

**UNIVERSITÉ PARIS XI  
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD**

**THÈSE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI**

Champs disciplinaires : Physiologie et biologie des organismes

École doctorale : Signalisation, Neurosciences, Endocrinologie et Reproduction

présentée et soutenue publiquement par

**ANNE-EMMANUELLE FÉLIX**

le 10 janvier 2008

**Ecologie chimique et approche phylogénétique  
chez trois espèces de Lépidoptères africains  
du genre *Busseola* (Noctuidae)**

Directeur de thèse : FREROT Brigitte  
Codirecteur de thèse : SILVAIN Jean-François

**JURY**

|                                 |            |                           |
|---------------------------------|------------|---------------------------|
| Président : M. JALLON Jean-Marc |            | Université de Paris XI    |
| Mme DESPRES Laurence            | Rapporteur | Université de Grenoble    |
| Mme HOSSAERT Martine            | Rapporteur | Université de Montpellier |
| M. ROQUES Alain                 | Examineur  | INRA                      |
| Mme FREROT Brigitte             | Examineur  | INRA                      |
| M. SILVAIN Jean-François        | Examineur  | IRD                       |

# Remerciements

Je tiens à remercier en particulier mes deux directeurs de thèse, Brigitte Frérot et Jean-François Silvain, qui m'ont donné la chance de vivre cette expérience dans la recherche, de partir à l'étranger (superbe voyage au Kenya, merci) et de travailler dans deux laboratoires remplis de gens extraordinaires, pour leurs amitiés, leurs conseils et leurs relectures.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ce travail : Laurence Desprès, Martine Hossaert, Jean-Marc Jallon et Alain Roques.

Un grand merci et une pensée toute particulière aux Kenyans par adoption, Paul-André pour sa bonne humeur permanente et Bruno pour sa gentillesse et sa patience. Sans eux, je n'aurais pas pu travailler sur un tel sujet, ni profiter du Kenya !

Une dédicace spéciale à Daniel Lachaise, qui nous a quitté trop tôt mais qui avait participé à mon comité de thèse avec sa passion pour la science et son charisme.

Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont entourée tout au long de ses presque quatre années parisiennes :

... dans l'équipe INRA, Hervé Guenego, toujours là tôt le matin pour que je ne sois pas seule et Gilles Genestier qui restait tard pour que le couloir soit moins sombre, d'abord des amis et aussi des aides précieuses pour le travail ; Sophie pour ses pauses café-bavardages-détente, nos prises de têtes statistiques et nos duos au badminton ou pour le jogging du midi ; Cyril pour ses « bonjour p'tit bonhomme ou bonjour la belle », toujours le mot pour nous détendre et pour ses courses folles du midi ; Adrien connu pour son sens du rythme qui m'a tenu compagnie à ma droite ; David, ses chansons et ses histoires pour me soutenir à ma gauche : l'équilibre idéal ; Ene, courageuse maman, avec sa bonne humeur et sa gentillesse ; Julien qui est là depuis le DEA, soutien moral pour le stress en commun ; Christophe pour son sens de l'informatique, sa passion entomologique et sa patience ; Jean-Marc pour sa chaleur des îles, son rhum et sa joie de vivre ; François pour son aide essentielle en chromatographie et sa gentillesse ;

... dans l'équipe IRD-CNRS, une mention particulière pour Antoine, ami sincère, pour sa patience envers mon ignorance, pour sa joie de vivre, la piscine et le jogging et son assistance irremplaçable ; Isabelle pour son amitié gravée à jamais, son soutien moral et intellectuel et ses moments de délire ; Magally en qui j'ai trouvé une amie (nous sommes unies pour la vie) et un grain d'extravagance colombienne ; Cécile C. pour sa bonne humeur, sa goutte de folie et sa compagnie agréable ; Cécile R. pour son amitié, sa passion bretonne et son aide si précieuse ; Delphine pour son soutien moral, les moments de détente et les soirées ; Catherine pour ses idées de sorties et pour ses conseils, même si je reste jalouse de ses papillons ; Michel Sezonlin pour ses

tirades et sa touche béninoise ; Claire pour tout son travail et pour les nombreux retours en RER (arrête de râler poulette), George for the Kenyan feeling

... Merci à tous les autres, Romina, Sebastian, Julien, Alexandre, et j'en oublie sûrement...

Un grand merci à Corinne pour m'avoir accueilli chez elle et à ma famille pour m'avoir tant soutenue : Guillaume, mon frère, pour son aide inestimable, pour m'avoir relue et pour être sur Paris avec moi, mes sœurs Marie-Solenne pour ses textos quelquefois incompréhensibles mais toujours chaleureux et drôles et Sophie-Aurélié pour son soutien et ses mots gentils et une attention spéciale à ma maman qui m'a tant aidée et fait confiance et à mon ange d'Italie, David sans qui je n'aurais pas tenu le coup. Merci à tout le reste de la famille, les lyonnais, les suisses et les nancéens pour leurs nombreux appels, leurs courriers et leur soutien.

Encore mille mercis aux Marseillaises : Audrey pour les remontées de moral et pour ses histoires délurées et sa joie de vivre ; Jessica pour nos conversations MSN si précieuses et pour sa force de continuer malgré tout ; Aude pour sa touche personnelle italo-asiatico-marseillaise et sa si longue amitié (plus de 20 ans déjà !) ; Faustine pour ses délires MSN et sa gentillesse, Pascale pour ses appels et son soutien.

Et à celles qui ne le sont pas : ma troisième sœur strasbourgeoise, Hélène et ses parents toujours si adorables ; la Cécile de Floride, souvent présente même loin.

|                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Liste des annexes, figures et tableaux .....</b>                                                                            | <b>5</b>  |
| <b>Introduction .....</b>                                                                                                      | <b>9</b>  |
| <b>Problématique .....</b>                                                                                                     | <b>13</b> |
| <b>Première partie : Généralités sur les concepts de l'espèce et de la spéciation .....</b>                                    | <b>15</b> |
| I. Généralités sur les concepts de l'espèce .....                                                                              | 17        |
| II. Les trois principales théories de la spéciation .....                                                                      | 21        |
| 1. La spéciation allopatrique .....                                                                                            | 23        |
| 2. La spéciation sympatrique.....                                                                                              | 25        |
| 3. La spéciation parapatrique.....                                                                                             | 27        |
| 4. L'isolement écologique .....                                                                                                | 28        |
| 5. Conclusion.....                                                                                                             | 28        |
| <b>Deuxième partie : Généralités sur le système spécifique de reconnaissance du partenaire sexuel chez les Lépidoptères...</b> | <b>29</b> |
| I. La période et le lieu de reproduction .....                                                                                 | 33        |
| II. La phéromone sexuelle femelle .....                                                                                        | 37        |
| III. Le comportement d'attraction du mâle et le comportement de cour .....                                                     | 40        |
| 1. Le comportement d'attraction du mâle .....                                                                                  | 40        |
| 2. Le comportement de cour.....                                                                                                | 41        |
| IV. L'accouplement et la fécondation.....                                                                                      | 43        |
| V. Les mécanismes d'isolement post-zygotiques intrinsèques .....                                                               | 45        |
| 1. La bactérie <i>Wolbachia</i> .....                                                                                          | 45        |
| 2. L'incompatibilité des génomes .....                                                                                         | 46        |
| VI. Les mécanismes d'isolement post-zygotiques extrinsèques.....                                                               | 47        |
| 1. La non-viabilité écologique.....                                                                                            | 47        |
| 2. La stérilité comportementale .....                                                                                          | 48        |
| VII. Conclusion .....                                                                                                          | 48        |
| <b>Troisième partie : Présentation des insectes étudiés.....</b>                                                               | <b>49</b> |
| I. <i>Busseola fusca</i> .....                                                                                                 | 51        |
| II. <i>Busseola phaia</i> et <i>Busseola segeta</i> .....                                                                      | 54        |
| III. Réception et conditionnement des insectes .....                                                                           | 56        |

## **Quatrième partie : Variabilité des modalités de reconnaissance du partenaire sexuel chez différentes populations de l'espèce *Busseola fusca*.....59**

- I. Mise au point technique et étude du comportement d'attraction du mâle de *Busseola fusca* en tunnel de vol ..... 63
  - 1. Matériels et méthodes..... 63
  - 2. Résultats ..... 66
  - 3. Discussion et conclusion ..... 69
- II. Etude du comportement de cour ..... 71
- III. Identification de la phéromone sexuelle de *Busseola fusca* ..... 79
- IV. Rôle de la plante-hôte sur le système de reconnaissance ..... 97
- V. Le système de reconnaissance du partenaire sexuel dans les populations identifiées par les marqueurs mitochondriaux et nucléaires chez *Busseola fusca* : relation entre le génotype, la phéromone et le comportement ..... 115
  - 1. Matériels et méthodes..... 118
  - 2. Résultats : variabilité de la composition phéromonale des individus femelles et de réponse des mâles de *Busseola fusca* caractérisées avec le marqueur mitochondrial.... 121
  - 3. Résultats : variabilité de la composition phéromonale des individus femelles et de réponse des mâles de *Busseola fusca* à l'aide des marqueurs nucléaires..... 125
  - 4. Discussion ..... 127

## **Conclusion.....131**

## **Cinquième partie : Les modalités de l'isolement reproducteur entre les espèces du genre *Busseola*.....135**

- I. Approche d'écologie chimique : étude de l'isolement reproducteur entre *Busseola phaia*, *Busseola segeta* et *Busseola fusca* ..... 137
  - 1. Matériels et méthodes..... 139
  - 2. Résultats ..... 143
  - 3. Discussion et conclusion ..... 153
- II. Approche moléculaire : étude du statut taxonomique de *Busseola phaia* et *Busseola segeta* ..... 157
  - 1. Matériels et méthodes..... 159
  - 2. Résultats ..... 163
  - 3. Discussion et conclusion ..... 169
- III. Discussion générale du chapitre..... 172

## **Conclusion.....181**

## **Bibliographie .....185**

## **Annexes.....197**

# Liste des annexes, figures et tableaux

---

## Annexes

|                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Annexe 1 : Schéma de la fibre SPME et de son support et photographie d'une glande phéromonale (loupe binoculaire x 50)..... | 198 |
| Annexe 2 : Les composés de la phéromone sexuelle femelle de <i>Busseola fusca</i> .....                                     | 198 |
| Annexe 3 : Protocoles pour les locus microsatellites .....                                                                  | 199 |
| Annexe 4 : Composition du liquide de Faure.....                                                                             | 200 |

## Figures

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1 : Schéma représentatif des alternatives possibles de structuration des populations. .                                                                                                                                                                                                                          | 22  |
| Figure 2 : Les différents mécanismes d'isolement pré et post-zygotique chez les Lépidoptères. ....                                                                                                                                                                                                                      | 31  |
| Figure 3 : Carte d'Afrique, le tracé blanc représente l'Afrique Sub-Saharienne. ....                                                                                                                                                                                                                                    | 51  |
| Figure 4 : Cycle de développement de <i>Busseola fusca</i> , les durées de chaque étape sont en vert. ....                                                                                                                                                                                                              | 53  |
| Figure 5 : Carte du Kenya (Google Earth) indiquant les localités de prélèvements des <i>B. segeta</i> et des <i>B. phaia</i> , leur situation géographique, l'écologie du lieu d'échantillonnage et la plante-hôte sur laquelle les chenilles ont été prélevées. ....                                                   | 55  |
| Figure 6 : Schéma du tunnel de vol. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 65  |
| Figure 7 : Ethogramme du comportement d'attraction du mâle testé avec la phéromone femelle dans le tunnel de vol : les items comportementaux encadrés sont les états et les autres sont les événements. ....                                                                                                            | 66  |
| Figure 8 : Schéma du vol orienté d'un mâle de <i>B. fusca</i> en tunnel de vol en présence de la phéromone sexuelle de femelles vierges en appel de <i>B. fusca</i> . La flèche indique le sens du flux d'air. Le Lock-On (LO) est représenté par le trait noir en pointillé et le vol orienté par le trait plein. .... | 68  |
| Figure 9 : Les photographies des plantes utilisées. ....                                                                                                                                                                                                                                                                | 99  |
| Figure 10 : Distribution géographique des individus <i>B. fusca</i> et les centres putatifs d'origine des trois clades mis en évidence par les analyses phylogénétiques (Sezonlin <i>et al.</i> , 2006b). ....                                                                                                          | 116 |
| Figure 11 : Carte du Kenya regroupant les localités de prélèvements des <i>B. fusca</i> et description des trois populations réalisées par le logiciel <i>Geneland</i> au Kenya à l'aide de ces <i>B. fusca</i> (Dupas, résultats non publiés). ....                                                                    | 116 |
| Figure 12 : Schéma du fragment du gène mitochondrial codant pour le cytochrome <i>b</i> avec les amorces utilisées lors des séquençages et les zones de coupures des enzymes de restriction. ....                                                                                                                       | 120 |
| Figure 13 : Pourcentage des comportements (mâles négatifs, vol orienté et contact) entre les individus sauvages et les individus d'élevage. ....                                                                                                                                                                        | 122 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 14 : Variation de comportements des mâles de <i>B. fusca</i> qui ne répondent pas (négatifs), qui ont un vol anémotaxique ou qui entrent en contact avec la phéromone sexuelle femelle de <i>B. fusca</i> en tunnel de vol en fonction de la variabilité observée au niveau haplotypique.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 124 |
| Figure 15 : Durée de divers comportements (temps de latence, temps de vol jusqu'au demi-tunnel (VO1/2) et temps de vol jusqu'au contact avec la femelle) des mâles de <i>B. fusca</i> mis en contact avec la phéromone femelle de <i>B. fusca</i> en tunnel de vol en fonction de la variabilité observé au niveau haplotypique. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 124 |
| Figure 16 : Diagramme en barres (barre plot) représentant les taux d'assignation des individus aux quatre populations définies par le logiciel Structure. Chaque barre correspond à un individu, chaque couleur représente une population et les individus encadrés de rouge appartiennent à notre échantillonnage. Les valeurs en ordonnée représentent le pourcentage d'appartenance d'un individu à une des populations. ....                                                                                                                                                                                             | 126 |
| Figure 17 : Les périodes de reproduction des trois espèces, <i>B. fusca</i> , <i>B. segeta</i> et <i>B. phaia</i> , en fonction des heures de la scotophase.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 143 |
| Figure 18 : Formule chimique du Z11-14:OH, composé additionnel de la phéromone sexuelle femelle de <i>Busseola segeta</i> et <i>Busseola phaia</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 143 |
| Figure 19 : Analyse en GC/MS d'un prélèvement par la technique SPME d'une glande phéromonale de <i>Busseola phaia</i> provenant de Kisii (RTX-5 Sil-MS, 30 m x 0.32 i.d., IE, 70 eV, 40 to 330 amu). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 144 |
| Figure 20 : Analyse en GC/MS d'un prélèvement par la technique SPME d'une glande phéromonale de <i>Busseola phaia</i> de Kakamega (RTX-5 Sil-MS, 30 m x 0.32 i.d., IE, 70 eV, 40 to 330 amu). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 144 |
| Figure 21 : Analyse en GC/MS d'un prélèvement phéromonal de <i>Busseola segeta</i> par la technique SPME (RTX-5 Sil-MS, 30 m x 0.32 i.d., IE, 70 eV, 40 to 330 amu). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 145 |
| Figure 22 : Ratios des composés phéromonaux minoritaires présents dans les phéromones sexuelles femelles de <i>Busseola segeta</i> et de <i>Busseola phaia</i> provenant de Kisii et de Kakamega. Les lettres indiquent les différences significatives.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 146 |
| Figure 23 : Ratios des composés phéromonaux minoritaires présents dans les phéromones sexuelles femelles des trois espèces du genre <i>Busseola</i> . Les lettres indiquent les différences significatives.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 147 |
| Figure 24 : Comportements en tunnel de vol des mâles de <i>B. fusca</i> testés avec une femelle de <i>B. phaia</i> (BP) ou de <i>B. segeta</i> (BS) et comportements des mâles de <i>B. phaia</i> et <i>B. segeta</i> testés avec une femelle de <i>B. fusca</i> (BF) : vol orienté avant le demi-tunnel (Vavt), vol orienté jusqu'au demi-tunnel (VO ½), vol orienté après le demi-tunnel (Vaps), vol près de la source (VS) et contact avec la source avec ou sans tentatives d'accouplement (Contact). Le comportement témoin est celui de mâles de <i>B. fusca</i> testés avec une femelle de <i>B. fusca</i> (BF). .... | 149 |
| Figure 25 : Dessin des trois génitalias de <i>Busseola fusca</i> , <i>Busseola segeta</i> et <i>Busseola phaia</i> (agrandissement x 17). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 152 |
| Figure 26 : Schéma des différences entre les quantités déposées et émises de composés phéromonaux sur les capsules utilisées en tunnel de vol. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 155 |
| Figure 27 : Schéma représentant les caractéristiques intervenant dans l'isolement reproducteur entre les espèces du genre <i>Busseola</i> . Le trait pointillé noir représente la vallée du Rift. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 156 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 28 : Schéma du fragment du gène mitochondrial codant pour le cytochrome <i>b</i> avec les amorces internes utilisées lors des séquençages de <i>Busseola segeta</i> et <i>Busseola phaia</i> .....                                                                                                                          | 159 |
| Figure 29 : Carte indiquant la position des prélèvements des populations de <i>Busseola segeta</i> et <i>Busseola phaia</i> au Kenya, en Ouganda et en Tanzanie.....                                                                                                                                                               | 161 |
| Figure 30 : Arbre phylogénétique réalisé en maximum de parcimonie (1000 répétitions) avec le logiciel Mega 4 à partir des individus de <i>B. fusca</i> appartenant aux trois clades d'haplotypes et des individus de <i>B. phaia</i> et de <i>B. segeta</i> d'origines différentes. L'extragroupe est <i>S. nonagrioides</i> ..... | 164 |
| Figure 31 : Détail de l'arbre phylogénétique : la population homogène des <i>B. segeta</i> , associée aux <i>B. phaia</i> de Tanzanie. ....                                                                                                                                                                                        | 166 |
| Figure 32 : Arbre phylogénétique réalisé avec la méthode de parcimonie (1000 répétitions) avec le logiciel Paup 4 à partir des individus de <i>B. phaia</i> et de <i>B. segeta</i> d'origines différentes. L'extragroupe est <i>S. calamistis</i> . ....                                                                           | 167 |
| Figure 33 : Schéma d'une hypothèse évolutive réalisée à partir des données de phylogénie entre les espèces du genre <i>Busseola</i> . LVC = Ligne Volcanique du Cameroun et Ma = millions d'années.....                                                                                                                            | 169 |
| Figure 34 : Arbre représentant les ratios du composé phéromonal par rapport à l'arbre phylogénétique construit à l'aide du marqueur mitochondrial.....                                                                                                                                                                             | 168 |
| Figure 35 : Corrélations entre les données moléculaires et les données phéromonales entre les espèces du genre <i>Busseola</i> . ....                                                                                                                                                                                              | 173 |
| Figure 36 : Synthèse phéromonale des quatre composés produits par les espèces du genre <i>Busseola</i> : le Z11-14:Ac, le E11-14:Ac, le Z9-14:Ac, le Z11-16:Ac et le Z11-14:OH. ....                                                                                                                                               | 175 |
| Figure 37 : Schéma des hypothèses évolutives pour <i>B. phaia</i> et <i>B. segeta</i> (AR : aire de répartition).....                                                                                                                                                                                                              | 180 |

## **Tableaux**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 1 : Les trois concepts majeurs de la spéciation et leurs différentes modalités. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 22  |
| Tableau 2 : Description des produits composant le milieu artificiel utilisé pour l'élevage de masse du laboratoire ICIPE et pour l'élevage au laboratoire INRA. La fraction B est ajoutée à la fraction A lorsque l'agar est dissout. ....                                                                                                                                                                                                          | 57  |
| Tableau 3 : Durées moyennes et variations du temps en secondes (s.) des différents items comportementaux conduisant à la localisation de la source phéromonale chez les mâles (N=20) de <i>Busseola fusca</i> en tunnel de vol.....                                                                                                                                                                                                                 | 66  |
| Tableau 4 : Pourcentages des ratios de chaque composé des phéromones femelles de <i>B. segeta</i> de la région de Race course, de <i>B. phaia</i> de Kisii ou de Kakamega. Les ratios des composés sont calculés en attribuant un pourcentage de 100% au Z11-14:Ac. ....                                                                                                                                                                            | 145 |
| Tableau 5 : Composition des mélanges phéromonaux synthétiques utilisés dans les expériences de piégeages sur le terrain dans deux localités : Maimahiu (Est de la vallée du Rift, Kenya) et Kakamega (Ouest de la vallée du Rift, Kenya) et nombre de mâles de <i>Busseola fusca</i> , <i>Busseola phaia</i> et <i>Busseola segeta</i> capturés. Les astérisques représentent la significativité du test ANNOVA, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05..... | 149 |
| Tableau 6 : Taux de divergence calculés avec le programme Mega 4 et suivant le modèle de Kimura à deux paramètres.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 165 |



# Introduction

---

Les insectes représentent plus de la moitié des êtres vivants décrits et sont présents dans presque tous les habitats et tous les milieux. Leur rôle est majeur dans de nombreux écosystèmes. La communication chez les insectes fait intervenir des systèmes sensoriels très sophistiqués, en particulier la communication par des signaux chimiques comme les phéromones. Chez les Lépidoptères, la communication chimique à l'aide de molécules phéromonales est très répandue et a fait l'objet de nombreuses études. Cet ordre représente un des quatre groupes majeurs chez les insectes, avec les Coléoptères, les Diptères et les Hyménoptères. Parmi les Lépidoptères, la superfamille des Noctuoïdés est la plus importante en nombre avec environ 40.000 espèces (Kristensen, 1999).

En grande majorité, les Lépidoptères sont phytophages au stade larvaire (chenille) et sont donc, la plupart du temps, associés à une ou plusieurs plantes-hôtes selon leur degré de spécialisation. Les chenilles de nombreuses espèces de Noctuidés s'alimentent aux dépens d'une ou plusieurs plantes cultivées. Ces espèces sont considérées comme des ravageurs, dont l'étude est devenue d'un intérêt croissant aux vues des pertes économiques observées. La lutte contre les ravageurs peut se faire par le biais de produits phytosanitaires coûteux, potentiellement dangereux pour l'environnement et la santé humaine. Appliqués à forte dose, ces produits induisent l'apparition de résistances. La surveillance biologique, à l'aide des pièges phéromonaux, permet de cibler l'application des insecticides pendant les périodes d'infestation et de réduire les coûts et les doses. La surveillance biologique de ces insectes ne peut pas être envisagée sans une parfaite connaissance de leur biologie, et plus particulièrement de leur système de reproduction.

La reproduction chez les Lépidoptères met en jeu de nombreux mécanismes qui permettent la localisation, la reconnaissance du partenaire sexuel et l'accouplement entre deux partenaires sexuels de la même espèce, afin d'engendrer une descendance d'individus viables et fertiles. La reproduction est une notion constante dans la définition des concepts de l'espèce.

Les processus complexes de localisation et de reconnaissance interviennent dans la définition de l'espèce selon Hugh Paterson (1985) et son concept de reconnaissance (Recognition Concept), concept que nous définirons plus précisément dans cette étude. Ce concept de l'espèce est associé à ce que Paterson appelle le système de reconnaissance spécifique du partenaire sexuel ou Specific Mate Recognition System (SMRS). Chez les Lépidoptères Noctuidae, dont l'activité se déroule essentiellement la nuit, les stimuli visuels sont peu ou pas présents et les signaux chimiques jouent un rôle essentiel tout au long de leur cycle de vie. La communication chimique permet aux Lépidoptères de repérer leur plante-hôte, de localiser et d'identifier leur partenaire sexuel et de se reproduire dans des conditions favorables à la transmission des gènes qu'ils portent.

Pour la première fois, en 1959, Karlson et Lüscher ont défini les phéromones comme étant « des substances chimiques sécrétées à l'extérieur par un individu et perçues par un autre individu de la même espèce, chez qui elles engendrent une réaction spécifique, par exemple un comportement défini ou une modification physiologique ». Les phéromones sont des sémiochimiques, c'est-à-dire des signaux chimiques émis par un animal et modifiant le comportement ou la physiologie d'autres animaux de la même espèce. Il existe plusieurs types de phéromones : sexuelles, d'agrégation, de piste, d'alarme, d'espacement... Ces phéromones sont constituées d'une ou plusieurs molécules chimiques, dont les ratios respectifs sont essentiels au déclenchement du comportement de l'individu qui les perçoit. Les composés utilisés dans les phéromones chez les insectes ne sont pas nombreux par rapport au nombre d'espèces, mais l'infinité des mélanges et des ratios possibles est un avantage non négligeable de la communication chimique, entre autre pour la reconnaissance des partenaires sexuels.

Chez les Lépidoptères nocturnes, la femelle sécrète une phéromone sexuelle pour attirer le mâle, en vue de la reproduction. Cette phéromone sexuelle femelle provoque chez le mâle une réaction très spécifique et permet donc la reconnaissance précise du partenaire sexuel. Lorsque les individus partagent le même biotope et la même période de reproduction, la réponse spécifique du mâle à la phéromone sexuelle femelle est la première étape qui aboutit à la reconnaissance au sein d'une espèce.

Le mélange phéromonal des Lépidoptères est un assemblage de composés dont la structure chimique se décline sur la base d'une chaîne hydrocarbonée de longueur variable, portant ou non des insaturations et des fonctions oxygénées. Les mâles sont sensibles à la fois au ratio de ces composés et à la quantité totale de phéromone, l'ensemble constituant la signature chimique d'une espèce donnée.

Attiré par la phéromone, le mâle effectue un vol orienté vers la femelle. Arrivé à proximité, le mâle engage un comportement de cour pendant lequel peuvent intervenir des phéromones sexuelles mâles. L'accouplement ne se produit que si les deux partenaires se reconnaissent comme étant de la même espèce et s'acceptent. La femelle a la possibilité de rejeter un mâle s'il ne présente pas les bonnes caractéristiques physico-chimiques ou s'il n'adopte pas le comportement adéquat. Lors de la copulation, la reconnaissance spécifique agit aussi par la compatibilité et l'accrochage des pièces génitales mâles et femelles, ainsi que par la compatibilité entre les organes d'intromission mâles et les voies génitales femelles. Après la fécondation, la formation de l'œuf dépend de la compatibilité des gamètes et des cytoplasmes mâles et femelles.

Les différentes étapes de la reconnaissance entre les partenaires sexuels au sein de l'espèce se font dans un environnement particulier. Les composés chimiques ne se comportent pas de la même façon dans un biotope fermé de forêt, dans un biotope ouvert de prairie ou de savane, dans un biotope humide ou dans un biotope sec (Murlis *et al.*, 2000). De plus, plusieurs espèces d'insectes, voire d'autres animaux utilisant la communication chimique, peuvent se trouver au même endroit et au même moment. Les individus d'une espèce donnée doivent percevoir la phéromone de leur partenaire dans un environnement chimique complexe, constitué par des odeurs conspécifiques ou produites par d'autres espèces animales et végétales. Chez les insectes, certains composés phéromonaux peuvent être des molécules antagonistes : un composé produit par une espèce peut être perçu par une autre espèce, chez qui il inhibera le comportement reproducteur. La communication chimique apparaît donc comme extrêmement complexe et originale.

L'évolution des mélanges phéromonaux chez les espèces de Lépidoptères est corrélée avec la systématique (Descoins et Frérot, 1979 ; Roelofs *et al.*, 1982). Une perturbation de la communication chimique peut avoir lieu et donc engendrer une rupture dans la reconnaissance entre certains individus de l'espèce, capables alors d'émettre et de reconnaître une phéromone différente. L'existence d'un polymorphisme phéromonal intraspécifique (Frérot et Foster, 1991 ; Pelozuelo *et al.*, 2004) peut conduire à l'absence de reconnaissance entre les races phéromonales formées. Ce mécanisme, mettant en jeu une variation dans le système de reconnaissance, peut faire partie des processus de spéciation et peut être un moteur conduisant à l'apparition d'une nouvelle espèce. Un isolement reproducteur se crée entre deux populations d'individus et peut engendrer la formation d'une nouvelle espèce. L'isolement reproducteur est le fondement du concept de l'espèce biologique développé par Ernst Mayr en 1942.

Les deux définitions de l'espèce, le concept de reconnaissance et le concept biologique, correspondent à des visions différentes d'une même notion, l'espèce, mettant en jeu une communauté reproductrice. Ces deux concepts sont étroitement liés, même s'ils interviennent à deux échelles différentes. S'il n'y a plus reconnaissance, il y a isolement reproducteur. Le concept biologique de l'espèce (Mayr) met l'accent sur ce qui sépare les individus. Le concept de reconnaissance (Paterson) met en avant les facteurs de reconnaissance entre les individus, comme par exemple les phéromones.

L'approche de Paterson présente un intérêt conceptuel et analytique lorsque nous nous intéressons à une espèce composée de plusieurs populations, celle de Mayr lorsque nous parlons de plusieurs espèces d'un même genre.

Ces deux principales définitions du concept de l'espèce sont les plus utilisées dans les recherches sur les mécanismes de la spéciation. Nous nous sommes appuyés sur ces théories pour étudier l'écologie chimique et la structuration génétique du genre *Busseola* (Lepidoptera : Noctuidae) en Afrique sub-Saharienne.

# Problématique

---

Le modèle étudié est constitué par les trois espèces africaines de Lépidoptères du genre *Busseola* : *Busseola fusca* (Fuller, 1901), *Busseola segeta* (Bowden, 1956) et *Busseola phaia* (Bowden, 1956). *B. fusca* est un des ravageurs les plus importants des cultures de maïs et de sorgho en Afrique sub-Saharienne, alors que les deux autres espèces ne sont observées que sur des plantes sauvages. L'espèce *B. fusca* aurait été à l'origine présent sur le sorgho sauvage et serait passée du compartiment sauvage au compartiment cultivé après la mise en culture du sorgho sélectionné et l'introduction du maïs en Afrique. Les deux autres espèces, *B. segeta* et *B. phaia* ne sont pas considérées de nos jours comme des ravageurs.

Un des problèmes important posé dans cette étude est de déterminer si la structuration génétique de *B. fusca*, mise en évidence grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires (Sezonlin *et al.*, 2006), se traduit par des différences dans le système de reconnaissance du partenaire sexuel selon l'appartenance des individus à un groupe génétique identifié. Pour comprendre cela, une étude de la biologie de la reproduction, comprenant les comportements mâles et femelles, l'analyse de la phéromone sexuelle femelle et le comportement de cour, est indispensable.

L'écologie et la signalisation chimique de la plante-hôte peuvent jouer un rôle particulier sur le système de reconnaissance du partenaire sexuel. La plante-hôte peut agir sur les comportements reproducteurs mâles et femelles. L'analyse de la relation plante-insecte peut permettre de mieux comprendre la spécialisation de l'insecte vis-à-vis du sorgho et du maïs cultivés et de proposer des hypothèses sur les processus de passage d'un compartiment sauvage à un compartiment cultivé.

L'étude des paramètres de l'écologie chimique au sein de *B. fusca* permet d'appréhender la variabilité intraspécifique de ces paramètres et de définir si elle est corrélée aux différents niveaux de structuration génétique de l'espèce à l'échelle de l'Afrique. Après l'identification de la phéromone femelle, nous avons étudié la variabilité de la production phéromonale et la variabilité comportementale et chaque individu provenant de différentes populations sauvages et d'élevage est caractérisé au moyen de marqueurs mitochondriaux et nucléaires.

Dans une seconde partie, nous avons étudié les facteurs qui permettent et maintiennent l'isolement reproducteur entre les trois espèces du genre *Busseola* en Afrique. Les espèces étudiées sont proches du point de vue de la systématique classique et le statut d'espèce de *B. phaia* et de *B. segeta* est débattu. Nous avons considéré l'ensemble des résultats dans une perspective phylogénétique. L'étude de l'isolement reproducteur couplée à une caractérisation génétique nous a permis de discuter du statut taxonomique de *B. phaia* et de *B. segeta* et de proposer des hypothèses de scénarii évolutifs. Cette approche pluridisciplinaire doit contribuer soit à confirmer la validité des deux taxons, soit à apporter des éléments nouveaux en faveur du regroupement de *B. phaia* et de *B. segeta* en une seule espèce.

L'originalité de notre étude réside dans une approche pluridisciplinaire, à la fois biochimique, comportementale, génétique, populationnelle et phylogéographique. Tous les individus étudiés ont été caractérisés du point de vue phéromonal pour les femelles, comportemental pour les deux sexes et génétique pour les deux sexes. De plus, l'intérêt de cette étude repose sur un modèle constitué de trois espèces pour expliquer d'une part comment se maintient la reconnaissance spécifique du partenaire sexuel au sein d'une espèce, et d'autre part comment se mettent en place les mécanismes de l'isolement reproducteur entre des espèces appartenant au même genre.

# Première partie : Généralités sur les concepts de l'espèce et de la spéciation

---



## I. Généralités sur les concepts de l'espèce

La définition de l'espèce a été et est toujours très débattue et plusieurs théories existent, d'où le nombre important de définitions possibles (Isaac *et al.*, 2004). Le terme latin *Species* signifie « la vue, le regard », mais aussi « l'apparence ou l'aspect ». Au IV<sup>e</sup> siècle, Aristote utilisait le mot grec « *eidos* », signifiant apparence, pour désigner une unité élémentaire. L'espèce reste quelque chose d'abstrait et peut donc être définie plutôt comme une notion ou un concept (Harry, 2001). Chaque concept de l'espèce est développé en rapport avec une théorie sur la spéciation.

En 1982, Mayr pose une question intéressante : « les espèces sont-elles des réalités dans la nature ou seulement des constructions théoriques servant à l'esprit humain et à l'étude des individus ? » Cette question nous montre combien la définition de l'espèce peut être subjective et qu'elle dépend totalement du sujet étudié, de son contexte et du point de vue du biologiste. C'est donc un sujet d'étude passionnant puisqu'il donne lieu à de nombreuses réflexions par rapport aux différents concepts élaborés depuis Darwin (1859) et son célèbre livre « De l'origine des espèces ». Malgré le titre de cet ouvrage, Darwin explique que la notion d'espèce est « **arbitrairement appliqué par commodité pour rassembler des individus qui se ressemblent** ». Dans son œuvre, Darwin décrit une théorie de la spéciation par sélection naturelle des individus aptes à survivre et par élimination des autres individus plus faibles.

Chaque sujet d'étude sur une « espèce », ou un groupe d'individus ou de populations, peut apporter sa pierre à l'édifice de la notion de l'espèce. La définition de l'espèce, même si elle reste vague, sert de support à l'étude des mécanismes de formation et de maintien de ces espèces, et donc à l'étude des mécanismes de la spéciation.

Depuis Aristote, Linné et Darwin, de nombreux concepts d'espèce ont été décrits dans la littérature, mais le but ici n'est pas d'en faire un inventaire. Nous allons seulement développer deux concepts qui s'opposent quant à la description des rapports entre les individus : le concept biologique de l'espèce de Dobzansky (1935) et Mayr (1942) et le concept de reconnaissance du partenaire sexuel de Paterson (1985) et son corollaire le système de reconnaissance du partenaire sexuel (SMRS).

Theodosius Dobzhansky (1935) décrit une espèce comme « **un groupe d'individus fortement interféconds, mais totalement séparés reproductivement des autres groupes similaires par des propriétés physiologiques (incompatibilité des deux parents et/ou stérilité des hybrides)** ». Cette définition repose sur l'absence complète de flux génétique.

Quelques années plus tard, Mayr (1942) définit l'espèce de façon moins stricte, c'est-à-dire comme « **un groupe de populations, totalement ou potentiellement interfécondes. Dans la nature, l'échange de gènes entre ces groupes est limité ou évité par un ou plusieurs mécanismes d'isolement reproducteur.** » Cette définition sera développée dans le livre « Populations, Species and Evolution » (Mayr, 1970). Les facteurs de l'isolement reproducteur peuvent se rencontrer de manière discrète ou se combiner. Ces facteurs peuvent être biologiques (physiologiques), écologiques (habitat, hôte, régime alimentaire), éthologiques (comportement de reproduction) et enfin géographiques (allopatrie – Figure 1).

La définition de l'espèce biologique proposée par Mayr est fondée sur tous les critères qui ont une influence sur l'isolement reproducteur des populations qui composent l'espèce et donc sur les mécanismes qui séparent les individus. La définition de l'espèce proposée par Mayr est assez largement reconnue et acceptée (Coyne et Orr, 2004). Cependant des difficultés persistent dans le cas d'espèces en voie d'isolement, dites « espèces naissantes », c'est-à-dire dont la spéciation n'est pas terminée, ou d'espèces à reproduction uni-parentale.

Avec le concept biologique de l'espèce, Mayr met l'accent sur les mécanismes d'isolement qui séparent les individus et qui conduisent à l'arrêt des échanges géniques entre eux. A l'opposé, Paterson développe en 1985 un autre concept qui met en avant le maintien de l'intégrité de l'espèce en privilégiant la reconnaissance des individus au sein de l'espèce. L'espèce est vue de l'intérieur et non pas en référence aux autres espèces extérieures. Paterson parle alors de système spécifique de reconnaissance entre partenaire sexuel ou SMRS. Il crée le concept de l'espèce par reconnaissance en opposition avec le concept de Mayr qu'il nomme le concept de l'espèce par isolement. Pour Paterson (1985), « **Une espèce est un ensemble d'individus qui peuvent potentiellement se reconnaître comme partenaire et qui partagent un système de reproduction commun** », c'est-à-dire qu'une espèce est un ensemble d'individus qui utilisent le même SMRS.

Les individus d'une même espèce sont soumis à une forte sélection stabilisatrice et partagent des caractères, morphologiques et génétiques, qui maintiennent leur cohésion au sein du groupe. La reconnaissance entre deux partenaires sexuels potentiels est une réponse spécifique d'un des partenaires à un signal produit par l'autre. Cette définition rejoint fortement celle des phéromones et de leur mode d'action ; ces notions seront développées par la suite. Pour Paterson (1985), la divergence du SMRS ne pourrait être que le résultat d'un isolement géographique. La spéciation est un effet imprévu résultant de l'adaptation des paramètres du SMRS à un nouvel habitat ou un nouveau mode de vie. Paterson voit donc les espèces comme une conséquence accidentelle d'une évolution adaptative.

Les deux concepts décrits précédemment sont deux visions d'un même concept, qui est l'espèce. L'espèce biologique de Dobzhansky et de Mayr privilégie les relations ou plutôt l'absence de relation entre les espèces, alors que le concept de reconnaissance de Paterson privilégie les facteurs de cohésion à l'intérieur d'une espèce. Comme nous l'avons signalé précédemment, ces deux concepts accordent une place majeure à la reproduction et notamment à l'interfécondité comme critère de l'espèce. On peut probablement aujourd'hui non plus les opposer, mais les considérer comme deux approches complémentaires, qui permettent d'aborder la question de la spéciation suivant des angles sensiblement différents en privilégiant soit l'étude des facteurs de cohésion, soit celle des barrières limitant les flux de gènes.

La reconnaissance du partenaire sexuel chez les Lépidoptères se réalise en plusieurs étapes et fait intervenir l'écologie et la biologie des individus. La phéromone sexuelle produite par la femelle déclenche un comportement d'attraction du mâle de la même espèce, qui se traduit par un vol orienté vers la femelle. Arrivé à proximité, le mâle peut engager un comportement de cour, qui aboutit à l'accouplement et à la production d'une nouvelle génération viable et féconde.

La communication chimique chez les Lépidoptères est un mode de reconnaissance du partenaire sexuel, d'où l'intérêt de l'approche de Paterson et du concept de SMRS dans cette étude. Nous nous sommes donc concentrés sur ces aspects. Cependant, l'intérêt conceptuel et pratique de l'approche de Paterson et du SMRS, pour étudier la reproduction chez les Lépidoptères, n'interdit pas de raisonner aussi en terme d'isolement reproducteur si les espèces étudiées permettent d'évaluer cet isolement.

Les caractéristiques de chaque SMRS dépendent de l'histoire phylogénétique du groupe auquel appartient l'insecte, de la complexité et de la stabilité de l'habitat (biotique et abiotique) dans lequel vivent les individus, de leur degré de mobilité, des systèmes sensoriels mis en œuvre et des modalités de fonctionnement de ceux-ci. Au sein d'une espèce de Lépidoptère, si un des constituants du SMRS est modifié chez certains individus, la notion même de SMRS commun à l'ensemble des individus de l'espèce peut disparaître. Cette modification dans la reconnaissance conduira à la différenciation de deux SMRS. Par référence avec la définition du concept de reconnaissance de Paterson, ceci signifiera que l'on se retrouvera face à deux espèces.

## II. Les trois principales théories de la spéciation

En écologie, la spéciation est le phénomène évolutif aboutissant à la formation d'une nouvelle espèce par différenciation d'une population d'individus au sein d'une espèce mère dans un écosystème.

Pour décrire les différents modèles de spéciation utilisés couramment en biologie, nous pouvons prendre en considération soit la nature des mécanismes impliqués dans la formation de l'espèce, soit le statut géographique des populations que l'on observe (Losos et Glor, 2003). Dans un premier temps, nous allons rappeler quelques définitions qui vont nous servir à décrire les modèles de spéciation.

