. Ils ne prennent pas en compte de possibles covariables confondantes.

Les tests de Mantels partiels analysent la relation entre une variable dépendante et une variable indépendante en prenant en compte une covariable indépendante. Les variables indépendantes peuvent être la distance génétique microsatellite ou le marqueur *for* (2 entre les deux homozygotes, 1 entre homozygote et hétérozygote et zéro pour les génotypes identiques). Les variables indépendantes peuvent être la distance plante hôte, la distance microsatellite, ou la distance géographique. La distance plante hôte est considérée comme discrète (0 pour deux individus échantillonnés sur le même groupe de plante hôte, 1 pour des individus échantillonnés sur deux groupes différents). Une distance plante hôte a été construite pour chaque famille de plante hôte (Poaceae, Typhaceae, Cyperaceae) et pour les groupes cultivé/sauvage. Le coefficient de Spearman non paramétrique a été choisi du fait de la nature discrète de certaines distances.

3- RESULTATS

Pour déterminer la part relative de l'isolement par la distance et de la plante hôte dans la différenciation nous avons effectué des tests de Mantel simples et partiels. *S. nonagrioides* s'attaquant aux végétaux appartenant aux trois familles de l'ordre des Poales : Typhaceae, Poaceae et Cyperaceae, nous avons voulu voir si le fait d'appartenir à l'une ou l'autre des familles ou la nature sauvage ou cultivée des plantes pouvait avoir un effet sur la différenciation génétique des marqueurs neutres (microsatellites) et celui potentiellement impliqué dans l'adaptation au milieu (gène *for*).

Tableau 1: Cluster Afrique de l'Ouest du centre et une partie de l'Ethiopie (AC)

AC	Variable dépendante	Variable indépendante	Co variable indépendante	Mantel r	Pvalue3
1	Distance microsat	Log Distance géographique		0.328	0.0001***
2		Distance Typhaceae		-0.006	0.945
3			Log Distance géographique	-0.044	0.615
4		Distance Poaceae		0.175	0.004***
5			Log Distance géographique	0.131	0.013**
6		Distance Cyperaceae		-0.075	0.344
7			Log Distance géographique	-0.029	0.705
8		Distance cultivé		0.045	0.033*
9			Log Distance géographique	-0.10	0.241
10	Distance foraging	Distance Typhaceae	Distance microsatellite	-0.107	0.826
11		Distance Poaceae	Distance microsatellite	0.067	0.109
12		Distance Cultivé	Distance microsatellite	-0.121	0.185

Tableau 2: Cluster d'Afrique de l'est (AE)

Afrique Est	Variable dépendante	Variable indépendante	Co variable indépendante	Mantel r	Pvalue3
1	Distance microsat	Log Distance géographique		0.580	0.0001***
2		Distance Typhaceae		0.069	0.422
3			Log Distance géographique	0.411	0.0003***
4		Distance Poaceae		0.293	0.004**
5			Log Distance géographique	0.018	0.854
6		Distance Cyperaceae		0.237	0.029*
7			Log Distance géographique	0.001	0.992
8	Distance foraging	Distance Typhaceae	Distance microsatellite	0.017	0.0001***
9		Distance Poaceae	Distance microsatellite	0.013	0.0001***
10		Distance Cyperaceae	Distance microsatellite	0.008	0.0001***

Tableau 3: Cluster situé entre les branches du rift (ER)

Afrique entre rift	Variable dépendante	Variable indépendante	Co variable indépendante	Mantel r	Pvalue3
1	Distance microsat	Log Distance géographique		0.146	0.001***
2		Distance Typhaceae		0.007	0.889
3			Log Distance géographique	-0.057	0.309
4		Distance Poaceae		0.297	0.0001***
5			Log Distance géographique	0.275	0.0001***
6		Distance Cyperaceae		0.082	0.163
7			Log Distance géographique	0.068	0.247
8		Distance Cultivé		0.045	0.03*
9			Log Distance géographique	0.048	0.02*
10	Distance <i>foraging</i>	Distance Typhaceae	Distance microsatellite	-4,8E-6	0.774
11		Distance Poaceae	Distance microsatellite	-0.056	0.229
12		Distance Cyperaceae	Distance microsatellite	-0.023	0.882
13		Distance Cultivé	Distance microsatellite	0.178	0.0004***

Tableau 4: France

France	Variable dépendante	Variable indépendante	Co variable indépendante	Mantel r	Pvalue3
1	Distance microsat	Log Distance géographique		0.235	0.0001****
2		Distance Typhaceae		-0.033	0.033*
3			Log Distance géographique	-0.125	0.0001****
4		Distance Poaceae		-0.033	0.034*
5			Log Distance géographique	-0.125	0.0001***
6		Distance cultivé		0.333	0.0001***
7			Log Distance géographique	0.268	0.0001***
8	Distance foraging	Distance Typhaceae	Distance microsatellite	0.011	0.269
9		Distance Poaceae	Distance microsatellite	0.011	0.274
10		Distance Cultivé	Distance microsatellite	-0.006	0.586

Tableau 5: populations d'Arles

France Arles	Variable dépendante	Variable indépendante	Co variable indépendante	Mantel r	Pvalue3
1	Distance microsat	Log Distance géographique		0.029	0.387
2		Distance Typhaceae		0.051	0.002**
3			Log Distance géographique	0.047	0.008**
4		Distance Poaceae		0.051	0.002**
5			Log Distance géographique	0.047	0.011**
6	Distance foraging	Distance Typhaceae	Distance microsatellite	-0.005	0.709
7		Distance Poaceae	Distance microsatellite	-0.005	0.701
8		Distance Cultivé	Distance microsatellite	0.004	0.628

The ecology and phylogeography of *Sesamia nonagrioides* analyzed from molecular markers

Kader NAINO JIKA^{1,4}, Bruno LE RU^{1,2}, Claire CAPDEVIELLE-DULAC¹, Floriane CHARDONNET¹, Jean-François SILVAIN¹, Laure KAISER^{1,3} and Stéphane DUPAS¹.

- 1- Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, CNRS UPR 9034, IRD UR72 et Université Paris-Sud Orsay, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France
- 2- *icipe*- African Insect Science for Food and Health, Duduville Campus, Kasarani, P.O. Box 30772 - 00100, Nairobi, Kenya
- 3- Physiologie de l'Insecte, Signalisation et Communication, INRA, Centre de Versailles-Grignon, Route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex, France
- 4- Université Pierre et Marie Curie, Paris France

Abstract

Sesamia nonagrioides (Lepidoptera: Noctuidae) also called Mediterranean corn borer, is one of the most damaging pest of maize in the Mediterranean basin. Native from tropical Africa, the pest is also found on wild Poales across its distribution range. The study was conducted at the scale of the insect distribution range to understand its phylogeography and at the local scale on different host plant species to understand the relationship between fine genetic structure and infestation dynamics. 447 individuals from 45 localities including four Palearctic and nine African countries were genotyped for fourteen (14) microsatellite loci and for the foraging gene (gene supposed to be involved in locomotion). Bayesian analyses showed four clusters, one in the Palearctic region, from Turkey to Spain and three in Africa separated from each other by the East African Rift Valleys. In France, *S. nonagrioides* was observed for the first time on *Typha domingensis* and was abundant on wild host plants in contradiction with the statement that it is seldom in wild environment in France. Simple and partial Mantel tests on SSR showed the presence of isolation by distance and isolation by host plant within southern French populations; partial mantel tests showed that the foraging gene non synonymous mutation was explained by microsatellite distance and not by host plant. Sibship analysis identified full sibs at 10 km distance in Southwestern France, suggesting good dispersion abilities of the adult females between field plots.

Key word: *Sesamia nonagrioides*; population genetics; host range; gene flows; dispersal; microsatellites; Mediterranean

1/ Introduction

In Lepidoptera insect species, the mechanisms of race differentiation can be of several types: ecological, when there is a divergence of habitat (host plant or location) (Schluter 2001, Via 2001, Pelozuelo *et al.* 2004); physiological, when the breeding periods between two races differ (Frérot *et al.* 1983 and 1984); chemical, when different sex-pheromones are used in the mate choice (Shorey 1964, Gaston & Shorey 1965, Farine *et al.* 1981); behavioural (Birch *et al.* 1989), resulting of innate or learned mechanisms (Murphy *et al.* 2007, Emelianov *et al.* 2001).

Although particularly well documented, biotypes of insects feeding on different species of host-plants are the starting-point of controversial theories about sympatric speciation (Bush 1969 and 1984; Via 2001). Analyses of population genetic structure showed the existence of host races in some poly- or oligophagous species, such as *Rhagoletis pomonella* Walsh (Xie *et al.*, 2008), *Acyrtosiphon pisum* Harris (Peccoud *et al.* 2009), *Sesamia calamistis* Hampson (Ong'amo *et al.*, 2008), *Ostrinia nubilalis* (Yan Thomas *et al.* 2003), and *Zeiraphera diniana* Hübner (Emelianov *et al.* 2001). In polyphagous or oligophagous insect species, individuals tend to reproduce on their larval host plant (matched mating, Hopkins' rule). This phenomenon leads to the formation of "host race" (Berlocher & Feder 2002, Drès & Mallet 2002), the first stage of a hypothetical specialisation and sympatric speciation.

Host-plant specialisation can be attributable to host-plant developmental traits (the evolution of detoxification capacities), host-plant selection traits (chemical ecology of the host-plant) detection, or phenologic traits (synchronisation with resources, *eg.* Feder *et al.* 1999). There are other cases where the activity period of adults can be very variable within a species or a population (according to physiological differences, or for example, to the adaptation to microclimatic conditions). In this case, only the synchronised individuals will be able to reproduce. Thus, under particular conditions, it is possible to observe an allochronic differentiation (Alexander *et al.* 1960).

The selection of the host-plant can be linked to the physiological status of the insect (Singer *et al.* 1971, 1982, 2010) or to ecological richness in host-plant species (Fox & Morrow 1981). Some studies showed a hierarchical order of preference for many Lepidoptera when they are in presence of several host-plant species (Singer 1971, Wiklund 1981, Chanteur 1982, Nylinet

al.1993, 1997, Thompson 1998; Forister 2004). The choice of the oviposition site by the female has an important impact on its offspring, especially for relatively immobile larvae (Murphy 2007). Thus, the plant where the insects develop is often determined by the behaviour of the adults (Jeremy 1984, Futuyma 1986). This choice can be genetically determined or learned. In the second case, the Hopkins' rule puts down the hypothesis of a transmission of the larvae to the adult of the choice of the plant guest. So, according to this theory holometabolous insects would lay preferably on the plant on which they would have performed their larval development. However this rule isn't proved at the butterfly *Papilio machaon aliaska* (Murphy *et al.* 2007) and few studies exist on this theory, such mechanisms (genetic or learned) of host plant niche conservatism can therefore lead to a genetic structure according to the host plant.

Understanding the mechanisms of host plant selection is particularly important for the management of pest populations. It can help in assessing their dispersal properties, fitness and persistence; such information would also improve the monitoring of the pests and the success of future control programmes (Armstrong & Wratten, 1996). *Sesamia nonagrioides*(Lefèbvre) (Lepidoptera, Noctuidae) is from this point of view an excellent model; it is a polyphagous insect with a large distribution area causing significant damage to cultivated and wild plants (Moyal *et al.*, 2011), This insect attacks throughout its repartition range more than twenty five (25) host plants including crops (maize, sorghum, sugar cane) and wild plants (Le Ru *et al.*, 2006, Le Ru, com per). Generally, *S. nonagrioides* is considered as a sedentary insect species and dispersal distances 100–400 m of adults emerged from maize fields have been recorded (Albajes *et al.*, 2004; Eizaguirre *et al.*, 2004). Distant movements to colonize maize fields early in the season have been reported among adults emerging from overwintering individuals (Larue, 1984).

Until 2007, our knowledge on genetic variation at both inter- and intra-population levels in *S. nonagrioides* was limited. On African populations, Tams and Bowden (1953) considered that the distribution of *S. nonagrioides* was limited to Europe and the Azores. A few years later, Nye (1960) noted that *S. nonagrioides* is morphologically very close to *Sesamia botanephaga* described by Tams and Bowden (1953) and proposed to consider them as subspecies, *S. nonagrioides nonagrioides* and *S. nonagrioides botanephaga*. In 2011 Moyal *et al.* using a nuclear gene and two mitochondrial genes on several host plants show the existence of three separate populations, one in the Palearctic region, one in East Africa and another one in West

Africa. In Palearctic region with allozymes, Buès *et al.* (1996) suggested the existence of two subpopulations collected on maize in France, Spain and Morocco: a Northwest (northern Spain and southern France) and a Southeast (Southeast Spain, South Eastern France and Morocco) populations. Using RFLP Kourti *et al.* (2006), on Greece and Spain larvae found on maize, suggested the existence of two subpopulations, one in the Northwest of Greece and one other in Southeast of Greece and Spain. With allozymes again, Leniaud *et al.* (2006), on caterpillars collected on maize, sorghum, sunflower and melon in the South of France, concluded that there is no differentiation in terms of distance but on the host plant. With AFLP, Margaritopoulos *et al.* (2007) on caterpillar found on maize in France, Spain, Italy and Greece, show the existence of a Northern (Spain, France, Italy, Northern Greece) and a Southern (Southern Greece) population. Using RAPD, De la Poza *et al.* (2008), on French, Spanish, Italian, Greek and Turkish samples collected on maize, show the existence of two populations, one in West (Spain, France) and one in East (Italy, Greece, Turkey) Europe. All the results recorded in these studies indicate a strong spatial genetic structure with a limited gene flow between distant populations suggesting *S. nonagrioides* is sedentary and moves slightly.

Despite the economic importance of this major cereal pest (30 to 70% crop loss in France, Rousseau 2009), which seemed to be genetically structured, the only study that took into account the incidence of the host plant factor in the populations genetic structure was done by Leniaud *et al.* 2006. In addition, there is no information on its fine spatial dynamics and dispersal potential. It is therefore important to know the status of geographical and ecological populations of *S. nonagrioides* taking into account the continuum local adaptation / host race / speciation / plasticity (Hopkins, date?), that will permit a better understanding of the spatial dynamics and the factors structuring this species. All this knowledge will allow defining more appropriate management methods against this major cereal pest.

DNA sequences are increasingly used as markers of individual movements (Andrew *et al.* 2013). Despite several recent studies of genetic structure of this pest based on the use of molecular markers have been conducted on the European population, the dispersal capacity of *S. nonagrioides* remains unclear. Only studies based on 'direct' methods have dealt with this issue. In this paper, we investigated i. the genetic structure of *S. nonagrioides* across its distribution range according to the host plant and geographic distance using fourteen (14)

microsatellite loci. ii. the role of the *foraging* gene in *S. nonagrioides* host plant adaptation and iii. the origin of the Palearctic population of *S. nonagrioides*.

2/ Materials and methods

Sampling

The individuals were collected from several countries covering the major part of the known distribution range of the species including: France, Spain, Turkey, Iran, Kenya, Ethiopia, Cameroon, Tanzania, Zambia, Uganda, Benin, Ghana and the Democratic Republic of Congo on various wild and cultivated plants belonging to Poales order (refer Table 1). In France the individuals were collected in the South east in different localities of Camargue region on *Typha domingensis* Pers. and *Sorghum halepense* (L.) Pers., and in the Southwest of France (Haute Garonne) on maize (*Zea mays* L.) in January 2012 in three fields separated by 2 to 10 km (Table 1). Individuals were kept in ethanol before DNA extraction. A total of 447 individuals from 45 locations in 13 countries were analyzed in this study (Table 1).

Tableau 1: characteristic of *S. nonagrioides* samples including locations, host plants, number of specimens per host plant and total number.

Countries	location	Host plant	Host plant number	location		Tot/countries
				latitude	Longitude	
Kenya	Bogoria	<i>Cyperus articulatus</i>	2	0,3682167	36,0446	113
	Chepirir	<i>Typha domingensis</i>	1	-0,47025	35,718217	
	Kabuto	<i>Zea mays</i>	1	-0,208867	34,887683	
	KissII2	<i>Pennisetum purpureum</i>	1	-0,913167	34,529	
	Kisumu	<i>Zea mays</i>	6	-0,1	34,316667	
		<i>Echinochloa pyramidalis</i>	5	-0,1	34,316667	
	Kisumu-Kabuto	<i>Zea mays</i>	14	-0,208867	34,887544	
		<i>Echinochloa pyramidalis</i>	21	-0,208867	34,887544	
	Makindu	<i>Typha domingensis</i>	37	-2,448	38,34485	
	Malindi	<i>Echinochloa fatmensis</i>	1	-3,134233	40,134967	
	MBSA7	<i>Echinochloa colonum</i>	1	-2,677117	38,19525	