Selon leur aire de distribution, on distingue quatre types de populations (Figure 1) et cette structuration agit sur le mode de spéciation :

- les populations sont **sympatriques** lorsqu'elles occupent la même aire de distribution,
- les populations sont **allopatriques** lorsque les aires de distribution sont différentes,
- les populations sont **parapatriques** si leurs aires de distribution se recouvrent partiellement,
- la population est **péripatrique** lorsqu'une population est en périphérie d'une autre.

Les théories de la spéciation sont résumées dans le tableau 1 et sont développées ensuite à partir du livre Speciation (Coyne et Orr, 2004).

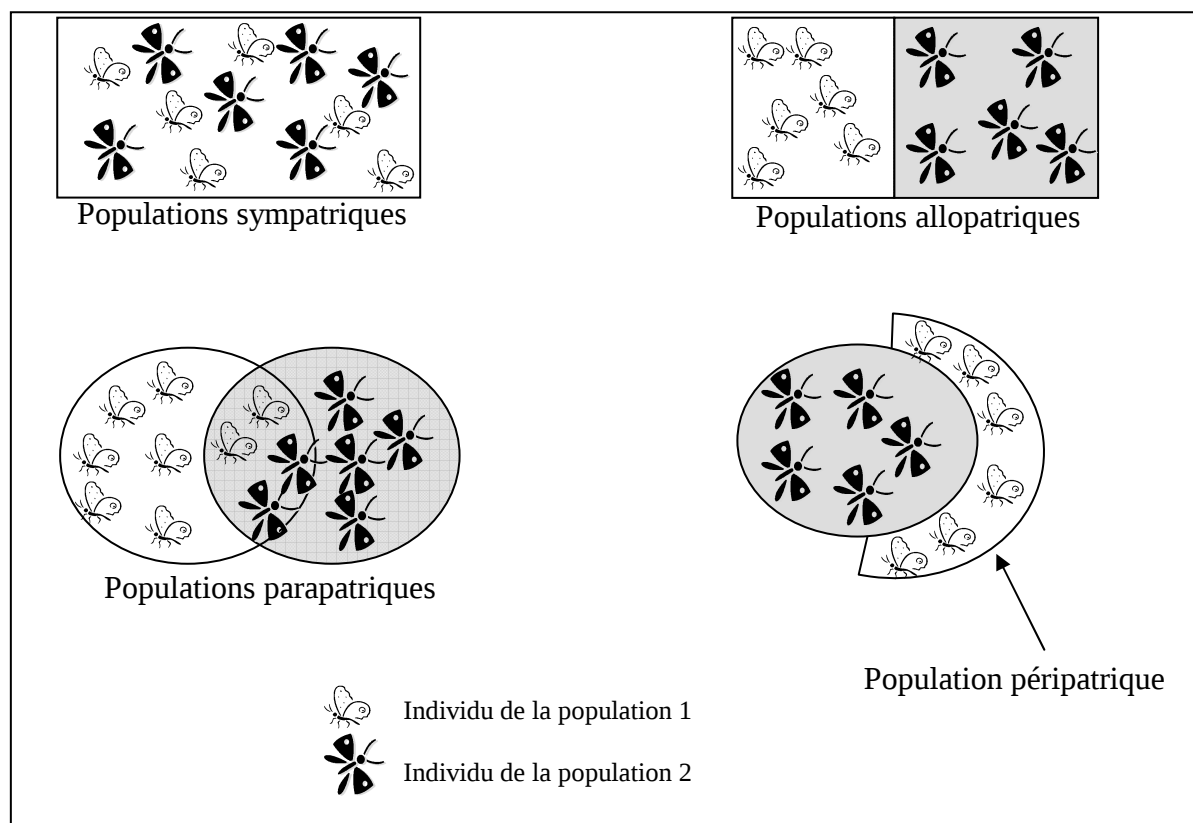


Figure 1 : Schéma représentatif des alternatives possibles de structuration des populations.

| Dénomination            | Modalités                              |
|-------------------------|----------------------------------------|
| SPECIATION ALLOPATRIQUE | Géographique ou vicariante             |
|                         | Péripatrique, par effet fondateur      |
| SPECIATION SYMPATRIQUE  | Perturbation de la sélection sexuelle  |
|                         | Perturbation de la sélection naturelle |
| SPECIATION PARAPATRIQUE | Modèle par gradient                    |
|                         | Modèle en « îlots »                    |

Tableau 1 : Les trois concepts majeurs de la spéciation et leurs différentes modalités.

## 1. La spéciation allopatrique

Ce processus de spéciation est le plus connu et celui accepté par le plus grand nombre de personnes. La spéciation allopatrique comprend deux modalités : une spéciation dite **géographique ou vicariante** et une spéciation **péripatrique**, encore appelée **par effet fondateur**.

**La spéciation allopatrique vicariante** ou la **vicariance** fait intervenir une étape de séparation physique suite à l'apparition d'une barrière géographique ou climatique assez importante pour que le flux génique soit stoppé entre les deux populations ainsi formées (formation de montagne, glaciation, drift continental, changement climatique). Les deux populations séparées doivent être de taille équivalente afin d'avoir une composition génétique et un nombre d'individus proches. Les fréquences génétiques de chaque caractère peuvent se maintenir entre les deux populations. La différenciation entre ces deux populations se fera uniquement sous l'action de différences écologiques ou environnementales (adaptation à un nouvel hôte, à des conditions de températures différentes...), qui imposeront différentes formes de sélection et différentes mutations au sein du génome de chaque population. La dérive génétique interviendra aussi dans la différenciation de ces deux populations nouvellement formées.

La divergence entre les deux populations peut être telle qu'elle engendre un isolement reproducteur lors d'une éventuelle remise en contact de ces populations. Lors de la disparition de la barrière qui séparait ces deux populations, deux cas peuvent être envisagés : soit la divergence entre les deux populations est assez importante pour qu'elles ne se croisent plus, les deux populations sont alors devenues deux espèces à part entière ; soit les deux populations sont encore interfécondes et s'homogénéisent.

Pendant longtemps, seule cette situation a été considérée comme le moteur de la spéciation et de nombreux exemples sont venus renforcer l'apparente universalité du processus. Nous ne citerons ici qu'une seule étude portant sur des Lépidoptères réalisée par Hall et Harvey (2002). Dans cet article, une corrélation entre la phylogénie et la biogéographie est établie pour 19 espèces du groupe *Charis cleonus* (Cramer) (Lepidoptera : Riodinidae) d'Amérique du sud. A l'intérieur de ce groupe, se distinguent des espèces sœurs, parapatriques ou

allopatriques. Les séparations entre ces populations correspondent aux rivières, qui peuvent être d'importantes barrières géographiques pour ces papillons. Les auteurs concluent en disant que seul le modèle de spéciation allopatrique vicariante peut expliquer l'isolation et donc la formation de ces espèces. Les espèces ont divergé au Pléistocène, au même moment où se sont formées les montagnes et les rivières en Amazonie. Il y a bien une congruence entre les données génétiques et géographiques en faveur d'une spéciation allopatrique vicariante.

**La spéciation allopatrique péripatrique** n'est différente de la spéciation allopatrique vicariante que par le fait qu'une des deux populations impliquées dans la spéciation est beaucoup plus petite. De ce fait, la spéciation péripatrique implique l'invasion d'un nouvel habitat par un petit nombre d'individus, ce qui entraînera une forte sélection et un goulot d'étranglement. La dérive génétique doit être très importante dans la petite population ainsi mise à l'écart et jouera un rôle dans la spéciation. La différenciation avec la population initiale va donc s'accroître du fait de cette dérive génétique. Le cas le plus probable de spéciation allopatrique péripatrique est celui de la colonisation d'un habitat isolé, une île par exemple, par un petit nombre d'individus (de un à 100), c'est ce que l'on appelle l'effet fondateur (Templeton, 1979). La spéciation péripatrique peut aussi être due à une barrière géographique. Un exemple de spéciation péripatrique est celui de *Drosophila santomea* Lachaise et Harry. Cette espèce endémique des forêts d'altitude de l'île de Sao Tomé est absente dans les zones cultivées de basse altitude, où l'on trouve une autre espèce de drosophile, *Drosophila yakuba* Burla. Les travaux de Lachaise *et al.* (2000) et de Cariou *et al.* (2001) ont confirmé l'appartenance de *D. santomea* au sous-groupe *melanogaster* et au complexe *yakuba*. *D. santomea* résulterait d'une spéciation péripatrique insulaire à partir d'une population ancestrale continentale de *D. yakuba*.

Jusqu'à la fin des années 1980, la grande majorité des évolutionnistes considéraient la spéciation allopatrique comme le seul modèle reconnu de spéciation (Mallet, 2001). Si la spéciation n'est pas complète lors de la séparation allopatrique, il peut exister des zones d'hybridation aux lieux de contact secondaire des deux espèces. L'hybridation est définie par le croisement entre deux populations d'individus génétiquement distinguables pouvant donner lieu à des hybrides viables. Cette hybridation par un seul individu dit migrant par génération est considérée comme suffisante pour annuler la différenciation de deux populations.

Seulement, Mallet *et al.* (2007) remettent en cause l'importance de l'isolement reproducteur dans la spéciation. Ils considèrent que la restriction du flux génique reste fondamentale, mais que l'observation d'hybrides avant et après la spéciation indique que l'isolement reproducteur complet n'est pas indispensable à la spéciation. Par exemple, 29% des papillons du genre *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae) appartenant à des espèces différentes s'hybrident.

## 2. La spéciation sympatrique

C'est la théorie de la spéciation la plus controversée. L'idée de la spéciation sympatrique apparaît pour la première fois dans les écrits de Darwin (1859). Les individus, qui ont divergé le plus fortement, peuvent être plus adaptés à survivre à une compétition entre les individus d'une même population (sélection naturelle). Cette compétition peut être par exemple pour la ressource en nourriture : les individus les plus adaptés à sa recherche ou à son assimilation seront préservés. Le mode de la spéciation sympatrique doit faire face à deux problèmes.

Le premier problème est l'antagonisme existant entre la sélection différentielle, qui permet la séparation d'une population en deux groupes, et les recombinaisons, qui sont continuellement présentes s'il y a panmixie et qui empêchent la mise en place de l'isolement reproducteur. Les théoriciens de la spéciation sympatrique résolvent ce problème en avançant les points suivants. (i) Soit il existe un lien fort entre les gènes sélectionnés en réponse à des pressions de sélection différentielle et les gènes impliqués dans l'isolement reproducteur. La sélection sur un de ces gènes entraînera inévitablement une sélection sur de nombreux gènes en relation avec l'isolement et la mise en place d'un isolement reproducteur. (ii) Soit l'évolution dans le choix du partenaire sexuel agit sur la diminution des recombinaisons. Ces deux phénomènes, qui peuvent se produire en même temps, permettent une réduction de la recombinaison entre les individus d'une même espèce.

Le deuxième problème est la coexistence. La spéciation sympatrique implique que les deux populations, qui ont développé assez de différences écologiques pour être considérées comme deux espèces, coexistent avant et après la spéciation. Pour que la spéciation sympatrique puisse avoir lieu, il faut donc que la capacité à coexister ainsi que l'isolement reproducteur évoluent simultanément.

La spéciation écologique est le plus souvent due à un isolement écologique (voir paragraphe suivant), à partir du moment où il y a une sélection différentielle pour des habitats ou micro habitats différents dans une même aire géographique.

La première théorie de spéciation sympatrique est une **perturbation de la sélection sexuelle**, qui peut se faire de deux manières. Dans la plupart des modèles, il se produit une évolution de deux groupes de femelles dans une même population. Chaque groupe de femelles va préférer les mâles qui possèdent des caractères différents des autres mâles de la population. Le deuxième processus possible (Higashi *et al.*, 1999) est le développement d'un groupe de mâles dont les caractères varient significativement des autres, associé à des femelles qui varient dans leur préférence pour ces nouveaux caractères.

La deuxième théorie de la spéciation sympatrique est la **perturbation de la sélection naturelle**. Dans un premier cas, il se produit une adaptation locale de certains individus, mâles et femelles, à des niches ou des habitats particuliers à l'intérieur même de l'habitat de l'espèce initiale, ce qui est le cas par exemple lorsqu'une ressource nouvelle est introduite dans un biotope donné. Les individus concernés doivent diverger génétiquement dans leur préférence pour ce nouvel habitat, en ce qui concerne à la fois le choix de nourriture, le lieu d'oviposition et le lieu de rencontre des partenaires sexuels.

Dans un deuxième cas, on parle du « modèle de ressource continue », c'est-à-dire une utilisation par deux groupes sympatriques appartenant à la même population de deux sortes différentes de ressources présentes au même endroit. Ce serait le cas des poissons Cichlidés des lacs d'Afrique de l'Est : les espèces sympatriques ne montrent pas de fortes différences de milieu de vie et sont écologiquement identiques, sauf au niveau nutritionnel. Le type de nourriture est très varié chez ces poissons. Les espèces ont donc pu diverger grâce à l'utilisation de deux types de ressources. Au delà de la spécialisation trophique, il existe une spécialisation liée au comportement reproducteur, qui comprend les parades, les colorations sexuelles et spécifiques, les comportements territoriaux et parentaux. On réunit ainsi toutes les conditions favorables à une spéciation sympatrique, puisque se créent des barrières de reproduction (Kornfield et Smith, 2000).

### 3. La spéciation parapatrique

La spéciation parapatrique est à mi-chemin entre la spéciation allopatrique et la spéciation sympatrique. Elle implique un isolement reproducteur entre deux populations, qui ne sont pas totalement isolées géographiquement, mais possèdent une zone de contact étroite. Les migrations entre populations sont cependant limitées puisque ces populations se développent dans des conditions environnementales différentes (gradient climatique par exemple). La sélection naturelle a donc un rôle important dans ce mode de spéciation.

Le **modèle par gradient ou « clinal model »** envisage une espèce unique distribuée graduellement dans un environnement variable, le flanc d'une montagne par exemple. Les sous-populations s'adaptent alors à leur habitat local, même si cette adaptation est retardée ou entravée par les flux de gènes continus entre les populations qui restent adjacentes le long du gradient. La première étape d'une telle spéciation est donc l'accumulation de différences génétiques le long du gradient géographique. Cependant, il faut l'extinction des populations intermédiaires pour créer deux espèces distinctes. On assiste à un isolement génétique des populations et la spéciation résulte de l'isolement reproducteur entre les deux populations extrêmes.

Le **modèle en îlot ou « stepping-stone model »** est fondé sur le même principe que le modèle par gradient, sauf que, au départ, les populations de la même espèce sont discrètes, c'est-à-dire disposées en îlots contigus à l'intérieur même de l'aire de répartition de l'espèce initiale. Les flux génétiques dans cette mosaïque de populations se restreignent et les populations distantes peuvent accumuler assez de différences pour devenir des espèces différentes.

#### 4. L'isolement écologique

Une autre notion importante développée par Coyne et Orr (2004) est **l'isolement écologique**, qui peut être réalisé par un changement d'hôte (Via et Hawthorne, 2002 ; Emelianov *et al.*, 2001, 2003). L'isolement écologique peut agir à deux niveaux : pré-zygotique et post-zygotique. L'isolement écologique pré-zygotique empêche l'accouplement ou la fécondation interspécifique. Les espèces qui occupent une même aire géographique peuvent ne pas se croiser si elles vivent dans des habitats distincts. Pour le niveau post-zygotique, il faut que les hybrides créés soient incapables de se reproduire dans les conditions de vie des deux parents. L'hybridation est possible, mais donnera des individus qui ne survivront pas ou ne pourront pas se reproduire, du fait de leur statut intermédiaire.

Dans les études de Emelianov *et al.* (1995, 2001 et 2003), les individus de *Zeiraphera diniana* Guenée (Lepidoptera : Tortricidae) sont associés à deux plantes-hôtes différentes, le mélèze et le pin. Ils emploient le terme de « races d'hôtes ». Aucun hybride n'est trouvé dans la nature alors que ces deux races vivent en sympatrie. Cet exemple peut être considéré comme une spéciation écologique sympatrique. C'est le cas aussi pour d'autres Lépidoptères (Pelozuelo *et al.*, 2004). La spéciation écologique peut être due à d'autres facteurs que la spécialisation à un habitat. L'isolement éthologique ou mécanique ou l'isolement temporel (période de reproduction) peuvent jouer un rôle.

#### 5. Conclusion

D'après Paterson (1985), le plus important dans les études sur les espèces et la spéciation ne semble pas être de savoir si telle ou telle population est une espèce, mais d'étudier les mécanismes de reconnaissance du partenaire sexuel qui permettent de maintenir la cohésion entre les individus. La modification d'un de ces paramètres engendrerait une rupture dans le SMRS, qui pourrait mener à une spéciation.

L'approche de l'écologie chimique des populations, et notamment de la reproduction gérée par les phéromones sexuelles peut tirer un bénéfice analytique dans le concept de l'espèce selon Paterson, en mettant l'accent sur une étude complète du système qui maintient la spécificité de la rencontre des sexes et donc du SMRS.

## Deuxième partie : Généralités sur le système spécifique de reconnaissance du partenaire sexuel chez les Lépidoptères

---



Les différentes barrières à la reproduction chez les Lépidoptères se situent sur deux niveaux : pré-zygotique et/ou post-zygotique (Figure 2).

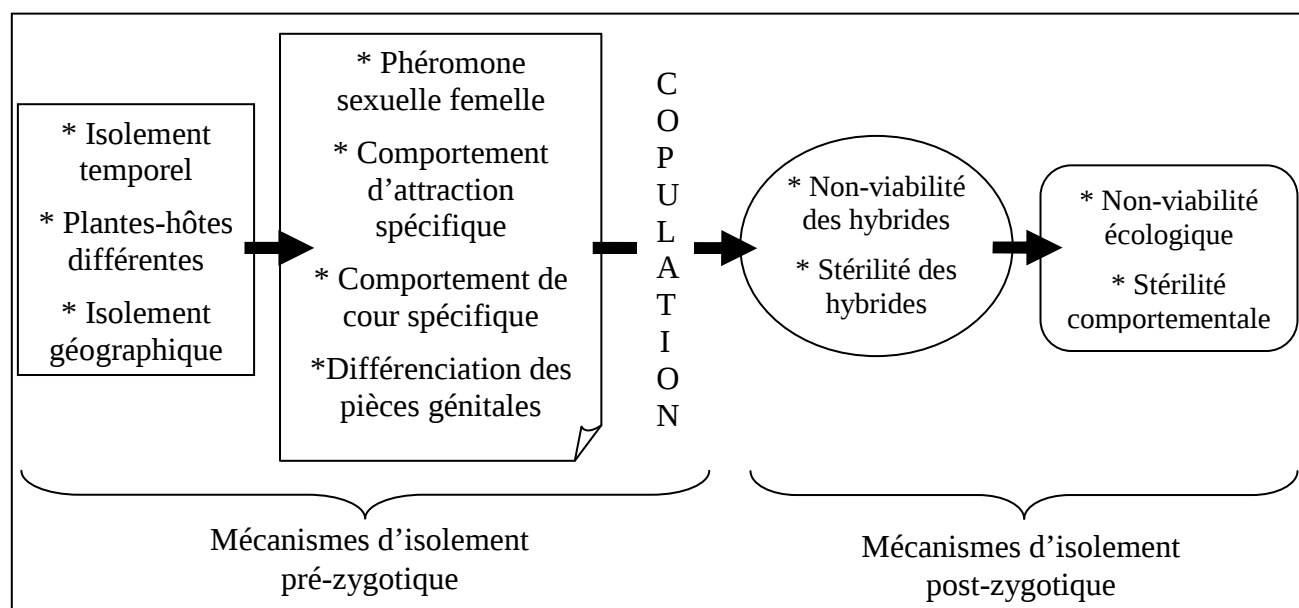


Figure 2 : Les différents mécanismes d'isolement pré et post-zygotique chez les Lépidoptères.

Les barrières pré-zygotiques peuvent être de plusieurs types chez les Lépidoptères :

- écologiques, lorsque les habitats divergent ou qu'il y a un partitionnement des ressources essentielles à la survie des espèces. La barrière écologique peut être due à une spécialisation d'habitat comme l'adaptation à une plante-hôte chez les phytophages (Schluter, 2001 ; Pelozuelo *et al.*, 2004 ; Via, 2001) ;
- phénologiques ou physiologiques, c'est le cas lorsque les périodes de reproduction entre deux espèces sont différentes (Frérot *et al.*, 1983 et 1984) ;
- chimiques, lorsque le choix du partenaire se fait à l'aide de composés chimiques comme la phéromone sexuelle femelle qui attire le mâle (Shorey, 1964 : Gaston et Shorey, 1965 ; Farine *et al.*, 1981) ;
- comportementales, lorsque le choix du partenaire se fonde sur les comportements d'attraction et de cour (Birch *et al.*, 1989) ;
- morphologiques, lorsque les organes de reproduction présentent une incompatibilité structurelle empêchant l'accouplement et le transfert des gamètes (Ming *et al.*, 2007).

Les barrières post-zygotiques agissent en diminuant la valeur sélective des hybrides (survie moindre ou réduction de la fécondité). Elles sont de deux types selon qu'elles sont dépendantes de l'environnement : barrières post-zygotiques extrinsèques, ou non : barrières post-zygotiques intrinsèques (Coyne et Orr, 2004).

Les barrières post-zygotiques extrinsèques peuvent être définies par (i) une non-viabilité écologique, lorsque les hybrides ne sont pas adaptés à l'un ou l'autre des milieux de vie des deux parents ou (ii) par une stérilité comportementale, lorsque les hybrides présentent des comportements intermédiaires entre leurs deux parents, notamment pour le comportement de cour, et ne peuvent donc pas être acceptés par un partenaire sexuel issu d'une des deux populations ou espèces parentes.

Les barrières post-zygotiques intrinsèques regroupent principalement la non-viabilité des hybrides et la stérilité des hybrides. Cette stérilité peut être due à une cause physiologique, l'appareil reproducteur est défectueux et les hybrides ne peuvent pas se reproduire ; ou une cause comportementale, les hybrides souffrent d'un défaut physiologique ou neurologique qui les empêche d'effectuer par exemple un comportement de cour correct.

Si les barrières post-zygotiques sont fortes et que les deux populations qui ont divergé sont remises en contact, il se met en place des pressions de sélection qui favorisent l'homogamie, c'est-à-dire les accouplements entre des individus qui ont un certain degré de ressemblance morphologique et/ou génotypique. Ce phénomène permet de favoriser les accouplements entre les individus qui ont divergé de la même manière et diminue la formation des hybrides. Ce phénomène est appelé le **renforcement** (Lukhtanov *et al.*, 2005).

Dans ce chapitre, nous allons aborder différentes étapes du SMRS chez les Lépidoptères Noctuidae : la période et le lieu de reproduction, la phéromone sexuelle femelle, le comportement d'attraction du mâle, le comportement de cour, l'accouplement et les mécanismes post-zygotiques.

## I. La période et le lieu de reproduction

Dans un premier temps, les individus potentiellement reproducteurs doivent avoir une aire de répartition commune lorsque toutes les conditions pour la reproduction sont réunies. Les partenaires sexuels doivent être en condition de sympatrie aussi bien dans l'espace que dans le temps. Dans les études de phylogéographie, deux populations sympatriques sont présentes dans la même aire géographique. En écologie comportementale, la notion de sympatrie est plus affinée et plus poussée, puisque les individus potentiellement interféconds doivent se trouver au même endroit, mais aussi au même moment pendant la reproduction : ils doivent avoir la même période de reproduction.

La notion de temps est très importante et permet d'éviter la formation d'un hybride entre deux espèces qui vivent au même endroit. Chaque espèce de Lépidoptères a une période de reproduction précise au niveau saisonnier. L'échelle temporelle peut être encore plus ajustée au point de jouer un rôle à l'intérieur même d'une journée. Certains Lépidoptères voient leur période de reproduction restreinte à certaines heures : quelques heures de la scotophase par exemple.

Chez les Lépidoptères, la période de reproduction est définie par la période pendant laquelle les femelles émettent la phéromone sexuelle, qui va agir sur le comportement des mâles. On dit que la femelle est en période d'appel. Pendant cette période, la femelle fait sortir la glande à phéromone située à l'extrémité de l'abdomen en étirant son abdomen et, chez certaines espèces, on observe une extension des ailes dans un plan horizontal ou au-dessus de l'axe du corps. Certaines espèces vibrent des ailes pour aider à la diffusion de la phéromone. Ce comportement d'appel chez les femelles de Lépidoptères varie peu d'une espèce à l'autre. Pendant cette période, les mâles, qui patrouillent souvent dans les zones de reproduction, ont un comportement dit de recherche, caractérisé par un vol anémotaxique, c'est-à-dire contre le vent, en larges zigzags afin de pouvoir croiser un flux de phéromone dans l'air qui les entoure (Ono, 1985 ; Sower et Daterman, 1985).

La période de reproduction au niveau du nycthémère est la même chez les mâles et chez les femelles. En dehors de ce moment bien défini et propre à chaque espèce, les individus mâles ne peuvent pas répondre à l'émission de phéromone femelle par un comportement d'approche (Shorey et Gaston, 1965). Les femelles ne produisent pas de phéromone sexuelle en dehors de la période d'appel (Witzgall et Frérot, 1989).

Même si la séparation temporelle entre les différentes espèces est potentiellement importante, les études sont peu abondantes sur ce sujet (Shorey *et al.*, 1968). Pourtant, la fenêtre d'appel des femelles d'une espèce peut se déplacer et dépend de nombreux aspects biotiques et abiotiques. L'initiation de ce comportement peut être un facteur essentiel dans la reconnaissance des partenaires sexuels et donc dans l'isolement reproducteur d'espèces géographiquement sympatriques. L'appel des femelles varie en fonction de l'espèce, mais est aussi contrôlé par des facteurs à la fois abiotiques : température, photopériode et luminosité, et biotiques : âge, nutrition, femelle vierge ou fécondée (Cardé *et al.*, 1974 ; Baker et Cardé, 1979). La réponse des mâles varie aussi selon ces facteurs (Linn *et al.*, 1988)

Schaefer *et al.* (1999) ont étudié le cas de *Lymantria fumida* Butler (Lepidoptera : Lymantriidae) qui vit, dans certaines parties du Japon, en sympatrie spatiale avec une autre espèce du même genre : *Lymantria monacha* Linné. Les captures des mâles dans des pièges phéromonaux ont montré que les périodes de reproduction de ces deux espèces étaient différentes. Les mâles de *L. fumida* et *L. monacha* sont capturés respectivement de 21h00 à minuit et de 2h00 à 4h00. Il n'y a pas d'attraction croisée possible entre ces deux espèces et cela suffit à empêcher la rencontre de partenaires sexuels autres que congénères et donc au maintien de la cohésion des deux espèces.

Les différences de période d'appel peuvent aussi se rencontrer au sein de la même espèce. Ce phénomène a été montré par Pashley *et al.* (1992) chez *Spodoptera frugiperda* J-E Smith (Lepidoptera : Noctuidae). La population associée au maïs se reproduit exclusivement pendant les deux premiers tiers de la nuit, alors que la population associée au riz se reproduit pendant le dernier tiers.

Un autre exemple intéressant a été décrit par Lalanne-Cassou *et al.* en 1999 chez plusieurs espèces du genre *Spodoptera* (Lepidoptera : Noctuidae). Même s'il existe un léger chevauchement, la période d'appel des femelles de *Spodoptera descoinsi* Lalanne-Cassou et Silvain est significativement plus précoce dans la nuit que celle de *Spodoptera latifascia* Walker et de *Spodoptera cosmoides* Walker. *S. descoinsi* et *S. cosmoides* vivant au même endroit, le décalage dans la période d'appel est essentiel pour le maintien de la spécificité de la reconnaissance des partenaires sexuels.

*S. latifascia* et *S. cosmoides* ont une période d'appel commune, mais elles sont allopatriques et ne peuvent donc pas se rencontrer pendant leur période de reproduction. Cependant, en cas de changement d'aire géographique, même s'il est peu probable, la rencontre sera alors possible. Ceci nous amène au deuxième cas de sympatrie : la sympatrie géographique et le lieu de reproduction des individus.

Le lieu de reproduction est très important puisqu'il permet la rencontre des partenaires sexuels au moment de la reproduction. Chez les Lépidoptères phytophages, la plante peut jouer un rôle prépondérant, en particulier pour les espèces dont les partenaires sexuels se retrouvent et se reproduisent à proximité de leur plante-hôte. Peu de données bibliographiques montrent une action de la plante-hôte sur le comportement d'attraction des mâles ou sur le comportement d'appel des femelles. Cependant, si la biosynthèse de la phéromone émise par la femelle n'est pas liée à la chimie de la plante-hôte, cette dernière peut directement influencer sur la production et la libération de la phéromone sexuelle. Un composé volatil libéré par les feuilles de maïs augmente la production de phéromone par les femelles de 20 à 30 fois et augmente le nombre de femelles en appel (Raina *et al.*, 1992).

Au travers d'un travail sur des races d'hôtes de *Z. diniana* (Lepidoptera : Tortricidae), Emelianov *et al.* (2001 et 2003) décrivent que l'augmentation du comportement d'appel des femelles est en relation avec la plante-hôte. L'attraction des mâles est accentuée si la femelle appelle sur sa propre plante-hôte. Les mâles ont tendance à trouver plus facilement leurs congénères femelles si elles appellent sur leur plante-hôte et il existerait une synergie entre la phéromone des femelles et les composés volatiles de plante, ce qui a été démontré au niveau des récepteurs olfactifs par Ochieng *et al.* (2002).

Chez *Earias vittella* Fabricius (Lepidoptera : Noctuidae), le début d'appel est avancé et le nombre de femelles en appel augmente en présence de la plante-hôte (Tamhankar, 1994). Ce phénomène permet d'ajuster la période de reproduction et la rencontre des partenaires sexuels avec la présence d'une ressource alimentaire essentielle pour la future larve. Chez la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella* Zeller (Lepidoptera : Acrolepiidae), la production de phéromone par la femelle et la réceptivité du mâle à cet phéromone sont directement stimulés par la présence de la plante-hôte, le poireau (Thibout, 1978).

Certaines espèces de ravageurs pourraient ne pas s'accoupler sur leur plante-hôte. Pour de nombreuses espèces dont les espèces du genre *Busseola* étudiées dans ce manuscrit, nous ne connaissons ni le lieu de rencontre des partenaires sexuels, ni les biotopes dans lesquels ils se reproduisent. Nous pouvons nous demander si les ravageurs, qui sont passés d'une plante sauvage à une plante cultivée, ne continuent pas à se reproduire sur leur plante-hôte d'origine. Pour *B. fusca*, la plante-hôte d'origine est hypothétiquement le sorgho et nous procéderons à des expérimentations en tunnel de vol pour observer l'effet de la présence d'une plante sur le comportement reproducteur.

## II. La phéromone sexuelle femelle

On estime le nombre de Lépidoptères à plus de 180.000 espèces décrites dans le monde. Cependant de nombreuses espèces utilisent les mêmes composés pour la rencontre des partenaires sexuels. Comme l'indique la première définition du terme phéromone par Karlson et Lüscher (1959), ce n'est pas la phéromone sexuelle femelle qui est spécifique, mais la réponse qu'elle provoque. Le site Internet The Pherobase ([www.pherobase.com](http://www.pherobase.com)) répertorie 377 composés pour 1572 espèces de Lépidoptères nocturnes décrites. La majorité de ces composés sont des chaînes hydrocarbonée, de 10 à 16 carbones, avec une fonction aldéhyde, alcool ou acétate pour les plus courantes et une ou plusieurs (rarement plus de trois) insaturations (Byers, 2005). La diversité des composés utilisés par les Lépidoptères nocturnes est faible, mais les phéromones varient par les différences de ratio entre les composés et par la variabilité des isomères possibles : ainsi le nombre de mélanges possibles reste immense.

Chez les Lépidoptères femelles, les phéromones sexuelles sont biosynthétisées « de novo » à partir d'acide gras. Elles sont émises par une glande située à l'extrémité de l'abdomen pendant la période d'appel. Les organes de l'olfaction chez les insectes sont les antennes qui portent des sensilles olfactives, véritables filtres à molécules. Le seuil de détection est inférieur au nanogramme (Baker, 1985 ; Baker *et al.*, 1998).

Les phéromones sexuelles sont constituées d'un assemblage précis de composés de structures chimiques différentes. Les mâles sont très sensibles à la fois au ratio de ces composés et à la quantité totale du mélange phéromonal ; l'ensemble constituant la signature chimique d'une espèce donnée. Ce schéma général est plus ou moins strict suivant les espèces et les mâles de certaines espèces peuvent tolérer des variations de ces paramètres. Cette tolérance constitue la fenêtre de réponse du mâle. Cette fenêtre reflète la plasticité olfactive du mâle et est très variable d'une espèce à l'autre et même d'un individu à l'autre. La concentration en phéromone (aspect quantitatif du mélange) modifie le comportement du mâle. Une trop forte concentration annihile la fin du comportement et arrête le vol orienté vers la femelle. On parle alors d'un « *arrestment* » : le mâle atterrit avant d'atteindre la source de phéromone. Une trop faible concentration n'attire pas le mâle (Baker *et al.*, 1981).

Les ratios respectifs des différents constituants (aspect qualitatif du mélange) sont des éléments clés du comportement sexuel à longue et courte distances. Dans les années 1970, Cardé *et al.* (1975) et Baker *et al.* (1976) avaient émis l'hypothèse suivante : le produit majoritaire est attractif à longue distance et les minoritaires sont attractifs à courte distance. Seulement, les travaux de Baker et Linn (1984) et Linn et Roelofs (1989) ont démontré que cette théorie était inexacte. Toutes les phases du comportement sont dépendantes d'un mélange bien précis et l'intégralité du mélange est nécessaire pour que l'attraction du mâle par la femelle aboutisse.

La structure chimique des phéromones de Lépidoptères peut être corrélée avec la position systématique (Roelofs, 1979 ; Descoins et Frérot, 1979). Les différences qualitatives ou quantitatives de composition des phéromones assurent ou contribuent à l'isolement reproducteur entre des espèces proches sur le plan phylogénétique. Nous ne savons pas grand-chose sur le polymorphisme (voir l'encadré de définitions) phéromonal au sein d'une population ou d'une espèce (Witzgall et Frérot, 1989), exception faite des cas de variabilité (Pelozuelo *et al.*, 2004). Par exemple, dans le genre *Spodoptera*, la composition de la phéromone sexuelle femelle est variable à l'intérieur d'une espèce et le coefficient de variation du ratio des composés phéromonaux peut atteindre 26% chez *S. latifascia* (Lalanne-Cassou *et al.*, 1999).

*Polymorphisme* : différence entre les individus d'une même population ou d'une même espèce.  
*Variation / variabilité* : différence entre les populations au sein d'une même espèce

Dès 1975, il a été démontré qu'il pouvait exister au sein d'une même espèce des races phéromonales (Klun, 1975). Des travaux menés sur des Tordeuses (Baltensweiler et Priesner, 1988 ; Foster *et al.* 1991) et sur des Noctuelles (Frérot et Foster, 1991 ; Pelozuelo *et al.*, 2004) démontrent que le polymorphisme phéromonal au sein d'une même espèce n'est pas rare chez les Lépidoptères et qu'il conduit dans la plupart des cas à un isolement reproducteur total entre les races phéromonales, que l'on pourrait considérer alors comme des espèces à part entière.

Selon les études de Frérot et Foster (1991), la population de *Graphania mutans* (Walker) (Lepidoptera : Noctuidae) provenant de Auckland produit une phéromone composée de deux alcools et de deux acétates. La population provenant de Lincoln ajoute un aldéhyde au mélange phéromonal précédent. Que ce soit en tunnel de vol ou dans les pièges phéromonaux,

les mâles de *G. mutans* de la population d'Auckland ne sont pas attirés par la phéromone sexuelle femelle de l'autre population. Un seul composé ajouté au mélange phéromonal provoque l'arrêt du comportement d'attraction des mâles. Cette composition phéromonale permet donc d'établir un système de reconnaissance particulier pour une population, voire une espèce. Cette modification du SMRS provoque l'absence de reconnaissance entre les individus de ces deux populations, pourtant identifiées comme appartenant à la même espèce.

L'existence du polymorphisme phéromonal des individus dans une espèce peut être aussi associée à une spécialisation à des plantes-hôtes différentes, phénomène qui pose la question de la notion de race d'hôte voire de la spéciation sympatrique (Emelianov *et al.*, 2001, 2003 ; Pelozuelo *et al.*, 2004). *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera : Crambidae) est divisée en deux sous populations, appelées aussi races d'hôtes puisqu'elles sont associées à des plantes-hôtes différentes, produisant une phéromone composée des mêmes produits Z11-14:Ac : E11-14:Ac, mais dans des ratios opposés : 97 : 3 pour la pyrale associée au maïs (race Z) et 1 : 99 pour la pyrale associée à l'armoise et au houblon (race E) (Bethenod *et al.*, 2005 ; Pelozuelo *et al.*, 2004). Les hybrides n'existent pas dans la nature, même si ces insectes se reproduisent au même endroit, sur des plantes herbacées en bordure des champs sans rapport avec leurs plantes-hôtes respectives. En laboratoire et en situation confinée, l'hybridation est possible et les hybrides sont viables et fertiles. Les mâles de chacune des races d'hôtes dans la nature font bien la distinction entre leurs partenaires sexuelles respectives.

Les races phéromonales pourraient constituer la première étape d'un processus d'isolement reproducteur qui, associé à des divergences écologiques, conduirait à l'apparition de nouvelles espèces (Drès et Mallet, 2002). Les races d'hôtes sont d'ailleurs reconnues par ces auteurs comme des sortes d'espèces, dont les individus échangent environ un migrant par génération, ce qui suffit à les considérer comme interfécondes et non comme des taxons totalement différenciés. Il est essentiel de connaître ce genre de phénomène dans le cadre du développement d'une lutte éthologique efficace, qui ne peut se mettre en place que si l'on connaît le lieu de rencontre des partenaires sexuels. La pose de pièges phéromonaux ou la mise en place de méthodes de lutte par la confusion sexuelle doivent tenir compte du lieu où se trouveront les insectes pendant la période de reproduction. Il faut donc absolument connaître les plantes-hôtes et leur action sur l'organisation des populations.

### III. Le comportement d'attraction du mâle et le comportement de cour

Le mâle, attiré par la femelle de son espèce grâce à l'émission d'une phéromone sexuelle, initie un comportement d'approche particulier, qui aboutit à un comportement de cour plus ou moins sophistiqué, mais spécifique. L'ensemble de ces événements comportementaux conduit, s'ils sont réalisés correctement, à l'accouplement.

#### 1. Le comportement d'attraction du mâle

A l'origine de la connaissance des phéromones sexuelles femelles et de leur utilité dans l'attraction des mâles, nous pouvons citer l'expérience de Fabre en 1911. Des femelles de Lépidoptères étaient gardées encagées, tandis que des mâles de la même espèce étaient lâchés à des distances variables de la cage allant jusqu'à cinq kilomètres. Les mêmes mâles se retrouvaient quelques instants plus tard autour de la cage. Fabre pense à une substance odorante émise par les femelles et qui attire les mâles. « Mais de la femelle de Bombyx ou du Grand Paon, que se dégage-t-il matériellement ? Rien d'après notre odorat. Et ce rien, lorsque les mâles accourent, devrait saturer de ses molécules un orbe immense, de quelques kilomètres de rayon ! » (Souvenirs Entomologiques).

Après la définition de la phéromone par Karlson et Lüscher (1959), les premières études au laboratoire sur le comportement d'attraction du mâle chez les Lépidoptères par la phéromone sexuelle de la femelle ont été réalisées par Shorey (1964) et reprises par Kennedy (1983) et Baker (1990). Le tunnel de vol (Figure 6) est un outil privilégié des études sur l'orientation d'un insecte volant vers sa source phéromonale (Baker et Linn, 1984 ; Kennedy, 1986). Dans le tunnel de vol, le mâle effectue des phases de vol particulières, qui sont décrites ci-après. Lorsque le mâle perçoit une odeur phéromonale qu'il reconnaît comme étant conspécifique, la première phase comportementale est l'activation alaire. Le mâle réchauffe ses muscles alaires par des mouvements pour pouvoir décoller. Cette activation est accompagnée de mouvements et de nettoyage des antennes. Ce comportement est interprété pour aider à la perception de l'odeur. Ensuite, il décolle et peut effectuer ce que l'on appelle un « *Lock-On* », ou en terme de navigation « faire l'azimut », c'est à dire qu'il vole en marche arrière face au flux d'air pour y localiser parfaitement la source d'émission de la phéromone. Dans le tunnel de vol, le flux d'air est laminaire et la structure du panache odorant est dite en filament. Le long de ce

filament d'odeurs phéromonales, la diffusion n'est pas régulière mais en bouffées (David, 1983 ; Murlis *et al.*, 2000). Le mâle remonte ce flux d'air en effectuant un vol orienté contre le flux (*upwind flight*), qui comprend des zigzags de plus en plus précis lorsqu'il arrive à proximité de la source de phéromone (Baker, 1990).