		<i>Typha domingensis</i>	1	-2,677117	38,19525	
	Shimba2	<i>Pennisetum meyerma</i>	1	-4,147383	39,449383	
	TavetaSwamp	<i>Echinochloa pyramidalis</i>	1	11,59795	37,38398333	
	Kokwaro	<i>Echinochloa pyramidalis</i>	3	0.2124	34.8865	
		<i>Cyperus dives</i>	5	0.2124	34.88655	
	Kajulu-Kadero	<i>Pennisetum purpureum</i>	1	0.0292833333	34.7947	
		<i>Echinochloa pyramidalis</i>	1	0.0292833333	34.7947	
		<i>Saccharum officinarum</i>	10	0.0292833333	34.7947	
France	Lavergne	<i>Zea mays</i>	3	?	?	277
	Champs 1	<i>Zea mays</i>	32	43,369517	1,1902167	
	Champs 2	<i>Zea mays</i>	32	43,374567	0,2007333	
	Champs 3	<i>Zea mays</i>	32	43,448	0,1936667	
	Arles	<i>Typha domingensis</i>	106			
		<i>Sorghum arrundinaceum</i>	72			
Ethiopie	Andasa	<i>Pennisetum thonbergii.</i>	1	11,513783	37,47595	9
	Awasa	<i>Typha domingensis</i>	1	7,0545	38,468667	
	Bahar Dar	<i>Echinochloa pyramidalis</i>	3	11,59795	37,383983	
	Black water	<i>Saccharum officinarum</i>	1	7,0881667	38,4763333	
	Chamoleto	<i>Typha domingensis</i>	1	5,9256667	37,533667	
	EsbayNuro	<i>Pennisetum purpureum</i>	1	7,9533333	38,7175	
	Koka	<i>Pennisetum mauritanus</i>	1	8,4176667	39,023667	
Cameroun	Ngaoundere	<i>Cyperus sp.</i>	3	7,3723333	13,56483333	4
	Tibati	<i>Echinochloa pyramidalis</i>	1	6,4553333	12,6195	
Tanzanie	Engora	<i>Typha domingensis</i>	1	-3,380733	36,5562	3
	Korogwe	<i>Typha domingensis</i>	1	-5,154783	38,442983	
	Ukwamani	<i>Typha domingensis</i>	1	-6,134883	36,858983	
Ouganda	Kabirara	<i>Typha domingensis</i>	1	-1,010083	30,11688333	3
	Kayanja	<i>Echinochloa pyramydis</i>	1	-0,49392	30,965233	
	Mihunga	<i>Pennisetum purpureum</i>	1	0,3556333	36,025583	

Turquie	Adana	?	?	37,016667	35,316667	4
Iran	Dezful	?	1	32,333333	48.5	1
Benin	Akassato	<i>Echonochoa pyramydalis</i>	1	6,5032167	2,3730667	5
	Attobon	<i>Zea mays</i>	1	6,7146167	2,1549833	
	Cotonou port	<i>Typha domingensis</i>	3	6,34735	2,4059667	
Ghana	Bobiri	<i>Zea mays</i>	1	6,63333333	-1,28333333	2
	Sagymasse	<i>Zea mays</i>	1	6,21666667	-0,51666667	
Congo (RDC)	Djasia	<i>Cyperus sp.</i>	1	?	?	6
	Scholastica	<i>Pennisetum purpureum</i>	2	0,5440333	25,213533	
		<i>Cyperus sp.</i>	2	0,5440333	25,213533	
	Kisangani	<i>Vossia cuspidata</i>	1	0.53	25.18	
Zambie	??	<i>Light trap</i>	10	??	????	
Espagne	Pontevedra	<i>Zea mais</i>	10			
Total	45 localities in 13 countries (including Zambian specimens?)					447

Molecular study

The DNA extractions performed for this study were made on third-stage larvae (whole body) and adults (chest and front legs) using the Qiagen ® Blood and Tissue Kit Dneasy. The DNA extracts were assayed at NANODROP® then diluted depending on the concentrations.

Microsatellite genotyping

Polymerase chain reaction of fourteen primers pairs: SN01, SN16 ; SN20, SN44; SN15, SN22 SN37; SN18, SN25 ; SN34, SN42 ; SN21, SN32 ; SN45 (Capdevielle *et al.* Unpublished data) with polymorphic loci and a single amplification were selected for genotyping. For each sample, four Multiplex fluorescent chain reactions PCR were performed. The final pcr or PCR mixture (10µl) consisted of 5µl Platinum® Multiplex PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 1µl Primer Mix, 3µl H2O and 1µl DNA. Four primer multiplex reactions (mixture of primers) were made for each sample. **Multiplex 1:** SN01 ; SN16 ; SN20 ; SN44 ; **multiplex 2:** SN15 ; SN22 ; SN37 ; **multiplex 3:** SN18 ; SN25 ; SN34 ; SN42 ; **multiplex 4:** SN21 ; SN32 ; SN45.

Amplification were performed in 96 well thermocycler using the following program: 5min at 95°C to activate the taq polymerase followed by 25 cycles of 30 s denaturation at 95°C, 30 s for primer annealing at 55°C and 30s extension at 72°C, and final extension of 5 min at 72°C. The amplified fragments were detected by a capillary sequencer ABI 3130xl(Applied Biosystems ®).Microsatellite profiles and allele scoring were done by using GeneMapper ® Software v4.0 (Applied Biosystems ®) program. The genotype scoring was manually checked for every individual. Individual locus within a multiplex panel that yielded ambiguous genotypes for a particular sample were reamplified with single primer pairs and reanalysed. Aproximatively $\approx 10\%$ (57 samples) of the samples were re-genotyped to check the validity of our results, only one sample did not give the same result.

Foraging gene genotyping:

We used ARMS technique (Amplification Refractory Mutation System) or Specific allele PCR (Newton et al, 1989) adapted to *S. nonagrioides* (C. Capdevielle-Dulac) to genotype samples for the two alleles of the interest *foraging* gene (*Snfor*). This technique is based on the specific amplification of the allele carrying the mutation point. To highlight the polymorphism, two amplifications (PCR) are performed for each sample, each of these two PCR showing the presence of one of the two alleles. 3 primers were used in each PCR: 2 common primers hybridizing with two alleles for the gene, amplifying fragment that is present in all samples (PCR positive control), and an internal primer to this fragment, specific for one of the two alleles and allowing the amplification of a smaller fragment only in the samples having the allele in question. Common primers are GenF Arms and R12 and specific primers were Arms - GlyR -T (for allele Glycine) and Arms-seR-C (for serine allele).

Data analysis

In Lepidoptera further more microsatellite wick presence, null alleles are especially frequent (Meglecz *et al.*, 2004; Zhang, 2004). All pair wise F_{ST} were corrected by the ENA (excluding null alleles) procedure of Chapuis and Estoup (2007) using the freena Or FreeNa software package (<http://www1.montpellier.inra.fr/URLB/>). All values of F_{ST} reported in the present study are ENA-corrected values. Linkage disequilibrium between pairs of loci and deviation from HWE for each locus and population were tested by the exact probability test approach (Guo and Thompson 1992), using GENEPOP 4.0.6 software (Raymond and Rousset 1995). We corrected for multiple testing, using the false discovery rate (FDR) approach (Benjamini & Hochberg 1995).

Populations' structure

The Geneland OR GENELAND program (Guillot *et al.* 2008) was used to identify population clusters based on panmictic model using a Bayesian clustering approach without a priori knowledge on the number of populational units and their limits (Jean-François Cosson *et al.* 2006). The program was run using thinning of 10, burning of 10,000 iterations followed by 1,000,000 iterations. Ten runs were performed independently and the run with best posterior probability was selected.

Population effective size (Ne) and Kinships analysis

To infer the effective size (Ne), the number of full-sibs and half-sibs, but also to determine the distances between half-sibs and full-sibs and infer adult dispersion ability in Southern France localities, Colony software (Wang *et al.* 2010) was used. This software categorizes the individual based on their optimal kinship according to the likelihood criterion pairs. To examine whether the genetic differentiation between individuals could be explained by "isolation by distance" only (Rousset 2001) or by a combination of geographical and ecological variables (Riginos *et al.* 2001) (different hosts plant families, wild or cultivated areas), the Library R ecodist was used. Simple and partial Mantel tests were performed (Mantel, 1967, Landguth *et al.*, 2010).

The value calculated on the real dataset is compared to its distribution generated by Monte Carlo randomization, where one matrix is held constant while the samples are permuted between geographical positions for the other matrix, which changes both its rows and columns. This procedure is valid because all permutations are equally likely under the null hypothesis.

The dependent variables are the microsatellite genetic distance or the *foraging* marker (2 distances between two homozygous, 1 distance between heterozygous and homozygous and zero distance for identical genotypes). The independent variables can be the host plant distance, the microsatellite distance (when dependent variable is the Foraging gene), or geographic distance (when dependent variable is microsatellite). The host plant distance is considered to be discrete (0 for two individuals sampled from the same group of host plant, 1 for individuals sampled from two different host plant groups). A host plant distance was constructed for each host plant family (Poaceae, Typhaceae, Cyperaceae) and for the

cultivated / wild partition. Because of the discrete nature of some distances the nonparametric Spearman coefficient was chosen.

3/ Results

GENELAND Analysis

To understand the map generated by GENELAND, we use Qantum GIS to superpose the graphs with world map.