Dans la nature, les comportements du mâle peuvent être différents. Les mâles présentent un comportement de recherche et patrouillent en effectuant un vol en larges zigzags (*casting flight*) dans les milieux où la femelle peut appeler durant la période de reproduction, cela jusqu'à croiser un flux de phéromone amené par le vent. Dans des conditions naturelles, un mâle de Lépidoptère peut perdre la piste phéromonale lors d'un changement de direction ou de force du vent. Il pourra localiser de nouveau une phéromone à l'aide de ces larges zigzags (Baker et Haynes, 1987). Lorsque qu'ils perdent le signal phéromonal en plein champ, les mâles adaptent la direction de leur vol par rapport à l'orientation du vent et ils ont même le réflexe de repartir en arrière pour essayer de localiser de nouveau la phéromone femelle. Le déplacement du mâle est de type chimio-anémotaxique (Baker et Haynes, 1987).

## 2. Le comportement de cour

Le comportement de cour est la dernière étape du système de reconnaissance du partenaire sexuel et le garant d'une reconnaissance et d'un accouplement intraspécifique, si on inclut dans l'accouplement la compatibilité mécanique des pièces génitales.

Le comportement de cour chez les Lépidoptères est très variable entre les espèces, sans relation avec la systématique. Chez les Lépidoptères, le comportement pré-copulatoire de la femelle est très souvent réduit au comportement d'appel décrit précédemment. La production de phéromone induit l'attraction chez le mâle. Quand il l'a rejointe, le mâle initie une parade nuptiale qui fait intervenir des comportements particuliers et parfois l'émission d'une phéromone sexuelle mâle que l'on appelle abusivement « aphrodisiaque ».

De nombreux exemples de comportement de cour ont été décrits dans la littérature. Les mâles engagent avec les femelles un véritable dialogue chimique. Ce comportement semble intervenir dans la sélection sexuelle en jouant un rôle appréciable dans le choix de la femelle à courte distance (Birch *et al.*, 1989 ; Jacquin *et al.*, 1991). Cette phéromone permet à la femelle de vérifier que le mâle est bien de son espèce et la qualité du signal chimique du mâle peut être le reflet de sa valeur sélective (*fitness*). En effet, les produits intervenant dans la composition chimique de la phéromone mâle sont issus très souvent d'éléments prélevés dans la nature lors de l'alimentation larvaire. Les composés produits par les mâles sont chimiquement très divers (Blum, 1987), ainsi que les structures spécialisées dans leur production (Birch et Hefetz, 1987). Une femelle peut refuser un mâle sur la base de la qualité de l'émission des phéromones par les mâles (Jacquin *et al.*, 1991).

Chez d'autres espèces de Lépidoptères, le comportement de cour est réduit à de simples tentatives d'accouplement sans production de phéromone mâle. C'est le cas pour *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Lepidoptera : Noctuidae), chez qui le mâle attiré par la phéromone sexuelle femelle, atterrit près de la femelle en vrombissant des ailes puis effectue directement des tentatives d'accouplement (Babilis et Mazomenos, 1992).

#### IV. L'accouplement et la fécondation

Une fois le mâle accepté par la femelle, l'accouplement a lieu en position tête-bêche chez les Lépidoptères. Cette étape n'est possible que si les pièces génitales ou génitalias des deux partenaires sont compatibles. La morphologie des pièces génitales varie selon les espèces et sont, chez les Lépidoptères, un critère d'identification du fait de leur spécificité. L'incompatibilité des pièces génitales se traduit, dans un premier cas, par le non accrochage du mâle et de la femelle et, dans un deuxième cas, par le non décrochage des insectes après l'accouplement. Dans le premier cas, l'accouplement est impossible. Dans le deuxième cas, les insectes mourront sans se détacher et donc sans se reproduire (Monti *et al.*, 1997).

Chez certaines espèces de Lépidoptères où les pièces génitales sont peu différenciées, il peut y avoir des différences et un rôle du tractus génital femelle ou des organes d'intromission mâles (Callahan et Chapin, 1960).

Lorsque le mâle et la femelle sont correctement accouplés, la fécondation a lieu. Le mâle transfère à la femelle un spermatophore dans lequel sont contenus les spermatozoïdes. Le spermatophore est contenu dans la spermathèque où il est stocké jusqu'à la fécondation. Après la fécondation, on retrouve dans la spermathèque les spermatophores en partie digérés.

Si la femelle ne reçoit pas assez de spermatozoïdes pour féconder tous les œufs, elle peut s'accoupler de nouveau. Chez certaines espèces, comme chez *Plodia interpunctella* (Hübner 1815) (Lepidoptera : Pyralidae), la femelle peut s'accoupler plusieurs fois, même si elle possède déjà assez de sperme (Cook, 1999), et ceci pour plusieurs raisons possibles. Elle pourraient avoir besoin d'une quantité additionnelle de spermatozoïdes afin soit de minimiser les coûts liés à un stockage de sperme à long terme, le stockage du sperme entraîne une diminution de la fertilité de la femelle ; soit de favoriser la diversité génétique de leur progéniture ; soit d'augmenter leur potentiel reproducteur par le biais des ressources nutritives contenues dans l'éjaculat mâle en plus des spermatozoïdes (Cook, 1999).

Ce comportement polyandre (plusieurs accouplements) chez la femelle est associé au processus de sélection ou de **compétition spermatique**. Ce processus défavorise la sélection des mâles, puisqu'ils s'accouplent et transfèrent leur sperme sans pour autant engendrer une descendance. Ce phénomène provoque la mise en place de stratégies reproductives particulières par les mâles, comme le fait d'entraîner des changements comportementaux chez la femelle qu'ils fécondent.

La présence d'un spermatophore inhibe le comportement d'appel pendant une période dite réfractaire dont la durée varie avec la taille du spermatophore (Torres-Villa *et al.*, 1997). La femelle, qui ne peut pas s'accoupler à nouveau, utilisera les spermatozoïdes d'un seul mâle pour féconder ses œufs. La période réfractaire est souvent liée à l'inhibition de la production de phéromone, phénomène appelé phéromonostasie (Foster, 1993).

La taille du spermatophore délivré à la femelle peut varier considérablement, comme chez *Choristoneura fumiferana* (Clemens) (Lepidoptera : Tortricidae) (Delisle et Hardy, 1997), suivant la masse corporelle du mâle, la qualité de la nourriture qu'il a consommé pendant son développement larvaire, l'âge à la première copulation, le nombre d'accouplements effectués précédemment ou encore le temps écoulé depuis le dernier accouplement. Chez les Lépidoptères, il existe deux types de spermatozoïdes : les eupyrènes, spermatozoïdes typiques nucléés qui servent à la fécondation ; et les apyrènes, anucléés et plus petits, généralement libres et très mobiles. Les apyrènes pourraient jouer un rôle dans la compétition spermatique, soit en éliminant les spermatozoïdes eupyrènes, soit en retardant la possibilité de ré-accouplement de la femelle. La qualité des plantes-hôtes peut influencer sur la qualité et la quantité des deux types de spermatozoïdes (Gage et Cook, 1994).

## V. Les mécanismes d'isolement post-zygotiques intrinsèques

Suite à la fécondation, sont mis en place plusieurs mécanismes provoquant une incompatibilité post-zygotique : après la formation de l'œuf. Les mécanismes post-zygotiques intrinsèques (sans relation avec l'environnement) peuvent être le résultat d'une infection par la bactérie *Wolbachia* ou d'une incompatibilité des génomes mâle et femelle.

### 1. La bactérie *Wolbachia*

La bactérie *Wolbachia* entre en jeu dans les mécanismes de sélection post-zygotique et est un des symbiotes les plus répandus dans le monde animal. Cette bactérie infecte le cytoplasme des invertébrés, essentiellement des arthropodes et donc des insectes. Les données qui suivent sont tirées d'une revue par Charlat *et al.* (2003).

La transmission des bactéries du genre *Wolbachia* est essentiellement verticale : elles sont transmises par la mère aux descendants par l'intermédiaire du cytoplasme des zygotes. Les mécanismes d'action sont nombreux et varient selon les espèces infectées. L'infection bactérienne peut féminiser les mâles ou tuer les mâles et donc changer le sex-ratio, provoquer une stérilité femelle ou bien encore entraîner des troubles de la fécondation avec le phénomène d'incompatibilité cytoplasmique. En rendant certains croisements stériles et en limitant ainsi le brassage génétique de ses hôtes, la bactérie *Wolbachia* participe aux phénomènes d'isolement post-zygotique et donc de la spéciation.

Chez certains Lépidoptères, la bactérie *Wolbachia* tue les mâles issus de femelles infectées. Ce processus est bénéfique pour la bactérie puisqu'elle n'est transmise que par les femelles, mais est souvent désavantageux pour les hôtes. Les femelles résultantes peuvent devenir parthénogénétique (reproduction sans fécondation). Ce processus est le « **male killing** » et a été récemment découvert chez des Lépidoptères (Charlat *et al.*, 2005 ; Sasaki *et al.*, 2005).

Les mâles infectés par la bactérie *Wolbachia* se féminisent, la bactérie empêchant la formation des organes génitaux mâles. Malgré un caryotype mâle, les individus se développent comme des femelles. C'est la **féminisation**, qui existe chez les Lépidoptères (Kageyama *et al.*, 2002).

L'**incompatibilité cytoplasmique** a lieu lorsque des mâles infectés par la bactérie *Wolbachia* se reproduisent avec des femelles non infectées ou si les deux sexes sont infectés par des souches de bactéries différentes (Sasaki *et al.*, 2005). La formation de l'œuf est alors impossible et il n'y a pas de descendance. Par contre, le zygote est viable si les deux protagonistes, mâle et femelle, sont infectés par la même souche de bactérie.

## 2. L'incompatibilité des génomes

Les mécanismes provoquant l'incompatibilité des génomes mâle et femelle après la fécondation ne sont pas encore très bien connus. La règle de Haldane (1922) est la tendance à la stérilité ou la non-viabilité des hybrides, affectant préférentiellement le sexe hétérogamétique, c'est-à-dire celui qui porte deux chromosomes sexuels différents (les femelles WZ chez les Lépidoptères).

La règle de Haldane est observée dans l'étude de Jiggins *et al.* (2001) sur différentes populations géographiques d'*Heliconius melpomene* Linné (Lepidoptera : Nymphalidae). La progéniture femelle, provenant du croisement entre un mâle de la population de Guinée et une femelle de Panama, est stérile alors que les mâles sont fertiles. La même stérilité femelle est observée lors du croisement entre les populations de Guinée et de Colombie. Les croisements en retour ont permis de démontrer que cette stérilité est due à une interaction entre le chromosome Z de la population de Guinée et les autosomes (chromosomes non sexuels) du génome des individus de Panama.

## VI. Les mécanismes d'isolement post-zygotiques extrinsèques

Les mécanismes d'isolement post-zygotiques peuvent être aussi extrinsèques, c'est-à-dire dus aux conditions environnementales.

### 1. La non-viabilité écologique

La non-viabilité écologique vient du fait que l'hybride, provenant du croisement de deux individus vivant dans deux milieux de vie différents, ne peut pas survivre dans l'un ou l'autre des milieux de vie des parents, à cause de son phénotype intermédiaire. Par exemple, les phénotypes intermédiaires exploitent les ressources alimentaires moins efficacement que les phénotypes extrêmes des deux parents (Schluter, 2001). Une isolation post-zygotique peut aussi avoir lieu lorsque les hybrides sont moins efficaces dans la capture des proies, ou parce que leur système de défense intermédiaire laisse les hybrides plus sensibles à la prédation ou au parasitisme.

Deux races sympatriques de pucerons sont fortement spécialisées sur deux plantes-hôtes différentes et sont isolées reproductivement par ce biais. La survie des hybrides entre ces races a été testée sur les deux hôtes. Dans les deux cas, les hybrides ont une survie bien moindre par rapport aux deux parents. Cette sélection écologique contre les hybrides dans les environnements parentaux est bien un cas d'isolement reproducteur post-zygotique entre deux races spécialisées (Via *et al.*, 2000).

## 2. La stérilité comportementale

La stérilité comportementale est observée lorsque les comportements reproducteurs intermédiaires des hybrides les empêchent de trouver un ou une partenaire sexuel(le). Cette stérilité comportementale intervient beaucoup dans l'étape du comportement de cour.

Un exemple de la diminution de la valeur sélective des hybrides est celui des croisements entre les deux espèces de Lépidoptères, *H. melpomene* et *Heliconius cydno* Doubleday, qui ont récemment divergé (Jiggins *et al.*, 2001). Le patron de couleur des ailes est essentiel à la survie par mimétisme et à la reconnaissance spécifique de ces deux espèces. Les hybrides, même s'ils sont rares dans la nature, présentent un patron de couleur intermédiaire entre les deux parents et donc un patron alaire non mimétique. Leur survie et leur descendance ne sont pas assurées. Dans ce cas, les deux phénomènes, à la fois de non-viabilité écologique et de stérilité comportementale, ont lieu.

## VII. Conclusion

Nous avons vu ici une liste non exhaustive des nombreux mécanismes permettant la reconnaissance spécifique entre les partenaires sexuels chez les Lépidoptères et donc des dispositifs mis en jeu lors de la reproduction. Ces différentes étapes seront reprises dans ce manuscrit pour étudier les espèces du genre *Busseola*. Cette démarche est indispensable à la compréhension de la biologie de la reproduction chez ces Lépidoptères et de la structuration des populations dans l'espèce *B. fusca*. Ce Lépidoptère étant un ravageur des cultures, il est essentiel de connaître sa biologie avant de pouvoir envisager un système de surveillance efficace. L'intérêt de l'étude comparée des espèces du genre *Busseola* repose sur la compréhension des mécanismes permettant leur reconnaissance spécifique sur deux niveaux taxonomiques : à la fois entre des populations au sein de l'espèce *B. fusca* et entre des espèces dans le genre *Busseola*.

## Troisième partie : Présentation des insectes étudiés

---



Les travaux que nous allons présenter ici portent sur trois espèces de Lépidoptères appartenant au genre *Busseola*.

### I. *Busseola fusca*

*Busseola fusca* (Fuller 1901) appartient au sous-ordre des Heteroneura, au sous-ordre des Macrolepidoptera, à la superfamille des Noctuoidea, à la famille des Noctuidae et à la sous-famille des Amphipyrinae.

Dans toute l'Afrique sub-Saharienne (Figure 3), *B. fusca* est devenu un des principaux ravageurs des cultures de maïs (*Zea mays* Linné 1753) et de sorgho (*Sorghum bicolor* Moench 1794). Les pertes occasionnées varient de 20 à 80% selon l'importance de l'infestation, d'où le fort impact économique dans des pays en voie de développement et où l'agriculture joue un rôle économique majeur (Haile et Hofsvang, 2002).



Figure 3 : Carte d'Afrique, le tracé blanc représente l'Afrique Sub-Saharienne.

Le papillon (photo) présente une envergure de 2,5 à 3 cm et les deux sexes sont semblables. Seule, la différence au niveau des antennes, lisses chez les femelles et bipectinées chez le mâle, peuvent les différencier. La chenille est rose violacé, terne, avec une tête roussâtre et des points bruns sur les flancs (photo).

*B. fusca* mâle adulteChenille au stade 3 de *B. fusca*

Des différences écologiques ont été observées entre les populations géographiques de *B. fusca*. La population Est-africaine est abondante surtout dans les zones tempérées de haute altitude (1500 à 2000 mètres environ), alors que la population Ouest-africaine est présente dans les régions chaudes de moyenne et basse altitude (inférieure à 1000 mètres) (Ndemah *et al.*, 2001).

Le cycle de développement (Figure 4) a été étudié chez *B. fusca* par Ratnadass *et al.* (2001) et Calatayud *et al.* (2007). De l'œuf à l'adulte, le développement dure environ soixante jours, mais cette durée varie beaucoup selon les conditions climatiques (humidité, température, pression atmosphérique). Le nombre d'œufs pondus varie beaucoup, de 100 à 800 œufs par femelle (Rensburg *et al.*, 1997). Ils sont déposés entre la feuille et la tige par groupe de 30 à 100 œufs par femelle. Les œufs éclosent environ une semaine après la ponte. Après l'éclosion des œufs, la durée des six stades larvaires est d'environ 30 jours. Les premiers stades larvaires se nourrissent à la surface des feuilles et ce n'est qu'au 3<sup>ème</sup> stade larvaire (15-20 jours) que les larves pénètrent dans les tiges. Les chenilles se développent à l'intérieur des tiges, presque exclusivement sur les graminées cultivées (Le Rü *et al.*, 2006). Après environ six stades larvaires, les chenilles se nymphosent dans la tige. Les adultes émergent environ dix jours après la nymphose, pour vivre une dizaine de jours pendant lesquels ils s'alimentent peu ou pas et se reproduisent. La majorité des adultes émerge pendant les trois premières heures de la nuit (Calatayud *et al.*, 2007).

Les mâles peuvent s'accoupler plusieurs fois avec un pourcentage de fécondation des œufs équivalent à chaque fois. Lors de la copulation, le mâle ne transfère qu'un seul spermatophore et ne peut copuler qu'une seule fois par nuit. Pour les femelles, un seul spermatophore est suffisant pour fertiliser tous les œufs. La polyandrie, si elle existe, n'est ni obligatoire, ni nécessaire pour la reproduction de *B. fusca* (Unnithan et Paye, 1990).

Les durées des cycles de développement sont différentes suivant les conditions géographiques et donc climatiques. Au Kenya, *B. fusca* passe par une phase de diapause au dernier stade larvaire dans la région de Nairobi (Kenya Est), mais son développement est continu près de Kakamega (Kenya Ouest). La diapause de *B. fusca* est liée aux conditions climatiques, et en particulier à l'humidité (Ratnadass *et al.*, 2001).

Au Kenya, des piégeages ont permis de déterminer qu'il existe trois périodes d'infestation pour *B. fusca* dans la région de Kitale (Critchley *et al.*, 1997). D'après Calatayud *et al.* (Comm. Pers.), *B. fusca* vole en mars-avril et novembre-décembre autour de Nairobi et toute l'année dans la région de Kakamega.

En Afrique de l'Ouest, Ratnadass *et al.* (2001) décrivent jusqu'à 7.4 générations par an pour des *B. fusca* en élevage. Les chenilles dans la nature (Mali) peuvent présenter une période de diapause au sixième stade larvaire, lorsque l'humidité est faible en période sèche (avril-mai). La sortie de diapause, juste avant la nymphose, se produit pendant la saison des pluies (juillet-octobre). La diapause peut durer trois à quatre mois.

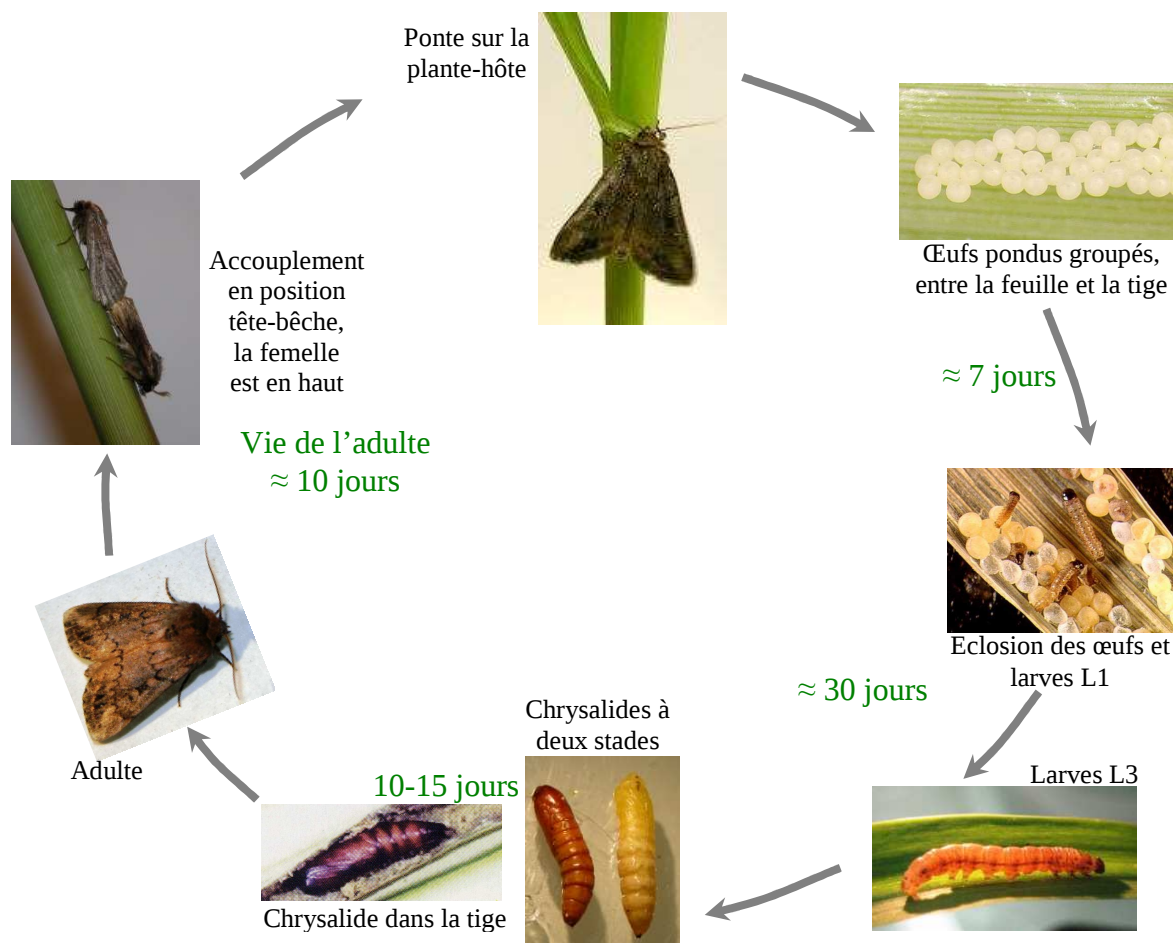


Figure 4 : Cycle de développement de *Busseola fusca*, les durées de chaque étape sont en vert.

## II. *Busseola phaia* et *Busseola segeta*

*Busseola phaia* Bowden 1956 et *Busseola segeta* Bowden 1956 appartiennent au même genre que *B. fusca* et ont été décrites comme deux espèces distinctes. Aux stades adulte et chenille, les individus sont très semblables morphologiquement. La chenille présente des bandes longitudinales alternativement claires et sombres sur la face dorsale, alors que la chenille de *B. fusca* n'a pas de bandes.



*B. segeta* mâle adulte  
(photo B. Le Rü)



*B. phaia* mâle adulte  
(photo B. Le Rü)



Chenille au stade L1 de  
*B. segeta* (photo B. Le Rü)

La question se pose de savoir si *B. phaia* et *B. segeta* sont des espèces distinctes ou des populations écologiquement différenciées d'une même espèce. Les études menées en Afrique (Calatayud, Comm. Pers.) suggèrent que *B. phaia* et *B. segeta* sont deux espèces dont la répartition géographique est distincte et qui se développent sur des plantes-hôtes différentes. D'autres auteurs (Le Rü et Moyal, Comm. Pers.) ne sont pas convaincus du statut d'espèce de *B. segeta* et *B. phaia* et envisage la possibilité que ce soient deux sous-espèces.

*B. segeta* est présente à l'Est de la vallée du Rift (Figure 5) et 95% des insectes ont été récoltés sur *Panicum deustum* Thunb. Les insectes étudiés au laboratoire proviennent de la région de « Race Course », au sud-est de Nairobi, qui est une zone de forêt claire ombrophile d'altitude. Certains individus de *B. segeta* proviennent de Gigiri situé à 6 Km au Nord du « Race course » et sont considérés comme provenant de la même région que les précédents.

*B. phaia* est présente à l'Ouest de la vallée du Rift, en Ouganda et en Tanzanie (Figure 5) et 90% des insectes ont été récoltés sur *Pennisetum purpureum* Shumacher 1827. Les insectes étudiés au laboratoire proviennent de deux régions différentes : Kisii, une savane au sud du lac Victoria et Kakamega, une forêt tropicale humide au nord du lac Victoria. D'autres insectes provenant de Tanzanie (Ordoto) ou d'Ouganda (Kerere) ont été utilisés.

Dans leurs aires de répartition respectives, les deux espèces, *B. segeta* et *B. phaia* cohabitent avec *B. fusca*, même si elles ne partagent pas la même plante-hôte. *B. fusca* est inféodée de manière relativement stricte aux cultures de sorgho et de maïs, tandis que les deux autres espèces se développent sur des plantes sauvages.

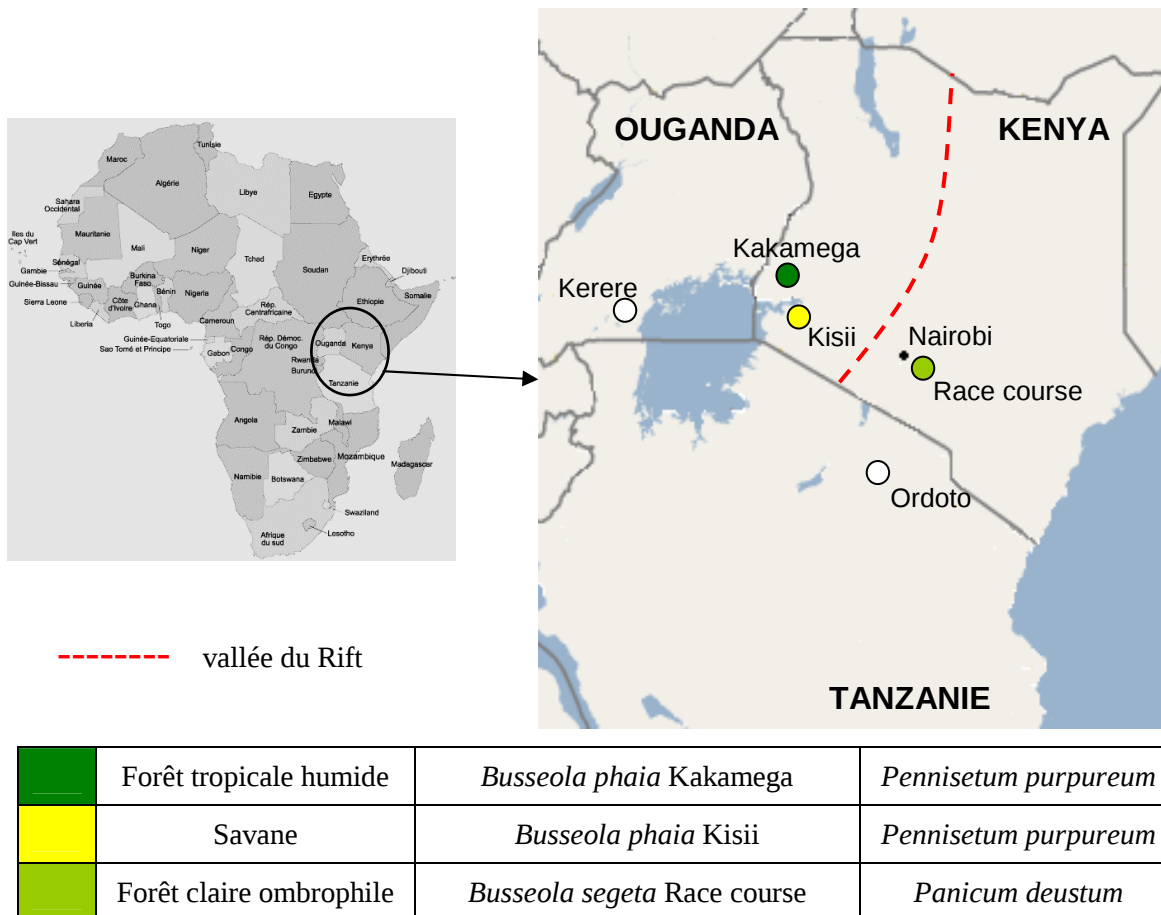


Figure 5 : Carte du Kenya (Google Earth) indiquant les localités de prélèvements des *B. segeta* et des *B. phaia*, leur situation géographique, l'écologie du lieu d'échantillonnage et la plante-hôte sur laquelle les chenilles ont été prélevées.

Les données de prélèvements larvaires dans la nature au Kenya ont permis de déterminer que *B. segeta* est présente en février-mars et octobre-novembre à Race course et *B. phaia* est présente toute l'année à Kakamega (Calatayud et Le Rü, Comm. Pers.).

Dans les mêmes conditions d'élevage, le cycle de développement de *B. segeta* et *B. phaia* est le même que pour *B. fusca*. Enfin, il n'y a pas de diapause connue pour *B. segeta* et *B. phaia* (Calatayud et Le Rü, Comm. Pers.). En ce qui concerne la reproduction, aucune donnée n'existe dans la littérature pour les deux espèces *B. segeta* et *B. phaia*.

### III. Réception et conditionnement des insectes

L'élevage de masse de *B. fusca* est effectué au laboratoire de l'ICIPE (International Centre of Insect Physiology and Ecology) à Nairobi au Kenya. Cet élevage est renouvelé par des apports d'insectes de la nature trois fois par an et maintenu en permanence. Certains individus sauvages de *B. fusca* proviennent de prélèvements sélectionnés dans des localités particulières du Kenya comme Mombasa, Mont-Kenya et Machakos à l'Est ou Kisumu et Kitale à l'Ouest de la vallée du Rift.

Les insectes des espèces *B. segeta* et *B. phaia* sont prélevés dans la nature au stade de chenille et élevés sur milieu artificiel au laboratoire ICIPE jusqu'au stade de la chrysalide.

Les insectes sont reçus au stade chrysalide au laboratoire de l'INRA. Elles sont placées dans des beurriers rectangulaires clos en polystyrène cristal (27x12x8) sur de la vermiculite humidifiée et maintenues dans les conditions suivantes jusqu'à l'émergence : 25°C, photopériode inversée 12L : 12D, humidité 85±10%. Les sexes sont séparés au stade de la chrysalide. La photopériode inversée nous permet d'étudier le comportement des insectes dans la journée.

A l'émergence, les mâles destinés aux études comportementales sont placés individuellement dans des enceintes grillagées (Ø2cm, longueur 6cm), qui serviront lors des expériences de comportement en tunnel de vol. Plusieurs enceintes sont maintenues ensemble dans une boîte hermétiquement fermée pour que les mâles restent naïfs, c'est à dire qu'ils n'ont aucun contact avec la phéromone sexuelle femelle avant les expérimentations. Les femelles sont placées individuellement dans de petites boîtes en polystyrène cristal avec un coton humide. Ces boîtes transparentes, placées dans des chambres en photopériode inversée nous permettent d'observer facilement les comportements de la femelle, et en particulier le comportement d'appel.

Les insectes des trois espèces sont parfois reçus au stade de chenille, notamment lorsqu'il s'agit d'individus prélevés dans la nature. La fin de leur développement s'effectue alors au laboratoire INRA sur milieu artificiel à base de maïs (tableau 2) dans des boîtes cylindriques (8xØ11) en polystyrène cristal munis de couvercles ouverts par un grillage très fin. Ces boîtes sont maintenues dans mêmes conditions que les chrysalides.

|            | Produit                   | Quantité |
|------------|---------------------------|----------|
| Fraction A | Agar                      | 126 g    |
|            | Eau distillée             | 4041 ml  |
| Fraction B | Eau distillée             | 4041 ml  |
|            | Poudre de haricot rouge   | 884 g    |
|            | Poudre de feuille de maïs | 254 g    |
|            | Levure de bière           | 227 g    |
|            | Sucrose                   | 354 g    |
|            | Vitamine E                | 21 g     |
|            | Acide ascorbique          | 25 g     |
|            | Acide sorbique            | 14 g     |
|            | Methyl p-hydroxy benzoate | 20 g     |
|            | Formaldéhyde 40%          | 20 g     |

Tableau 2 : Description des produits composant le milieu artificiel utilisé pour l'élevage de masse du laboratoire ICIPE et pour l'élevage au laboratoire INRA. La fraction B est ajoutée à la fraction A lorsque l'agar est dissout.

Dans les conditions du laboratoire INRA, la majorité des chrysalides envoyées émergent après une dizaine de jours. Le développement des chenilles pose plus de problèmes. Le taux de nymphose est faible, bien que nous nous soyons placés dans les mêmes conditions qu'au laboratoire ICIPE. Nous avons aussi entrepris de mener à bien un élevage de *B. fusca* au laboratoire INRA. La mortalité des chenilles dans les premiers stades larvaires est importante. La durée de la vie larvaire est doublée par rapport à l'élevage au laboratoire ICIPE, s'étendant sur presque deux mois. Peu d'individus se nymphosent et peu émergent. Il semble qu'ils se mettent en diapause au stade de nymphe, contrairement à ce qui est observé dans la nature. Nous avons essayé plusieurs conditions pour lever la diapause ou réduire la durée du stade larvaire (augmentation ou diminution de température et d'humidité, changement de la composition du milieu), sans résultats. Ces différences au niveau de l'élevage pourraient être dues à la différence de pression atmosphérique par rapport au laboratoire ICIPE. L'élevage au laboratoire INRA ne pouvant pas fournir assez d'individus pour les expériences, le laboratoire ICIPE a continué à nous envoyer des insectes régulièrement dans le cas des *B. fusca*. Les envois de *B. segeta* et de *B. phaia* étaient plus aléatoires car liés aux récoltes sur le terrain.



Quatrième partie : Variabilité des modalités  
de reconnaissance du partenaire sexuel  
chez différentes populations de l'espèce  
*Busseola fusca*

---



Dans cette partie, nous allons étudier les différentes étapes du système spécifique de reconnaissance du partenaire sexuel (SMRS) chez *B. fusca*. En dehors de la détermination de la période d'activité des femelles (Calatayud *et al.*, 2007), rien n'était connu sur le SMRS de *B. fusca*. Ce SMRS peut varier au sein d'une espèce et permet la structuration des populations au niveau intraspécifique. Son étude est nécessaire pour appréhender les liens entre les individus et pour comprendre la répartition des populations dans les différents compartiments au niveau géographique d'une espèce à large distribution. De plus, nous essayerons de corréler les éventuelles variations de ce SMRS dans l'espèce *B. fusca* avec la différenciation de populations réalisée préalablement à l'aide de marqueurs moléculaires (Sezonlin *et al.*, 2006 ; Dupas *et al.*, résultats non publiés).

D'un point de vue appliqué, l'étude de la phéromone sexuelle femelle et des comportements d'attraction de *B. fusca* pourra aider à améliorer les conditions de surveillance de cet insecte ravageur des cultures.

L'étude du SMRS chez *B. fusca* est décrite dans différents chapitres dont le contenu est brièvement décrit ici :

- Dans un premier temps, nous présenterons la mise au point des conditions techniques nécessaires à la description du comportement d'attraction des mâles de *B. fusca* en tunnel de vol.
- Dans un deuxième temps, nous décrirons le comportement de cour de *B. fusca* dans les conditions de laboratoire, sous la forme d'un article publié dans les *Annales de la Société Entomologique de France* (Frérot *et al.*, 2006).
- Dans un troisième temps, nous présenterons l'identification de la phéromone sexuelle des femelles de *B. fusca*, sous la forme d'un article accepté avec des révisions mineures dans *Journal of Chemical Ecology*.
- Dans un quatrième temps, nous présenterons une analyse du mode d'action des plantes sur le comportement d'appel des femelles et sur le comportement d'attraction des mâles, sous la forme d'un article à soumettre.
- Dans une cinquième partie, nous présenterons les analyses génétiques réalisées en vue de déterminer un éventuel lien entre la structuration génétique des populations de *B. fusca* et la variabilité observée au niveau du SMRS chez cette espèce.



## I. Mise au point technique et étude du comportement d'attraction du mâle de *Busseola fusca* en tunnel de vol

Le tunnel de vol permet d'étudier l'attraction à courte distance d'insectes soumis à une substance attractive, phéromone ou kairomone. Cet outil est très performant pour étudier l'attraction phéromonale chez les Lépidoptères (Baker, 1990).

Le comportement sexuel chez *B. fusca* n'a jamais fait l'objet d'une description précise. Les comportements, qui permettent la rencontre des sexes, font intégralement partie du système de reconnaissance du partenaire sexuel chez les Lépidoptères et nécessitent toute notre attention.

Nous avons donc mis au point les conditions expérimentales qui permettent d'étudier une attraction de type chimio-anémotaxique chez *B. fusca* en tunnel de vol et nous avons établi les états et les évènements qui permettent de caractériser la séquence du comportement d'attraction du mâle par la phéromone femelle. L'état est un comportement qui a une durée relativement importante contrairement à l'évènement qui n'a pas de durée ou une durée très faible. Les évènements peuvent être définis par une fréquence. La description de ces états et évènements nous a permis d'établir l'éthogramme du comportement des mâles de *B. fusca* et nous a fourni une base pour étudier l'action des composés phéromonaux et pour définir l'ampleur de la fenêtre de réponse des mâles. L'ensemble de ces études est ensuite discuté en terme de polymorphisme ou de plasticité de réponse des mâles.

### 1. Matériels et méthodes

*Conditionnement des insectes.* Les mâles et les femelles utilisées sont âgés de 2 à 3 jours et sont maintenues dans les conditions suivantes : 25°C, photopériode inversée 12L:12D, humidité 85±10%.

Les mâles (N=20) sont placés dans les enceintes grillagées (Ø2 cm, longueur 6cm) décrites dans la partie consacrée à l'élevage et sont maintenus naïfs. Ces enceintes sont introduites dans le tunnel de vol avant les expériences pour que les mâles s'habituent aux conditions de la pièce. Puis, pour les observations du comportement, les enceintes sont disposées

simultanément sur un support métallique à 12cm de hauteur et à environ 120cm de la source de phéromone.

Les femelles sont maintenues individuellement dans les boîtes en polystyrène cristal (Ø 8cm, hauteur 6cm) et sont observées toutes les quinze minutes à partir du début de la période d'appel. Une fois en appel, les femelles sont utilisées comme attractif dans le tunnel de vol.

Les heures d'expérimentation sont corrélées aux heures d'appel des femelles, situées dans la seconde partie d'une scotophase de 12h, c'est-à-dire de la 5ème à la 9ème heure après le début de la scotophase.

*Description du tunnel de vol.* Le tunnel de vol utilisé (Figure 6) est un hémicylindre de 190cm de long, 80cm de large et 45cm de haut. La zone où évoluent les insectes fait 150cm de long. Le courant d'air en flux laminaire de 0.6m/s est généré par un ventilateur à une des extrémités du tunnel. Un extracteur placé à l'autre extrémité permet d'éliminer le courant d'air à l'extérieur du bâtiment et d'éviter la pollution phéromonale du tunnel et de la pièce. La température est maintenue à  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , l'humidité est de 45 à 50%. Un éclairage en lumière rouge de faible intensité permet l'observation des insectes sans les gêner. Des spots infrarouges permettent de filmer les comportements des insectes par une caméra Hitachi KP 161 CDD noir et blanc placée au-dessus du tunnel, équipée d'un objectif Nikkor 60mm 1:2,8 D. et reliée à un magnétoscope Panasonic AG-7330. Les insectes ont besoin de nombreux repères au sol pour se diriger : ils sont représentés par des bandes et des points jaunes posés sur le fond noir du tunnel.

Lors de nos observations, nous utilisons le programme d'étude et d'analyse du comportement : The Observer 5.0 (Noldus, Wageningen, The Netherlands, 2004) couplé à un Psion Workabout ou à un enregistreur Archos AV500.

La durée de chaque étape a été enregistrée comme un paramètre d'étude essentiel à l'analyse des résultats de comportement. Après chaque expérience, les antennes et les ailes des mâles sont vérifiées et nous ne conservons que les mâles morphologiquement capables de voler et de détecter la phéromone. Chaque expérience dure cinq minutes.

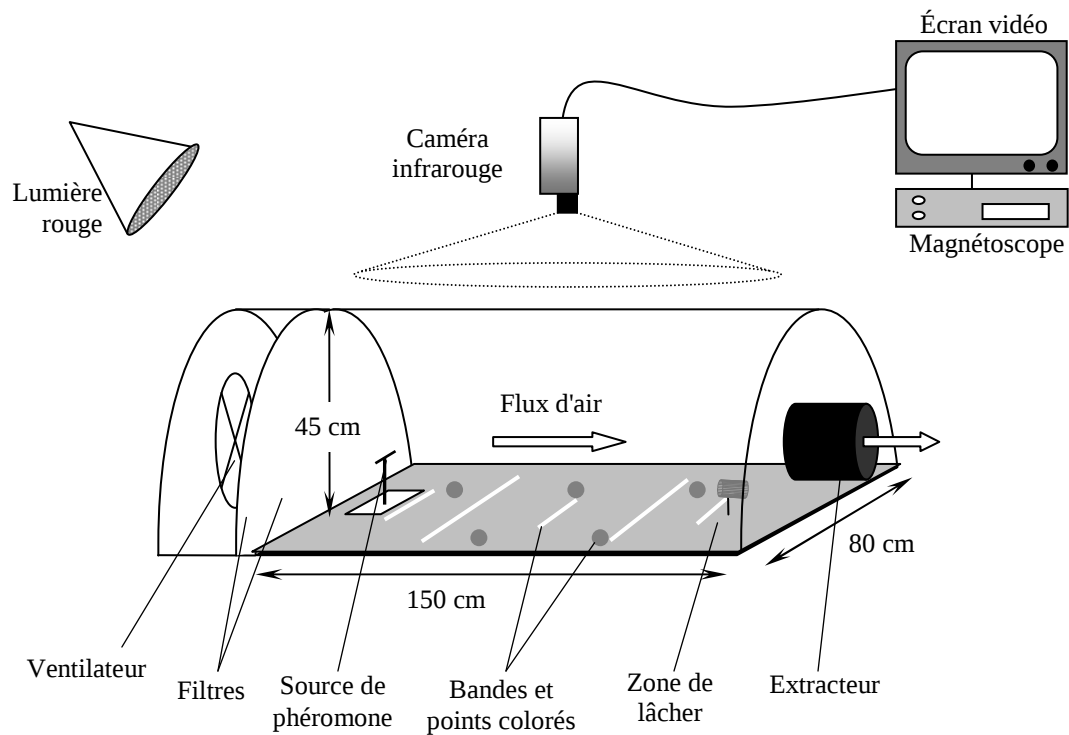


Figure 6 : Schéma du tunnel de vol.