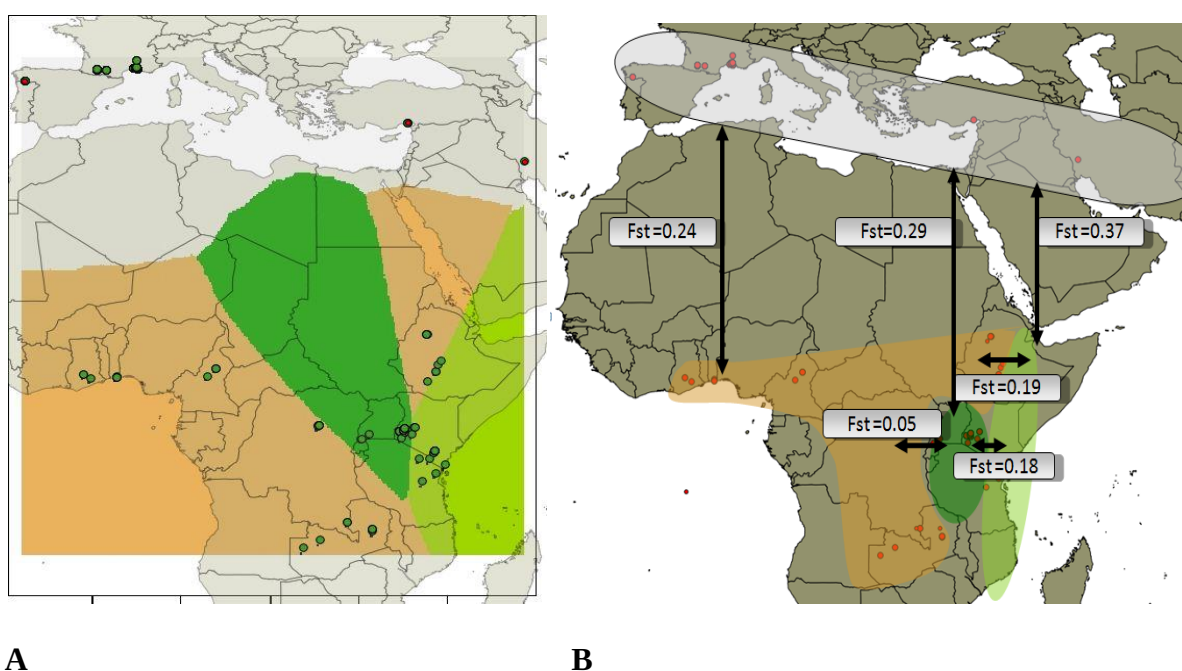


Figure 1: Geneland results. A: exit Geneland modal populations superimposed on a world map, B: partition localities sampled cluster microsatellite taking into account samples present in localities, Fst between clusters calculated with FreeNA.

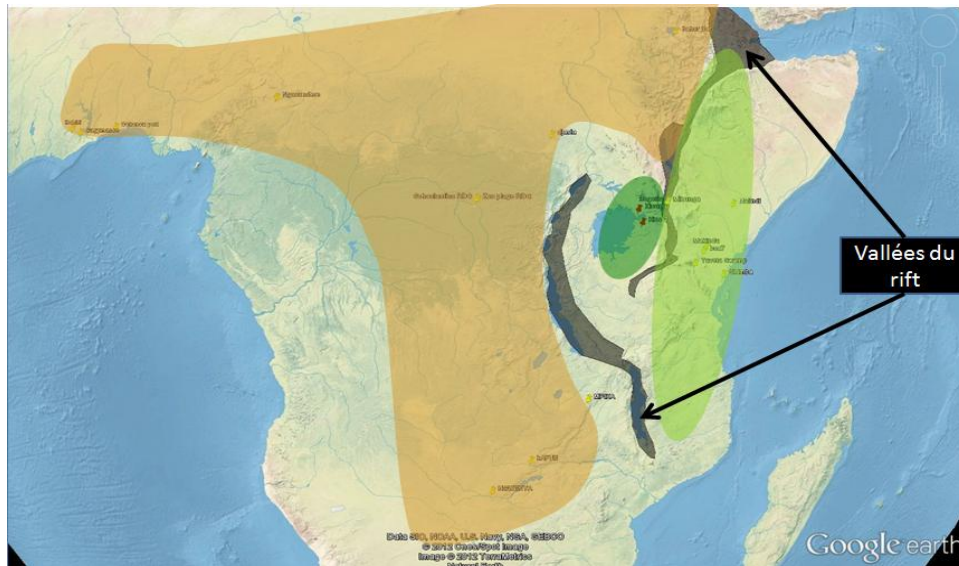


Figure 2: potential topographic and climatic barriers to gene flow in Africa and Geneland clusters background physical map showing the two East African Rift Valleys (Google Earth).

We observed one Palearctic population (PA), and three African populations, one extending to the North, West to East from Ghana to Ethiopia and South to Zambia (AC), one East African population from Tanzania to East Ethiopia(AE) and one localized in Western Kenya and Uganda (ER) wedged between the two African Rift Valley branches (Fig.).

Colony results

The Colony software categorizes the individuals based on their optimal kinship according to the likelihood criterion pairs.

Figure 3: the estimated number of full sibs, half-sibs, the number of fathers, mothers and effective size (N_e) taking into account inbreeding ($F \neq 0$) and without inbreeding ($F = 0$). Individuals with a relatedness rate of 0.5, are considered full brothers sisters ("full sibs")

	Full sibs	Half sibs	Individus	Possibles pairs	% Fullsibs	% Halfsibs	N_e ($F=0$)	N_e ($F \neq 0$)	FIS	Fathers	Mothers
Field 1	1	76	32	496	0,2%	15,3%	25	23		13	10
Field2	4	22	32	496	0,8%	4,4%	66	73		23	17
Field3	5	23	31	465	1,1%	4,9%	56	55		20	19
All fields	56	245	95	4465	1,3%	5,5%	64	44	0	38	38

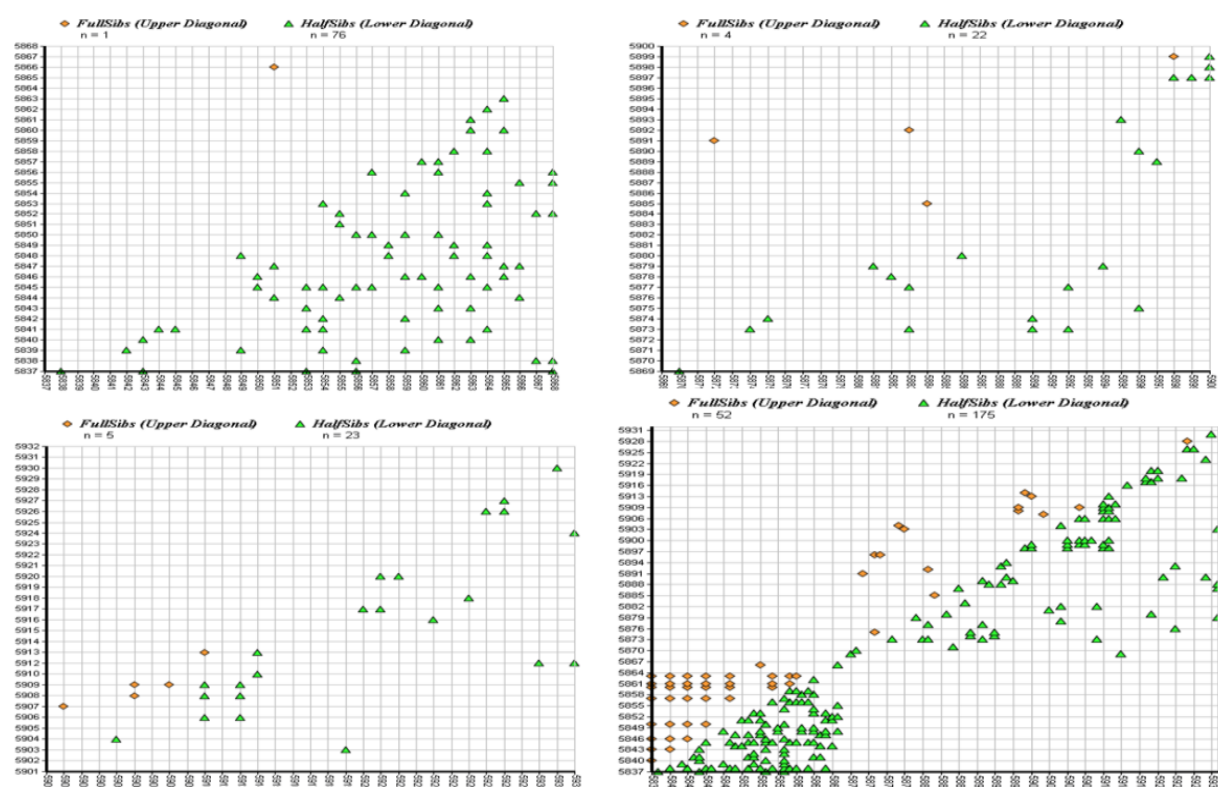


Figure 4: graph representing the matrices of pairs of individuals. Full brothers sisters above the diagonal in brown, half-brothers sisters below the diagonal in green. A: field 1, B: field 2, C: field 3, D: three fields of Haute Garonne.

Mantel test

To determine the relative contribution of isolation by distance and host plant differentiation we performed simple and partial Mantel tests.

S. nonagrioides attacking plants belonging to three families of the Poales Order: Typhaceae, Poaceae and Cyperaceae, we wanted to see if there was genetic differentiation between insects on different families of host plants for microsatellite and for the foraging gene. By performing partial Mantel tests, we checked the structure of microsatellite markers by setting covariate geographical distance, and the structuring of foraging gene with microsatellite markers structure like covariate.

France	Dependant variable	Independant variable	Independant covariable	Mantel r	Pvalue3
1	Microsatellite distance	Log geographical distance		0.235	0.0001***
2		Typhaceae distance		-0.033	0.033*
		Typhaceae distance	Log geographical distance	-0.125	0.0001***
3		Poaceae distance		-0.033	0.034*
		Poaceae distance	Log geographical distance	-0.125	0.0001***
4		Cultivated distance		0.333	0.0001***
		Cultivated distance	Log geographical distance	0.268	0.0001***
6	Foraging distance	Typhaceae distance	Microsatellite distance	0.011	0.269
7		Poaceae distance	Microsatellite distance	0.011	0.274
8		Cultivated distance	Microsatellite distance	-0.006	0.586

Tableau 2: simple and partial Mantel test for the French population

Mantel test results were tested with Fst analysis of *S. nonagrioides* larvae collected on *T. domingensis* and *S. halepense* growing in sympatry in Arles 12 (Camargue region) (Figure 6).



Figure 1: *Typha domingensis* and *Sorghum halepense* growing in sympatry in Arles12 (Camargue region).

The F_{st} calculation with FreeNa software shows a significant result between the two host plants: $F_{st} = 0.019607$ (CI = [0.005, 0.036]); however the differentiation is small between these two populations. The migrant rate confidence interval (Nm) under the assumption of drift-migration equilibrium gave by $(1 - F_{st}) / 4 F_{st}$ is CI = [6.68, 49.54] migrants between plants per generation.

4/ Discussion

This large scale population genetic and molecular ecology study on *S. nonagrioides* is the first using microsatellite markers and putative candidate gene sequences. It included various host plants which perhaps could explain the diversity of result observed in previous study.

Genetic structure, evolutionary history and origin of Palearctic population

In the present study we found significant genetic differentiation between *S. nonagrioides* populations. Our results show that *S. nonagrioides* is genetically structured in four clusters: one in the Palearctic region, one in West and Central Africa, one located between the two branches of the East African Rift Valleys and one localized in the Eastern area of the Oriental Rift Valley.

Moyal et al. (2011), using mitochondrial and nuclear genes, show that *S. nonagrioides* Sub-Saharan taxons were fragmented in two isolated population (West and East); using the mitochondrial genes, the Palearctic population was related to the East African clade, in particular to *S. nonagrioides* population from Central Ethiopia. Using a nuclear gene they found that the alleles were distributed mainly in two West and East African clades, whereas some Palearctic alleles belonged to the West clade. The mitochondrial genes show an East African origin when the nuclear gene shows the origin of west and east African populations so they conclude that the palearctic population originated therefore from East and West and propose that it is the progeny of the cross between these two African populations (admixture). However, Moyal *et al.* (2011) considered only Ivory Coast specimens from West Africa and lacked Central African samples, unavailable at this time.

In this study, we identified the important role of the East African Rift Valleys, so there is no difference between West African populations and west of rift valley populations and Ethiopian population is fragmented in two populations by the rift valley. It is difficult for us to test admixture hypothesis. Our results suggest that the African Rift Valleys and the separation between Europe and Africa were the main structuring forces of *S. nonagrioides*. This is in agreement with the allegiance of this species in wetlands observed by Le Ru (Com.pers.), Such structuring effect of Rift Valleys have been observed in another noctuid maize stem borer *Busseola fusca* (Fuller) (Sezonlin *et al.* 2006). About African origin of the European population, the nearest population is AC, which extends from East to West and Southern Africa (The Fst between AC population and Palearctic population is lower than the palearctic population and others African populations).

Dynamics of colonization and dispersal potential

In *Ostrinia nubilalis* European corn borer, mark recapture studies also showed important dispersal abilities of females, with distances of 23-46 km recovered 100 min after release (Hun *et al.* 2001). Dispersal decisions depend on the suitability of the site. In irrigated crops the females do not disperse (William B. *et al.* 2001). Few data are available for African stem borers, but dispersal may be more limited. In *B. fusca* and *Chilopartellus* (Swinhoe), oviposition distribution within field differs. *Busseola* tend to oviposit uniformly within the field. Whereas *Chilopartellus* oviposits in the vecinal plants near release point (<http://ir-library.ku.ac.ke/handle/123456789/3706>). In another crambid species, *Chilosuppressalis*. Most of the moth flight out of sight after release (Cuonget *al.* 2003)

In our study, the results of the sibship analysis shows that the majority of caterpillars collected in the same field are unrelated. Thus, the field has been colonized by many females. But the noctuid females lay eggs grouped and the caterpillars disperse during development (Kaufmann, 1983; Calatayud, pers com.). Knowing that the females lay their eggs in clusters one would expect to find brothers-sisters individuals in the same field. However, in our data only small number of pairs of individuals are concerned. Three explanations can be advanced: (i) the high winter mortality (larvae were collected at the end of hibernation), could reduce the number of surviving by siblings (ii) samples were collected at a greater distance than insects dispersal ability, (iii) the insects disperse and many were completely mixed, and also competitions between Bf females ovipositing in the same area.

However, the Colony software result shows that the number of full-sibs is low (between 0.2 and 1.3%), the number of half-sibs is higher but still low (15.3% to 5.5% for all). A significant number of specific full sib observed between fields (on total of 56 full sib pairs estimated Haute Garonne only 10 have been identified within one of the three fields). It may be surprising to see a significant number of full-sibs apparentements between distant fields (10 km). This suggests significant dispersal abilities of adult females between fields. The relatedness results differ slightly depending on the fields sampled. Moreover, the effective sizes observed in Haute Garonne populations are comparable across the field or more than 10 km distant fields. This suggests again good dispersal abilities of adults. A very small percentage of full-sibs (0.2%) was observed compared to the half-sibs (15.3%) in field 1 in Haute Garonne sample. This could be explained by the polyandry of females and / or males; it could also be related to inbreeding (double cousin for example). The result of all these possible mechanisms related to polygamy and good dispersion is corroborating by the Hardy-Weinberg equilibrium observation in Haute Garonne ($F_{is} \approx 0$). These results on the capacity of dispersion suggest that cultural practices to alternating between neighboring maize fields to limit infection rates are not totally effective against *S. nonagrioides*. Those estimates are of course approximate but provide an indication of the scale at which dispersal and gene flow are occurring in this species. We cannot compare because no one study on *S. nonagrioides* dispersal potential is done, we wish that this study will stimulate this kind of studies.

About ecological differentiation and host race existence

Several examples of host races have been demonstrated in Lepidoptera species. The first example of host race in Lepidoptera is the rice and Corn strains of *Spodoptera frugiperda* (Klun et al 1973). In *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera Crambidae) stem borers the two variants attacking Maize and Corn (Bourguet *et al.* 2000) are now considered as subspecies (Malausa *et al.* 2007). Host races exist if there are genetic differences not due only to non genetic host selection effects (Drès and Mallet, 2002). But the genetic difference must not be due to host selection only.

In *Sesamia nonagrioides*, the status of the different populations attacking *Typha* and *Sorghum* in Camargue is still undetermined. It is not known if the differences are genetic. The fact that they are observe at distance (the effect is still observed when controlling for microsatellite differentiation between samples at different sites from 0 to 40 km distance) suggests that the trait is trans-generational. The differentiation is not due to a founder effect lasting only one

generation that could be observed between sympatric plants. Further studies will test whether the differentiation is due to Hopkins rule (does the food plant on which a female is reared as a larva influence her future choices when she is searching for host plants for her own offspring (Murphy *et al.* 2006)) or to genetic differences. (Leniaud *et al.*)

In France population, we observed structure depending on the host plant. Only one genetic structure study done by Leniaud *et al.* 2006 limited to the French population had taken into account the effect of the host plant in the genetic structure of *S. nonagrioides* populations, they show the existence of significant host-plant effect on the genetic differentiation of *S. nonagrioides* collected on pepper (*Capsicum frutescens* L.), sorghum (*Sorghum spec.*), sunflower (*Helianthus annuus* L.), cocklebur (*Xanthium spec.*), cantaloupe (*Cucumis melo* L.), and hop (*Humulus lupulus* L., which is in accordance with our result; they also found little or no evidence for an influence of geographic distance contrary of result support by our data , we observed isolation by distance between all populations. However, it is important to note that this study is still preliminary and the authors had only three polymorphic markers. In addition, one problem is that they collected *S. nonagrioides* sample on *Dicotyledon* plants, it is possible that those insect are not developed on those plant or was not born on them but colonize them after their development because the spawning behavior of the insect requiring the presence of a specific monocot leaf sheath and no pubescence. Indeed the female scans with his ovipositor before laying and pubescence of some plants would be embarrassing then she inserted it between the sheath and stem in all Poales order and lays her eggs, plants which do not have this structure are therefore disadvantaged (Com pers. PA Calatayud, B. Frerot *et al.* 1998, Calatayud *et al.* . 2006, 2008).