*Source d'attraction.* Les expérimentations sont effectuées avec la phéromone sexuelle naturelle produite par la ou les glandes d'une ou plusieurs femelles en appel (en général trois), dont l'abdomen est pincé pour maintenir la glande extrudée. Cette source phéromonale est placée à une hauteur de 15 cm et à une distance de 120 cm du point de lâcher du mâle.

## 2. Résultats

La comparaison entre un vol stimulé par une émission phéromonale et un vol lié uniquement à l'air circulant, sous la forme d'un flux laminaire dans le tunnel de vol, nous a permis de dégager les items comportementaux décrits ci-après et repris dans l'éthogramme de la Figure 7.

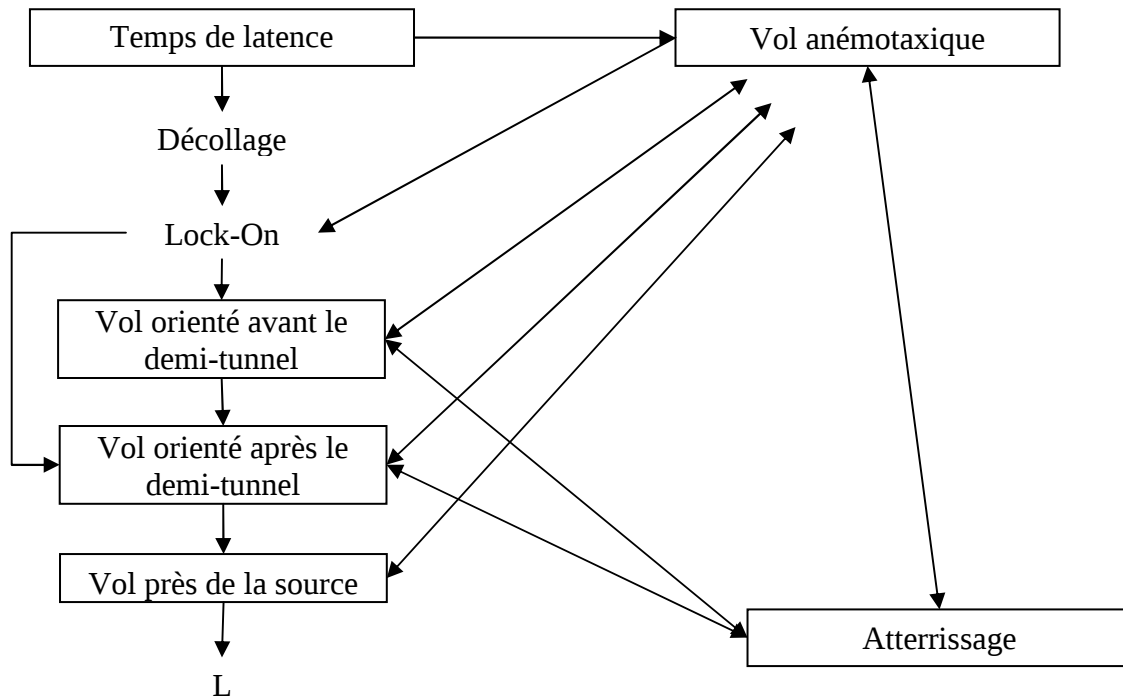


Figure 7 : Ethogramme du comportement d'attraction du mâle testé avec la phéromone femelle dans le tunnel de vol : les items comportementaux encadrés sont les états et les autres sont les évènements.

|                                   | Temps moyen | Variations     |
|-----------------------------------|-------------|----------------|
| Temps de latence                  | 51 s.       | de 0 à 116 s.  |
| Temps de vol jusqu'au demi-tunnel | 31 s.       | de 5 à 88 s.   |
| Temps de vol jusqu'à la source    | 69 s.       | de 13 à 186 s. |

Tableau 3 : Durées moyennes et variations du temps en secondes (s.) des différents items comportementaux conduisant à la localisation de la source phéromonale chez les mâles (N=20) de *Busseola fusca* en tunnel de vol.

Le **temps de latence** (état) est le temps qui s'écoule entre l'introduction du mâle dans le panache odorant et les premières réactions (vibration des ailes, mouvement des antennes) jusqu'au décollage. Le **décollage** (événement) se produit lorsque le mâle sort de sa cage et commence à voler dans le tunnel.

Le « **lock-on** » ou « faire l'azimut », lorsque le mâle vole en marche arrière face au vent pour repérer où se situe la source de phéromone, est considéré comme un événement. Le **vol anémotaxique** (état) est un vol aléatoire dirigé dans le flux d'air. Le mâle occupe tout le champs disponible du tunnel de vol.

Le **vol orienté** est le vol caractéristique des Lépidoptères : le mâle vole en direction de la femelle en effectuant des zigzags dans le flux phéromonal. La distance du vol en direction de la source est noté et divisé en deux : le vol orienté avant le demi-tunnel et le vol orienté après le demi-tunnel (états). Le vol près de la source (état) est un vol orienté à moins de cinq centimètres de la source phéromonale, qui peut se terminer par un **contact avec la source** (événement). Ce contact est suivi quelques fois de tentatives d'accouplement. L'atterrissage sur la source est le comportement final et le plus significatif. Il arrive parfois que le mâle se pose n'importe où dans le tunnel de vol. La signification de cet événement est différente du précédent. Toutefois, dans les deux cas, l'atterrissage met fin à l'expérimentation.

La latence est la phase de début de perception d'une odeur par le mâle. Pendant un temps de latence moyen de 51 secondes (écart-type 40.27), le mâle commence à vibrer des ailes de façon à augmenter la température de ses muscles alaires. Quelquefois, il se nettoie les antennes. Le temps de latence est variable de zéro à presque deux minutes (tableau 3). La fin de la latence est définie par le décollage.

Après la période de latence, la séquence du comportement d'attraction de *B. fusca* en tunnel de vol est la suivante (Figure 8). Le mâle décolle, fait un « lock-on », puis il vole dans le panache phéromonal, contre le vent (*upwind flight*) vers la femelle. Le zigzag lui fait alterner la perte de la piste phéromonale et le retour à l'intérieur de celle-ci. Ce vol est de type chimio-anémotaxique. Ensuite, le mâle effectue un vol plus ou moins stationnaire à proximité de la source phéromonale, atterrit ou touche la source de phéromone et parfois procède à des tentatives d'accouplement.

La durée moyenne du vol orienté avant le demi-tunnel est de 31 secondes et varie de 5 à 88 secondes. La durée moyenne du comportement du décollage au contact avec la source phéromonale est de 69 secondes et varie de 13 à 186 secondes (tableau 3).

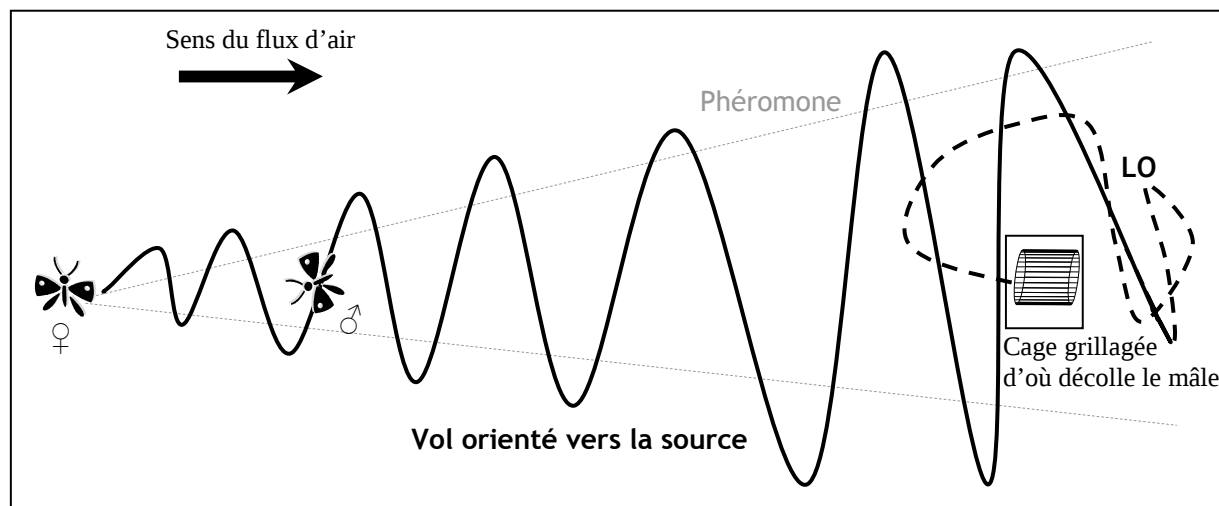


Figure 8 : Schéma du vol orienté d'un mâle de *B. fusca* en tunnel de vol en présence de la phéromone sexuelle de femelles vierges en appel de *B. fusca*. La flèche indique le sens du flux d'air. Le Lock-On (LO) est représenté par le trait noir en pointillé et le vol orienté par le trait plein.

Plus il se rapproche de la femelle, plus la concentration en molécules de phéromone devient élevée et le vol précis. Quelquefois, le mâle perd le panache odorant et se dirige alors vers le fond du tunnel où il effectue un deuxième « lock-on ». Lorsque les mâles décollent immédiatement, et donc sans avoir eu le temps de percevoir la phéromone, ils ont tendance à remonter le vent (anémotaxie positive) en larges zigzags et finissent par croiser la piste odorante. Ils effectuent alors un vol orienté comme celui décrit précédemment.

Les tests avec la phéromone sexuelle femelle donnent lieu à 85% de vols orientés avant le demi-tunnel (N=17 mâles) et 80% de mâles vont jusqu'au contact avec la femelle (N=16 mâles). Seulement 15% des mâles sont négatifs ou effectuent seulement un vol anémotaxique (N=3 mâles). Nos observations montrent que certains mâles ne répondent pas du tout et restent dans la cage. Ce résultat est courant dans les expériences en tunnel de vol, sans que l'on sache exactement pourquoi. De même, certains mâles s'envolent, mais n'atteignent pas la femelle. Leur envol est seulement une réponse au flux d'air (vol anémotaxique). Nous avons choisi de soumettre de nouveau ces mâles au test. Si ils ne décollent ou si leur vol reste un vol anémotaxique, ces mâles ont été considérés comme négatifs.

### 3. Discussion et conclusion

Les mâles de *B. fusca* attirés par des femelles conspécifiques présentent les mêmes spécificités comportementales, mais une grande variabilité individuelle en terme de durée des items comportementaux. Cette variabilité n'est pas liée au jour d'analyse (variations possibles des conditions extérieures comme la pression atmosphérique), ni au lot de mâles utilisés lors de la manipulation. Le comportement des mâles de *B. fusca*, résumé dans l'éthogramme, présente toutes les caractéristiques décrites précédemment chez les Lépidoptères (Baker et Roelofs, 1981 ; Baker et Haynes, 1996).

Les mâles de *B. fusca* effectuent un vol en zigzag de plus en plus précis, à mesure qu'ils se rapprochent de la source phéromonale et que la concentration en composés augmente. Ce vol est souvent suivi par de nombreuses tentatives d'accouplement, même si la femelle est morte dans le tunnel. Ces essais non concrétisés provoquent souvent chez le mâle un atterrissage ou un retour en arrière dans le flux de phéromone et un deuxième vol orienté. Les mâles de *B. fusca* ont besoin de beaucoup d'espace pour effectuer leur orientation dans le panache de phéromone (Lock-On). Cette conclusion confirme des observations antérieures sur le comportement des noctuelles en tunnel de vol (Frérot, Comm. Pers.). Toute étude sur cet insecte nécessite un tunnel de vol ayant au moins les dimensions du notre. L'intensité du flux d'air et l'âge du mâle sont des paramètres importants de la réponse à la stimulation phéromonale. Dans ces conditions, 80% des mâles entrent en contact avec la source phéromonale femelle. Ce taux est satisfaisant et sera pris comme référence dans les autres expérimentations de comportement en tunnel de vol.

Dans toutes les expériences en tunnel de vol, les mâles qui ne répondent pas seront appelés mâles négatifs. Sachant que nous avons conservé seulement les mâles physiquement capables de voler, l'absence de réponse n'est pas due à un problème anatomique. Nous ne possédons aucune information sur ces mâles. Diverses hypothèses ont été émises pour expliquer l'absence de réponse : les mâles n'ont pas ou peu de récepteurs aux composés phéromonaux (malformations) ; leur sensibilité à la phéromone a diminué à cause d'un effet dû à l'élevage ou d'un manque de maturation sexuelle. Nous chercherons ultérieurement en développant une approche de caractérisation génétique à déterminer si ces mâles « négatifs » ne sont pas particuliers voire différents des mâles « positifs ».

Cette étude en tunnel de vol du comportement d'attraction du mâle de *B. fusca* par la phéromone sexuelle de la femelle a été un préliminaire indispensable à l'étude du polymorphisme phéromonal femelle et du rôle de la plante-hôte sur l'attraction du mâle.

## II. Etude du comportement de cour

Le comportement de cour est une des composantes du SMRS chez les Lépidoptères. Il est essentiel au bon déroulement de la reproduction et peut être un des agents du maintien de la spécificité de la rencontre des partenaires sexuels. Il constitue souvent la dernière barrière (sans compter les différences morphologiques au niveau des pièces génitales) permettant l'isolement reproducteur pré-zygotique entre deux espèces.

Le comportement de cour de *B. fusca* n'était pas connu. Son étude est indispensable à la compréhension des mécanismes qui conduisent à l'accouplement entre les individus et doit nous permettre de statuer sur l'existence d'une phéromone sexuelle mâle. Ce point est important, puisque les signaux chimiques émis par les mâles de certaines espèces de Lépidoptères renforcent la spécificité de la reconnaissance du partenaire sexuel.

Les phéromones sexuelles produites par les mâles sont issues de composés prélevés dans leur milieu de vie lors de l'alimentation larvaire. Ces phéromones sont un reflet de la valeur adaptative de l'individu qui les émet (Birch *et al.*, 1989). Une phéromone mâle de qualité, possédant les ratios exacts de chaque composé et présentant une quantité totale précise, montrera que le mâle qui se présente est en bonne santé et qu'il fera un bon reproducteur. Les phéromones sexuelles mâles jouent donc un rôle essentiel dans la sélection des mâles par les femelles et donc dans le choix d'un partenaire sexuel capable de donner la meilleure descendance possible (Jacquin *et al.*, 1991).

D'un point de vue appliqué, la compréhension des processus comportementaux qui conduisent le mâle vers la femelle peut servir à la conception de pièges phéromonaux aux formes adaptées à ce comportement. Nous avons donc étudié et analysé le comportement de cour de *B. fusca*, qui n'avait jamais été décrit.

# Courtship behaviour of the African Maize Stem Borer: *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions

BRIGITTE FRÉROT<sup>(1)\*</sup>, ANNE-EMMANUELLE FÉLIX<sup>(1)</sup>, ENE SARAPUU<sup>(1)</sup>, PAUL-ANDRÉ CALATAYUD<sup>(2)</sup>,  
BRUNO LE RÜ<sup>(2)</sup> & HERVÉ GUENEGO<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> INRA, UMR PISC 1272, Route de St Cyr, 78026 Versailles, France

<sup>(2)</sup> IRD, UR 072, c/o ICIPE PO Box 30772, Nairobi, Kenya

\* Corresponding author

**Abstract.** *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae) is the most important African stem borer damaging maize and sorghum. Chemical mediators play an essential role in all life cycle of this moth, especially for mating recognition and host plant choice. The female sex pheromone, courtship and mating behaviour act on the reproductive isolation within insect populations. *B. fusca* courtship behaviour was studied to decipher each step that could account as a process for reproductive isolation. *B. fusca* males and females presented a very simple and fast courtship behaviour, without any particular events or male pheromone emission.

**Résumé.** Comportement de cour du foreur de graminées africain : *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae) en conditions de laboratoire. *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae) est le plus important ravageur des cultures de maïs et de sorgho en Afrique. L'écologie chimique est essentielle pendant toute la vie de ces Lépidoptères nocturnes et intervient pour la rencontre des partenaires sexuels et le choix de la plante hôte. La phéromone sexuelle produite par la femelle et le comportement précopulatoire sont des facteurs importants du maintien de l'isolement reproducteur au sein des populations de cet insecte. Le comportement de cour de *B. fusca* a été étudié pour préciser chaque événement comportemental, qui pourrait avoir un rôle dans l'isolement reproducteur. Le comportement de cour s'avère être très simple et rapide, sans événement particulier ni émission d'une phéromone mâle.

**Keywords:** Stem Borer, *Busseola fusca*, Noctuidae, Africa, mating and calling behaviour.

Moth reproduction i.e. mate location, courtship behaviour and copulation, mostly relies on the use of chemical signals. Long range behaviour is steered by the female produced sex pheromone perceived by the male that flies upwind to where the female is standing in calling posture. This scheme is, with few exceptions, common in all moths from the more primitive to the more evolved species. In contrast, the characteristic close range behaviour of courtship is very diverse between species and even within the same genus, with no relation between complexity and evolutionary stage. In some species, courting males release chemicals and engage a chemical dialogue with the females, that seems to be involved in sexual selection (Birch *et al.* 1989), whereas some species exhibited a courtship behaviour reduced to copulation attempts. Male produced scents

are chemically very diverse (Blum 1987), as well as the specialized scent structure (Birch & Hefetz 1987).

The specific recognition system expressed between males and females (SMRS) is constituted by a complex set of adaptive traits and thus can be considered as an essential element in the evolution of moth populations. Specifications of each SMRS depend in part on the phylogenetic history of each species and on complexity and stability of the environment in which the insects develop. In insects and especially moths, SMRS plays a major role in reproductive isolation and speciation processes. Thus, the chemically disturbed environment produced by sympatric species and interspecific competition has to be taken into account for understand means implemented by our insect to realize its reproductive isolation. Achievement of reproductive isolation is linked to different processes such as the chemistry of the blend, the difference in dial periodicity of sexual behaviour and the possible adult sympatry. At least, when two species share the same pheromone blend and when they behave in sympatry with the same timing in sexual activity, courtship behaviour is the last protection against interspecific copulation.

E-mail: frerot@versailles.inra.fr, afelix@versailles.inra.fr,  
eleppik@versailles.inra.fr, pcalatayud@icipe.org,  
bleru@icipe.org, hguenego@versailles.inra.fr

Accepté le 6 mai 2006

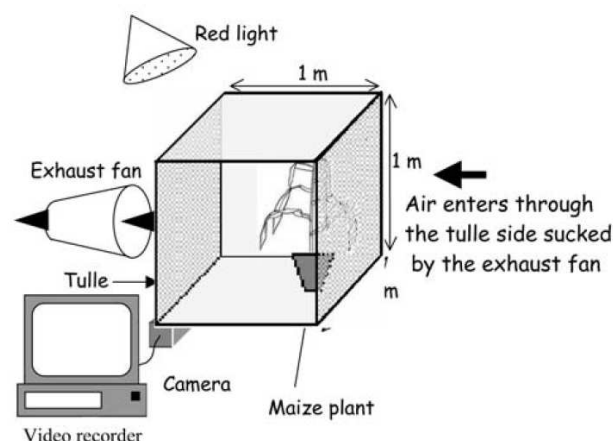
*Busseola fusca* (Fuller 1901) (Lepidoptera: Noctuidae) is the most important stem borer species damaging cultivated gramineae: sorghum (*Sorghum bicolor* Moench 1794) and maize (*Zea mays* L. 1753) in Africa (Ratnadass *et al.* 2001). The larvae cause yield losses ranging from region to region from 20% to 80%. *B. fusca* populations have moved from native wild sorghum to cultivated cereal plants and developed a preference for them (Le Rü *et al. in lit.*). As populations can be adapted to the local requirements of the habitat, host plant selection by an insect might partly be explained by the phylogeny as shown by patterns among related species (Wyatt 1997).

The objective of this study was to describe qualitatively and quantitatively pre-courtship and courtship behaviour in *B. fusca* on cultivated host plants under laboratory conditions. Such knowledge provides information on the process involved in reproductive isolation and also contributes to improve the trap design adapted to the male landing behaviour.

### Materials and Methods

#### Insect rearing

Pupae originated from the mass rearing unit of the International Centre for Insect Physiology and Ecology (ICIPE-Nairobi-Kenya). Individuals were sexed and each sex was kept in separate close rectangular crystal polystyrene containers (27x12x8 cm) on vermiculite until emergence. Adults were collected daily and males were housed together in boxes as described above. Adult females were placed individually into a cylindrical crystal polystyrene box (ø 3x6 cm) until they were used for experiments when two or three days old. Adults were kept under the following conditions: 25 °C, 85±10% R.H. with a 12:12-h light-dark-reversed photoperiod.



**Figure 1**  
Experimental set up for the courtship behaviour study.

#### Description and analysis of courtship behaviour

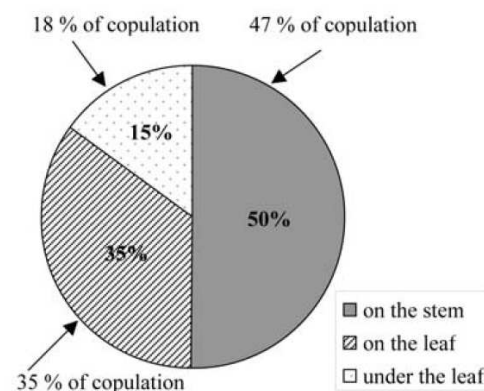
Female calling behaviour is necessary to induce male attraction. The ovipositor of *B. fusca*, like in most moths, is protractible and females initiate calling by extruding the ovipositor and cease calling by retracting it slowly. In our study calling behaviour was defined as 50% of the full ovipositor extension.

According to Calatayud *et al. (in lit.)*, the onset of female calling behaviour is related to the diel periodicity and age. Thus observations of the pre-courtship and courtship behaviours were conducted during the five hours after the beginning of the 12h-scotophase. Courtship behaviour was recorded by placing a two to three day-old calling female on a maize plant in a mosquito-net cubic cage (1 m<sup>3</sup>). Two sides were made of Plexiglas and the other two sides were covered by tulle. A wind fan allowed a constant air flow to pass through (fig. 1). This airflow set up was necessary to avoid pheromone permeation and for the males to succeed in locating the calling female. Once the female was in calling posture, a male was carefully deposited on the bottom of the cage, downwind from the female. Courtship behaviour was tape recorded (Panasonic AG-7330) until copulation with a Hitachi KP 161 CDD black and white camera equipped with a Nikon objective AF Micro Nikkor 60 mm 1:2.8 D. Each experiment lasted five minutes under 20-25 °C, 45-50% R.H. and red light. The tapes were transcribed in video folders on a computer and analysed with The Observer 5.0 software (Noldus, Wageningen, The Netherlands, 2004) linked to a Pision Workabout.

### Results

#### Female pre-courtship behaviour

Most of the females started to call within the 5<sup>th</sup> hour of the scotophase. The female remained motionless in calling position. No wing fanning or abdomen puff movements was observed. Females called on the maize plant: 50% were observed on the stem, 35% on the leaf and 15% under the leaf (fig. 2).



**Figure 2**  
Relation between calling female position and percentage of mating: the percentages on the pie represent the different female positions out of all the tested females. The percentages outside of the pie represent the percentage of copulation out of the total copulation recorded.

### Male pre-courtship behaviour

With airflow, moths could sense the dimension and the gradient of the pheromone plume and used this information to steer a course to the source (Cardé & Charlton 1984). As soon as a *B. fusca* male encountered a female pheromone plume, the first behaviour observed were wing fanning, antennae rising up and moving up and down. This step was considered as the activation process before take-off. After taking-off, males flew toward the female in a zigzagging upwind flight in the pheromone plume. This step was clearly an oriented displacement towards the female and lasted an average of 13 seconds.

### Courtship behaviour

The observation of 17 complete successful behaviours led us to divide of the courtship behaviour into three steps:

1. The landing. The male landed at different places: either on the stem under the female or on the female side or directly on the female;

2. The attempt to copulate. After landing the male exhibited a wing fanning walk to reach the female and displayed an eversion of the genitalia claspers bearing hair-pencils. Then, the male bent the abdomen to contact the extremity of the female abdomen, trying to hold the female genitalia with the genitalia claspers in copulation attempts;

3. Copulation: the male and female genitalia joined and the male wing fanning ceased. The male spun around 180° staying opposite the female frontal orientation in a tail-to-tail posture typical in Lepidoptera mating. When copulation was successful, male and female remained linked for *ca* three hours.

66% of experimented pairs ( $n = 26$ ) copulated and the courtship behaviour from the take-off to the contact between male and female genitalia lasted an average of 19.73 seconds ( $\text{sem} \pm 19.75$ ). 46% of the males landed on the plant underneath the female and then walked while wing fanning to reach the female side; 27% landed on the side near the female and 27% on the female (fig. 3). Landing underneath the female leads to 48% copulation success whereas 28% and 24% ( $P = 1.52$ ) success rates were recorded for landing on the female side or directly on the female respectively. When the male landed on the female, calling behaviour stopped and the male could not again locate the female.

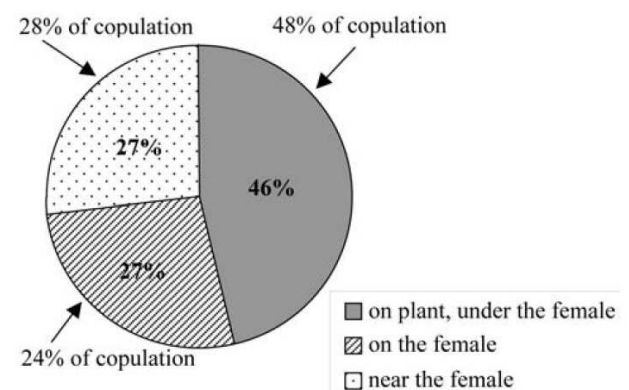
Observed unsuccessful copulations ( $n = 9$ ) were due to female rejection ( $n = 5$ ), female escaping ( $n = 2$ ) or a cease of calling ( $n = 2$ ).

Copulation percentages varied according to the site of calling behaviour: 47% of mating occurred when females called on the stem, 35% when on the leaf and 18% when under the leaf.

### Discussion

The *Busseola fusca* courtship behaviour is relatively short and simple. The pheromone modulates the male upwind flight to locate the female. Once the male encounters the female pheromone plume, it usually lands on the stem underneath the female. Despite the fact that our results are not significant certainly due to low number of experiments, it appears that landing on the stem underneath the female is the most efficient for successful copulation and must be taken into account for optimizing the design of the pheromone trap in a way that the males can land underneath the pheromone source and then walk up toward it. Sometimes, the male lands brutally on the female which exhibits a rejection motion and stops calling. Female rejection remains the main reason for unsuccessful mating. In most Lepidoptera, the mate choice is the decision of the females (Zagatti & Castel 1987).

*B. fusca* males do not present a highly elaborated mating behaviour contrary to other noctuid species such as *Mamestra brassicae* L. 1758, which exhibit a sophisticated mating behaviour with the release of a male sex pheromone produced by the abdominal brushes acting as an attractant for the calling female (Birch *et al.* 1989; Jacquin *et al.* 1991; Noldus & Potting 1989). Male pheromone release is necessary for copulation success and increases female recognition and acceptance at short range. The female are supposed to choose the courting male releasing the higher quantity of male pheromone and a sort of "sexual selection" based on female choice and male pheromone occurs (B. Frérot *in lit.*).



**Figure 3**

Relation between landing places and percentage of mating: the percentages on the pie represent the different male landing places out of all male tested. The percentages outside of the pie represent the percentage of copulation out of the total copulation recorded.

Clasper hair pencils of *B. fusca* males do not seem to release any sex pheromone. *B. fusca* females seem to select the males on their landing behaviour and to reject copulation, using two means: escape or stop calling. Sexual selection plays an essential role in most of Lepidoptera which copulate only once; only the most efficient moths will copulate. *B. fusca* is a polyandrous species (Calatayud *et al.* 2005) and this may account for no mate selection in this species. Thereby, very simple *B. fusca* courtship behaviour and the apparent absence of sexual selection lead to draw some hypothesis. With a sex-ratio favouring males (Ratnadass *et al.* 2001) and with polyandrous females, a mate choice by the female would be a waste of energy and would be detrimental for the species fitness. Sperm selection could be another way for intra specific selection but no information is available on the occurrence of such a process in *B. fusca* female egg fertilization.

The entire pheromone blend functions as a species-specific unitary signal for long range attraction, courtship and copulation (Linn *et al.* 1984). In the case of *B. fusca*, the female sex pheromone is a mixture of three compounds: the (Z)-11-tetradecenyl acetate (main), the (E)-11-tetradecenyl acetate and (Z)-9-tetradecenyl acetate (minors), 70:15:15% respectively (Nesbitt *et al.* 1980; Hall *et al.* 1981). Diversity of moth species developing on maize and sorghum crops in Kenya is reduced. The other main populations developing on these plants are *Sesamia calamistis* Hampson 1810 (Lepidoptera: Noctuidae) and *Chilo partellus* (Swinhoe 1885) (Lepidoptera: Crambidae), which produce a sex pheromone whose main components are characterized by 16 carbons ([www-pherolist.slu.se](http://www-pherolist.slu.se)) preventing interspecies attraction.

Many stem borers are associated with their host plants. Phytophagous insects often meet, court and mate on plants (Landolt & Phillips 1997). To date, how host plants influence *B. fusca* SMRS remains unresolved. Maize plants in our study allow the female to be in a good calling position and the male to spin after copulation. Does the plant only represent a calling stand or does it affect sexual behaviour remains to be answered.

**Acknowledgments.** The authors are grateful to Jenny Smith for the English revisions.

## References

- Birch M.C., Hefetz A. 1987. Extrusible organs in male moths and their role in courtship behavior. *Bulletin Entomological Society of America* 33: 222-229.
- Birch M. C., Lucas P., White P.R. 1989. The courtship behaviour of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae), and the role of male hair-pencils. *Journal of Insect Behavior* 2: 227-239.
- Blum M.S. 1987. Biosynthesis of arthropod exocrine compounds. *Annual Review of Entomology* 32: 381-413.
- Calatayud P.-A., Guénégó H., Le Rû B., Silvain J.F., Frérot B. 2006. Temporal patterns of emergence, calling and oviposition of the maize stem borer, *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)* 42(3-4): (in press)
- Cardé R.T., Charlton R.F. 1984. Olfactory Sexual Communication in Lepidoptera: Strategy, Sensitivity and Selectivity, p. 241-265 in: T. Lewis (ed.), *Insect Communication*. Academic Press, London.
- Hall D.R., Beevor P.S., Cork A., Lester R., Nesbitt B.F., Nyirenda G.K.C., Phiri D.D.N., Blair B.W., Tannock J. 1981. The female sex pheromone of the maize stalk-borer *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae) : identification and initial field trials. *Zimbabwe Journal of Agricultural Research* 19: 111-122.
- Jacquin E., Nagnan P., Frérot B. 1991. Identification of hairpencil secretion from male *Mamestra brassicae* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) and electroantennogram studies. *Journal of Chemical Ecology* 17: 239-246.
- Landolt P. J., Phillips T.W. 1997. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology* 42: 371-391.
- Linn C. E., Bjostad L.B., Du J.W., Roelofs W.L. 1984. Redundancy in a chemical signal: behavioral responses of male *Trichoplusia ni* to a 6-component sex pheromone blend. *Journal of Chemical Ecology* 10: 1635-1658.
- Nesbitt B. F., Beevor P.S., Cork A., Hall D.R., Lester R., Blair B.W., Tannock J. 1980. Identification of the female sex pheromone of the maize stalk borer, *Busseola fusca* : a preliminary note. *Tropical Pest Management* 26: 327.
- Noldus L.P.J.J., Potting R.P.J. 1989. Calling Behavior of *Mamestra brassicae* : Effect of Age and Photoperiod. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 3: 61-71.
- Ratnadass A., Traore T., Sylla M., Diarra D. 2001. Improved techniques for mass-rearing *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) on an artificial diet. *African Entomology* 9: 167-175.
- Wyatt T. D. 1997. Methods in studying insect behaviour, p. 27-56 in: Dent D.R., Walton M.P. (eds.), *Methods in Ecological and Agricultural Entomology*. CABI, Wallingford.
- Zagatti P., Castel Y. 1987. Courtship behaviour of the false codling moth, *Cryptophlebia leucotreta* (Meyrick): androconial display and mating success (Lepidoptera, Tortricidae). *Annales de la Société Entomologique de France (N.S.)* 23: 113-123.

Le comportement de cour de *B. fusca* est peu sophistiqué. La phéromone sexuelle de la femelle module le vol orienté du mâle qui atterrit sur la tige de la plante sous la femelle. Ce comportement doit être pris en compte pour le choix du piège à phéromone à utiliser. Le rejet du mâle par la femelle, en arrêtant le comportement d'appel, est le principal facteur qui fait que l'accouplement n'a pas lieu. Chez la plupart des Lépidoptères, le choix final du partenaire sexuel en vue de l'accouplement est une décision de la femelle (Zagatti et Castel, 1987). Les mâles de *B. fusca* ne présentent donc pas un comportement de cour hautement élaboré, contrairement à d'autres espèces de Lépidoptères Noctuidae. Dans le cas de notre modèle, la phéromone est un mélange de quatre composés dont trois avec 14 atomes de carbone et un avec 16 atomes de carbone (voir l'article sur la phéromone dans ce manuscrit). Au cours de l'évolution, dans le cas de la lignée qui a conduit à l'espèce *B. fusca*, la complexification de la phéromone sexuelle femelle a été favorisée. La phéromone doit jouer donc un rôle majeur dans la reconnaissance du partenaire sexuel au détriment du comportement de cour, qui est resté simple.

Nous pouvons introduire ici la notion d'investissement différentiel dans différents types de mécanismes pouvant conduire à la reconnaissance du partenaire sexuel et à éviter les accouplements interspécifiques. Des exemples dans la littérature nous montrent que lorsqu'une des étapes du SMRS est complexe, comme la production de mélanges phéromonaux femelles sophistiqués, les étapes suivantes peuvent être moins élaborées, à l'exemple d'un comportement de cour simple et de durée relativement brève, c'est le phénomène observé chez *B. fusca*. Inversement, une phéromone sexuelle simple, constituée d'isomères du même composé par exemple, conduit à la mise en place d'un comportement de cour élaboré et spécifique, qui s'accompagnera souvent de la mise en jeu d'une phéromone sexuelle mâle.

Par exemple, la phéromone sexuelle femelle de *Mamestra brassicae* Linné 1758 (Lepidoptera : Noctuidae) est un mélange simple de seulement deux acétates (Subchev *et al.*, 1987) et, par contre, l'identification de la phéromone sexuelle mâle de *M. brassicae* par Jacquin *et al.* (1991) a permis de décrire un mélange complexe de six composés. Dans les expériences d'électro-antennographie, les femelles ainsi que les mâles répondent à tous les composants de la phéromone sexuelle mâle. Cela pourrait indiquer à la fois une action sur les femelles pour l'accouplement, mais aussi une inhibition des autres mâles compétiteurs (Toth, 1982).

Dans un autre cas, les mâles de *Cryptophlebia leucotreta* (Meyrick) (Lepidoptera : Tortricidae) possèdent trois types d'androconies qui sont utilisées successivement lors du comportement de cour (Zagatti et Castel, 1987). Ce comportement de cour est assez complexe avec plusieurs étapes pendant lesquelles le mâle déploie toutes ses androconies : les corematas situées à l'extrémité de l'abdomen, les glandes alaires et les androconies situées sur les pattes arrières. Bien que l'usage de ces androconies ne semble pas indispensable, il augmente fortement et significativement le taux d'accouplement. La phéromone sexuelle femelle est simplement composée de deux isomères d'acétates (Newton *et al.*, 1993).

Le comportement de cour de *Grapholesta molesta* (Busck) (Lepidoptera : Tortricidae) se réalise en plusieurs étapes : le mâle attiré par la femelle atterrit devant elle et sort ses pinceaux androconiaux situés entre les 7ème et 8ème segments abdominaux. Il attire la femelle qui touche son abdomen avec ses antennes, ce qui déclenche chez le mâle les tentatives d'accouplement (Baker et Cardé, 1979 ; Löfstedt *et al.*, 1989). La phéromone sexuelle femelle est aussi relativement simple puisqu'elle est composée de deux isomères d'acétates et d'un alcool, tous composés de 12 atomes de carbone (El-Sayed et Trimble, 2002).

Deux autres Lépidoptères, *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera : Heliothinae) et *Peridroma saucia* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) présentent un comportement de cour particulier et spécifique et les mâles de *P. saucia* libèrent une phéromone sexuelle (Teal *et al.*, 1981 ; Birch *et al.*, 1976). Leurs phéromones sexuelles femelles sont simples (Hendricks *et al.*, 1989 ; Inomata *et al.*, 2002).

Tout comme *B. fusca*, *S. nonagrioides* (Lepidoptera : Noctuidae) ne présente pas de comportement de cour sophistiqué et le mâle ne libère pas de phéromone sexuelle (Babilis et Mazomenos, 1992). Par contre, la phéromone sexuelle femelle est complexe avec deux acétates, un à 12 et un à 16 atomes de carbone, un aldéhyde et un alcool (Sans, 1997). Un autre Lépidoptère Noctuidae, *Spodoptera littoralis* (Boisduval), est dans le même cas avec une phéromone sexuelle femelle composée de nombreux produits avec une voire deux doubles liaisons (Dunkelblum, 1982) et un comportement de cour simple et rapide (Ellis et Brimacombe, 1980).

De nombreux exemples vont dans le sens de cette hypothèse d'investissement différentiel, qui ne peut cependant pas être généralisé à toutes les espèces. Par exemple, chez *P. interpunctella* (Lepidoptera : Pyralidae), le mâle produit une phéromone sexuelle alors que la phéromone femelle (Grant *et al.*, 1975) est complexe avec des composés à deux doubles liaisons (Hu et Du, 2005).



### III. Identification de la phéromone sexuelle de *Busseola fusca*

Chez *B. fusca*, la phéromone sexuelle femelle a été décrite il y a presque 30 ans (Nesbitt *et al.* 1980 ; Hall *et al.* 1981). C'est un mélange de trois acétates à 14 atomes de carbone (annexe 2) dans un ratio de 10 : 2 : 2, équivalent à 70%, 15%, 15%. Le composé majoritaire de cette phéromone est le (Z)-11-tétradécén-1-yl-acétate ou **Z11-14:Ac** et les deux composés minoritaires sont le (E)-11- tétradécén-1-yl-acétate ou **E11-14:Ac** et le (Z)-9- tétradécén-1-yl-acétate ou **Z9-14:Ac**. Cette composition phéromonale décrite par Nesbitt *et al.* (1980) a été utilisée dans des expériences de piégeages dans les champs de maïs dès 1983 (Campion et Nesbitt). Ces pièges ont servi à contrôler la présence de *B. fusca* dans les zones de tests, mais n'ont pas pu servir à la mise en place d'un piégeage de masse ou d'expériences de confusion sexuelle, car le nombre d'insectes capturés était trop faible.

Des expériences de piégeage ont été réalisées au Kenya pour établir le meilleur type de piège à utiliser pour *B. fusca* (Critchley *et al.*, 1997). Il s'avère que les meilleurs pièges sont les pièges à eau fabriqués localement, la couleur important peu. Les pièges sont placés à la hauteur de la canopée des cultures, à 60 mètres ou plus de distance les uns des autres. La composition phéromonale utilisée est toujours celle de Nesbitt *et al.* (1980) avec une concentration de 1 mg. Dans ces conditions, le nombre de mâles capturés reste très faible et ne permet pas un contrôle adapté. Ces piégeages avaient cependant permis d'observer trois générations de *B. fusca* par an au Kenya.

L'inefficacité des piégeages pourrait provenir d'une identification incomplète de la phéromone sexuelle femelle de *B. fusca*. Nous avons donc repris l'identification de la phéromone, qui n'avait pas été étudiée depuis 1981, en nous intéressant à différentes populations de *B. fusca* provenant de plusieurs localités géographiques, prélevées dans la nature ou élevées au laboratoire ICIPE. De nouvelles techniques, comme la nouvelle méthode de prélèvement par SPME (annexe 1), et des outils d'analyse plus performants, peuvent permettre de préciser la composition d'une phéromone sexuelle femelle.

L'hétérogénéité des milieux écologiques colonisés par *B. fusca* depuis l'introduction du maïs aurait pu s'accompagner d'un polymorphisme phéromonal. Notre objectif est donc aussi d'estimer de la manière la plus précise possible ce polymorphisme phéromonal et de déterminer s'il peut agir sur le contrôle ou la lutte biologique que nous voudrions mettre en place. Par ailleurs, si de telles « races phéromonales » existent chez *B. fusca*, l'identification précise des composés des phéromones de chaque population géographique permettra d'améliorer les attractifs de synthèse utilisés pour piéger les mâles en champs ou pour brouiller la rencontre des sexes (confusion sexuelle). Ceci pourra permettre d'agir sur la densité et la dynamique de la population de ces ravageurs, en diminuant la fréquence des accouplements dans une lutte éthologique plus efficace.