We observe a very low differentiation (F_{st}), although significant, due to the host plant in Arles 12 (*Typha* vs. *sorghum*) in total sympatric situation (Figure 6). In the test, we used the Spearman non parametric coefficient to overcome the host variables discontinuity. It is true that the partial Mantel tests are criticized by some authors like Nathalie (1999), but others like Castellano (2002) show the adequacy of the partial Mantel test and its widespread use is not currently challenged by the scientific community. Furthermore, in Arles population, where we have a fairly large sampling and balanced different families host plants with low geographical distance, corroborate mantel partial test by showing a neutral structure depending on the host plant family. The genetic differentiation among insects collected on sorghum and maize could be that individuals grow preferentially on their maternal plant in accordance with Hopkins

theory. To our knowledge no one study had been published on the verification of this theory among Poales stem borer so we can't compare with others result.

We can't confirm yet if this plant effect is the proof of host race existence in this species, need more suitable sampling on several generations especially in the situation when one of the host plants vanished locally to distinguish the exact genetic factor in the differentiation. We have not observe genetic adaptation due to foraging gene this is not in accordance with our team search, our team show that the caterpillar witch develop on wild plant collect in Kenya is more dispersal than the populations collected on maize in France.

***Snfor* gene and adaptation**

We tested the hypothesis of a positive relationship between the allele serine *Snfor* and wilderness host plants. The experimental results of the team show that individuals carrying the allele serine move more in laboratory device. It was therefore expected that the wild plants generate more trips than cultivated plants. At the plot level (Arles 12), there is no significant foraging gene structuring in relation to the host plant. In Arles, the habitat of the different wild host plants is similar and heterogeneous. (Figure 6). This could explain the lack of effect of a change related to locomotion. Future investigations will look for a situation where both heterogeneous wild habitat and homogenous cultivated crops are found at vicinity to test the hypothesis.

5/ Conclusion

Our results show the existence of a significant correlation between populations and distance from host plant family. The genetic or learned nature (Hopkins rule) loyalty to the host plant may be questioned. This study provides data and some details on the variety of French populations dispersal potential, loyalty to the host plant in France and show that a factor underlying foraging gene selection must be questioned. We observed for the first time that *S. nonagrioides* grew abundantly in France on *Typha domingensis*, which goes against Galichet (1982) observations reporting that people were not frequently found on wild plants in France. This plant is the main host of *S. nonagrioides* in Africa (Moyalet *al.* 2011, Bruno Le RU com pers) this plant is further north than the known range for *S. nonagrioides* on corn, it could be that the insect is now much further north. The distribution of this insect in France is largely

unknown. The latest study on the subject from 2009 (D Rousseau) reports its presence on maize in Vallée de la Loire.

Perspective: it would be interesting to try to better balance the data set based on host plants for different regions (same plant in several communities and vice versa) to better understand the effect of the host plant. In terms of analysis, the use of other approaches such as software would deepen the reflection on the involvement of the foraging gene in *S. nonagrioides* adaptation.

Acknowledgements

6/ References

- Braginets, O.P.; Minakawa, N.; Mbogo, C.M. & Yan, G. (2003). Population genetic structure of the African malaria mosquito *Anopheles funestus* in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* September 2003 vol. 69 no. 3 303-308
- Berlocher, S. H., & Feder, J. L. (2002). Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? *Annual review of entomology*, 47, 773–815.
- Bush. (1969). Sympatric Host Race Formation and Speciation in Frugivorous Flies of the Genus *Rhagoletis*.
Author (s): Guy L. Bush Reviewed work (s): Published by: Society for the Study of Evolution Stable URL
: <http://www.jstor.org/stable/2406788>, 23(2), 237–251.
- Cooley, J. R., Simon, C., & Marshall, D. C. (2003). Temporal Separation and Speciation in Periodical Cicadas. *BioScience*, 53(2), 151
- 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. Series B, Biological sciences*, 357(1420), 471–92.
- Emelianov, I., Drès, M., Baltensweiler, W., & Mallet, J. (2001). Host-induced assortative mating in host races of the larch budmoth: host-induced assortative mating in host races of the, 55(10), 2002–2010.
- Ethenod, S. E. B., Elozuelo, L. A. P., & Re, B. R. F. (2003). Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*: sex pheromone, European corn borer, emergence timing, and parasitism, 57(2), 261–273.
- Feder, J. L., & Filchak, K. E. (1999). It's about time: the evidence for host plant-mediated selection in the apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella*, and its implications for fitness trade-offs in phytophagous insects, 211–225.
- Friesen, V. L., Smith, A. L., Gómez-Díaz, E., Bolton, M., Furness, R. W., González-Solís, J., & Monteiro, L. R. (2007). Sympatric speciation by allochrony in a seabird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), 18589–94.
- Klun J. A., Chapman O. L., Mattes K. C., Wojtkows P. W., Beroza M., et al. (1973) *Insect sex pheromones: minor amount of opposite geometrical isomer critical to attraction. Science* 181: 661–663.
- Landguth, E.L., Cushman, S. a, Schwartz, M.K., McKelvey, K.S., Murphy, M. & Luikart, G. (2010). Quantifying the lag time to detect barriers in landscape genetics. *Molecular ecology*, 4179–4191.
- Lehmann, T. ; Hawley, W.A. ; Grebert, H., Danga, M., Atieli, F. and Collins, F.H. (1999) The Rift Valley complex as a barrier to gene flow for *Anopheles gambiae* in Kenya *Journal of Heredity*, 90 (6), 613-621.

- Murphy, S. M. (2007). Inconsistent use of host plants by the Alaskan swallowtail butterfly: adult preference experiments suggest labile oviposition strategy, 143–152.
- Ong'amo, G. O., Le Rü, B. P., Moyal, P., Calatayud, P. -a., Le Gall, P., Ogol, C. K. P. O., Kokwaro, E. D., *et al.* (2008). Host plant diversity of *Sesamia calamistis*: cytochrome b gene sequences reveal local genetic differentiation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128(1), 154–161.
- Peccoud, J., Ollivier, A., Plantegenest, M., & Simon, J.-C. (2009). A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7495–7500.
- Pélozuelo, L., C. Malosse, G. Genestier, H. Guenego and B. Frérot, 2004. Host-plant specialization in pheromone strains of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* in France. *J. Chem. Ecol.* 30: 335–352. [PubMed]
- Peterson, M. a & Denno, R.F. (1998). The influence of dispersal and diet breadth on patterns of genetic isolation by distance in phytophagous insects. *The American naturalist*, 152, 428–46.
- Pool, J.E. & Aquadro, C.F. (2006) History and Structure of Sub-Saharan Populations of *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 174(2), 915–929.
- Ritchie, M. G. (2001). Chronic speciation in periodical cicadas. *Trends in ecology & evolution*, 16(2), 59–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11165695>
- Singer, M. C., & Parmesan, C. (2010). Phenological asynchrony between herbivorous insects and their hosts: signal of climate change or pre-existing adaptive strategy? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1555), 3161–76.
- Schluter, D. (2001). Ecology and the origin of species. *Trends in ecology & evolution*, 16(7), 372–380. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11403870>
- Via, S. (2001). Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in ecology & evolution*, 16(7), 381–390.
- Xie, X., Michel, a P., Schwarz, D., Rull, J., Velez, S., Forbes, a a, Aluja, M., *et al.* (2008). Radiation and divergence in the *Rhagoletis pomonella* species complex: inferences from DNA sequence data. *Journal of evolutionary biology*, 21(3), 900–13.
- Yamamoto, S., & Sota, T. (2009). Incipient allochronic speciation by climatic disruption of the reproductive period. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 276(1668), 2711–9.

Annexe 3 : Article complémentaire publié durant la thèse

BRÈVE NOTE - SHORT NOTE

Ann. soc. entomol. Fr. (n.s.), 2011, 47 (3-4) : 524-527

The French touch in entomological biology: synthesis of the “16th Colloque Biologie de l’Insecte”

Floriane CHARDONNET ⁽¹⁾, Emilie DELAVA ⁽²⁾, Vincent FORAY ⁽²⁾, Cecilia
MULTEAU ⁽³⁾,
Aurelien VIGNERON ⁽⁴⁾ & Nathalie MONDY ^{(5)*}

⁽¹⁾ Laboratoire Evolution, Genomes et Speciation, CNRS UPR 9034, IRD UR72 et Université Paris-Sud Orsay, 1 Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

⁽²⁾ Université de Lyon, F-69000, Lyon ; Université Lyon 1 ; CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France

⁽³⁾ Biotop, Route de Biot F-06560 Valbonne, France

⁽⁴⁾ UMR203 BF2I, Biologie fonctionnelle insectes et interactions, Université de Lyon, INRA, INSA-Lyon, IFR41, 20, avenue A. Einstein, F-69621 Villeurbanne, France

⁽⁵⁾ Université de Lyon, F-69000, Lyon ; Université Lyon 1, UMR CNRS 5023, F – 69622, Villeurbanne, France

* Corresponding author

E-mail: nathalie.mondy@univ-lyon1.fr, floriane.chardonnet@orange.fr,
emilie.delava@univ-lyon1.fr; vincent.foray@univ-lyon1.fr,
cecilia.multeau@supagro.inra.fr, aurelien.vigneront@insa-lyon.fr

Accepté le 16 juin 2011

The present paper represents a synthesis of communications collected in the “16^e Colloque Biologie de l’Insecte” which gathered about 160 researchers from France and other European countries at Lyon in October 2010 (on-line reports of the symposium <http://www.insavalor.fr/CBI2010>). Because insects are some of the most familiar organisms of global ecosystems and because of their diversity, they are suitable models to investigate a broad spectrum of questions, in genetics and ecology as well as on populations and physiological responses to environmental changes. Molecular ecology approaches, spurred on by the recent advances in genomics, were omnipresent during this congress and revealed their relevance for the study of specific proximal mechanisms. As a consequence, most of presentations were focused on functional and mechanistic biology rather than conceptual approaches, following several of the recent trends outlined below.