D'un point de vue plus fondamental, ces recherches nous serviront à mettre au point une formulation phéromonale de synthèse plus attractive que celle utilisée en champs et plus compétitive que la phéromone sexuelle femelle naturelle. Cette étude nous permettra aussi d'envisager la forme et le placement dans les champs des pièges phéromonaux adéquates.

A NEW INSIGHT INTO PHEROMONE COMMUNICATION IN *Busseola fusca*

A.-E. FÉLIX <sup>(1,2)</sup>, C. MALOSSE <sup>(1)</sup>, P.-A. CALATAYUD <sup>(3)</sup>, B. LE RÜ <sup>(3)</sup>, J.-F. SILVAIN <sup>(2)</sup>  
and B. FRÉROT <sup>(1)\*</sup>

<sup>(1)</sup>INRA, UMR PISC 1272, Route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex, France.

<sup>(2)</sup>IRD-CNRS, UR 072, LEGS, Avenue de la Terrasse, Bâtiment 13, Boite Postale 1, 91198  
Gif-sur-Yvette, France.

<sup>(3)</sup>IRD, UR 072, c/o ICIPE PO Box 30772, Nairobi, Kenya.

\*to whom correspondence should be addressed. E-mail: [frerot@versailles.inra.fr](mailto:frerot@versailles.inra.fr)

**Abstract**—We investigated potential correlations between molecular characteristics of *B. fusca* populations and pheromone mixtures produced by females, by coupling DNA analyses with pheromone identification and behavior. The study provides insight into variation in pheromones produced by insect populations developing on maize crops in various African countries. Within each population, polymorphism in pheromone mixture was studied and individual variations were shown to be equivalent to those observed between populations characterized by either different geographic origins or by different mitochondrial DNA clades. The comparison between pheromone mixtures of the different populations did not show difference that can be responsible of any reproductive isolation process. Wind tunnel experiments demonstrated that males were sensitive to small variations in pheromone mixture; however in each population, some of them presented wider response windows than the others. From our study, we can conclude that interbreeding remained possible between the populations studied, despite some of the populations having been separated geographically for one and a half million years. We also identified a novel pheromone component, (Z)-11-hexadecen-1-yl acetate and report the pheromone mixture that was most efficient for eliciting male responses in our study ((Z)-11-tetradecen-1-yl acetate (62%), (E)-11-tetradecen-1-yl acetate (15%), (Z)-9-tetradecen-1-yl acetate (13%) and (Z)-11-hexadecen-1-yl acetate (10%)). This pheromone mixture could be beneficial for monitoring flight and including in current crop treatments.

**Key Words**—Lepidoptera, Noctuidae, SPME, GC-MS, synthetic pheromone, wind tunnel, population, field trapping, reproductive isolation, clade.

## INTRODUCTION

*Busseola fusca* (Fuller, 1901) is now rarely found on wild plants; rather, it commonly develops on cultivated plants (Le Rü *et al.*, 2006; Ong'amo *et al.*, 2006). Indeed, *B. fusca* is considered to be the main pest on some cultivated Gramineae: *Sorghum bicolor* Moench and *Zea mays* L. in sub-Saharan Africa (Kfir *et al.*, 2002; Ratnadass *et al.*, 2001). In African countries, the scarcity of insecticides, and thus their high cost, means that they must be sprayed at the right time for optimal efficiency. The study of insect flight patterns is important in determining timing. Moreover, alternative methods for use in integrated pest management are of great interest. Pheromone identification is a first step in creating an effective synthetic attractant and developing new tools to reduce insect population levels. The sex pheromone produced by *B. fusca* females was identified by Nesbitt *et al.* (1980) as a mixture of three isomer acetates: (Z)-11-tetradecen-1-yl acetate or Z11-14:Ac, (E)-11-tetradecen-1-yl acetate or E11-14:Ac and (Z)-9-tetradecen-1-yl acetate or Z9-14:Ac, produced at an average ratio of 10:2:2. In Kenya and in other African countries, the use of this attractant for detecting flight was abandoned because of its poor efficacy; thus, further investigation into the composition of sex pheromone is required.

The long-range attraction behavior of a male moth induced by a pheromonal odor released by females has been widely studied in the Lepidoptera Noctuidae (Baker, 1990). Such behavioral studies — mostly using wind tunnels (Baker and Linn, 1984) — are essential to understand reproduction mechanisms and are important for sex pheromone identification. In Lepidoptera, male attraction requires particular ratios of different female sex pheromone components and a specified dose overall (Linn and Roelofs, 1989). Males have variable levels of tolerance to changes in the ratio of pheromone components, depending on the species. The male "response window" is an important factor in the specific mate recognition system. In this study, we determined the relative importance of minor pheromone components using a wind tunnel, to develop improved synthetic attractants, and to assess the polymorphism of pheromone-based reproductive system.

Our approach was based on findings from recent studies (Sezonlin *et al.*, 2006) of mitochondrial diversity among *B. fusca* populations from different geographic areas in Africa. Three clades of mitochondrial haplotypes were identified. All moths collected from several populations in various countries (Mali, Benin, Ghana and Togo) in West Africa belonged to a single clade, **W**. In East Africa, two distinct clades were also identified: a minor clade (clade I) and a major clade (clade II) containing most of the moths collected in Kenya. The

divergence of clades I and II in East Africa and that of the East and West African clades occurred around one and a half million years ago (Sezonlin *et al.*, 2006). The pheromone composition of individual moths from each clade is of interest because the specific mate recognition system acts as a strong force in the isolation of populations, as observed in other Lepidoptera species (Frérot and Foster, 1991; Pelozuelo *et al.*, 2004). In this study, we investigate the relationship between pheromones produced by the different populations and the mitochondrial clades they belong to.

## MATERIALS AND METHODS

*Insects.* *B. fusca* from two sources were used in this study: from the mass rearing unit of ICIPE in Nairobi (Kenya) and from the field. Wild populations were collected in various localities of Kenya (East Africa) and in several countries of West Africa (Table 1). Individuals were sexed and kept in closed rectangular crystal polystyrene containers (30 cm length, 12 cm width, and 8 cm height) on moist vermiculite until emergence, separated according to sex. Adults were collected daily. Males were housed together in a rectangular crystal polystyrene box (30 cm length, 12 cm width, and 8 cm height) and females were placed individually into cylindrical crystal polystyrene boxes (ø10 x 6 cm length). They were used for experiments at two or three days old. Pupae and adults were maintained at 25°C, with relative humidity  $85 \pm 10\%$ , under a 12:12 h light:dark, reversed photoperiod.

*Chemical Analyses.* Two- or three-day-old calling females were used. Onset of calling is five hours after the beginning of the scotophase. Twenty-four originated from ICIPE rearing, 21 females collected in the field in various Kenya localities and 28 females collected in West African countries. The pheromone gland was extruded with thin forceps. The adsorbent part of a Solid Phase Micro Extraction (SPME) fiber was gently rubbed on the glandular tegument area for 5 min, according to the method described by Frérot *et al.* (1997). The SPME fiber consisted of 65 µm of Carbowax™-Divinylbenzene (CW/DBV) (SUPELCO). Gas chromatography (GC) analyses were conducted using a Varian 3400 CX with a split-splitless injector and a FID detector heated at 260°C. The fiber was subjected to thermal desorption in the injector at 240°C for 5 min. A Rtx®-Wax column, 30 m x 0.32 mm i.d., was used (Restek®, France). The column temperature was ramped from 50 to 100°C at 15°C/min, then to 245°C at 5°C/min. Helium was the carrier gas (15 psi pressure). GC linked to a mass spectrometer (GC-MS) was used to identify the pheromone components: ion trap Saturn II

coupled to a 3400 CX GC, electron impact (IE), 70 eV, 40 to 330 amu. GC conditions were as follows: injector split-splitless at 250°C, oven temperature ramped from 50 to 300°C at 8° C/min and equipped with a RTX-5 Sil-MS (Restek®, France), 30 m x 0.32 mm i.d. Pheromone compounds were identified by comparing retention times and mass spectra of the samples collected from the gland with those of reference samples.

*Wind Tunnel Bioassays.* The wind tunnel experiment was based on the protocol developed by Baker and Linn (1984) and Frérot *et al.* (1989): a half-cylinder (190 cm length x 80 cm wide x 45 cm high), in which males fly about 150 cm. The airflow, supplied by a fan and laminarized by a muslin layer, was 0.6 m/s. These airflow parameters were controlled by regular checks with incense stick smoke and an anemometer. An exhaust fan at the exit side of the air flow prevented pheromone contamination. The temperature throughout the various experiments was  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  and humidity was maintained around 45%. A constant red incandescent light source above the tunnel allowed observations and video recording.

Two- or three-day-old naive males were flown individually, stimulated by either two- or three-day-old calling females or by synthetic lures loaded onto rubber septa (100 µg, Sigma Aldrich). Naive males, placed individually in capped wire mesh cages (Ø3 x 6 cm), were released from a 12 cm-high platform. Each experiment lasted 5 min and was recorded on video (Panasonic AG-7330) until copulation with a Hitachi KP 161 CCD black and white camera equipped with a Nikon objective AF Micro Nikkor 60mm 1:2.8 D. The tapes were transcribed onto computerized video files and analyzed with The Observer 5.0 software (Noldus, Wageningen, The Netherlands, 2004). Attractiveness of the lures was assessed by scoring several events involved in the male response behavior: latency (LT) from the moment a male is placed on the platform to take-off; the upwind flight in the first half of the wind tunnel (FB); the flight to the half-way point (HF); the flight in the second half (FA); the source approach (AL); and landing at the source point or copulation attempts (L/C). Timings of behavior events were recorded in sec. The most informative male behavior event was contact with the pheromone source. The males that did not respond or only exhibited an anemotaxic flight, i.e. orientation of flight that followed the direction of airflow rather than the direction of pheromone plume (Metcalf, 1987), were tested again. If they did not respond, the condition of the antennae and wings were checked.

*Natural Stimulus.* According to Calatayud *et al.* (2007), the reproductive period starts five hours after the beginning of the scotophase and the optimum age of both sexes for reproduction is between two and three days old. Pheromone glands of two calling females were maintained extruded by crocodile clips. These females were killed and put on a 15 cm-high metal support under the airflow in the wind tunnel. Such females can be tested for 3 hrs.

*Synthetic Pheromones.* Stimuli for the wind tunnel and field-trapping experiments were made with the synthetic chemicals, Z11-14:Ac, E11-14:Ac, Z9-14:Ac and Z11-16:Ac, in standard hexanic solution (Table 2). The purity of Z9-14:Ac and Z11-16:Ac was 100%, and of Z11- and E11-14:Ac about 97%. The desired amounts of each compound were applied onto rubber septa (Sigma-Aldrich) and used in wind tunnel and field-trapping experiments.

*Field-Trapping.* Field work was carried out at Mai-Mahiu (Rift Valley, Kenya). The appropriate amount of chemicals (1000 µg or 100 µg) was loaded onto a rubber septum (Sigma-Aldrich) and placed inside an Unitrap (Biosystèmes France, SARL) (multicolored with green cover, yellow top and white bottom). The traps were hung, surrounding a maize field, at approximately 1.5 m above the ground and placed at least 30 m from each other. Traps were checked every two days and renewed every two weeks. Each treatment was replicated three times and checked for five consecutive weeks (N=15).

*Genetic Analyses.* All females used for pheromone identification were subjected to molecular analysis. Moths were preserved in absolute alcohol immediately after the experiment. Total genomic DNA was extracted from insect thoraxes and legs, using a DNeasy Tissue Kit (QIAGEN). Heads and abdomens were transferred into tubes with absolute alcohol for subsequent species identification. A 965 bp fragment of the mitochondrial gene encoding cytochrome *b* was amplified with primers CP1 (5'GAT GAT GAA ATT TTG GAT C 3') and Tser (5'TAT TTC TTT ATT ATG TTT TCA AAA C 3'). Polymerase chain reactions were performed on a Biometra® thermocycler using the following conditions: initial denaturation for 5 min at 94°C; 40 cycles of 94°C for 1 min, 46°C for 1 min 30 sec and 72°C for 1 min 30 sec; and 5 min final extension at 72°C. The reaction mixture contained 5 µl of 5X buffer, 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl primers (10 mM), 0.6µl dNTPs (10mM), 1 µl PCR DNA and 1U of Promega *Taq* polymerase per 25 µl of reaction mixture.

Moths from East and West mitochondrial clades were distinguished using *Bsu* 36 *I* restriction digests of the amplified DNA fragment (restriction site: CC-TTAGG). Assignment of individuals to the East I or East II mitochondrial clades was based on *Xho* II restriction digests of the amplified DNA fragment (restriction site: A-GATCC). Reaction mixtures were incubated for 6 hr at 37°C and restriction fragments were separated by agarose gel electrophoresis.

*Statistics.* Results from wind tunnel experiments were recorded as percentages. All data coming from pheromone identification and male behavior were compared using *Student's t-test* (taking  $P < 0.05$  to be significant). Analyses were performed with R 2.4.0 software (A Language and Environment Copyright, 2006).

For the analysis of field-trapping experiments, the mean numbers of moths caught for each treatment were compared using *Kruskal-Wallis test*. The ranks were generated using proc Rank of SAS 9.1 (SAS Institute, 2003) and then analyzed using proc GLM. Means were then separated using *Tukey-Kramer* comparison procedure ( $P < 0.05$  was deemed significant).

## RESULTS

*Chemical Analyses.* SPME pheromone samples (N=24) obtained by rubbing the gland surface of calling females from mass rearing were analyzed by GC; they contained four different components (Figure 1). GC-MS analyses in EI provided mass spectra of three tetradecene acetates (1, 2, 3) ( $m/z = 43$  (100%), 55 (45%), 67 (97%), 81 (98%), 194 ( $M^+ - 60$ , 24 %)) and of one hexadecene acetate (4) ( $m/z = 43$  (94%), 55 (60%), 67 (100%), 81 (94%), 222 ( $M^+ - 60$ , 17%). The following components were identified by comparing retention times of the four female pheromone components with those of synthetic compounds: (Z)-9-tetradecen-1-yl acetate (Z9-14:Ac), (E)-11-tetradecen-1-yl acetate (E11-14:Ac), (Z)-11-tetradecen-1-yl acetate (Z11-14:Ac) and (Z)-11-hexadecen-1-yl acetate (Z11-16:Ac). The mean proportion for each component was as follows (taking the main component to be 100%): Z9-14:Ac 15% ( $\pm 6.09$ ), E11-14:Ac 27% ( $\pm 3.70$ ), Z11-14:Ac 100%, Z11-16:Ac 14% ( $\pm 9.58$ ).

GC and GC-MS analyses of wild females collected in East and West African countries revealed that all populations shared these same four components (Table 1). Assigning a value of 100% to the main component, Z11-14:Ac, the East African female pheromone mixture (N=20) was: Z9-14:Ac, 23% ( $\pm 12.41$ ); E11-14:Ac, 27% ( $\pm 8.72$ ); and Z11-16:Ac, 15% ( $\pm 12.23$ ). The relative proportions of each component did not significantly differ from those of the mass reared population described above ( $P > 0.05$ ). The West African population (N=28) produced the same four components: Z9-14:Ac, 25% ( $\pm 12.97$ ); E11-14:Ac, 23% ( $\pm 6.60$ ); Z11-14:Ac, 100%; and Z11-16:Ac, 18% ( $\pm 15.14$ ). The pheromone mixture of the West African population was not significantly different from that of the mass reared population ( $P > 0.05$ ).

The pheromone composition of moths from the mass reared ICIPE population was less variable than that from the wild populations from the East and West African countries, as indicated by the standard deviation (SD) values.

*Wind Tunnel Bioassays with Females.* Wind tunnel conditions were optimized in preliminary tests. Flight behavior was not hindered by weak intensity red light and the take-off platform was placed so that it allowed lock-on flight in response to the pheromone plume (Kennedy *et al.*, 1981). To take advantage of the optomotor responses, strips and dots were placed on the floor; this gave a better male response to the pheromone plume than the use of only strips or dots. In our hands, white was the color that gave the best response.

The *B. fusca* male flight behavior (N=20) was the same as that described for most Lepidoptera (Baker, 1990 and Baker and Haynes, 1996). After a very variable period of latency (mean LT = 51sec; range 10 to 116 sec), males (85%) took flight and exhibited a lock-on; then they flew upwind (80%) with low amplitude zigzag (mean flight time = 69 sec; range 10 to 186 sec). Finally, the male touched the female and/or attempted to copulate (80%). Attraction behavior of *B. fusca* males with virgin calling females was considered as the reference behavior for the further studies with synthetic lures.

*Wind Tunnel Bioassays with Synthetic Lures.* We tested various synthetic mixtures (Table 2) to investigate the role of the pheromone components in male attraction, in particular that of the newly identified compound, Z11-16:Ac (Figure 2). The composition of mixture **A** was based on the natural female pheromone composition. Mixture **A** did not elicit the same level of male responses as the virgin calling female but led to response rates of 63% for upwind flights and 21% for landings. The absence of any minor component from this mixture affected the male responses. The absence of either Z9-14:Ac or E11-14:Ac abolished the upwind flight response, whereas absence of Z11-16:Ac resulted in a response rate of 42% for upwind flight and 8% for landing at the source point.

A smaller proportion of Z9-14:Ac (5% in mixture **B** compared to 10% in mixture **A**) did not lead to a significant difference in the number of males reaching the source but there were fewer upwind flights. However, a smaller proportion of both Z9-14:Ac and Z11-16:Ac (mixture **C**) led to slightly fewer upwind flights (25%) and abolished the landing response ( $P < 0.05$ ).

A decrease of 10% in the amount of E11-14:Ac (mixture **D**) also led to significantly fewer upwind flights (18% rather than 53%;  $P < 0.05$ ) and slightly fewer landings at the source point (12% rather than 21%).

Increased Z9-14:Ac abundance (mixture **E**) did not affect the number of upwind flights but landing at the source point was abolished ( $P < 0.05$ ). Male response rates for both upwind flights and landings were substantially lower with 5% less Z11-14:Ac (mixture **F**) than mixture **B**: fewer upwind flights (18%) and fewer landings (9%) ( $P < 0.05$ ).

Mixtures **A** and **B** elicited the highest overall male responses, although they were lower than the responses elicited by calling females. The percentage of males reaching the pheromone source when stimulated with **A** was not significantly different from that with mixture **B**. In addition, the duration of the flight from take-off to contact with the pheromone source was not significantly different between these two mixtures (47 sec for **A** and 35.75 sec for **B**), or from the reference value (69sec).

*Field Trapping.* The effect of the newly identified component in *B. fusca* female pheromone was tested on male catches in the field (Table 3). The addition of Z11-16:Ac (10%) to the mixture **2** (forming mixture **1**) resulted in more males caught (122 males instead of 85). The catches differed significantly according to the mixture proposed ( $H = 47.9$ ,  $P < 0.0001$  according to the *Kruskal-Wallis* test).

When either the Z9-14:Ac or the E11-14:Ac was excluded from the mixture (mixtures 4 and 3), the number of males caught was significantly lower ( $P < 0.01$ ). Traps baited with higher doses (1000  $\mu\text{g}$ , mixture 1) caught greater numbers of males than traps baited with the lower doses (100  $\mu\text{g}$ , mixture 5).

*Genetic Analyses.* Molecular analyses of 72 *B. fusca* females separated them into the three previously described mitochondrial clades (Sezonlin *et al.*, 2006). Among East African females studied, three were found to belong to clade I and 41 to clade II. The relative compositions (mean proportions) of pheromone mixture for individuals belonging to clades I and II were: Z11-14:Ac, 100% for both clades; E11-14:Ac, 20% ( $\text{SD} \pm 10.6$ ) and 27% ( $\text{SD} \pm 6.1$ ); Z9-14:Ac, 16% ( $\text{SD} \pm 19.3$ ) and 19% ( $\text{SD} \pm 10.5$ ); and Z11-16:Ac, 13% ( $\text{SD} \pm 14.9$ ) and 15% ( $\text{SD} \pm 10.6$ ), respectively. We confirmed that all West African females belong to the West clade. The mean relative composition of their pheromone mixture did not differ from the two East clades and was as follows: Z11-14:Ac, 100%; E11-14:Ac, 23% ( $\text{SD} \pm 6.6$ ); Z9-14:Ac, 25% ( $\text{SD} \pm 13$ ); and Z11-16:Ac, 18% ( $\text{SD} \pm 15.1$ ).

## DISCUSSION

*B. fusca* females produced a complex sex pheromone composed of four components. Three of these have been identified previously (Nesbitt *et al.*, 1980). A new component, Z11-16:Ac, was detected and identified by both GC and GC-MS. Field experiments and wind tunnel behavioral tests confirmed that this new component contributes to the effects on male behavioral responses. Significantly fewer males were caught when one of the minor components was absent from the mixtures. This result is consistent with previous suggestions that sexual attraction behavior in male Lepidoptera is triggered by a multicomponent perception (Linn and Roelofs, 1989). However, even though the presence of this new compound improved male attraction responses, making it beneficial for use in synthetic pheromones for field survey of *B. fusca* populations, it did not reach the attraction level obtained using the natural female pheromone. Ratio variations of *B. fusca* pheromone mixture existed within each geographic populations. Wind tunnel experiments with synthetic mixtures showed that most of *B. fusca* males were sensitive to small variations of ratio (from 5 to 10%). In spite of that, some males initiated an upwind flight, revealing a larger window of response than the majority. Whatever the population is, such plasticity of the male response

behavior may explain why the polymorphism of pheromone mixtures is not a negative factor for reproductive success.

The *B. fusca* pheromone — a mixture of three tetradecen-1-yl acetates (with double bonds in 9 and 11) and a hexadecen-1-yl acetate — is not common among Lepidoptera (<http://www-pherolist.slu.se/pherolist.php>). Other Lepidoptera species, developing in sympatry with *B. fusca* on maize crops, produce different pheromone mixtures. For instance, *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Crambidae) produces a pheromone mixture with (Z)-11-hexadecen-1-al and (Z)-11-hexadecen-1-ol; *Sesamia nonagrioides* (Lef.) and *Sesamia calamistis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae) sex pheromones are mainly composed of Z11-16:Ac, whereas this compound accounts for an average of only 15% of the *B. fusca* mixture. *Spodoptera littoralis* (Boisduval), which also develops on maize in Africa, produces a different molecule — a dienic C14 acetate. Thus, the specific mate recognition system in each species is preserved in maize environment. The olfactory environment in the field is very complex, so a multicomponent perception could be advantageous for males deciphering the chemical signal released by conspecific females.

We show that pheromone composition did not differ between East and West populations collected on maize, although within each population, some individuals produced a very different pheromone mixture. Pheromone composition did not differ between the three clades as defined by the mitochondrial DNA study. Moreover, polymorphism in pheromone composition did not correlate with any of the genetic markers tested. These results make likely that there is no reproductive isolation link to the geographic locations or between mitochondrial clades. In East Africa, most females analyzed in this study belong to the East clade II, the most common clade; only three individuals were from clade I. These two clades develop in sympatry and can interbreed which is consistent with the homogeneity found at the pheromone level.

In conclusion, we could not relate a particular pheromone mixture composition to a particular mitochondrial clade and the pheromone-based reproductive system was similar for the different geographic origins. East and West African *B. fusca* populations are separated by geographic location but there is no evidence in our results for reproductive isolation due to the pheromone system.

In the field-trapping experiments, the most effective attractant was obtained using the pheromone components, (Z)-11-tetradecen-1-yl acetate (62%), (E)-11-tetradecen-1-yl acetate (15%), (Z)-9-tetradecen-1-yl acetate (13%) and (Z)-11-hexadecen-1-yl acetate (10%). Field-trapping with the appropriate pheromone could be a useful tool for detecting *B. fusca*, for monitoring their flight and for integrated pest management.

*Acknowledgements*-We are very grateful to Peter Mwatha Njoroge and Joseph Njoroge Mwatha for helping us to run the field trapping at Mai-Mahiu (Rift Valley, Kenya). Thanks are also given to Peter O. Ahuya for his help, Anthony Wanjoya, Hervé Guénégó, and Gilles Genestier for technical assistance.

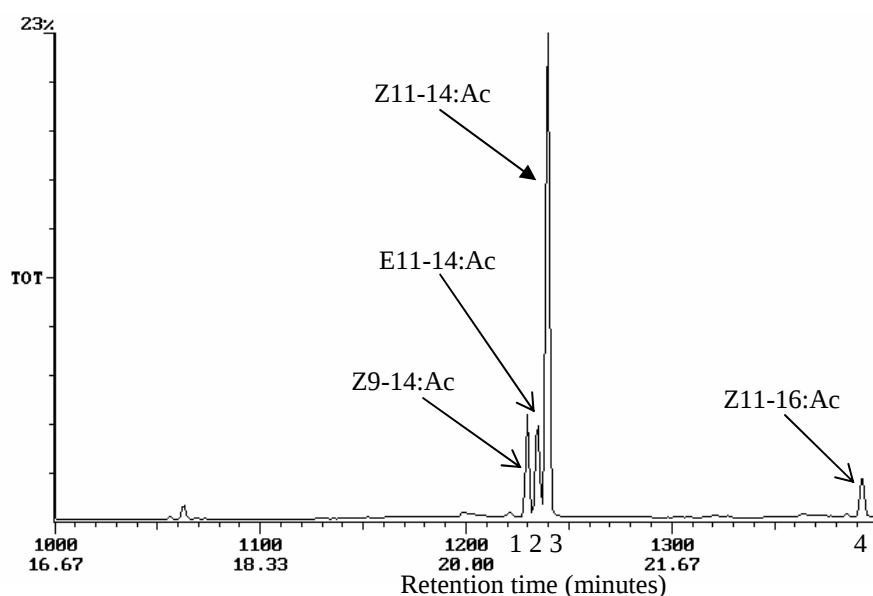


FIG. 1. GC/MS analysis of SPME collection from a single *Busseola fusca* pheromone gland (RTX-5 Sil-MS, 30 m x 0.32 i.d., IE, 70 eV, 40 to 330 amu)

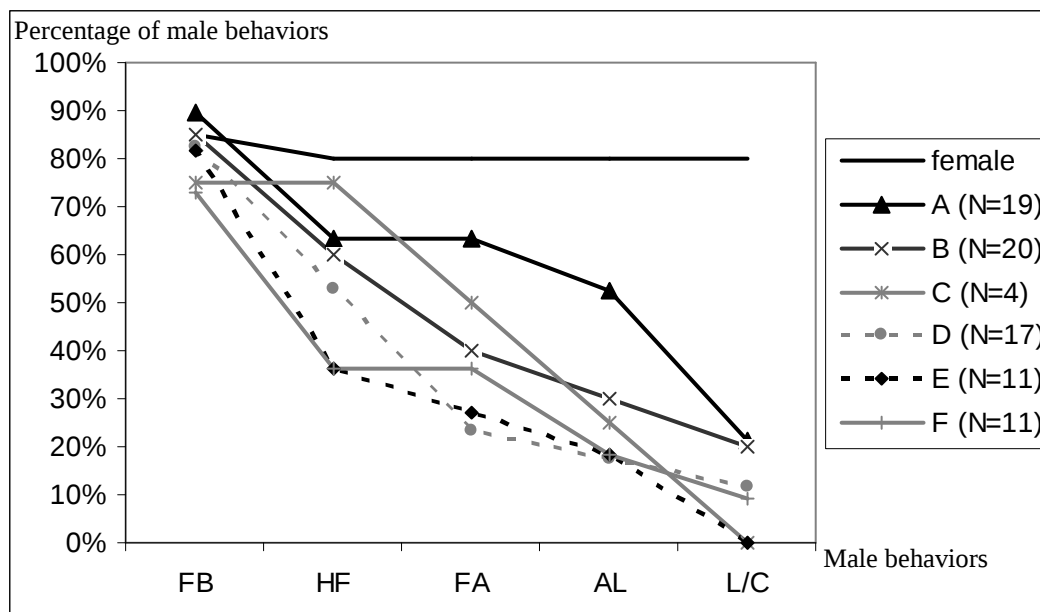


FIG. 2. Male response behavior in wind tunnel experiments using female sex pheromone and synthetic pheromone mixtures A, B, C, D, E and F: flight in the first half of the tunnel (FB); halfway flight towards pheromone lure (HF); flight in the second half of the tunnel (FA); approaching lure (AL); landing on lure or copulation attempts (L / C)

TABLE 1. THE DIFFERENT LOCALITIES AND RATIOS OF SEX PHEROMONE COMPONENTS OF *Busseola fusca* FEMALES FROM EAST AFRICA (FROM MASS REARING OR WILD) AND FROM WEST AFRICA. COMPONENTS RATIOS ARE CALCULATED BY ALLOCATING A PERCENTAGE OF 100 TO THE MAJOR COMPONENT, THE Z11-14:Ac

|                            | Latitude       | Longitude      | N  | Z11-14:Ac | Z9-14:Ac | Std dev | E11-14:Ac | Std dev | Z11-16:Ac | Std dev |
|----------------------------|----------------|----------------|----|-----------|----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| <b>EAST AFRICA / Kenya</b> |                |                |    |           |          |         |           |         |           |         |
| ICIPE (mass rearing)       | S 01°13'13''   | E 36°53'46''   | 24 | 100%      | 15%      | 6.09    | 27%       | 3.70    | 14%       | 9.58    |
| Wild total                 |                |                | 20 | 100%      | 23%      | 12.41   | 27%       | 8.72    | 15%       | 12.23   |
| Eldoret                    | N 00°34'53.28" | E 35°13'33.48" | 2  | 100%      | 28%      | 5.99    | 31%       | 1.51    | 15%       | 1.07    |
| Kisii                      | S 00°46.216'   | E 34°58.788'   | 1  | 100%      | 2%       | /       | 9%        | /       | 2%        | /       |
| Kisumu                     | N 00°35.775'   | E 34°27.165'   | 2  | 100%      | 20%      | 9.83    | 30%       | 0.72    | 5%        | 4.93    |
| Kitale                     | N 01°15.675'   | E 35°10.214'   | 3  | 100%      | 27%      | 20.51   | 23%       | 10.07   | 26%       | 18.63   |
| Narok                      | S 01°05'32.34" | E 36°07'01.62" | 4  | 100%      | 34%      | 13      | 29%       | 4.14    | 21%       | 8.12    |
| Rift valley                | S 00°57'26.22" | E 36°33'28.44" | 8  | 100%      | 18%      | 8.41    | 27%       | 11.17   | 13%       | 13.25   |
| <b>WEST AFRICA</b>         |                |                |    |           |          |         |           |         |           |         |
| Wild total                 |                |                | 28 | 100%      | 25%      | 12.97   | 23%       | 6.60    | 18%       | 15.14   |
| Togo                       | N 06°10'       | E 01°21'       | 5  | 100%      | 35%      | 19.47   | 28%       | 4.72    | 19%       | 20.78   |
| Burkina Faso               | N 12°20'       | O 01°40'       | 2  | 100%      | 20%      | 13.31   | 22%       | 21.67   | 20%       | 21.58   |
| Benin                      | N 06°30'       | E 02°47'       | 21 | 100%      | 23%      | 10.46   | 22%       | 4.89    | 17%       | 14.09   |

TABLE 2. COMPOSITION OF FEMALE SEX PHEROMONE AND SYNTHETIC PHEROMONE MIXTURES (IN  $\mu\text{g}$  OF EACH COMPONENT PER RUBBER SEPTUM) USED IN WIND TUNNEL

|           | female | A         | B         | C  | D  | E  | F  |
|-----------|--------|-----------|-----------|----|----|----|----|
| Z11-14:Ac | 80     | <b>80</b> | <b>80</b> | 80 | 80 | 80 | 75 |
| E11-14:Ac | 22     | <b>20</b> | <b>20</b> | 20 | 10 | 10 | 20 |
| Z9-14:Ac  | 12     | <b>10</b> | <b>5</b>  | 5  | 10 | 20 | 5  |
| Z11-16:Ac | 12     | <b>10</b> | <b>10</b> | 5  | 10 | 10 | 10 |

TABLE 3. COMPOSITION OF SYNTHETIC PHEROMONE MIXTURE USED FOR FIELD-TRAPPING AND MALE CAPTURES (MAIMAHU-RIFT VALLEY, KENYA)

|                                 | Mixture 1 | Mixture 2 | Mixture 3 | Mixture 4 | Mixture 5 |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Z9-14:Ac                        | 130       | 130       | 130       | /         | 13        |
| E11-14:Ac                       | 150       | 150       | /         | 150       | 15        |
| Z11-14:Ac                       | 620       | 620       | 620       | 620       | 62        |
| Z11-16:Ac                       | 100       | /         | /         | /         | /         |
| Total male captures             | 122       | 85        | 2         | 33        | 66        |
| Mean* male caught per trap/week | 8.1 d     | 5.7 c     | 0.1 a     | 2.2 b     | /         |

\*Means followed by different letters are significantly different from each other according to Tukey-Kramer test at the 5% level

## REFERENCES

- BAKER, T. C. 1990. Upwind flight and casting flight: complimentary phasic and tonic systems used for location of sex pheromone sources by male moths, pp. 18-25, in K. B. Doving. International Symposium on Olfaction and Taste X, Graphic Communication Systems, Oslo.
- BAKER, T. C. and HAYNES, K. F. 1996. Pheromone-mediated optomotor anemotaxis and altitude control exhibited by male oriental fruit moths in the field. *Physiol. Entomol.* 21:20-32.
- BAKER, T. C. and LINN, C. E., JR. 1984. Wind tunnels in pheromone research, pp. 75-110, in H. E. Hummel and T. A. Miller. Techniques in pheromone research, Springer-Verlag, New York Inc., New-York.
- CALATAYUD, P.-A., GUENEGO, H., LE RÜ, B. P., SILVAIN, J. F., and FREROT, B. 2007. Temporal patterns of emergence, calling behaviour and oviposition period of the maize stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 43:63-68.
- FREROT, B. and FOSTER, S. P. 1991. Sex pheromone evidence for two distinct taxa within *Graphania mutans* (Walker). *J. Chem. Ecol.* 17:2077-2093.

- FRÉROT, B., LUCAS, P., and ROCHAT, D. 1989. Responses of *Mamestra suasa* male moths to synthetic pheromone compounds in a wind tunnel. *Entomol. Exp. Appl.* 53:81-87.
- FRÉROT, B., MALOSSE, C., and CAIN, A. H. 1997. Solid-Phase Microextraction (SPME): A New Tool in Pheromone Identification in Lepidoptera. *J. High Resol. Chromatogr.* 20:340-342.
- KENNEDY, J. S., LUDLOW, A. R., and SANDERS, C. J. 1981. Guidance of flying male moths by wind-borne sex pheromone. *Physiol. Entomol.* 6:395-412.
- KFIR, R., OVERHOLT, A. W., KHAN, R. Z., and POLASZEK, A. 2002. Biology and management of economically important lepidopteran cereal stem borers in Africa. *Annu. Rev. Entomol.* 47:701-731.
- LE RÜ, B. P., ONG'AMO, G. O., MOYAL, P., MUCHUGU, E., NGALA, L., MUSYOKA, B., ABDULLAH, Z., MATAMA-KAUMA, T., LADA, V. Y., PALLANGYO, B., OMWEGA, C. O., SCHULTHESS, F., CALATAYUD, P. A., and SILVAIN, J. F. 2006. Geographic distribution and host plant ranges of East African noctuid stem borers. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 42:353-361.
- LINN, C. E., JR. and ROELOFS, W. L. 1989. Response specificity of male moths to multicomponent pheromones. *Chem. Sens.* 14:421-437.
- NESBITT, B. F., BEEVOR, P. S., CORK, A., HALL, D. R., LESTER, R., BLAIR, B. W., and TANNOCK, J. 1980. Identification of the female sex pheromone of the maize stalk borer, *Busseola fusca*: a preliminary note. *Trop. Pest Manag.* 26:327.
- ONG'AMO, G. O., LE RÜ, B. P., DUPAS, S., MOYAL, P., CALATAYUD, P. A., and SILVAIN, J. F. 2006. Distribution, pest status and agro-climatic preferences of lepidopteran stem borers of maize in Kenya. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 42:171-177.
- PELOZUELO, L., MALOSSE, C., GENESTIER, G., GUENEGO, H., and FRÉROT, B. 2004. Host-plant specialization in pheromone strains of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* in France. *J. Chem. Ecol.* 30 (2): 335-352.
- RATNADASS, A., TRAORE, T., SYLLA, M., and DIARRA, D. 2001. Improved techniques for mass-rearing *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) on an artificial diet. *Afr. Entomol.* 9:167-175.
- SEZONLIN, M., DUPAS, S., RU, B. L., GALL, P. L., MOYAL, P., CALATAYUD, P. A., GIFFARD, I., FAURE, N., and SILVAIN, J. F. 2006. Phylogeography and population genetics of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Lepidoptera, Noctuidae) in sub-Saharan Africa. *Mol. Ecol.* 15:407-420.

#### IV. Rôle de la plante-hôte sur le système de reconnaissance

L'hypothèse est que la plante originelle de *B. fusca*, avant l'introduction du maïs, est une plante endémique de l'Afrique, comme *P. purpureum* ou *S. bicolor*. D'après les travaux de Le Rü *et al.* (2006), les chenilles de *B. fusca* se développent maintenant presque exclusivement aux dépens des plantes cultivées. Les auteurs n'ont jamais trouvé de chenille de *B. fusca* sur des graminées sauvages du type *P. purpureum* ou sorgho. *B. fusca* est vraisemblablement passé d'un compartiment sauvage constitué par le sorgho sauvage au compartiment cultivé, constitué par les champs de sorgho et de maïs (Polaszek et Khan, 1998 ; Le Rü *et al.*, 2006). Nous ne disposons d'aucune donnée sur le rôle de la plante-hôte dans le processus reproducteur de *B. fusca*, ni sur les lieux d'accouplements des adultes, qui ne se rencontrent que rarement dans les parcelles cultivées contrairement aux chenilles (Le Rü *et al.*, 2006).

Nous avons donc testé l'hypothèse d'une « mémoire » de la plante ancestrale qui pourrait se matérialiser lors de la rencontre des partenaires sexuels, en exerçant une action synergiste. Les mâles et femelles de *B. fusca* s'accoupleraient sur le sorgho sauvage, en supposant la présence de ce sorgho aux abords des champs. Ensuite, les femelles iraient pondre sur le sorgho et le maïs cultivés. Ces graminées sont présentes en plus grande quantité et peuvent fournir les nutriments nécessaires au développement des chenilles.

Nous avons testé l'attraction des mâles de *B. fusca* par la phéromone femelle en tunnel de vol, en présence ou en l'absence de plante. Lors de nos expérimentations, nous avons utilisé diverses plantes qui appartiennent à la famille des Gramineae/Poaceae, sous-famille des Panicoideae, tribu des Maydeae pour *Zea mays* ; tribu des Andropogoneae pour *Sorghum bicolor* ; tribu des Paniceae pour *Setaria glauca* (Linné), *Pennisetum purpureum*, *Melinis minutiflora* Beauvois et *Panicum deustum* (Figure 9).

##### Justification du choix des plantes utilisées

Les chenilles de *B. fusca* se développent dans les champs de maïs et de sorgho. Le sorgho et *P. purpureum* pourraient être les plantes originelles de ce ravageur. De plus, *P. purpureum* est utilisé dans la lutte biologique en champs par push-and-pull (Khan *et al.* 2000, Cook *et al.*, 2007) et c'est aussi la plante-hôte principale de *B. phaia*. *P. deustum* n'est pas utilisé dans nos expériences puisque nous n'avons pas pu avoir la souche, mais elle est décrite ici puisque c'est la plante-hôte principale de *B. segeta*.

*S. glauca* est une autre graminée endémique, présente aux abords des champs, qui ressemble morphologiquement au maïs et qui pourrait être un hôte potentiel pour les larves ou un lieu de rencontre des adultes. *M. minutiflora* est décrite comme répulsive et est également utilisée dans les stratégies de push-and-pull pour lutter entre autres contre *B. fusca* (Kahn *et al.* 2000, Cook *et al.*, 2007).

La technique du push-pull est employée en champs pour lutter ou contrôler la présence des insectes ravageurs phytophages. Une plante répulsive est plantée en quinconce avec la plante cultivée à l'intérieur du champ pour repousser (push) les insectes. Une plante attractive, mais non favorable ou moins favorable au développement de l'insecte, est placée autour des cultures pour attirer (pull) les insectes à l'extérieur du champ ou les empêcher d'y pénétrer. Dans les techniques de push-and-pull employée en Afrique contre les ravageurs du type *B. fusca* (Kahn *et al.* 2000, Cook *et al.*, 2007), *M. minutiflora* est planté en alternance avec le maïs à l'intérieur des champs pour repousser (push) les ravageurs et *P. purpureum* ou le sorgho sont plantés en bordure pour attirer (pull) les insectes.

Quelques données sur ces plantes sont aussi à prendre en compte. Khan *et al.* (2000) ont montré que les graminées endémiques d'Afrique, *P. purpureum* et le sorgho, sont beaucoup plus attractives pour l'oviposition des femelles de *B. fusca* que le maïs. Cependant, la majorité des chenilles de *B. fusca*, qui se développent sur *P. purpureum*, a tendance à mourir et 70 à 80% des chenilles qui se développent sur le sorgho sont parasitées et ne se développent pas.





Figure 9 : Les photographies des plantes utilisées.

#### Description des plantes utilisées

Les données relatives aux plantes décrites ci-après proviennent de l'article de Polaszek et Khan (1998) et du site Internet de la « Grass Base - The Online World Grass Flora » (<http://www.kew.org/data/grasses-db.html>, Clayton *et al.*, 2006).

Le **sorgho** est une plante endémique. Sa domestication a commencé il y a 5000 ans dans le Nord de l'Afrique (Polaszek et Khan, 1998) et sa distribution est dans toute la zone Nord et tropicale africaine. Le sorgho est constitué de tiges dressées de 30 à 400 cm de long et 2 à 15 mm de diamètre, les feuilles sont de 5 à 75 cm de long et de 5 à 70 mm de large, lisses et glabres sur la surface. L'inflorescence est une panicule. La production de sorgho en Afrique Sub-Saharienne équivaut à 32% de la production mondiale en 2006 avec plus de 18 millions de tonnes (données de la FAO).

Le **maïs** a été introduit en Afrique de l'Est et du Sud dès le 16<sup>ème</sup> siècle. La généralisation de sa culture à toute l'Afrique est toujours considérée comme récente, surtout en terme de co-évolution plante-insecte, en comparaison avec les céréales africaines plus traditionnelles comme *P. purpureum* et *S. bicolor*. Au XVII<sup>ème</sup> siècle, le maïs est présent en Afrique dans toutes les aires où il peut être cultivé et est utilisé comme nourriture à la fois pour les hommes et les animaux. C'est une plante annuelle dressée de 200 à 300 cm de long avec des feuilles linéaires ou lancéolées de 25 à 100 cm de long et de 20 à 100 mm de large. La production annuelle du maïs est de 2 à 3.10<sup>6</sup> tonnes pour l'Afrique sub-Saharienne. Les pertes dues aux dégâts causés par *B. fusca* varient de 20 à 80% selon le taux d'infestation. La production de

maïs par l'Afrique Sub-Saharienne représente 6% de la production mondiale, c'est-à-dire environ 38 millions de tonnes (données de la FAO).

***Pennisetum purpureum***, endémique, est une plante dressée de 150 à 300 cm de long avec des feuilles de 50 à 100 cm de long et 8 à 70 mm de large. *P. purpureum* trouve probablement son origine en Afrique de l'Ouest tropicale il y a 3000 ans, mais c'est une plante cosmopolite en Afrique de nos jours. *P. purpureum* est considéré comme très attractif pour *B. fusca* (Khan *et al.*, 2000).

***Setaria glauca***, endémique, provient vraisemblablement du Nord de l'Afrique. Les tiges sont dressées, souvent aplaties et glabres, d'environ 300 cm. Les feuilles mesurent 30 cm de long et de 7 à 12 mm de large. La base des feuilles est ornée de longs poils soyeux.

***Panicum deustum***, endémique, est une plante de 70 à 200 cm de haut avec des feuilles linéaires ou lancéolées de 15 à 48 cm de long et 5 à 35 mm de large. La surface des feuilles est glabre ou pileuse. L'inflorescence est une panicule. Cette plante est cosmopolite en Afrique.

***Melinis minutiflora***, endémique, est une plante plus particulière et différente des autres par son apparence. La tige a une hauteur de 90 cm. Le feuillage est collant et odorant. Les feuilles montent jusqu'à un mètre de haut.

Host-plants and reproductive behaviour  
in *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae)

FÉLIX A.-E. <sup>(1)\*</sup>, SMAIL T. <sup>(1)</sup> AND FRÉROT B. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>INRA, UMR PISC 1272, Route de St Cyr, 78026 Versailles, France.

\*Corresponding author. E-mail: [frerot@versailles.inra.fr](mailto:frerot@versailles.inra.fr)

**Abstract**

*Busseola fusca*, major stem borer of maize and sorghum crops in Sub-Saharan Africa, probably shifts from wild host-plant to cultivated Gramineae. A hypothesis is that native host-plant of *B. fusca* is the wild sorghum, but we do not know where the mate behaviour occurs in nature. Plants are essential for phytophagous insects, on which larvae feed. Recent researches showed that chemical released by host plant act on reproduction in Lepidoptera. This paper reports behavioural tests carried out to determine whether cultivated host-plants modified two critical points in reproductive behaviours, calling for female and responses to pheromone by males. To investigate what could have been the native host plant in the past, the behaviours considered were study towards native Gramineae, and plants known as been repellent, used in push-and-pull strategies. Male attraction by female sex pheromone is significantly ameliorated with the presence of sorghum in flight tunnel experiments, but is not disturbed by repellent plants. Visual cues of raising plants seem to improve the attraction. Calling female behaviour is observed on and is not modified whatever the plant, even in the presence of repellent plant. Sorghum can be the native plant of *B. fusca* and the prior estimates can act on male attraction by female.

**Keywords:** male attraction, SMRS, prior estimates, native plant

Phytophagous insects are generally adapted to their native host-plant via behavioural and/or physiological adjustments. Consequently, an extension of host range could be at the origin of considerable modifications caused by new plant chemicals and anatomy or new environment conditions, biotic and abiotic (Vanberger *et al.*, 2003). Nevertheless, a novel host can allow colonisation of areas where the native host does not occur and to escape from natural enemies like parasitoids and fungi. Cultivated host-plant represented also an inexhaustible resource of food that led to population success (Stastny *et al.*, 2006).

In most of cases, insect accept host plant that are closely relative to their natal host: shape, chemicals, environment, and nutrients. For example, the recent shift of *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera: Tephritidae) from native host, hawthorn (Rosaceae: Maloideae), to introduced domesticated apple (Rosaceae: Maloideae) (Walsh, 1864).

Plant chemicals are summaries in “green leaf volatiles” (GLV) i.e. various saturated and monounsaturated six-carbon aldehydes, alcohols and ester. Most of the plants released these compounds, but in different mixture. Plant families shared also common alkaloids. Plant chemicals are released at a precise time during photophase or scotophase, depending on the species (Ruther, 2000).

For phytophagous insect, plant is principally a source of food for larvae and a place where adults mating behaviour is possible. Host-plant compounds can stimulate female pheromone production and release, gravid female oviposition and attraction of male moth to mate (Mc Neil and Delisle, 1989a; Raina *et al.*, 1992; Landolt and Phillips, 1997).

In *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae), host-plant compounds influence female age initiated calling and time of calling (Mc Neil and Delisle, 1989a). *Homeosoma electellum* (Hulst) (Lepidoptera: Pyralidae) female calling is stimulated by pollen of the host-plant (Mc Neil and Delisle, 1989b). In *Earias vitella* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), onset of calling is earlier with host presence and more females call on plant. This phenomenon allows adjusting mating behaviour with the presence of an essential resource for larvae (Tamhankar, 1994). Host plant are essential for pheromone production by *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) females. A volatile released by maize improve number of calling females and also pheromone production by 20 to 30 times (Raina *et al.*, 1992).

Few studies have demonstrated the action of host-plants on male behaviour attraction. In most of case, modifications in this attraction are due to increase of female pheromone production. Emelianov *et al.* (2001 and 2003) described female calling behaviour improvement of *Zeiraphera diniana* Guenée (Lepidoptera, Tortricidae) in relation with host-plant. Two host-races of *Z. diniana* develop on larch and pine respectively. Male attraction is improved by calling female from its own host. Males find more females landing on host-plant or a synergy occur between calling behaviour and host-plant volatiles. That being, reproductive isolation and host-plant adaptation can be associated with mate finding.

Electrophysiology experiments on *H. zea* males showed that olfactory receptor neuron response is synergised when plant compounds are presented in a mixture with major female pheromone component. Increasing in male attraction to *H. zea* female placed on host-plant is probably due also to synergy between pheromone components and plants volatiles (Ochieng *et al.*, 2002).

In another hand, Davis and Stamps (2004) showed that natal habitat experience act on host attraction and new host selection. In 2006, Stamps and Davis proved that prior estimates of the dispersers, acquired in larvae development, play an important role in colonisation of a new host-plant. Walsh (1864) proposed that host-specific populations could speciate in the absence of geographic modifications by shifting and adapting to a new host. This kind of ecological isolation can be considered as a sympatric speciation.

*Busseola fusca* (Fuller 1901) (Lepidoptera: Noctuidae) is the major pest of cultivated Gramineae: *Sorghum bicolor* Moench 1794 and *Zea mays* L. 1753 in sub-Saharan Africa. The larvae feed into the stem so used of insecticides is not efficient and remain expensive in developing countries. Moreover, we did not know where *B. fusca* adults mate in the wild (Ratnadass *et al.*, 2001).

Wild sorghum is considered as a putative native plant of *B. fusca*. Survey studies carried out across East Africa indicates that *B. fusca* is uncommon as larvae in wild plants, even if it is an endemic Lepidoptera (Le Rü, unpublished). This insect showed a specific adaptation to maize and sorghum crops. Sorghum domestication began 5000 years ago in northeast Africa whereas maize was introduced recently in Africa since the 17<sup>th</sup> century (Polaszek and Khan, 1998). Several insect species switched from wild plants to cultivated crops, and became pests.

The timing and the reason of *B. fusca* host-shift from wild to cultivated compartment is unknown, but cultivated range provides more abundant larvae food. Moreover, shapes of this two Poaceae are really very close as much for their colour than size, leaf and stem.

Host-plant studies on female calling behaviour and male attraction behaviour can help to understand the possible effects of sorghum domestication and maize introduction on *B. fusca*. In *B. fusca* species, the impact of plant on reproductive behaviours must be considered to understand the underlying mechanisms of the shift and perhaps found a remaining importance of the native host-plant in reproduction.

These two behaviours, female calling and male attraction, essential for mate finding in Lepidoptera can be under the influence of host-plant and are studied here for *B. fusca*.

## MATERIALS AND METHODS

*Experimental Insects and plants.* The moths were obtained as pupae from the mass rearing maintained at the International Centre for Insect Physiology and Ecology (ICIPE-Nairobi-Kenya). Insect were allowed to emerge under the following conditions: temperature of 25°C, relative humidity of 85±10% with a 12:12-h light-dark-reversed photoperiod. Individuals were sexed as pupae and were sexually isolated in separate close rectangular crystal polystyrene containers (27x12x8cm) on moist vermiculite until emergence. Newly emerged adults were collected daily. Adult males were housed individually in metal mesh cylindrical cages (Ø3x6cm) closed in a hermetically sealed containers for 2 or 3 days before testing to ensure reproductive maturity. Adult females were placed individually into a cylindrical crystal polystyrene box (ø3x6cm) for 2 or 3 days before testing to ensure reproductive maturity. Adults were kept under the same conditions than the pupae.

Maize, sorghum, *Pennisetum purpureum* Schumacher 1827, *Setaria glauca* (L. 1753) and *Melinis minutiflora* Beauvois 1812 were grown in the greenhouse at INRA (Versailles, France) from seeds and cuttings. *P. purpureum*, *S. glauca*, *M. minutiflora* and sorghum are native plants in Africa, whereas maize is a cultivated variety. All plant species belong to *Poaceae* family. *P. purpureum* and *S. glauca* were chosen because Ndemah *et al.* (2002) described them as attractive for gravid females. They bear the same shape as maize and

sorghum, whereas *M. minutiflora*, described as an oviposition repellent (Khan *et al.*, 2000; Khan and Pickett, 2004), looks like more a creeping plant.

Plants were kept in the same temperature, hygrometry and photoperiod conditions than the insects.

*Wind tunnel experiments.* Wind tunnel is based on the protocol developed by Baker and Linn (1984) and Frérot *et al.* (1989). It has the shape of a half-cylinder (196 cm long x 80cm wide x 45cm high) in which males fly about 150 cm. The airflow, supplied by a fan and laminarized by a muslin layer, was pulled at a constant rate of 0.6 m/s. These airflow parameters were controlled by regular checks with incense stick smoke and an anemometer. An exhaust fan at the exit side of the air flow prevented pheromone contamination and removed pheromone-contaminated air outside of the building. Experiments were conducted during the dark phase of a reverse 12:12 light:dark cycle at a temperature of  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  and at a relative humidity of around 45%. A constant red incandescent light source above the tunnel allowed observations and video recording.

*Wind tunnel bioassay.* Two or 3-day-old naïve males were tested individually. Sex pheromone stimulation was provided by 2 or 3-day-old calling females which pheromone glands were held extruded by crocodile clips. These females were killed and put on a 10cm high metal support under the air stream. Five plants were placed behind females for experiments on attraction elicited by combination of pheromone and plant volatiles. Reproductive behaviour conditions, controlled by the calling female behaviour, occurred from 5 to 9 hours in scotophase. Naïve males were released downwind from metal mesh cylindrical cages (Ø3x6cm) on a 12cm high platform. Each experiment lasted 5 min and was recorded on video (Panasonic AG-7330) until copulation with a Hitachi KP 161 CCD black and white camera equipped with a Nikon objective AF Micro Nikkor 60mm 1:2.8 D. The tapes were transcribed onto computerized video files and analyzed with The Observer 5.0 software (Noldus, Wageningen, The Netherlands, 2004).

Attractiveness of the lures was assessed by scoring several behavioural items involved in the male response behaviour: latency (LT) from the moment a male is placed on the platform to take-off; the upwind flight in the first half of the wind tunnel (FB); the flight to the half-way

point (HF); the flight in the second half (FA); the source approach (AL); and landing at the source point or copulation attempts (L/C).

Timings of behaviour events were recorded in sec as essential parameters. The most informative male behaviour event was contact with the pheromone source. The males that did not respond or only exhibited an anemotaxic flight, i.e. orientation of flight that followed the direction of airflow rather than the direction of pheromone plume (Metcalf, 1987), were tested again. If they did not respond, the condition of the antennae and wings were checked.

*Non choice female calling behaviour.* Female calling behaviour was observed putting a female on a plant and another on a rolled paper (control). Female and plant were placed in closed Plexiglas cylinder (ø30x60cm). Females were tested from the emergence to the death on maize, sorghum and *M. minutiflora* and we determined the onset of calling.

*Statistics.* The results concerning taking flight male response have been expressed relative to the total of males tested for each experiment. The data concerning oriented flight response and contact with female have been expressed relative to the total of taking flight males. Series of data concerning these behaviour and also behaviour time were compared using student test, Fisher-Snedecor test (ANOVA) and Kruskal-Wallis test with R 2.4.0-A Language and Environment Copyright, 2006.

## RESULTS

*B. fusca* males stimulated with extruded glands of calling females exhibited a classic upwind flight observed and described on several moth (Baker, 1990).

In test with female sex pheromone alone (table 1), 100% of tested males (N=18) elicited an oriented flight up to the mid tunnel, then 84% carried on to reach the pheromone source. 77% landed and/or attempt to copulate with the pheromone lure.

When females glands are exposed in an environment of plants (table1), maize (N=20) and *P. purpureum* (N=20) did not modify significantly the response, 80% of pheromone source contact, whereas when the plant was sorghum (N=21), the level of response increase significantly ( $P<0.05$ ) to 95% of landing on pheromone source.

*S. glauca* (N=19) and *M. minutiflora* (N=21) elicited almost the same level of behaviour. For both plants, one male did not flight at all. The level of landing on pheromone lure dropped to 73% and 71% for *S. glauca* and *M. minutiflora* respectively, which is not significantly different from attraction with female sex pheromone alone.

The best score was obtained with sorghum (95% of contact) and the worst with *M. minutiflora* (71% of contact) but the difference is not significant between female and host-plants together (maize, sorghum and *P. purpureum*) and non host-plants together (*S. glauca* and *M. minutiflora*),  $P < 0.05$ .

Among the males which touched female, the time latency is not significantly different between protocols ( $P > 0.05$ ). There is a high variability in behaviour total time between and in the same experiments. But there is no significant difference between female sex pheromone alone and each plant plus female. Averages of time behaviour are 54 sec., 44 sec., 68 sec., 33 sec., 35 sec., and 38 sec. for females, maize, sorghum, *P. purpureum*, *S. glauca* and *M. minutiflora* respectively. General average is 46 seconds (table 2).

There is another behaviour which seems to be not negligible: time spent after midpoint of the tunnel (table 2). Respectively for maize, sorghum, *P. purpureum* and *S. glauca*, 40, 55, 56 and 64% of males spent more time after than before midpoint tunnel against only 14 and 33% for females and *M. minutiflora*.

Female calling behaviour data are shown in table 3. Females start to call 5h52, 5h20 and 5H05 after the beginning of the scotophase for maize, sorghum and *M. minutiflora* respectively. These hours are not significantly different with the control ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

Host-plant compound integrated with female sex pheromone can improve biological control and pest management. Several studies describe host-plant effects on female pheromone production and release and female oviposition. A few studies are interested in host plant enhancement of male attraction, probably because male are usually attracted by female even in the absence of plant (Reddy and Guerrero, 2000).

For *B. fusca*, sorghum, which could be the native host-plant, is synergic of the male attraction by female sex pheromone. Percentage of contact is significantly increased in the presence of this plant. For each plant or without plant, we obtained a high percentage of female contacts and the presence of maize, major host plant chosen by females for oviposition, seems not to modify male attraction behaviour. The behaviour time from the beginning to touch the female is not significantly different between the different protocols. *M. minutiflora*, repellent for other insects, does not prevent male attraction. However, in presence of a host plant (maize, sorghum or *P. purpureum*) or a resembling plant (*S. glauca*), males spend more time after the mid-point tunnel. Generally, males pass the female and turn around the plants. It is as if males sought the calling female on the stems. All these plants are tall and raising-anatomy compared to *M. minutiflora*, creeping plant shape. With the females or with *M. minutiflora* which appearance is very different from the other plants, they go directly on the female. The plant can be a visual indication of the presence of a calling female and the males recognize the plant more with appearance than with odour so the plant act more for the last behaviours: flight near or around the female, landing and copulation attempts, “visual behaviours”, than for long-range attraction. Habitat natal experience (Stamps and Davis, 2006) can explain this behaviour and, also, the improvement of male attraction with sorghum. Male *B. fusca* were raised in laboratory in the absence of cues from any natural habitat. However, laboratory rearing is renewed by natural populations. Laboratory insects can have prior estimates of the value of parameters that affect habitat selection (Stamps and Davis, 2006). Males seem to recognize host plant even if they come from rearing.

Landolt *et al.* (1994) worked on laboratory-reared cabbage looper moth *Trichoplusia ni* (Hübner) and male attraction in wind tunnel is enhanced by the presence of the host plant but this effect could be due to an increase of female calling or a synergy between pheromone and plant odour. Females used were alive in the wind tunnel contrary to our experiments so variations in female calling behaviour need to be done for *B. fusca*.

However, in Yang *et al.* (2004) experiments, attraction of reared *Cydia pomonella* male moths to synthetic sex pheromone compounds can be also synergize by the presence of host-plant volatiles, as in *B. fusca* with presence of sorghum. Yang *et al.* (2004) used synthetic plant compounds corresponding to only a part of the blend released by host (GLV) instead of plants. In our wind tunnel experiments, plants were kept in the same conditions than the insects and corresponding to natural environment. Production of volatiles was not checked. Experiments with synthetic blend of characteristic volatiles from each plant can complete our data.

Onset and period of calling do not vary according to plant presence. Pheromone production is not improved with the host plant and calling behaviour can be observed even if there is not a plant. Female calls as well on host plant than on repellent plant or on control. No chemical is necessary for calling posture and repellent odour for other insects can not prevent calling and so mating behaviours. In *B. fusca*, calling behaviour seems to be regulated by photoperiod and humidity.

Reproductive behaviours of *B. fusca* were not observed in natural conditions in fields. Mating can be developed in ancestral environment on wild sorghum identify by ancestral prior estimates and apparently recognized by males. Haile and Hofsvang (2002) have shown that sorghum is the most preferred host for *B. fusca* oviposition in host choice field experiments and that highest infestation occurred on it. The highest larval density was found on maize and sorghum. In natural populations, maize can be more perceived by wild female like a huge source of larval nutrition.

Plants are essential to the survival of the larvae and could be more linked with female behaviour during oviposition behaviour. Gravid females seem to be a stronger link with host-plant so the plant choice is in relation to larvae feeding and development. Some insect are closely linked with their host-plant like *Ostrinia nubilalis* (Pelozuelo *et al.*, 2004). Adaptation of *B. fusca* to the cultivated maize can be due to the presence of more nutritional value and food in large quantity for larvae development and to the female oviposition choice.

To our knowledge, *B. fusca* mate place is not on crops. These insects probably mate on wild plant along fields, maybe on wild sorghum, which could be the native plant. *B. fusca* males seem to be more attract by sorghum than by the others plants, including maize. Host shift to colonize maize and sorghum crops would fall instead of the female behaviour. Gravid females seem to be more sensitive to plant odours than females or males. Gravid females are repelled by *M. minutiflora* (Calatayud, unpublished results) and attracted to *P. purpureum* and *S. bicolor* (push-and-pull) (Khan *et al.* 2000, Cook *et al.*, 2007). Male attraction behaviour synergized by the presence of sorghum must be taking into account to establish chemical biocontrol against this pest. Adding sorghum volatiles into pheromone traps could increase *B. fusca* male captures.

Electro-physiological experiments could be made to understand exactly the specific chemical compounds of sorghum.

TABLE 1. NUMBER OF *B. FUSCA* MALES EXHIBITING NO FLIGHT (NF), ANEMOTAXIC FLIGHT (AF), BEFORE HALFWAY FLIGHT (BHF), HALFWAY FLIGHT (HF), APPROACHING FEMALE LURE (AL), LANDING ON FEMALE OR COPULATION ATTEMPTS (L / C) TOWARDS FEMALES SEX PHEROMONE WITH OR WITHOUT PLANT IN WIND TUNNEL.

| Attractive            | number of males tested | Males responding to assessment criteria |    |      |     |     |       |
|-----------------------|------------------------|-----------------------------------------|----|------|-----|-----|-------|
|                       |                        | NF                                      | AF | BHF  | HF  | AL  | L / C |
| Females               | N=18                   | 0%                                      | 0% | 100% | 83% | 83% | 78%   |
| <i>Z. mays</i>        | N=20                   | 0%                                      | 5% | 95%  | 80% | 80% | 80%   |
| <i>P. purpureum</i>   | N=20                   | 0%                                      | 5% | 95%  | 95% | 17  | 16    |
| <i>S. bicolor</i>     | N=21                   | 0%                                      | 5% | 95%  | 95% | 95% | 95%   |
| <i>S. glauca</i>      | N=19                   | 5%                                      | 5% | 85%  | 84% | 74% | 74%   |
| <i>M. minutiflora</i> | N=21                   | 5%                                      | 0% | 95%  | 71% | 71% | 71%   |

TABLE 2. AVERAGE BEHAVIOUR TIMES FOR *B. FUSCA* MALE ATTRACTION BEHAVIOUR BY *B. FUSCA* FEMALE SEX PHEROMONE WITH OR WITHOUT PLANT IN WILD TUNNEL

| time (sec.)           | latency time |         | total time  |         | time before mid-point tunnel |         | time after mid-point tunnel |         |
|-----------------------|--------------|---------|-------------|---------|------------------------------|---------|-----------------------------|---------|
|                       | time         | Std dev | time        | Std dev | time                         | Std dev | time                        | Std dev |
| Female                | <b>42.8</b>  | 34.3    | <b>54.3</b> | 36.2    | <b>35.4</b>                  | 27.1    | <b>18.9</b>                 | 33.1    |
| <i>Z. mays</i>        | <b>47.5</b>  | 28.8    | <b>43.9</b> | 25.9    | <b>26.4</b>                  | 21.4    | <b>19.1</b>                 | 18.8    |
| <i>S. bicolor</i>     | <b>43.4</b>  | 27.9    | <b>68.2</b> | 51.5    | <b>18.2</b>                  | 24.3    | <b>43.6</b>                 | 44.8    |
| <i>P. purpureum</i>   | <b>58.4</b>  | 33.9    | <b>33.3</b> | 12.6    | <b>15.6</b>                  | 13.1    | <b>17.7</b>                 | 9.5     |
| <i>S. glauca</i>      | <b>65.4</b>  | 44.6    | <b>35.4</b> | 20.0    | <b>12.4</b>                  | 12.7    | <b>23</b>                   | 19.6    |
| <i>M. minutiflora</i> | <b>54.8</b>  | 40.9    | <b>37.8</b> | 21.9    | <b>23.0</b>                  | 19.3    | <b>15.1</b>                 | 15.0    |

TABLE 3. HOURS OF FEMALE CALLING BEHAVIOUR AFTER THE BEGINNING OF THE SCOTOPHASE ON MAIZE, SORGHUM AND *M. MINUTIFLORA* IN COMPARISON TO CONTROL AND PERCENTAGES OF CALLING FEMALES.

| Age of female | Maize | Calling female/N | Control | Calling females/N | Sorghum | Calling females/N | Control | Calling female/N | <i>M. minutiflora</i> | Calling females/N | Control | Calling females/N |
|---------------|-------|------------------|---------|-------------------|---------|-------------------|---------|------------------|-----------------------|-------------------|---------|-------------------|
| 1 day         | 5h51  | 70%              | 5h21    | 70%               | 4h      | 33%               | 3h30    | 33%              | no call               | 0%                | no call | 0%                |
| 2 days        | 5h36  | 70%              | 5h33    | 100%              | 4h07    | 100%              | 4h45    | 100%             | 5h04                  | 100%              | 4h50    | 100%              |
| 3 days        | 5h33  | 50%              | 5h30    | 40%               | 3h54    | 100%              | 4h06    | 11%              | 5h33                  | 75%               | 5h45    | 66%               |
| 4 days        | 5h30  | 60%              | 5h45    | 60%               | 6h      | 33%               | 5h36    | 11%              | 5h30                  | 75%               | 6h30    | 66%               |
| 5 days        | 5h27  | 60%              | 5h09    | 70%               | 5h38    | 14%               | 5h13    | 14%              | 4h15                  | 50%               | 4h15    | 66%               |
| 6 days        | 5h24  | 70%              | 5h28    | 80%               | 5h18    | 29%               | 3h36    | 14%              |                       |                   |         |                   |
| 7 days        | 5h36  | 30%              | 5h56    | 70%               | 5h25    | 10%               | 4h05    | 10%              |                       |                   |         |                   |
| 8 days        | 5h24  | 60%              | 6h      | 60%               | 6h10    | 25%               | 5h40    | 25%              |                       |                   |         |                   |
| 9 days        | 5h51  | 60%              | 6h36    | 40%               | 6h15    | 25%               | 5h45    | 25%              |                       |                   |         |                   |
| 10 days       | 6h42  | 40%              | 5h42    | 20%               | 6h      | 30%               | 5h40    | 10%              |                       |                   |         |                   |
| 11 days       | 6h42  | 10%              | 6h57    | 10%               | 6h      | 10%               | 5h45    | 10%              |                       |                   |         |                   |

## REFERENCES

- BAKER, T. C. and LINN, C. E., JR. 1984. Wind tunnels in pheromone research, 75-110, in *Techniques in pheromone research*, H. E. Hummel and T. A. Miller, Springer-Verlag, New York.
- COOK, S. M., KHAN, Z. R. and PICKETT, J. A. 2007. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology* 52: 375-400.
- DAVIS, J. M. and STAMPS, J. A. 2004. The effect of natal experience on habitat preferences. *Trends in Ecology & Evolution* 19 (8): 411-416.
- EMELIANOV, I., DRES, M., BALTENSWEILER, W. and MALLET, J. 2001. Host-induced assortative mating in host races of the larch budmoth. *Evolution* 55 (10): 2002-2010.
- EMELIANOV, I., SIMPSON, F., NARANG, P. and MALLET, J. 2003. Host choice promotes reproductive isolation between host races of the larch budmoth *Zeiraphera diniana*. *Journal of Evolutionary Biology* 16 (2): 208-218.
- FRÉROT, B., LUCAS, P. and ROCHAT, D. 1989. Responses of *Mamestra suasa* male moths to synthetic pheromone compounds in a wind tunnel. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 53: 81-87.
- HAILE, A. and HOFVSANG, T. 2002. Host plant preference of the stem borer *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop Protection* 21: 227-233.
- KHAN, Z. R. and PICKETT, J. A. 2004. The "push-pull" strategy for stemborer management: a case study in exploiting biodiversity and chemical ecology, 155-164, in *Ecological Engineering for Pest Management: Advances in Habitat Manipulation for Arthropods*, COMSTOCK PUBL ASSOC, Ithaca.
- KHAN, Z. R., PICKETT, J. A., VAN DEN BERG, J., WADHAMS, L. J. and WOODCOCK, C. M. 2000. Exploiting chemical ecology and species diversity: stem borer and striga control for maize and sorghum in Africa. *Pest Management Science* 56 (11): 957-962.
- LANDOLT, P. J., HEATH, R. R., MILLAR, J. G., DAVIS-HERNANDEZ, K. M., DUEBEN, B. D. and WARD, K. E. 1994. Effects of host-plant, *Gossypium hirsutum* L., on sexual attraction of cabbage looper moths, *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Chemical Ecology* 20 (11): 2959-2974.
- LANDOLT, P. J. and PHILLIPS, T. W. 1997. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology* 42: 371-391.
- MCNEIL, J. N. and DELISLE, J. 1989a. Are host plants important in pheromone-mediated mating systems of Lepidoptera? *Experientia* 45 (3): 236-240.
- MCNEIL, J. N. and DELISLE, J. 1989b. Host plant pollen influences calling behavior and ovarian development of the sunflower moth, *Homoeosoma electellum*. *Oecologia* 80 (2): 201-205.
- METCALF, R. L. 1987. Plant volatiles as insect attractant. *Critical reviews in plant sciences* 5 (3): 251-301.
- NDEMAH, R., SCHULTHESS, F., KORIE, S., BORGEMEISTER, C. and CARDWELL, K. F. 2001. Distribution, relative importance and effect of lepidopterous borers on maize yields in the forest zone and mid-altitude of Cameroon. *Journal of Economic Entomology* 94 (6): 1434-1444.

- OCHIENG, S. A., PARK, K. C. and BAKER, T. C. 2002. Host plant volatiles synergize responses of sex pheromone-specific olfactory receptor neurons in male *Helicoverpa zea*. *Journal of Comparative Physiology, Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology* 188 (4): 325-333.
- PELOZUELO, L., MALOSSE, C., GENESTIER, G., GUENEGO, H. and FREROT, B. 2004. Host-plant specialization in pheromone strains of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* in France. *Journal of Chemical Ecology* 30 (2): 335-352.
- POLASZEK, A. and KHAN, Z. R. 1998. Host plants. *CAB international*: 3-10.
- RAINA, A. K., KINGAN, T. G. and MATTOO, A. K. 1992. Chemical signals from host plant and sexual behavior in a moth. *Science* 255 (5044): 592-594.
- RATNADASS, A., TRAORE, T., SYLLA, M. and DIARRA, D. 2001. Improved techniques for mass-rearing *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) on an artificial diet. *African Entomology* 9 (2): 167-175.
- REDDY, G. V. P. and GUERRERO, A. 2000. Behavioral responses of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, to green leaf volatiles of *Brassica oleracea subsp capitata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (12): 6025-6029.
- RUTHER, J., HOMANN, M. and STEIDLE, J. L. M. 2000. Female-derived sex pheromone mediates courtship behaviour in the parasitoid *Lariophagus distinguendus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 96 (3): 265-274.
- STAMPS, J. A. and DAVIS, J. M. 2006. Adaptive effects of natal experience on habitat selection by dispersers. *Animal Behaviour* 72: 1279-1289.
- STASTNY, M., BATTISTI, A., PETRUCCO-TOFFOLO, E., SCHLYTER, F. and LARSSON, S. 2006. Host-plant use in the range expansion of the pine processionary moth, *Thaumetopoea pityocampa*. *Ecological Entomology* 31 (5): 481-490.
- TAMHANKAR, A. J. 1994. Influence of host presence, age and mating on the calling behaviour of female *Earias vitella* (Fabricius) (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Science and Applicata* 15 (3): 275-280.
- VANBERGEN, A. J., RAYMOND, B., PEARCE, I. S. K., WATT, A. D., HAILS, R. S. and HARTLEY, S. E. 2003. Host shifting by *Operophtera brumata* into novel environments leads to population differentiation in life-history traits. *Ecological Entomology* 28 (5): 604-612.
- WALSH, B. J. 1864. On phytophagous varieties and phytophagous species. *Proceedings Entomology Society of Philadelphia* 3: 403-430.
- YANG, Z. H., BENGTSSON, M. and WITZGALL, P. 2004. Host plant volatiles synergize response to sex pheromone in codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Chemical Ecology* 30 (3): 619-629.

## V. Le système de reconnaissance du partenaire sexuel dans les populations identifiées par les marqueurs mitochondriaux et nucléaires chez *Busseola fusca* : relation entre le génotype, la phéromone et le comportement

Dans le cas de l'espèce *B. fusca*, des études au niveau génétique ont permis de mettre au point des marqueurs mitochondriaux (Sezonlin *et al.*, 2006a et 2006b) et microsatellites (Faure et Silvain, 2005). Différentes populations au sein de l'espèce *B. fusca* ont pu être mises en évidence grâce à l'analyse de ces deux types de marqueurs dans le cadre d'une approche phylogéographique. Ces populations ont des caractéristiques en liaison directe avec la répartition géographique. L'isolement géographique de populations à l'intérieur d'une espèce peut donner lieu à de la divergence du SMRS entre ces populations et à une rupture de la reconnaissance spécifique (Hall et Harvey, 2002). Le but de ce chapitre est de déterminer s'il existe une corrélation entre la variabilité génétique observée et une éventuelle divergence du SMRS entre des populations définies au sein d'une espèce.

L'étude de la diversité mitochondriale des différentes populations géographiques de l'espèce *B. fusca* a permis de caractériser trois clades d'haplotypes à l'aide du fragment du gène mitochondrial codant pour le cytochrome *b* (Sezonlin *et al.*, 2006a et 2006b et Figure 10). Le génome mitochondrial, transmis uniquement par la mère, est autonome et possède la caractéristique d'évoluer plus vite que le reste du génome, donc d'avoir un taux de mutation élevé. C'est un outil privilégié dans des études de systématique ou de phylogéographie, en particulier sur des périodes relativement brèves (Avice, 1987 ; Simmons et Weller, 2001).

En Afrique de l'Ouest, tous les haplotypes appartiennent au même clade appelé le clade Ouest, noté **W**. En Afrique de l'Est, les haplotypes se regroupent en deux clades de taille différente : le clade **KI**, minoritaire, et le clade **KII**, majoritaire, qui contient aussi les individus provenant du Cameroun (Figure 10).

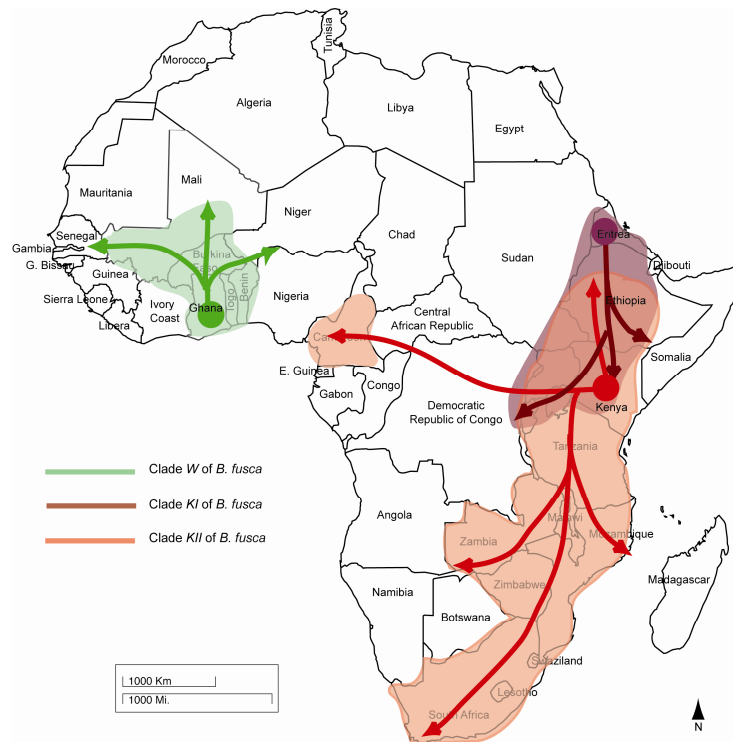


Figure 10 : Distribution géographique des individus *B. fusca* et les centres putatifs d'origine des trois clades mis en évidence par les analyses phylogénétiques (Sezonlin *et al.*, 2006b).

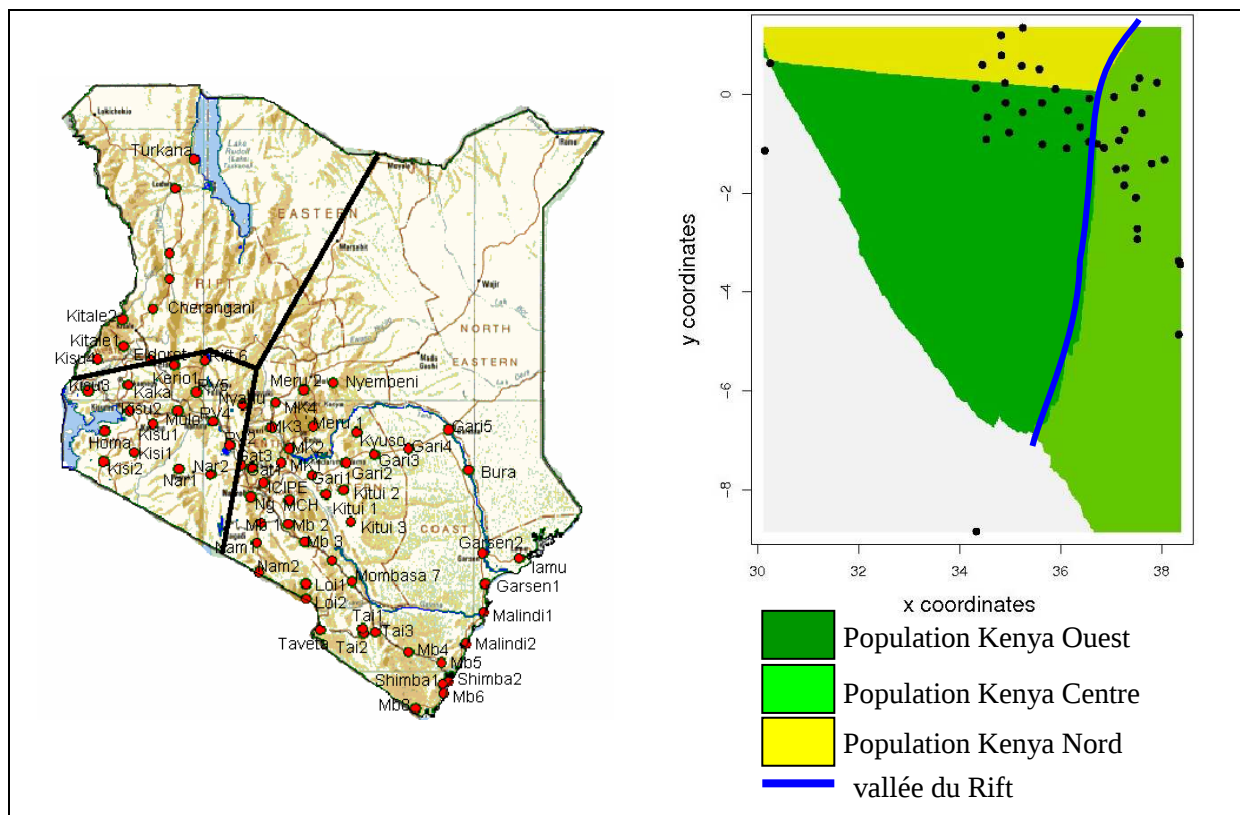


Figure 11 : Carte du Kenya regroupant les localités de prélèvements des *B. fusca* et description des trois populations réalisées par le logiciel *Geneland* au Kenya à l'aide de ces *B. fusca* (Dupas, résultats non publiés).

D'après Sezonlin *et al.* (2006a), en Afrique de l'Est, les clades **KI** et **KII** sont issues d'une séparation datant d'environ 1,5 millions d'années, inférence résultant des taux évolutifs du cytochrome *b* (Brower, 1994). Les individus de ces deux clades sont actuellement présents en sympatrie et se reproduisent entre eux. Nous savons qu'ils s'hybrident en laboratoire, capacité qui est confirmée par les données nucléaires.

Les clades Est et Ouest ont aussi été séparés il y a environ 1,5 millions d'années et dans l'état actuel de nos connaissances, ils sont toujours allopatriques. La séparation entre les populations Est et Ouest se situe grossièrement au niveau de la ligne volcanique du Cameroun, mais sa localisation exacte n'a pas encore pu être précisée. Il n'est pas impossible qu'il existe une zone de sympatrie à cet endroit. Le niveau de divergence entre ces trois clades d'haplotypes est relativement élevé (2,5%), tout en restant inférieur à ce qui existe entre de « vraies » espèces de noctuelles foreuses (Silvain, Comm. Pers.).