From physiology to integrative physiology

Spectacular advances have been made in numerous disciplines of biological sciences that focus on genes, cells, individuals, populations and ecosystems. In this context, the communications presented clearly showed the need for integrative physiology studies to determine the underlying control mechanisms in phenotype expression and plasticity. For example, a functional characterization of the frost gene (*Fst*) implicated in cold tolerance in *Drosophila melanogaster* demonstrated that silencing *Fst* by transgenic RNA interference impaired the recovery process from chill coma (Colinet *et al.* 2010). Another study focused on post-mating sexual abstinence in the male moth, *Agrotis ipsilon* (Barrozo *et al.* 2010). By an experimental approach, the authors demonstrated that the behavioural responses of mated males to flower odors were inhibited by pheromone dose artificially heightened above the detection threshold of central neurons. Mated male moths have thus evolved a strategy based on selective central processing of transient odour, which prevents them from rapidly remating, in order to refill their reproductive glands for a potential new ejaculate. *Acyrtosiphon pisum* is an important model for physiology studies: critical stages of developmental changes during morphogenesis between embryo and larva exhibit an important role of aromatic amino acids (Rabatel *et al.* com. O07).

Importance of the studies of virus-insect interactions

Because numerous viruses infect insect species and often manipulate the physiology of their hosts, interactions between viruses and insects potentially impact populations functioning. The determinisms of the phenotypic effects of these viruses on their hosts, as well as their origins and their epidemiology are central issues. Through the example of the LbFV virus, manipulating the behaviour of superparasitism in the parasitoid *Leptopilina boulardi*, a study investigated the contribution of host and virus genotypes on the variability of the phenotypic effect induced by the virus but also how environmental factors influence epidemiology of the virus (Patot *et al.* 2010). In another study, Clavijo *et al.* (com. O32) analyze the spatio-temporal expression of the vankyrins (IKappaBlike proteins of the endosymbiont *Hyposoter didymator* Ichnovirus, *HdIV*) which could play an important role in the parasitism success of the wasp *Hyposoter didymator*. Plants-virus interactions were also discussed with, for example, the ability of a polerovirus to bind to phloem proteins in order to be transmitted during aphids' meals (Bencharki *et al.* 2010). The increase of the viral transmission could be correlated with a decrease in plant infestation. And last, many thousands of endoparasitic wasp species are known to inject polydnavirus particles into their caterpillar host during

oviposition, causing immune and developmental dysfunctions that benefit the wasp larva. An analysis of the genes involved in Ichnovirus particles of *Hyposoter didymator* demonstrated that the ancestor of Ichnovirus differs from that of Brachovirus (Volkoff *et al.* 2010). These data provide an example of convergent evolution where different groups of wasps have independently domesticated viruses to deliver genes into their hosts.

Insect Ecology studies: contributing to new application fields

Because ecological paradigms are complex, they are nowadays studied through a wide diversity of scientific disciplines. Thanks to this plurality, application fields are numerous. The insights of insect ecology can be used to improve the control of pests and disease vectors, as well as in forensic entomology. Models seem today chosen not for their great contributions to scientific knowledge, but with the aim of finding a direct application for researches.

Mosquitoes: a model in medical entomology

Mosquito models were very representative of the congress, due to the great need to control these vectors of human diseases. A study on the gut flora of *Anopheles gambiae* suggested that *Plasmodium falciparum* was able to infect secondary hosts in relation with the composition of the mosquito flora (Boissiere *et al.* com. **O33**). On the same model, another study showed that two carboxypeptidases are required for the development of this parasite, giving new potential targets for strategies limiting malaria transmission (Fougere *et al.* com. **O37**). In the other well-known mosquito, *Aedes aegypti*, a genomic study reinforced the hypothesis that a cadherine gene plays an important role in the resistance phenomenon emerging against the insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* (Bonin *et al.* 2009). In a similar way, the study of the transcription profiles of several P450 genes in *A. aegypti* show different transcription profiles according to xenobiotic exposure, life stage and sex (Poupardin *et al.* 2010). Authors identified particular genes likely to have chemo-protective functions in this insect.

Pest control and urban entomology

Although inherent to any research work, interaction between researches performed in the laboratory and the application of acquired knowledge in the field must be particularly developed. By this dynamic, biological pest control can be implemented while considering the practical and economic pressures met by farmers, as was done in the control of the sugar cane borer *Chilo sacchariphagus* in La Reunion Island (Tabone *et al.* com. **O14**). Another way to

control pests is the use of natural substances. For example, dicaffeoylquinic acids (diCQ), derived from caffeic acid, presents a high potential for repulsion and toxicity against insects. These properties have been tested and confirmed on different species of aphids, like *Myzus persicae* (Servier *et al.* com. **O09**).

Insect pollinators, necessary to the reproduction of many plant species, are essential at an ecological and economic level. At the end of this international year of biodiversity, a European program Life+ Biodiversite called “Urbanbees” for URBAN BEE biodiversity action planS (2010-2014) has been launched to protect the stupendous diversity of wild bees living in urban and sub-urban environment (Mouret *et al.* com. **O11**). Moreover, chemical ecology is one of the approaches allowing the understanding of the functioning of pollinators, and it has been studied with the analysis of the mutualistic interactions between coleopterans (genus: *Elaeidobius*) and the African oil palm *Elaeis guineensis* (Frerot & Ollivier, com. **O12**).

Impact of human activities on insect ecology

The consequences of anthropogenic activities on ecosystems confront scientists to new and complex problematic illustrated by the studies respectively on climate changes and invasive and pest species. To bring up original questions, these studies profited from particularities of insect models, namely their sensitivity to temperature, their various interactions with others species, and their adaptability in response to a resource change. Thus, by focusing on populations of the parasitoid *Leptopilina boulardi* in the Rhone valley, (Delava *et al.* com. **O22**) investigated the relative genetic adaptation to cope with increasing temperature; while Kaufmann *et al.* (com. **O24**) attempted to assess, through the ecological system *Fallopia* spp. And *Lasius neglectus*, the effects of mutualistic interactions between invasive species on their capacity to colonize a new habitat. From the pest species of the genus *Sesamia*, Chouquet *et al.* (com. **O17**) studied the ability of insect populations to preferentially exploit wild-host plants or cultivated host-plants due to the extension of agricultural areas, by the analysis of the cGMP-dependent protein kinase (PKG) encoded by the *foraging* gene.

The missing: symbioses, behavioural ecology and ecology of community

Surprisingly, few presentations discuss about symbiosis and insect ecology. A study on four *Curculio* spp. brought the hypothesis that species and prevalence of symbiont have a major implication in the different ways used by insects for resources' exploitation. The ability of

specific symbiont to digest particular compounds should allow the coexistence of host species on a resource changing qualitatively with time (Merville *et al.* com. **O38**). Another study also suggests that *Wolbachia* symbiotes can contribute to feeding behaviours by directly interacting with plants. Indeed, the leaf-mining herbivorous insect *Phyllonorictor blancardella* that use deciduous leaves to fuel growth and reproduction even beyond leaf fall is able to block the senescence of a leaf after its infestation in order to keep a lasting pantry (Kaiser *et al.* 2010). Bacteria impacted plant physiology through manipulation of cytokinin levels. Furthermore, the scientific community working on symbiosis has been thrilled by an innovating result from a study on *Acyrtosiphon pisum* secondary symbiosis. Here, in addition to their obligatory symbiont *Buchnera aphidicola*, populations of these aphids live with a great diversity of facultative symbionts. The symbiont *Spiroplasma* presents an important effect of male-killing whereas a new facultative symbiont, close to *Rickettsiella* induces a change of aphid colour, from pink to green (Tsuchida *et al.* 2010).

Few communications focused on behavioural and community ecology. First, Froissart *et al.* (com., **O20**) investigated, in the parasitoid *Venturia canescens*, the dynamic of memory in relation to resources distribution in environment. Secondly, Pelisson *et al.* (com. **O21**) explored theories developed in community ecology (niche versus neutral theories) to explore the coexistence mechanism of four insect species of genus *Curculio*, in competition for a same resource.