Une approche à l'aide de marqueurs microsatellites a apporté des données sur l'histoire plus récente des populations de *B. fusca*. Les microsatellites sont de courtes régions d'ADN présentant un motif répété qui peut être dinucléotidique (CA)<sub>n</sub>, trinucéotidique (CAT)<sub>n</sub> ou quadrinucléotidique (CATG)<sub>n</sub> et le nombre de répétitions est en moyenne de 10 à 30. Ces marqueurs, aussi nommés STR pour « Short Tandem Repeats », appartiennent à la catégorie plus large des marqueurs présentant un nombre variable de répétitions dites en tandem ou VNTR pour « Variable Number of Tandem Repeats ». Les microsatellites sont présents dans le génome nucléaire de la plupart des Eucaryotes. Depuis 1989, ces marqueurs sont de plus en plus utilisés en génétique des populations et, dans une moindre mesure, en phylogéographie, car ils sont hautement polymorphes et considérés comme neutres (Jarne et Lagoda, 1996).

La recherche de locus microsatellites dans le génome de *B. fusca* a conduit à la mise au point de sept marqueurs microsatellites polymorphes sur cette espèce (Faure et Silvain, 2005). Les noms et caractéristiques des sept locus sont décrits dans l'annexe 3. Ces marqueurs ont été utilisés pour étudier la structure génétique des populations de *B. fusca* et l'étude en cours confirme la séparation entre l'Afrique de l'Est et l'Afrique de l'Ouest déterminée par le marqueur mitochondrial. Ils ont aussi permis de mettre en évidence, via l'utilisation du logiciel *Geneland* (Guillot *et al.*, 2005), trois populations au Kenya : une population Kenya Nord (jaune), une population Kenya Ouest (vert foncé) et une population Kenya Centre (vert

clair) séparée des deux autres par la vallée du Rift (Dupas *et al.*, résultats non publiés, Figure 11). Les facteurs à l'origine de la séparation entre les populations Kenya Nord et Kenya Ouest ne sont pas connus.

Lors de notre étude, tous les individus de l'espèce *B. fusca* pris en compte soit pour les analyses physico-chimiques, soit pour les études comportementales, ont ensuite été caractérisés à l'aide d'un fragment du gène mitochondrial codant pour le *cytochrome b* et des sept locus microsatellites. Nous avons aussi étudié les capacités de reconnaissance des partenaires sexuels entre des individus de différentes populations géographiques à partir d'individus d'Afrique de l'Est prélevés dans la nature dans la région de Kitale, à partir d'insectes élevés au laboratoire de l'ICIPE et sur des individus d'Afrique de l'Ouest (Attogon – Bénin). L'objectif poursuivi était de vérifier la capacité de ces populations à communiquer sur la base des phéromones sexuelles et de fait, à déceler une éventuelle divergence du SMRS dans ces populations se développant soit en sympatrie (Afrique de l'Est) soit en allopatrie (Afrique de l'Est et de l'Ouest). Chaque individu femelle a été caractérisé par sa composition phéromonale et des caractères génétiques ; chaque individu mâle a été caractérisé par son comportement d'attraction et par des caractères génétiques. L'hypothèse d'une divergence du SMRS liée à un isolement géographique et caractérisée par les marqueurs génétiques est discutée aux vues des résultats.

## 1. Matériels et méthodes

*Insectes.* Les individus testés en tunnel de vol proviennent : (i) de l'élevage ICIPE, (ii) de Kitale, une région de l'Ouest du Kenya, où se trouve une majorité d'individus du clade mitochondrial **KI** (Sezonlin *et al.*, 2006a), (iii) d'Afrique de l'Ouest, plus précisément d'Attogon au Bénin. Les analyses phéromonales ont été réalisées sur des femelles de différentes régions d'Afrique : quarante-quatre femelles proviennent d'Afrique de l'Est : soit de l'élevage ICIPE (N=24), soit sont prélevées dans la nature (N=20) ; vingt-huit femelles d'Afrique de l'Ouest sont prélevées dans la nature (les détails de l'échantillonnage sont décrits dans le tableau 1 de l'article « A new insight into pheromone communication in *Busseola fusca* » présent dans ce manuscrit).

*Etude comportementale.* Les expériences d'attraction croisée ont été réalisées dans les mêmes conditions de tunnel de vol que celles décrites précédemment. Le tunnel de vol utilisé (1,90m de long, 80cm de large et 45cm de haut) est traversé par un courant d'air en flux laminaire de 0.6m/s. La température est maintenue à  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , l'humidité est de 45 à 50%. Les comportements des insectes sont filmés par une caméra Hitachi KP 161 CDD noir et blanc équipée d'un objectif Nikkor 60mm 1:2,8 D. et reliée à un magnétoscope Panasonic AG-7330 et placée au-dessus du tunnel.

*Variabilité de la composition phéromonale.* Les phéromones ont été extraites individuellement sur chaque femelle par la méthode SPME (Frérot *et al.*, 1997). L'analyse des compositions phéromonales se fait par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS), et par chromatographie en phase gazeuse (GC). Les matériels et méthodes utilisés sont décrits plus précisément dans l'article « A new insight into pheromone communication in *Busseola fusca* » présent dans ce manuscrit.

*Extraction d'ADN.* Les ADN de tous ces insectes sont extraits à partir du thorax et des pattes, avec le kit DNeasy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN) et conservés à  $-20^\circ\text{C}$ . La tête, l'abdomen et les ailes de chaque insecte sont conservés en vue d'une éventuelle confirmation d'identification.

*Amplification PCR.* Le fragment de gène codant pour le cytochrome *b* est utilisé pour distinguer les trois groupes d'haplotypes mitochondriaux chez *B. fusca* (haplotype **KI**, **KII** ou **W**). Le génotypage des haplotypes mitochondriaux se fait par digestion enzymatique après une amplification par PCR. Cette amplification est réalisée avec les amorces CP1 (5'GAT GAT GAA ATT TTG GAT C 3') et Tser (5'TAT TTC TTT ATT ATG TTT TCA AAA C 3') (Figure 12). Le programme du thermocycleur est le suivant : une dénaturation initiale à  $94^\circ\text{C}$ , suivie par 40 cycles de 1min à  $94^\circ\text{C}$ , 1min30 à  $46^\circ\text{C}$ , 1min30 à  $72^\circ\text{C}$ , puis une extension finale à  $72^\circ\text{C}$  pendant 5min. Le mélange PCR utilisé est le suivant : 5  $\mu\text{l}$  de tampon 5X, 3  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1  $\mu\text{l}$  de chaque amorce (10 mM), 0.6 $\mu\text{l}$  de dNTPs (10mM), 1  $\mu\text{l}$  d'ADN et 1U de *Taq* polymérase Promega pour 25  $\mu\text{l}$  de mélange de réaction.

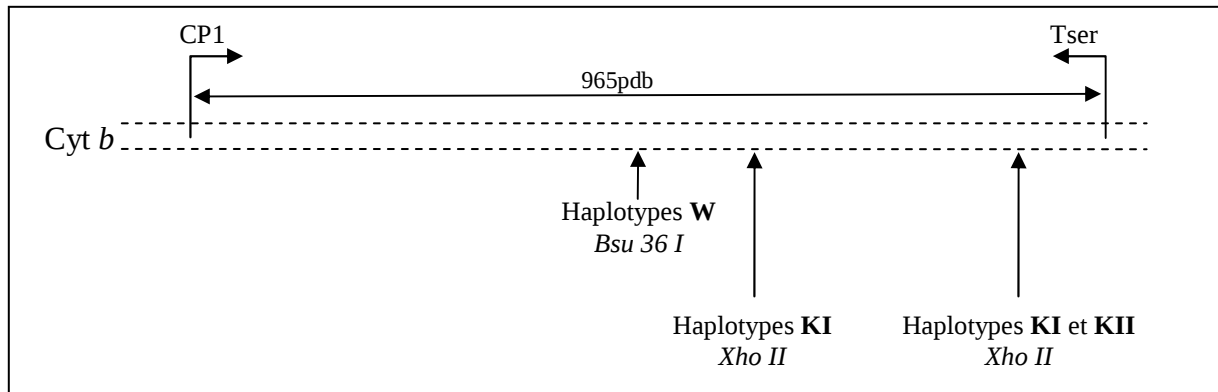


Figure 12 : Schéma du fragment du gène mitochondrial codant pour le cytochrome *b* avec les amorces utilisées lors des séquençages et les zones de coupures des enzymes de restriction.

*Digestion enzymatique.* La digestion sur ces fragments de PCR se fait avec deux enzymes différentes (Figure 12) selon que les individus de *B. fusca* proviennent d'Afrique de l'Est (deux clades d'haplotypes) ou d'Afrique de l'Ouest (un clade d'haplotypes). Les deux réactions enzymatiques se font dans un thermocycleur à 37°C pendant 6 heures.

Pour les clades de l'Afrique de l'Est, l'enzyme *Xho II* coupe la séquence du gène codant pour le cytochrome *b* amplifié au niveau du site de restriction A | GATCC situé à deux endroits (606<sup>e</sup> et 885<sup>e</sup> bases) pour le type I, ce qui produit deux coupures, mais à un seul endroit (885<sup>e</sup> base) pour le type II, ce qui ne produit qu'une seule coupure. Au final, la révélation de l'électrophorèse sur gel des fragments produits par la digestion enzymatique donne trois bandes pour les types I et deux bandes pour les types II.

Pour les clades de l'Afrique de l'Ouest, nous avons sélectionné l'enzyme *Bsu 36 I* qui a comme site de restriction : CC | TTAGG. Ce site est présent chez le type Ouest à la position 478 du gène codant pour le cytochrome *b* et absent chez les types Est. Ce gène sera coupé uniquement chez le type Ouest, ce qui permettra de savoir à quel type appartient l'individu étudié sans procéder à un séquençage long et coûteux.

*Marqueurs nucléaires.* Sept marqueurs microsatellites polymorphes identifiés par Faure et Silvain (2005) sont utilisés pour traiter 75 mâles et femelles de *B. fusca* testés dans les expériences de comportement ou dont la phéromone sexuelle a été analysée. Le mélange pour les PCR est le suivant : 1µl d'ADN dilué 10 fois, 1µl de tampon 10X, 2µl de Qsol, 2µl de dNTPs, 0,2µl de chaque amorce (sauf pour le locus B2.67 : 0,4µl de chaque amorce), 0,05µl de *Taq* polymérase (*hotstart Qiagen*) (0,25U) pour 10µl de mélange. Le programme du thermocycleur est le suivant : une dénaturation initiale à 94°C, suivie par 40 cycles de 1min à 94°C, 1min30 à 46°C, 1min30 à 72°C, puis une extension finale à 72°C pendant 10 min. La

séparation et la détection des locus microsatellites se fait par une électrophorèse capillaire réalisée sur un séquenceur automatique Applied Biosystems International PRISM®310. Les détails du protocole sont décrits dans l'annexe 3.

Pour l'étude à l'aide des locus microsatellites, nous avons utilisé le programme *Structure* 2.2 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html> ; Falush *et al.*, 2007) pour étudier les relations existant entre nos individus, en s'appuyant sur les résultats du logiciel *Geneland* utilisé par Dupas *et al.* (Comm. Pers.). Le logiciel *Structure* regroupe les individus en fonction de leur association de génotypes et crée des populations.

## 2. Résultats : variabilité de la composition phéromonale des individus femelles et de réponse des mâles de *Busseola fusca* caractérisées avec le marqueur mitochondrial

*Variabilité phéromonale entre les populations d'Afrique.* La variabilité phéromonale est décrite dans l'article « A new insight into pheromone communication in *Busseola fusca* » présent dans ce manuscrit. Les analyses physico-chimiques (GC et GC-MS) de 72 femelles de *B. fusca* montrent que les phéromones sexuelles des différentes populations sont constituées des mêmes composés chimiques. Nous notons une variabilité individuelle importante et présente dans chaque population. Cette variabilité porte essentiellement sur les ratios des différents composés et aucune différence significative ne caractérise une population particulière. La composition phéromonale ne différencie pas les populations d'Afrique de l'Est et d'Afrique de l'Ouest. De même les populations d'élevage ne sont pas différentes des populations sauvages.

*Comportement croisé entre les populations d'Afrique de l'Est.* Les expérimentations en tunnel de vol montrent que l'inter-attraction entre les populations étudiées est possible (Figure 13). La totalité (100%) des mâles de l'élevage ICIPE effectue un vol orienté vers une source constituée d'une femelle sauvage (Kitale), contre 80% pour les mâles sauvage (Kitale) vis-à-vis d'une femelle d'élevage. Avec une femelle sauvage, 80% des mâles d'élevage touchent la source contre 60% des mâles sauvages avec une femelle d'élevage. L'élevage n'a apparemment pas eu d'influence sur l'éthologie de *B. fusca*.

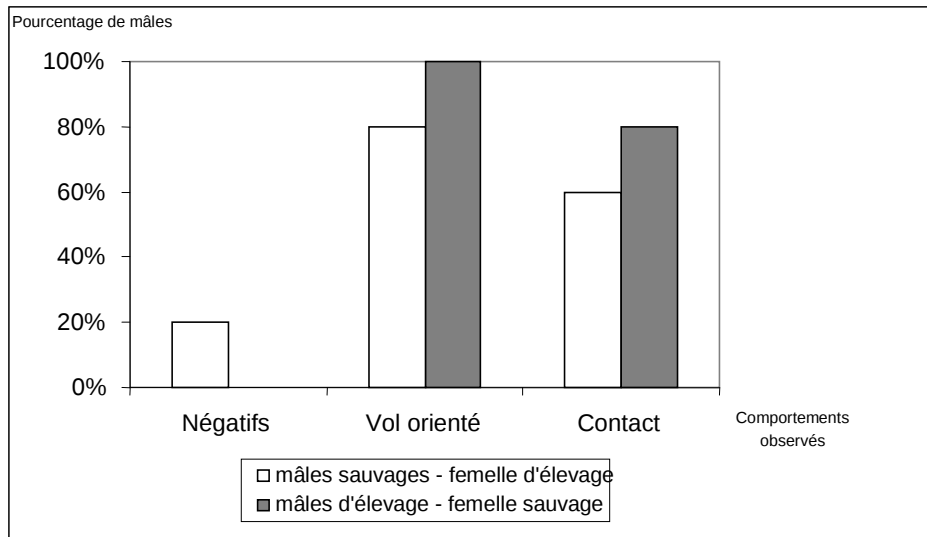


Figure 13 : Pourcentage des comportements (mâles négatifs, vol orienté et contact) entre les individus sauvages et les individus d'élevage.

La moyenne du temps de latence des mâles sauvages est de 70 secondes (écart-type 40,3) et celle des mâles d'élevage est de 75 secondes (écart-type 49,9). Les mâles sauvages (N=3) mettent 122 secondes (écart-type 60,4) et les mâles d'élevage (N=4) mettent 81 secondes (écart-type 73,3) pour entrer en contact avec les femelles. Nous n'avons pas pu faire de statistiques du fait du faible nombre de répétitions effectuées, mais il faut noter que les mâles sauvages mettent plus de temps que les mâles sauvages pour entrer en contact avec la femelle. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les mâles d'élevage sont moins sensibles aux manipulations et aux conditions expérimentales que les mâles sauvages.

*Comportement croisé entre les populations d'Afrique de l'Est et d'Afrique de l'Ouest.* L'interattraction entre les mâles d'Afrique de l'Ouest et les femelles d'Afrique de l'Est est possible. Sur 12 mâles d'Afrique de l'Ouest (Attogon-Bénin) testés avec des femelles d'Afrique de l'Est (ICIPE), 92% des mâles effectuent un vol orienté (N=11) vers la source de phéromone et 50% des mâles entrent en contact avec la source phéromonale (N=6). Un seul mâle n'a pas répondu. Le temps de latence moyen est de 61 secondes (écart-type 35,8), le temps moyen mis par le mâle pour atteindre le demi-tunnel est de 23 secondes (écart-type 10,2) et le temps moyen pour entrer en contact avec la source de phéromone est de 28 secondes (écart-type 8,9).

*Analyse à l'aide du marqueur mitochondrial.* L'analyse à l'aide du marqueur mitochondrial codant pour le cytochrome *b* nous a permis de définir la population de l'élevage ICIPE. Cet élevage comporte les types **KI** et **KII** dans une proportion équivalente à celle de la nature, c'est-à-dire 37% d'individus appartenant au clade d'haplotypes **KI**.

Les analyses des 72 femelles, dont la phéromone a été identifiée, séparent ces femelles en trois clades d'haplotypes mitochondriaux (**KI**, **KII** et **W**), qui correspondent à ceux décrits précédemment (Sezonlin *et al.*, 2006a). Ces analyses confirment que toutes les femelles qui proviennent d'Afrique de l'Ouest sont du type **W**. En ce qui concerne les individus d'Afrique de l'Est, nous n'avons mis en évidence que trois femelles d'haplotype Est **KI**, toutes les autres femelles sont du type **KII**. Ces données confirment le fait que le clade d'haplotypes **KII** est majoritaire en Afrique de l'Est. Les individus que l'on retrouve dans les trois clades mitochondriaux ne sont pas caractérisés par une composition phéromonale particulière.

Nous avons identifiés à quel clade d'haplotypes appartiennent les femelles et les mâles testés en tunnel de vol. Les individus d'élevage sont du type **KII** et les femelles et les mâles sauvages provenant de Kitale sont du type **KI**. L'interattraction est donc possible entre les deux clades d'haplotypes d'Afrique de l'Est. On pourrait penser, à la vue de ces résultats, que les mâles de type **KI** sont moins réactifs à la phéromone de type **KII** que l'inverse. Seulement, le nombre de mâles testés (N=5) ne permet pas d'effectuer des analyses statistiques.

Nous avons mis en parallèle les résultats du comportement des mâles en tunnel de vol avec les résultats obtenus à l'aide du marqueur mitochondrial codant pour le cytochrome *b*. Pour ces résultats, les individus analysés proviennent de l'élevage et sont caractérisés moléculairement après les tests de tunnel de vol. Nous avons ajoutés à ces résultats les mâles d'Afrique de l'Ouest, qui appartiennent au clade d'haplotypes **W**.

Pour les mâles de *B. fusca* d'Afrique de l'Est, testés en tunnel de vol avec la phéromone sexuelle femelle, le temps de comportement est très variable. Nous n'avons pas pu mettre en relation le fait que les mâles soient positifs ou négatifs avec le polymorphisme au niveau des haplotypes mitochondriaux (Figure 14).

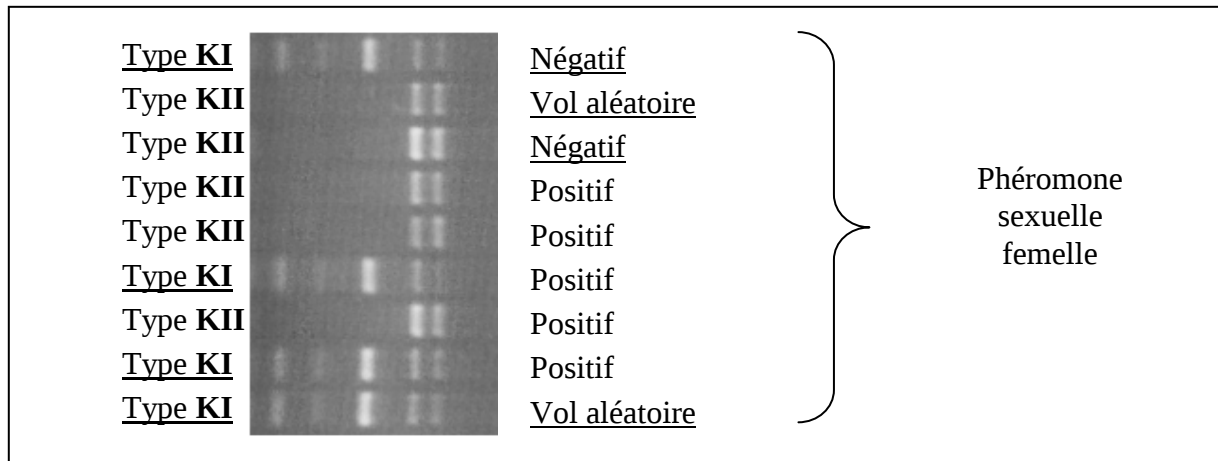


Figure 14 : Variation de comportements des mâles de *B. fusca* qui ne répondent pas (négatifs), qui ont un vol anémotaxique ou qui entrent en contact avec la phéromone sexuelle femelle de *B. fusca* en tunnel de vol en fonction de la variabilité observée au niveau haplotypique.

Nous n'avons pas pu corréler les données de temps de comportement avec les données moléculaires (Figure 15). Par exemple, un mâle du clade d'haplotypes **KII** peut mettre 185 secondes comme 10 secondes pour atteindre la femelle (flèches sur le graphique). Le temps de latence peut être d'environ 40 secondes quelque soit le clade d'haplotypes **KI**, **KII** ou **W** (étoiles sur le graphique).

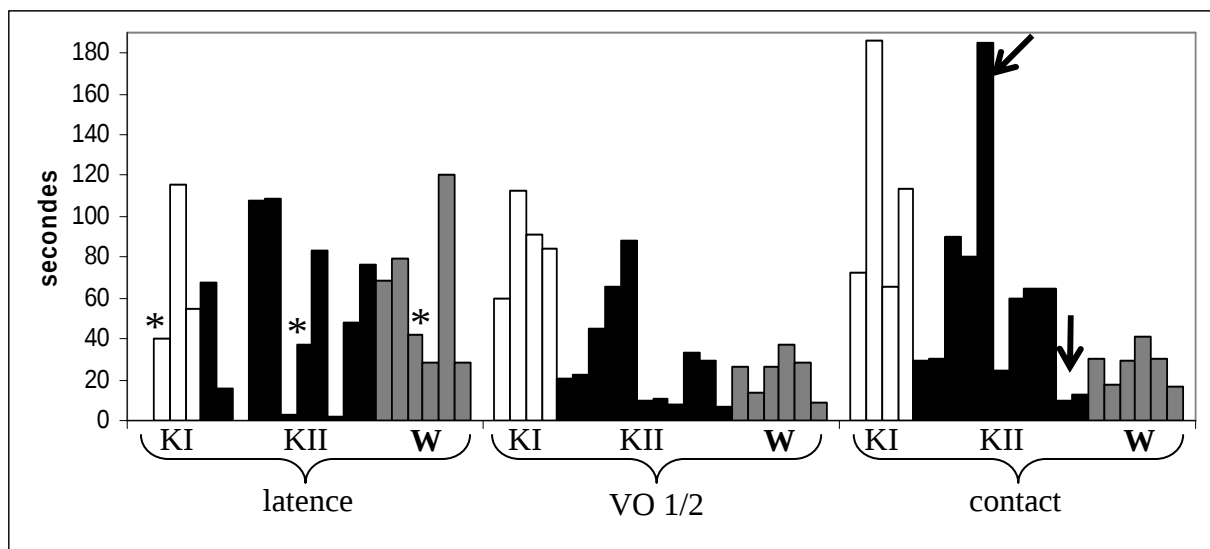


Figure 15 : Durée de divers comportements (temps de latence, temps de vol jusqu'au demi-tunnel (VO1/2) et temps de vol jusqu'au contact avec la femelle) des mâles de *B. fusca* mis en contact avec la phéromone femelle de *B. fusca* en tunnel de vol en fonction de la variabilité observée au niveau haplotypique.

### 3. Résultats : variabilité de la composition phéromonale des individus femelles et de réponse des mâles de *Busseola fusca* à l'aide des marqueurs nucléaires

Nous avons utilisé le logiciel *Structure* pour analyser les individus *B. fusca* à l'aide des marqueurs microsatellites. Nous avons utilisé des individus précédemment analysés à l'aide de ces mêmes marqueurs (Dupas *et al.*, résultats non publiés), ainsi que nos individus précédemment analysés en comportement pour les mâles et dont la phéromone a été identifiée pour les femelles. Ces individus apparaissent Figure 16 sous forme d'un numéro encadré en rouge. Le logiciel *Structure* propose de regrouper les individus dans deux à sept populations différentes. L'analyse menée par Dupas *et al.* (résultats non publiés) suggère l'existence de trois populations au Kenya et si nos individus en font partie, ils devraient se rattacher à l'une ou l'autre de ces populations. Lorsque nous analysons la sortie graphique correspondant à l'hypothèse de structuration des individus en trois populations, nous remarquons que la majorité de nos individus, notamment les individus sauvages, se rassemble dans une même population. Nous avons donc observé le résultat correspondant à l'hypothèse de structuration en quatre populations (Figure 16). Nous observons que 90% des individus (N=56) provenant de l'élevage forment une population différenciée en jaune par rapport aux autres individus qui se répartissent dans trois populations. A l'intérieur de cette population jaune, nous retrouvons des individus sauvages. Quelques individus de l'élevage (N=13) se trouvent dans les trois autres populations et il pourrait s'agir d'individus récemment issus des insectes prélevés dans la nature pour renouveler l'élevage ICIPE.

Les trois populations restantes sont plus ou moins bien corrélées aux trois populations suggérées par le programme *Geneland*. La population 1 (rouge) contient 77% des individus de la population Kenya Centre, la population 2 (verte) comprend 50% des individus de la population Kenya Ouest et la population 3 (bleue) comporte 81% des individus de la population Kenya Nord.

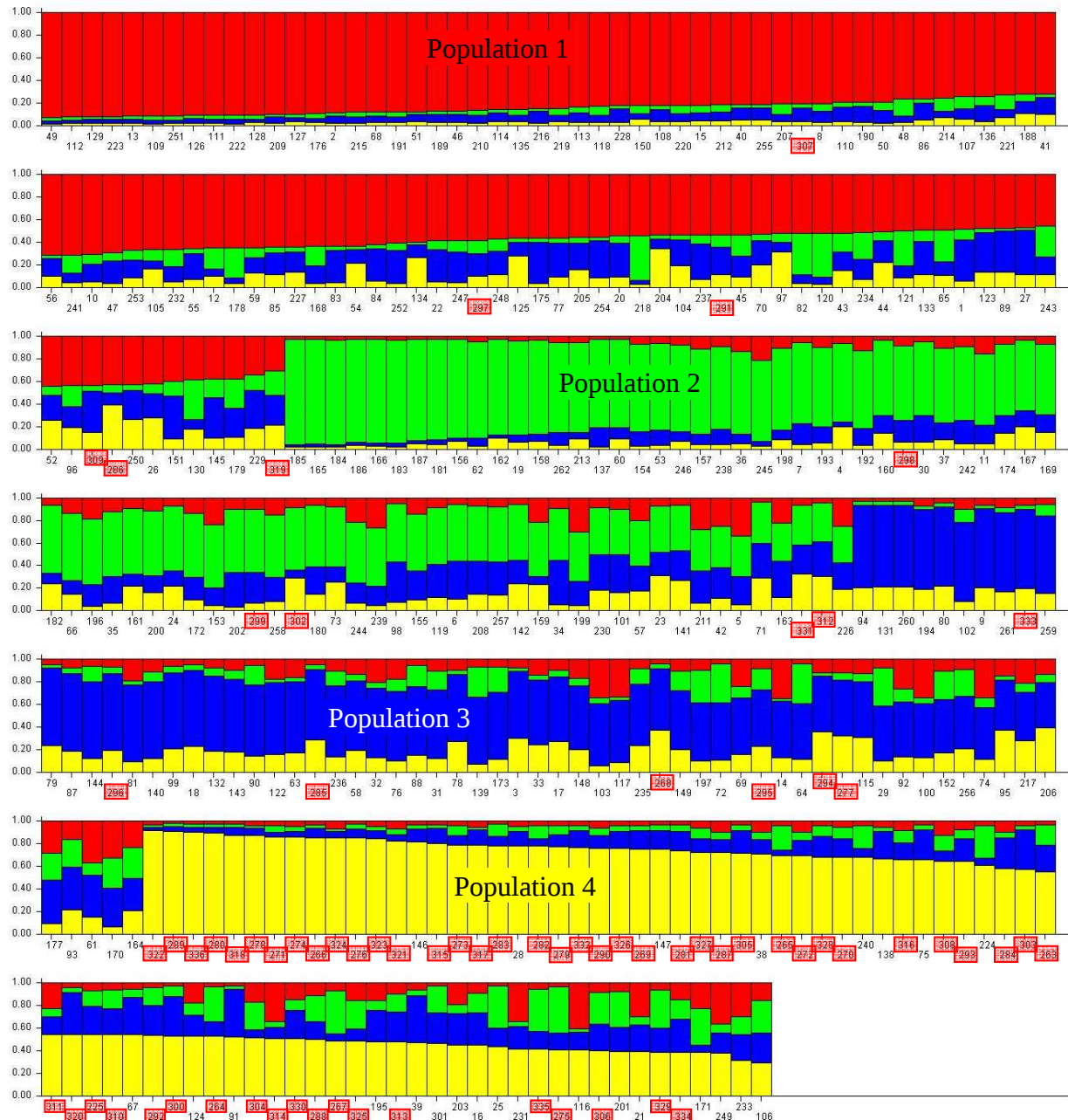


Figure 16 : Diagramme en barres (bar plot) représentant les taux d'assignation des individus aux quatre populations définies par le logiciel Structure. Chaque barre correspond à un individu, chaque couleur représente une population et les individus encadrés de rouge appartiennent à notre échantillonnage. Les valeurs en ordonnée représentent le pourcentage d'appartenance d'un individu à une des populations.

#### 4. Discussion

Les mâles et les femelles, qu'ils appartiennent aux deux clades d'haplotypes d'Afrique de l'Est ou au clade d'haplotypes d'Afrique de l'Ouest, sont interattractifs. Les variations de composition de la phéromone sont aussi importantes à l'intérieur des populations d'haplotypes qu'entre les divers groupes d'haplotypes mitochondriaux. A partir de ces résultats, nous pouvons dire qu'il n'existe pas de barrière liée à une différence dans le SMRS. Le SMRS ne semble donc pas avoir divergé entre ces populations, même pour les deux populations d'Afrique de l'Est et d'Afrique de l'Ouest de nos jours encore en situation d'allopatrie.

L'élevage en laboratoire ou la séparation ancienne mais persistante entre les individus de l'Est et de l'Ouest n'ont eu aucune influence sur l'éthologie des mâles de *B. fusca*, même s'il apparaît que les mâles d'élevage semblent être moins sensibles aux expérimentations que les mâles provenant de la nature. Les mâles de *B. fusca* d'Afrique de l'Ouest sont fortement attirés par les femelles d'Afrique de l'Est. Le manque de disponibilité en matériel ne nous a pas permis d'effectuer les tests inverses. Nous ne pouvons pas exclure l'existence d'un isolement comportemental asymétrique, même s'il paraît peu probable du fait de la non-différenciation des compositions phéromonales. Une différenciation allopatrique n'a donc pas eu lieu ni au niveau phéromonal, ni au niveau du comportement d'attraction des mâles. Une remise en contact de ces deux populations géographiques aurait probablement pour conséquence un nouveau brassage génétique. Ces expériences doivent être vérifiées et confirmées par des expérimentations dans leur milieu naturel et notamment en Afrique de l'Ouest. L'absence de différenciation du SMRS, malgré des barrières reproductives importantes, a été montrée aussi au sein de l'espèce *S. nonagrioides*. Il existe trois populations géographiques en France, en Espagne et en Grèce, sans différenciation du mélange phéromonal. De plus, les mâles d'une population répondent à la phéromone sexuelle femelle d'une autre population (Krokos *et al.*, 2002).

Chez *B. fusca*, il n'y a pas de correspondance entre le polymorphisme phéromonal et la structuration génétique des populations telle que révélée par l'utilisation d'un marqueur mitochondrial. Pour ce qui est de la composition phéromonale, il n'existe donc pas de phérotypes différents selon l'origine géographique ou l'appartenance à un groupe génétique donné.

L'absence de différence phéromonale entre les individus appartenant aux deux clades d'haplotypes mitochondriaux d'Afrique de l'Est peut être expliquée par le fait que les deux clades d'haplotypes I et II sont de nos jours présents en sympatrie au Kenya et qu'il peuvent s'hybrider naturellement. S'il existait des différences lorsque les populations étaient séparées, il n'y a pas eu de renforcement de ces différences lors de leur remise en contact.

L'absence de phérotipe différent entre les populations d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique de l'Est montre que la différenciation génétique observée ne s'est pas traduite par une différenciation des composantes du SMRS. Les deux populations d'Est et d'Ouest ont été séparées il y a approximativement 1,5 millions d'années, compte tenu du taux de divergence d'environ 3% observé sur la portion du gène mitochondrial codant pour le *cytochrome b* (Brower, 1994). Cette séparation est vraisemblablement liée à la formation et à la présence de la Ligne Volcanique du Cameroun. Malgré cette séparation relativement ancienne, et l'absence vraisemblable de flux de gènes entre les populations occupant les deux moitiés de l'Afrique, il n'y a pas eu de divergence des compositions phéromonales, que ce soit par un changement de ratio ou par l'ajout d'un composé, entre les deux populations. Le maintien de ce caractère nous amène à formuler plusieurs hypothèses : (1) l'absence de flux de gènes pourrait ne pas être absolue au niveau de la ligne volcanique du Cameroun ; (2) l'isolement géographique n'exerce pas de pression sur le SMRS ou la divergence est trop récente pour s'accompagner d'une différenciation du SMRS ; (4) l'absence de différenciation du SMRS au sein de l'espèce *B. fusca* peut être due à son statut de ravageur, qui se reproduit rapidement et à l'adaptation aux cultures de maïs et de sorgho, qui sont des milieux de reproduction stables, qui n'exercent pas une pression de sélection de type alimentaire ; (5) Les changements du SMRS peuvent être une réponse à un changement d'habitat ou d'environnement et les différences d'habitats actuels entre l'Est et l'Ouest ne sont pas suffisamment prononcées pour exercer une pression différentielle sur le SMRS. Au contraire, que l'on soit à l'Est ou à l'Ouest de l'Afrique, les populations de *B. fusca* sont adaptées aux cultures de sorgho et de maïs, ce qui peut exercer une pression de sélection « stabilisatrice » sur l'ensemble des populations en favorisant certains génotypes.

L'analyse des données des marqueurs microsatellites à l'aide du logiciel de traitement *Structure* nous indique que les individus provenant de l'élevage ICIPE en Afrique de l'Est présentent en majorité le même profil, qui correspondrait à une structuration due à l'élevage. Nous ne pouvons donc pas les assigner à l'une des trois populations décrites pour le Kenya à partir de l'analyse des locus nucléaires microsatellites (*Geneland*). Par contre, nous avons

quelques difficultés à comprendre pourquoi les individus sauvages (Narok, Kisii) se retrouvent dans cette population et que certains individus d'élevage sont dans les populations définies par Dupas *et al.* Nous ne pouvons pas expliquer cela dans la mesure où nous ne connaissons pas l'histoire des individus sauvages et d'élevage que nous avons reçu d'Afrique. Chez *B. fusca*, l'espèce est clairement séparée en trois clades mitochondriaux et plusieurs populations microsatellites sans que l'on n'arrive à identifier de variabilités phéromonale ou comportementale. Notre travail nous a permis de démontrer que les mâles négatifs en tunnel de vol appartiennent à une population différenciée par les marqueurs utilisés.

Aucune étude n'a mis en corrélation des données comportementales avec des données génétiques. Par contre, en ce qui concerne les données phéromonales, nous pouvons citer l'exemple d'*O. nubilalis*. La différence phéromonale très marquée chez ce Lépidoptère est reflétée par certains gènes nucléaires (Thomas *et al.*, 2003 ; Dopman *et al.*, 2004), mais pas par des gènes mitochondriaux (Marçon *et al.*, 1999).



## Conclusion

---



Le comportement d'appel des femelles de *B. fusca* est limité dans le temps, mais ne varie pas avec la présence d'une plante, hôte ou non-hôte. Les mâles de *B. fusca* sont attirés pendant cette période d'appel et leur comportement d'attraction correspond au comportement caractéristique décrit chez de nombreux Lépidoptères. Dans leur réponse, les mâles de *B. fusca* tolèrent des variations du ratio des composés de la phéromone sexuelle femelle de 5 à 10%. Cette tolérance correspond au polymorphisme observé au niveau de la composition de la phéromone sexuelle femelle. Le sorgho, plante hypothétiquement originelle de *B. fusca*, semble avoir une action synergique sur le comportement d'attraction du mâle stimulé par la phéromone sexuelle femelle, comme démontré dans l'article sur les plantes. Les femelles et les mâles de *B. fusca* s'attirent même s'ils n'appartiennent pas aux mêmes groupes génétiques ou géographiques. Le SMRS n'a pas varié entre les différentes populations africaines de *B. fusca*, même pour les populations d'Est et d'Ouest encore en allopatrie.

Le comportement de cour de *B. fusca* est très court et très simple sans l'intervention d'une phéromone sexuelle mâle. Ce comportement rapide et peu différencié joue un faible rôle dans l'acceptation du mâle par la femelle. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le système de reconnaissance du partenaire sexuel chez *B. fusca* repose principalement sur l'émission par les femelles d'une phéromone sexuelle particulière et complexe. Notre travail a porté autant sur des individus prélevés dans la nature que sur des individus d'élevage et nous sommes donc sûrs que la mise en place d'une surveillance et d'une lutte biologique efficace contre ce ravageur peut profiter de l'utilisation de la composition phéromonale que nous avons décrite.

L'étude populationnelle de *B. fusca* devra être complétée par des expériences en tunnel de vol entre des individus appartenant aux haplotypes Est **KI** et **KII**, puisque le nombre de répétitions lors de nos tests était faible. Il serait intéressant aussi de rechercher une zone d'hybridation possible entre les individus appartenant aux haplotypes Est et Ouest (ligne volcanique du Cameroun). Le SMRS ne varie pas entre ces populations. Si ces deux populations possédaient une aire de répartition commune, un phénomène de renforcement a peu de chance de se produire du fait de l'absence de choix du géniteur par la femelle lors du comportement de cour et du fait de la fenêtre de réponse assez large du mâle. Si on se base sur le concept de l'espèce de Paterson, les populations de *B. fusca* ne sont pas en voie de spéciation.

La connaissance de l'histoire des individus provenant de la nature ou de l'élevage peut nous permettre de comprendre l'analyse des données microsatellites, que nous interprétons comme un effet dû à l'élevage.

## Cinquième partie : Les modalités de l'isolement reproducteur entre les espèces du genre *Busseola*

---



## I. Approche d'écologie chimique : étude de l'isolement reproducteur entre *Busseola phaia*, *Busseola segeta* et *Busseola fusca*

Au Kenya, il n'existe pas de barrière géographique à des interactions entre *B. fusca* et respectivement *B. segeta* à l'Est de la vallée du Rift et *B. phaia* à l'Ouest de la vallée du Rift. *B. fusca*, *B. segeta* et *B. phaia* prélevées dans différentes localités ont des périodes de vol communes au Kenya (Calatayud et Frérot, Comm. Pers.). Ecologiquement, nous savons que chacune des trois espèces est spécialisée sur une plante-hôte différente et que *B. fusca* ne s'observe que dans les zones cultivées. *B. phaia* se rencontre sur *P. purpureum* et *B. segeta* sur *P. deustum* (Le Rü, Comm. Pers.). Comme chez d'autres Noctuidae phytophages, ces espèces offrent des cas intéressants de passage quasi absolu du compartiment sauvage au compartiment cultivé ou des cas de fidélité à l'hôte endémique.

Comme nous l'avons démontré dans l'introduction, le système de reconnaissance du partenaire sexuel (SMRS) est un facteur important du maintien de l'intégrité des espèces. Le SMRS est le fruit de l'évolution et sa variation peut être un moteur de la spéciation. Dans le cadre de l'étude sur ce complexe de trois espèces, proches d'un point de vue de la systématique classique, mais isolées par des paramètres géographiques et écologiques, il était intéressant d'étudier les composantes de leur isolement reproducteur.

Les différentes étapes que nous avons étudiées et qui peuvent mener à leur isolement reproducteur sont les suivantes. (1) La période de reproduction de chaque espèce va être déterminée par l'observation du comportement d'appel chez les femelles. (2) Les phéromones sexuelles femelles de *B. segeta* et *B. phaia* sont ensuite identifiées et comparées au mélange phéromonal que nous avons décrit pour *B. fusca*. Il sera intéressant de voir s'il existe une corrélation entre les niveaux de parenté observés entre les espèces ou populations étudiées et les mélanges phéromonaux et si l'on peut en savoir plus sur l'ancêtre commun de ces espèces au niveau phéromonal. L'identification phéromonale est importante aussi pour mettre en place un système de surveillance par des pièges phéromonaux. Ce contrôle des populations de *B. segeta* et *B. phaia* peut s'avérer utile au cas où elles envahiraient aussi le compartiment cultivé et deviendraient des ravageurs, au même titre que *B. fusca*.

(3) S'il existe des composés communs aux phéromones de *B. fusca*, *B. segeta* et *B. phaia*, nous détermineront leurs ratios respectifs et l'action de ces ratios sur le comportement d'attraction du mâle. S'il existe des composés en plus ou en moins dans les mélanges phéromonaux, il conviendra d'identifier leur action sur le comportement d'attraction du mâle et déterminer s'il existe des antagonistes parmi ces composés, capables alors de bloquer l'attraction d'une espèce par une autre. L'action des mélanges phéromonaux sur les mâles sera étudiée en réalisant des attractions croisées entre les trois espèces en tunnel de vol. les taux d'attraction des mâles nous donneront des informations sur la possibilité de croisement dans la nature. (4) L'accouplement a été testé entre *B. segeta* et *B. fusca*, ainsi que le devenir d'une éventuelle descendance. (5) De plus, nous avons étudié morphologiquement ces trois espèces à l'aide des pièces génitales mâles pour déterminer les différences qui pourraient être une barrière à un accouplement interspécifique.