As the “16e Colloque Biologie de l’insecte” demonstrated, insects are exciting in vivo models at the molecular or organism level to enhance knowledge of the integrative physiology of insects. Another point raised during the congress is the involvement of members of others communities, like medicals ones, mainly on the emerging mosquitoes’ model. Due to these new points of view, the “Colloque Biologie de l’Insecte” showed depth approaches at the molecular level to lighten the understanding of functional pathogens-insects interactions mechanisms. But as the professor A. Nappi from the University of Loyola, Chicago, said “things are not always what they seem” and this assertion leads the community to question at a wider focus, on the global conception of the insect biology, with poorly explored fields such as symbiosis, behavioural ecology and ecology of community to enlarge. Moreover, most of speakers were young scientist showing the present dynamism of French entomology.

References

- Barrozo R. B., Jarriault D., Simeone X., Gaertner C., Gadenne C., Anton S. 2010.** Mating-induced transient inhibition of responses to sex pheromone in a male moth is not mediated by octopamine or serotonin. *The Journal of Experimental Biology* **213**: 1100-1106.
- Bencharki B., Boissinot S., Revollon S., Ziegler-Graff V., Erdinger M., Wiss L., Dinant S., Renard D., Beuve M., Lemaitre-Guillier C., Brault V. 2010.** Phloem protein partners of cucurbit aphid borne yellows virus: possible involvement of phloem proteins in virus transmission by aphids. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 799-810.
- Boissiere A., Abate L., Tchioff o M., Marie A., Awono-Ambene P., Morlais I. 2010.** Analyse de la flore bactérienne intestinale de populations naturelles d'*Anopheles gambiae*. *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**: 57 (O33).
- Bonin A., Paris M., Tetrau G., David J. P., Despres L. 2009.** Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variations. *BMC Genomics* **10**: 551.
- Chouquet B., Chardonnet F., Le Ru B., Capdevielle-Dulac C., Silvain J.-F., Kaiser L. 2010.** Le gène *for* ferait-il des ravages ! *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**: 41 (O17).
- Clavijo G., Doremus T., Ravallec M., Mannucci M.-A., Jouan V., Volkoff A.-N., Darboux I. 2010.** Analyse transcriptionnelle des gènes de la famille des vankyrines de l'ichnovirus HdIV, symbionte de l'hyménoptère parasitoïde *Hyposoter didymator* chez différents hôtes. *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**: 56 (O32).
- Colinet H., Fai Lee S., Hoff mann A. 2010.** Functional characterization of the *frost* gene in *Drosophila melanogaster*: importance for recovery from chill coma. *PLoS ONE* **5**(6): e10925.
- Delava E., Gibert P., Charif D., Allemand R., Fleury F. 2010.** Changement climatique et adaptation : réponse des populations d'un hyménoptère parasitoïde a différents régimes de température. *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**:46 (O22)
- Fougere A., Bourgoûin C. 2010.** Analyse fonctionnelle des carboxypeptidases digestives d'*Anopheles gambiae*, impliquées dans le développement de *Plasmodium falciparum* responsable du paludisme. *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**: 61 (O37).
- Frerot B., Ollivier L. 2010.** Mutualisme et pollinisation par duperie olfactive : cas du palmier a huile et des *Elaeodobius* spp. *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**: 36 (O12).
- Kaufmann B., Demarcy M., Amiez M., Piola F. 2010.** Impacts croises de 2 especes invasives mutualistes sur des communautés indigènes : l'exemple des renouées invasives (*Fallopia* spp.) et de la fourmi *Lasius neglectus*. *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**: 48 (O24).
- Merville A., Henri H., Vallier A., Venner S., Vavre F., Heddi A., Venner M.-C. 2010.** Partitionnement de niches écologiques et diversité endosymbiotique chez les balanins du chene (*Curculio* sp.). *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**: 62 (O38).
- Froissart L., Sauzet S., Desouhant E. 2010.** La distribution spatiale des ressources façonne-t-elle la dynamique de la mémoire ? *Venturia canescens* sur le gril. *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**: 44 (O20)
- Kaiser W., Huguet E., Casas J., Commin C., Giron D. 2010.** Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proceedings of the Royal Society, London B* **277**: 2311-2319.
- Mouret H., Sabah C., Vyghen F., Guilbaud L., Visage C., Vaissiere B. 2010.** URBANBEE, un programme européen LIFE pour valoriser la biodiversité des abeilles en ville. *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**:35 (O11).
- Patot S., Martinez J., Allemand R., Gandon S., Varaldi J., Fleury F. 2010.** Prevalence of a virus inducing behavioural manipulation near species range border. *Molecular Ecology* **19**: 2995-3007.
- Pelisson P. F., Bel-Venner M. C., Menu F., Venner S., 2010.** Coexistence d'insectes phytophages et partitionnement temporel de l'exploitation d'une ressource pulsée. *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**: 45 (O21).

- Poupardin R., Riaz M. A., Vontas J., David J. P., Reynaud S., 2010.** Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* **19**: 185-193.
- Rabatel A., Febvay G., Gaget K., Duport G., Rahbe Y., Charles H., Calevro F., Colella S. 2010.** Caractérisation transcriptomique du développement embryonnaire et larvaire du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*. *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**: 31 (O07).
- Servier S., Sauge M. H., Febvay G., Corre M. N., Croset C., Lacroze J. P., Rahbe Y., Poessel J.-L. 2010.** Etude du mode d'action des acides dicafeoylquiniques, molécules naturelles aphicides. *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**: 33 (O09).
- Tabone E., Roux E., Goebel R., Colombel E., Clain C., Marquier M., Frandon J., Bodendorfer J, Bonnet A., Do Thi Khanh H. 2010.** Une stratégie de lutte biologique en combinant lâchers inondatifs et conservation. *Actes du 16e Colloque Biologie de l'insecte* **1**: 38 (O14).
- Tsuchida T., Koga R., Horikawa M., Tsunoda T., Maoka T., Matsumoto S., Simon J. C., Fukatsu T. 2010.** Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science* **330**: 1102-1104.
- Volkoff A. N., Jouan V., Urbach S., Samain S., Bergoin M., Wincker P., Demetere E., Cousserans F., Provost B., Coulibaly F., Legeai F., Beliveau F., Cusson M., Gyapay G., Drezen J. M. 2010.** Analysis of virion structural components reveals vestiges of the ancestral *Ichnovirus* genome. *Plos Pathogen* **6**(5): e1000923.

Rôle du gène *foraging* dans l'évolution du comportement alimentaire de noctuelles foreuses de céréales

Résumé

En réponse aux changements importants d'usage des terres via l'agriculture, certaines espèces d'insectes phytophages se sont adaptées en exploitant les plantes cultivées, provoquant ainsi de lourds dommages agro-économiques. L'espèce *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera : noctuidae), un représentant important des espèces ravageuses du maïs, présente deux populations distinctes : une population ravageuse trouvée dans les champs de maïs, et une population non-nuisible trouvée exclusivement sur herbacées sauvages. Ces préférences écologiques spécifiques suggèrent l'évolution de stratégies alimentaires distinctes, conférant aux insectes une fitness spécifique selon la plante-hôte consommée. Puisque le gène *foraging* (*for*) est un gène candidat pour l'évolution des stratégies alimentaires, celui-ci pourrait être impliqué dans l'adaptation à des ressources spécifiques.

Sur la base d'une approche intégrative incluant les analyses de conservation de séquence, du polymorphisme, des fréquences alléliques, de l'activité recherche alimentaire, et des traits d'histoire de vie, nous avons comparé des larves issues des populations sauvages et ravageuses. L'ensemble des résultats obtenus ont démontré la conservation de la fonction du gène *for* chez *S. nonagrioides*. L'établissement d'un lien causal entre les génotypes et les phénotypes associés à l'écologie des populations illustre comment un polymorphisme nucléotidique (SNP) peut moduler une fonction comportementale majeure. L'évolution du gène *for* pourrait ainsi être impliquée dans l'adaptation d'un insecte phytophage aux ressources cultivées.

Mots clés : *Sesamia nonagrioides*; Gène *foraging*; Lepidoptera; Adaptation; PKG; Ravageur.

Abstract

Some phytophagous insect species have been able to cope with rapid changes in land use and have shifted to cultivated host plants, where they cause great economic losses. One of these insects is *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), which has two distinct ecological populations: pest populations found in maize crop, and non-pest populations found exclusively on wild herbaceous host plants. Because *foraging* (*for*) is a candidate gene for variation in feeding strategies, it could be involved in the adaptation to cultivated plants. Natural selection could have led to differences in food-search strategies used by the insects because of qualitative and quantitative differences between these two types of resources.

From an integrative experimental approach including analyses of sequence conservation and polymorphism, of allelic frequencies, of foraging activity, of life history traits, and pharmacology experiments, we compared larvae from crop and wild populations. The overall results showed a conservation of the *for* function in the *S. nonagrioides* species. By linking phenotype to genotype and population ecology, this study illustrates how a single nucleotide polymorphism (SNP) can modulate a major behavioural function, and suggest that evolution of the *foraging* gene could be one of the mechanisms involved in the adaptation of a phytophagous insect to a cultivated host plant.

Keywords: *Sesamia nonagrioides*; *Foraging* gene; Lepidoptera; Adaptation; PKG; Pest.