## 1. Matériels et méthodes

*Allochronie du comportement sexuel.* A l'émergence, les femelles de *B. phaia* et *B. segeta* sont placées dans des boîtes cylindriques dans des chambres climatisées en photopériode inversée 12L : 12D, à une température de 25°C et une humidité de 85±10%. Les observations se font pendant le jour, grâce à une lumière rouge toutes les 15 minutes pendant toute la durée de la scotophase. La position d'appel, avec l'abdomen tendu et la glande phéromonale extrudée, est le comportement observé.

*Identification des phéromones sexuelles femelles.* Les identifications phéromonales de *B. segeta* et *B. phaia* sont réalisées en utilisant des femelles de deux à trois jours. Trente deux femelles proviennent de la population *B. segeta* de la forêt ombrophile de la région de Race course, treize de la population de *B. phaia* de la savane dans la région de Kisii et neuf de la population de *B. phaia* de la forêt tropicale de Kakamega. Durant la période d'appel et donc de production et de libération de la phéromone, la glande phéromonale est dévaginée par une légère pression sur l'abdomen et maintenue dans cette position par une pince fine. On utilise alors la méthode de prélèvement appelée SPME pour Solid Phase Micro Extraction décrite par Frérot *et al.* en 1997 (annexe 1). La surface d'une fibre de carbone (65 µm Carbowax<sup>TM</sup>-Divinylbenzène – CW/DVB – SUPELCO) est frottée délicatement sur le tégument de la glande pendant cinq minutes. Cette fibre peut être stockée dans du papier aluminium au congélateur (-20°C) avant analyse. L'analyse des composés adsorbés sur les fibres se fait par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) ou par chromatographie en phase gazeuse (GC).

La GC-MS est pratiquée sur un chromatographe Varian 3400 CX couplé à un spectromètre de masse ion trap Saturn II (Varian). L'ionisation est obtenue par impact électronique (IE) avec une énergie de 70 eV et une gamme de masse de 40 à 330 uma. Les conditions du GC sont les suivantes : la température du four est programmée de 50°C à 300°C à raison de 8°C/min. Le chromatographe contient une colonne apolaire RTX-5 Sil-MS (Restek®, France) de 30m de longueur, 0.32mm de diamètre interne. L'injecteur split-splitless est chauffé à 250°C.

La GC est pratiquée sur un appareil Varian 3400 CX muni d'un injecteur split-splitless avec la méthode et les conditions suivantes. La température du four est programmée de 50 à 100°C à raison de 15°C/min, puis de 100°C à 245°C à raison de 5°C/min. La colonne Rtx®-Wax est de 30m de longueur, de 0.32mm de diamètre interne (Restek®, France). Avant chaque journée d'analyse, un standard est injecté. Il est obtenu à partir de solutions titrées de composés de synthèse. Les mélanges phéromonaux obtenues pour chaque espèce sont identifiés en comparant les temps de rétention et les spectres de masse des produits avec ceux des standards.

*Confirmation de l'activité biologique par des tests de piégeage sur le terrain.* Le travail de terrain a été réalisé dans la localité de Mai-Mahiu (vallée du Rift, Kenya) où sont présents *B. fusca* et *B. segeta* et dans la localité de Kakamega où sont présents *B. fusca* et *B. phaia*. La quantité appropriée de chaque composé phéromonal est appliquée sur des capsules en caoutchouc (Sigma-Aldrich). Ces capsules sont placées dans un piège Unitrap à entonnoir (Biosystèmes France, SARL). La base du piège est blanche, l'entonnoir jaune et le couvercle vert foncé. Les pièges sont accrochés à environ 1.5 mètre de hauteur et espacés de 30 mètres les uns des autres en bordure des champs. Ils sont vérifiés tous les deux jours et renouvelés toutes des deux semaines. Les attractifs de synthèse utilisés (tableau 6) sont fabriqués au laboratoire INRA à partir de solutions titrées des composés de synthèse, Z11-14:Ac, E11-14:Ac, Z9-14:Ac, Z11-16:Ac et Z11-14:OH. La pureté des composés Z9-14:Ac, Z11-16:Ac et Z11-14:OH est de 100% (purification par HPLC), celle des composés Z11- et E11-14:Ac d'environ 97%. Les composés phéromonaux purs sont dilués dans de l'hexane pour obtenir des solutions titrées et les mélanges ont été fait sur la base des analyses des identifications phéromonales de chaque espèce. La dose totale est de l'ordre de 1000µg. Les quatre types de pièges portent le nom de l'espèce qu'ils représentent : mélange *B. fusca*, mélange *B. phaia* Kakamega, mélange *B. phaia* Kisii et mélange *B. segeta*. Tous les pièges sont placés dans les deux localités testées même si toutes les espèces ne sont pas présentes aux deux endroits.

*Attraction croisée en tunnel de vol.* Le tunnel de vol utilisé est de 1,90m de long, 80cm de large et 45cm de haut. Le courant d'air en flux laminaire est de 0.6m/s. La température est maintenue à 23±2°C et l'humidité à 50%. Les comportements des insectes sont filmés par une caméra Hitachi KP 161 CDD noir et blanc équipée d'un objectif Nikkor 60mm 1:2:8 D. et reliée à un magnétoscope Panasonic AG-7330. Les tests en tunnel de vol se font dans les mêmes conditions que ceux réalisés lors des études du comportement des mâles de *B. fusca*.

Nous avons réalisé des tests de comportement croisé faisant intervenir des mâles de *B. fusca* (N=25 mâles testés) et des femelles de *B. phaia* ; des mâles de *B. fusca* (N=33 mâles testés) et des femelles de *B. segeta*. Les tests réciproques ont été réalisés entre des femelles de *B. fusca* et des mâles de *B. phaia* (N=26 mâles testés) et entre des femelles de *B. fusca* et des mâles de *B. segeta* (N=24 mâles testés).

Nous avons aussi utilisé la formulation phéromonale la plus performante de *B. fusca*, la formulation (B) décrite dans l'article d'identification phéromonale de *B. fusca* : (62% de Z11-14:Ac, 15% de E11-14:Ac, 13% de Z9-14:Ac et 10% de Z11-16:Ac), à laquelle nous avons ajouté deux ratios différents de Z11-14:OH, alcool contenu dans la phéromone sexuelle des femelles *B. phaia* et *B. segeta* : 5% de Z11-14:OH pour la formulation OH1 et 10% de Z11-14:OH pour la formulation OH2. L'objectif de ces expériences est d'apprécier l'effet de l'alcool sur le comportement d'attraction des mâles de *B. fusca*.

*Analyses statistiques.* Les résultats concernant les comportements des mâles en tunnel de vol sont exprimés en relation avec le nombre total de mâles testés. Les résultats concernant les temps de comportements des mâles en tunnel de vol sont exprimés en fonction des mâles qui sont entrés en contact avec la source phéromonale. Les séries de données concernant ses comportements ainsi que tous les autres résultats (analyses phéromonales, comportement de cour, appel des femelles) sont comparés en utilisant le test de Student, le test de Fisher-Snedecor (ANOVA) et le test de Kruskal-Wallis avec le programme R 2.4.0-A Language and Environment Copyright, 2006.

*Accouplements croisés en cage d'accouplement.* Les expériences d'accouplement ont été réalisées entre quatre femelles de *B. segeta* et quatre mâles de *B. fusca* et entre deux femelles de *B. fusca* et deux mâles de *B. segeta*. Dans ce protocole, nous utilisons une cage 50x50x55cm dont les parois latérales sont en tulle afin de laisser passer un flux d'air à l'aide d'un extracteur. La température est maintenue à 23±2°C, l'humidité est de 45 à 50% et la lumière rouge d'intensité moyenne. Une fois accouplés, les insectes sont placés dans des pondoires (cage cylindrique : hauteur 30 cm, Ø 20 cm) en présence d'un plant de maïs. Les insectes sont observés toutes les 30 minutes jusqu'à ce le couple se détache. Le lendemain, nous vérifions la présence d'œufs sur le plant de maïs. Les œufs sont retirés délicatement du plant de maïs et déposés dans une boîte avec un couvercle grillagé sur du milieu d'élevage pour permettre leur développement. Les femelles, une fois mortes sont conservées dans de l'alcool absolu jusqu'à la dissection qui permettra de vérifier la présence d'un spermatophore.

Lors de la dissection, les abdomens sont ouverts délicatement, puis nous cherchons la bourse copulatrice et le ou les spermatophores.

*Etude des pièces génitales chez les mâles.* La dissection se fait sous une loupe binoculaire à partir des abdomens. La tête, le thorax et les ailes sont conservés dans l'alcool absolu en vue d'une identification ultérieure et pour les analyses moléculaires. Les abdomens sont préalablement trempés pendant 20 minutes dans une solution de soude chauffée afin de ramollir et éclaircir la cuticule. Les abdomens sont ouverts délicatement dans la longueur côté ventral (plus souple) à partir de l'extrémité côté thorax jusqu'à l'autre extrémité. Une fois l'abdomen ouvert, on dégage du reste de l'abdomen les valves génitales auxquelles est attaché le pénis. On détache délicatement le pénis des valves et on positionne l'ensemble entre lame et lamelle pour pouvoir les observer et les comparer. La fixation sur lame s'effectue dans du liquide de Faure (composition en annexe 4).

## 2. Résultats

*Allochronie du comportement sexuel.* La période d'activité sexuelle varie avec les espèces chez les lépidoptères. Cette période d'activité sexuelle nocturne marque la période de reproduction et est déterminée par l'appel des femelles, la production et la libération de phéromone. La Figure 17 montre que les femelles de *B. segeta* appellent de la quatrième à la huitième heure de la scotophase. Les femelles de *B. phaia* que se soient de Kisii ou de Kakamega, appellent de la première à la troisième heure de la scotophase. Pour rappel, la période d'appel des femelles de *B. fusca* s'étale de la 5ème à la 9ème heure après le début de la scotophase.

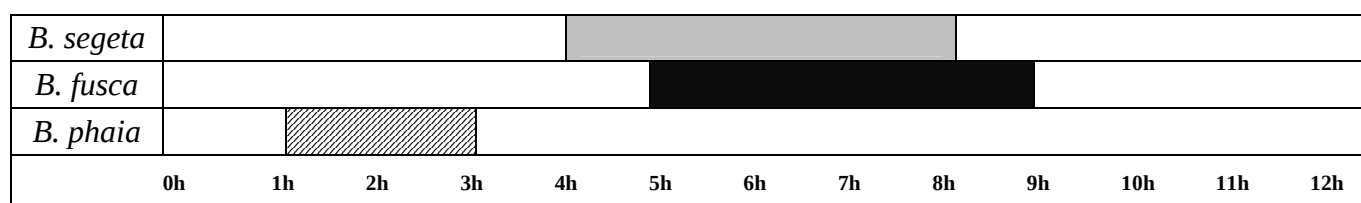


Figure 17 : Périodes d'appel des trois espèces, *B. fusca*, *B. segeta* et *B. phaia*, en fonction des heures de la scotophase.

*Identification des phéromones sexuelles femelles.* Les compositions phéromonales sont analysées en GC/MS (Figure 19, Figure 20 et Figure 21) par comparaison des temps de rétention et des spectres de masse avec ceux d'authentiques. Les phéromones des femelles de *B. segeta* et de *B. phaia* provenant du Kenya sont composées des mêmes acétates que la phéromone des femelles de *B. fusca* : le Z11-14:Ac majoritaire, le E11-14:Ac minoritaire, le Z9-14:Ac minoritaire et le Z11-16:Ac minoritaire. Un alcool à 14 atomes de carbone, le Z11-tétradécèn-1-ol (Z11-14:OH) est identifié comme un composé supplémentaire (Figure 18), m/z : 41 (57%), 55 (50%), 67 (82%), 81 (100%), 95 (68%), 109 (25%), 123 (12%), 137 (6%), 151 (2%), 166 (1,4%), 194 (0,1%), 211 (0,4%).

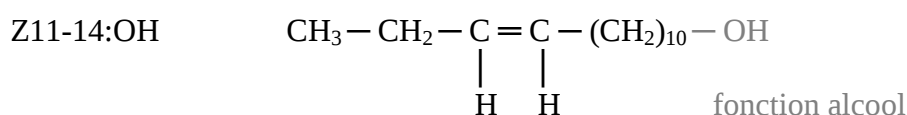


Figure 18 : Formule chimique du Z11-14:OH, composé additionnel de la phéromone sexuelle des femelles de *Busseola segeta* et *Busseola phaia*.

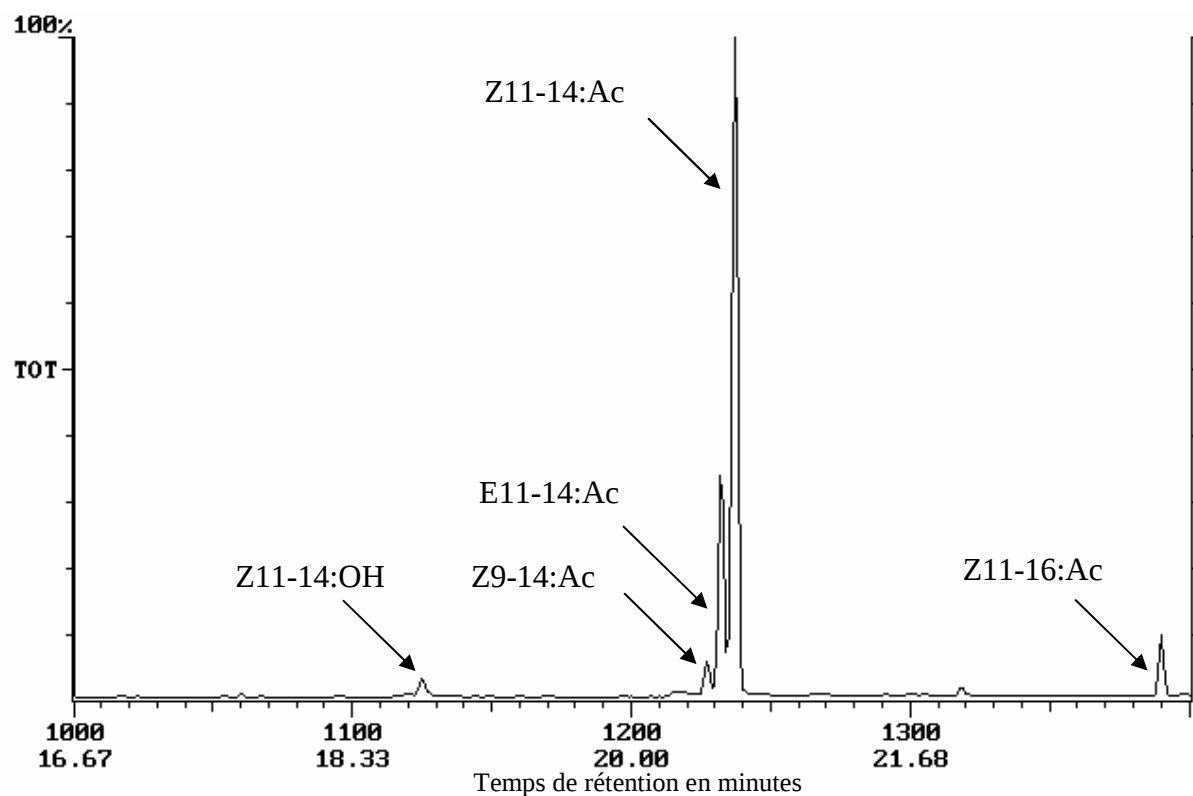


Figure 19 : Analyse en GC/MS d'un prélèvement par la technique SPME d'une glande phéromonale de *Busseola phaia* provenant de Kisii (RTX-5 Sil-MS, 30 m x 0.32 i.d., IE, 70 eV, 40 to 330 amu).

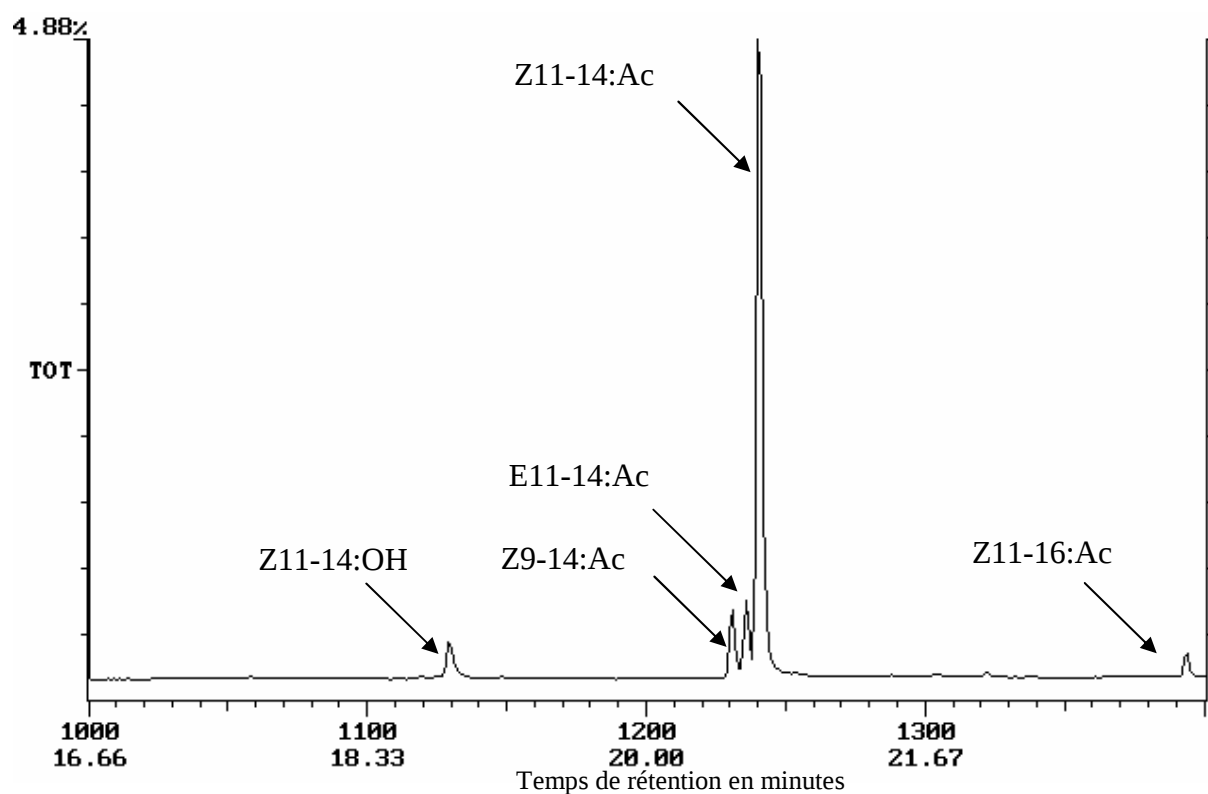


Figure 20 : Analyse en GC/MS d'un prélèvement par la technique SPME d'une glande phéromonale de *Busseola phaia* de Kakamega (RTX-5 Sil-MS, 30 m x 0.32 i.d., IE, 70 eV, 40 to 330 amu).

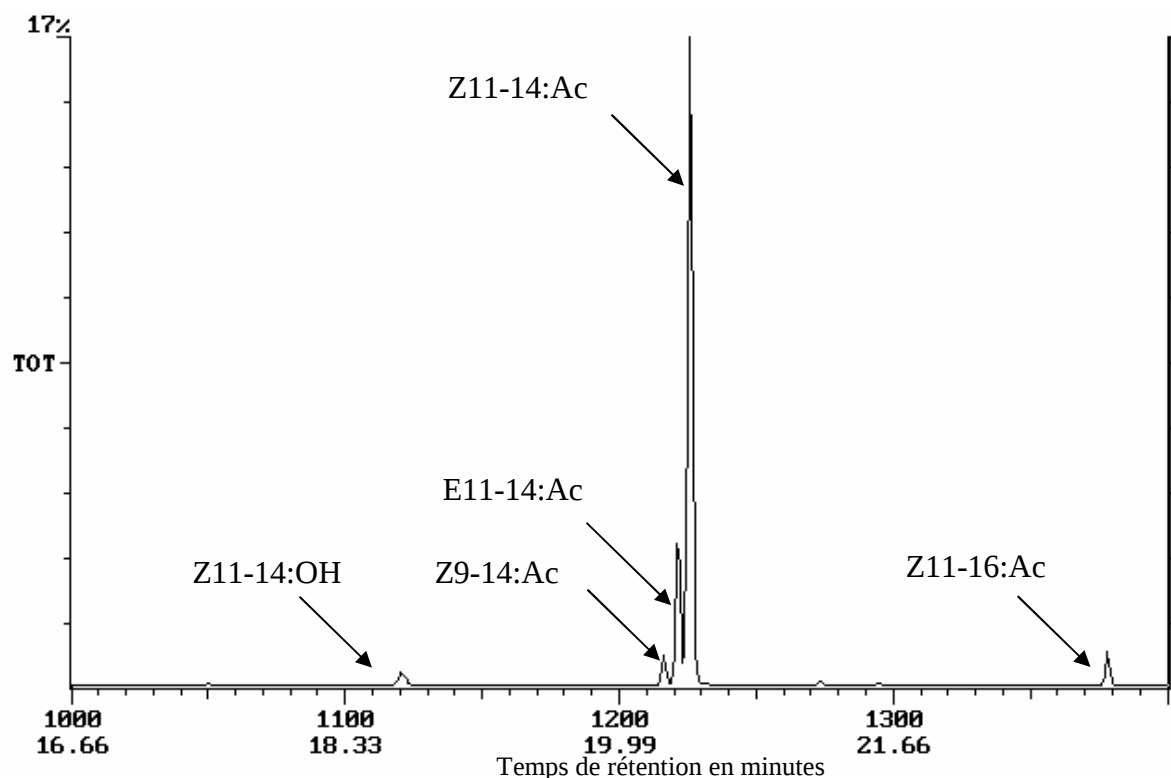


Figure 21 : Analyse en GC/MS d'un prélèvement phéromonal de *Busseola segeta* par la technique SPME (RTX-5 Sil-MS, 30 m x 0.32 i.d., IE, 70 eV, 40 to 330 amu).

La quantité de chaque produit est déterminée par la surface du pic observé sur le chromatogramme, que ce soit en GC-MS ou en GC. La quantité de chaque produit est rapportée en pourcentage à la quantité totale de produit contenu dans le mélange phéromonal. A ce niveau, on constate que la quantité du composé majoritaire, Z11-14:Ac, ne varie pas significativement selon les populations ( $P < 0.05$ ). Pour pouvoir comparer plus facilement les différentes populations, nous avons attribué un pourcentage de 100% au composé majoritaire et nous avons calculé ainsi le ratio de chaque composé minoritaire dans chaque mélange et nous en avons fait la moyenne (tableau 4).

| Provenance                      | N  | Z11-14:Ac | E11-14:Ac | Z9-14:Ac | Z11-16:Ac | Z11-14:OH |
|---------------------------------|----|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| <i>B. segeta</i><br>Race course | 32 | 100%      | 30%       | 8%       | 19%       | 6%        |
| <i>B. phaia</i><br>Kisii        | 13 | 100%      | 24%       | 6%       | 8%        | 6%        |
| <i>B. phaia</i><br>Kakamega     | 9  | 100%      | 22%       | 9%       | 8%        | 13%       |

Tableau 4 : Pourcentages des ratios de chaque composé des phéromones femelles de *B. segeta* de la région de Race course, de *B. phaia* de Kisii ou de Kakamega. Les ratios des composés sont calculés en attribuant un pourcentage de 100% au Z11-14:Ac.

L'analyse de la moyenne des ratios des composés phéromonaux montre des différences entre les trois populations pour les composés minoritaires (Figure 22).

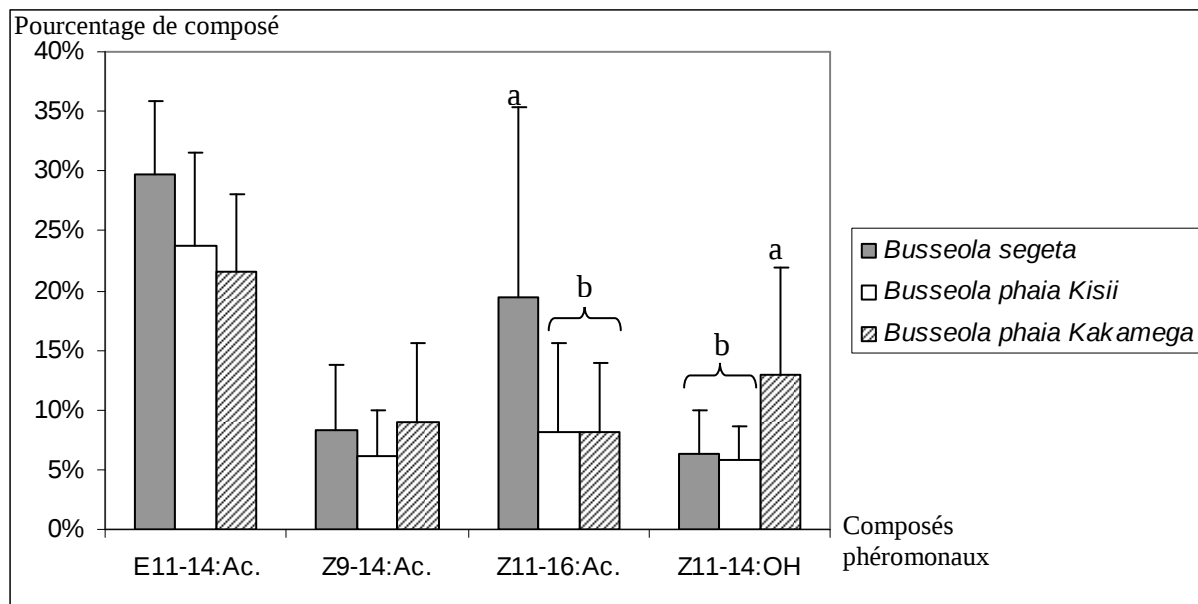


Figure 22 : Ratios des composés phéromonaux minoritaires présents dans les phéromones sexuelles femelles de *Busseola segeta* et de *Busseola phaia* provenant de Kisii et de Kakamega. Les lettres indiquent les différences significatives.

Pour les composés minoritaires, E11-14:Ac et Z9-14:Ac, on n'observe pas de différence significative ( $P > 0,05$ ) entre les *B. phaia* qu'elles viennent de Kisii ou de Kakamega et pas de différence significative non plus ( $P > 0,05$ ) entre les *B. segeta* et les *B. phaia*. Les ratios des composés Z11-14:Ac, E11-14:Ac et Z9-14:Ac ne varient donc pas entre ces trois populations. Pour le composé minoritaire Z11-16:Ac, il n'y a pas de différence significative entre les *B. phaia* qu'elles viennent de Kisii ou de Kakamega. La différence est significative ( $P < 0,05$ ) entre *B. segeta* (19% de Z11-16:Ac) et *B. phaia* (8% de Z11-16:Ac en moyenne pour les deux localités).

Pour le composé minoritaire Z11-14:OH, présent uniquement chez les femelles de *B. phaia* et *B. segeta*, la différence est significative ( $P = 0,01$ ) entre les *B. phaia* de Kakamega (13% de Z11-14:OH) et les *B. phaia* de Kisii (6% de Z11-14:OH) et entre les *B. phaia* de Kakamega (13% de Z11-14:OH) et les *B. segeta* (6% de Z11-14:OH). Par contre, il n'y a pas de différence significative entre les *B. phaia* de Kisii et les *B. segeta*.

L'identification des phéromones des trois espèces, *B. fusca*, *B. phaia* et *B. segeta*, nous a permis de mettre en évidence des différences significatives pour les composés suivants : le Z9-14:Ac et le Z11-16:Ac (Figure 23).

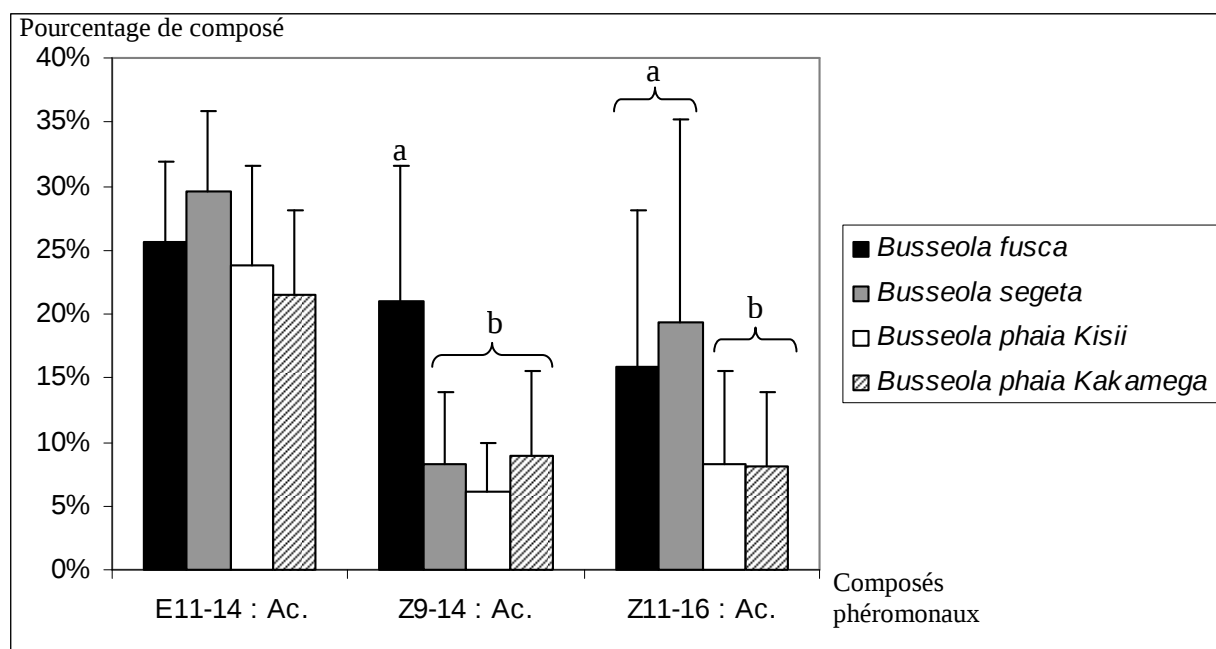


Figure 23 : Ratios des composés phéromonaux minoritaires présents dans les phéromones sexuelles femelles des trois espèces du genre *Busseola*. Les lettres indiquent les différences significatives.

Pour le composé majoritaire, Z11-14:Ac, et le composé minoritaire, E11-14:Ac, on n'observe pas de différence significative ( $P > 0,05$ ) entre *B. fusca* et *B. segeta*, ni entre *B. fusca* et *B. phaia*. Les ratios des composés Z11-14:Ac et E11-14:Ac ne varient donc pas entre ces trois espèces.

Pour le composé minoritaire Z9-14:Ac, la différence est significative ( $P < 0,05$ ) entre *B. fusca* (21% de Z9-14:Ac) et *B. phaia* (6% de Z9-14:Ac pour les femelles provenant de Kisii et 9% de Z9-14:Ac pour les femelles provenant de Kakamega) et entre *B. fusca* (19% de Z9-14:Ac) et *B. segeta* (8% de Z9-14:Ac).

Pour le composé minoritaire Z11-16:Ac, la différence est significative ( $P < 0,05$ ) entre *B. fusca* (15% de Z11-16:Ac) et *B. phaia* (8% de Z11-16:Ac), mais il n'y a pas de différence entre *B. fusca* (15% de Z11-16:Ac) et *B. segeta* (19% de Z11-16:Ac).

*Confirmation de l'activité biologique des phéromones identifiées par des tests de piégeage sur le terrain.* Les résultats des piégeages sont présentés dans le tableau 5 avec les mélanges phéromonaux de chaque piège. L'action du composé supplémentaire, le Z11-14:OH, est testée sur les mâles de *B. fusca* en plaçant les pièges avec les mélanges phéromonaux des deux autres espèces au même endroit que les pièges pour *B. fusca* (Mai-Mahiu et Kakamega).

Pour la localité de Mai-Mahiu, les trois pièges qui contiennent le Z11-14:OH capturent significativement moins de *B. fusca* que le piège qui est destiné à la capture de cette espèce ( $P < 0.05$ ). Dans la localité de Kakamega, aucun mâle de *B. fusca* n'est capturé dans les pièges *B. phaia* / *B. segeta* par rapport aux neuf attrapés dans le piège *B. fusca* ( $P < 0.05$ ). L'addition de 10% (mélange *B. phaia* Kakamega) ou de 5% (mélange *B. segeta* ou mélange *B. phaia* Kisii) du composé alcool au mélange *B. fusca* diminue fortement et significativement l'attraction des mâles de *B. fusca* ( $P < 0.05$ ) dans les deux localités, Mai-Mahiu et Kakamega.

Dans la localité de Mai-Mahiu, seulement quatre mâles de *B. segeta* sont capturés dans le piège *B. segeta*. Même si aucun mâle de *B. segeta* n'a été attrapé dans les autres pièges, la différence n'est pas significative. On note que les mâles de *B. fusca* ( $N=77$ ) sont plus attirés que les mâles *B. segeta* ( $N=4$ ) dans le piège *B. segeta* ( $P < 0.05$ ). Par contre, les mâles *B. fusca* ( $N=77$ ) sont moins attirés par les pièges *B. phaia* ( $N=23$  mâles et 7 mâles *B. fusca*) que par les pièges *B. segeta*.

Dans la localité de Kakamega, seulement un mâle *B. phaia* de Kakamega est attrapé dans le piège *B. fusca* qui ne contient pas d'alcool. Les mâles de *B. phaia* de Kakamega sont plus attirés par les pièges *B. phaia* Kakamega ( $N=226$ ) que par les pièges *B. phaia* Kisii ( $N=146$ ) et la différence est significative ( $P < 0.05$ ).

Les mâles *B. phaia* de Kakamega sont fortement attirés par la phéromone des femelles de *B. segeta* ( $N=302$ ) et même plus attirés que par leur propre piège ( $P < 0.05$ ). Quand on regarde la composition des capsules, l'attraction des mâles *B. phaia* de Kakamega est significativement augmentée lorsque le taux de Z11-14:OH est de 5% (piège *B. segeta*) et quand le taux de Z11-16:Ac est de 10% (piège *B. phaia* Kakamega et piège *B. segeta*). Mais lorsque l'on augmente le taux de Z11-14:OH à 10% (piège *B. phaia* Kakamega) ou que l'on diminue le taux de Z11-16:Ac à 5% (piège *B. phaia* Kisii), les mâles *B. phaia* de Kakamega sont significativement moins attirés ( $P < 0.05$ ).

|                                              | Mélange<br><i>B. fusca</i> | Mélange<br><i>B. phaia</i> Kakamega | Mélange<br><i>B. phaia</i> Kisii | Mélange<br><i>B. segeta</i> |
|----------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Z9-14:Ac                                     | 50                         | 50                                  | 50                               | 50                          |
| E11-14:Ac                                    | 150                        | 150                                 | 200                              | 200                         |
| Z11-14:Ac                                    | 620                        | 620                                 | 620                              | 620                         |
| Z11-16:Ac                                    | 100                        | 100                                 | 50                               | 100                         |
| Z11-14:OH                                    | /                          | 100                                 | 50                               | 50                          |
| <b>Piège de Mai-Mahiu</b>                    |                            |                                     |                                  |                             |
| Nombre de mâles de <i>B. fusca</i> capturés  | 408                        | 7***                                | 23**                             | 77**                        |
| Nombre de mâles de <i>B. segeta</i> capturés | 0                          | 0                                   | 0                                | 4                           |
| <b>Piège de Kakamega</b>                     |                            |                                     |                                  |                             |
| Nombre de mâles de <i>B. fusca</i> capturés  | 9                          | 0*                                  | 0*                               | 0*                          |
| Nombre de mâles de <i>B. phaia</i> capturés  | 1***                       | 226***                              | 146***                           | 302                         |

Tableau 5 : Composition des mélanges phéromonaux synthétiques utilisés dans les expériences de piégeages sur le terrain dans deux localités : Mai-Mahiu (Est de la vallée du Rift, Kenya) et Kakamega (Ouest de la vallée du Rift, Kenya) et nombre de mâles de *Busseola fusca*, *Busseola phaia* et *Busseola segeta* capturés. Les astérisques représentent la significativité du test ANNOVA, \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05.

*Attraction croisée en tunnel de vol.* L'interattraction entre les trois espèces est possible, même si la représentation de chaque item comportemental réalisé par les mâles diffère significativement (Figure 24). Rappelons que lorsque l'on stimule des mâles de *B. fusca* avec des femelles de leur espèce, nous obtenons 80% de vol orienté suivi de contact (N=20).

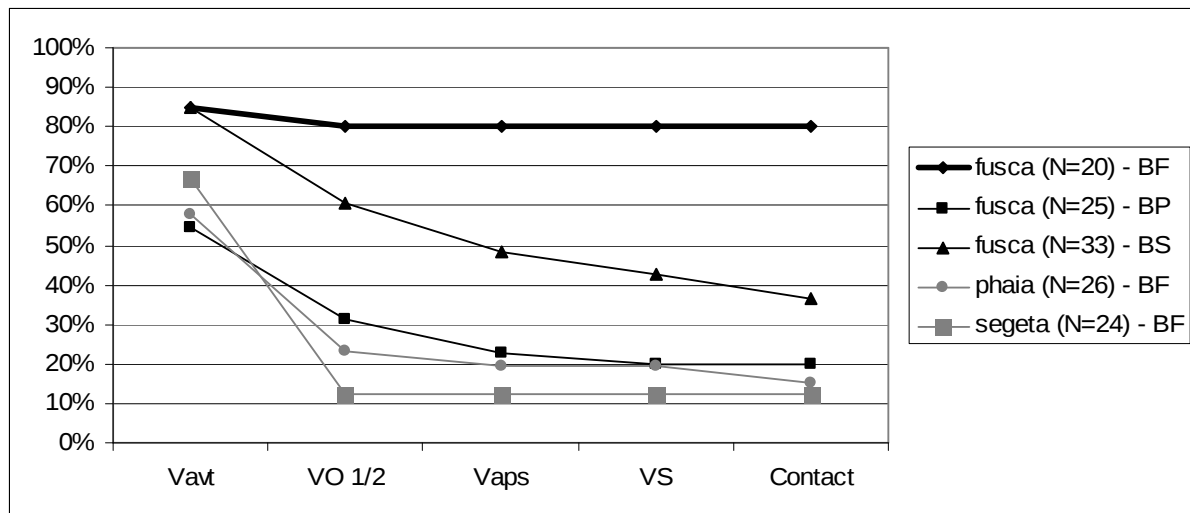


Figure 24 : Comportements en tunnel de vol des mâles de *B. fusca* testés avec une femelle de *B. phaia* (BP) ou de *B. segeta* (BS) et comportements des mâles de *B. phaia* et *B. segeta* testés avec une femelle de *B. fusca* (BF) : vol orienté avant le demi-tunnel (Vavt), vol orienté jusqu'au demi-tunnel (VO 1/2), vol orienté après le demi-tunnel (Vaps), vol près de la source (VS) et contact avec la source avec ou sans tentatives d'accouplement (Contact). Le comportement témoin est celui de mâles de *B. fusca* testés avec une femelle de *B. fusca* (BF).

Quand on stimule les mâles de *B. fusca* avec des femelles de *B. phaia* et des femelles de *B. segeta*, il n'y a respectivement que 20% (N=25) et 36% (N=33) de contact avec la source. Dans les comportements réciproques, 15% des mâles de *B. phaia* (N=26) et 13% des mâles de *B. segeta* (N=24) entrent en contact avec une femelle *B. fusca* (Figure 24).

Si on considère les différents items, les temps de latence varient selon les tests. Les mâles *B. fusca* testés avec les femelles *B. phaia* mettent significativement moins de temps pour décoller, 59 secondes (écart-type 36,6), que les mâles *B. phaia* testés avec des femelles *B. fusca*, 161 secondes (écart-type 29,1).

Le temps de latence est de 59 secondes (écart-type 36,6) pour les mâles *B. fusca* testés avec des femelles *B. segeta* et de 114 secondes (écart-type 85,9) pour les mâles *B. segeta* testés avec des femelles *B. fusca*. La différence n'est pas significative. De même, la différence n'est pas significative entre les mâles *B. segeta* et les mâles *B. phaia* testés avec la phéromone de femelles *B. fusca*.

Le pourcentage de mâles effectuant un vol orienté avant le demi-tunnel est intéressant. L'attraction des mâles de *B. fusca* par les femelles de *B. segeta* est largement supérieure à celle suscitée par les femelles de *B. phaia* (Figure 24).

La durée de la séquence comportementale des mâles de *B. fusca* qui entrent en contact avec la phéromone de *B. phaia* ou la phéromone de *B. segeta* est respectivement de 39 secondes (écart-type 31,5) et de 47 secondes (écart-type 35,4).

Lors des tests inverses, les mâles de *B. phaia* mettent 26 secondes (écart-type 20,3) pour atteindre une femelle *B. fusca*. Les mâles de *B. segeta* mettent 17 secondes (écart-type 12,7). Si on considère ces durées, il n'y a pas de différence significative entre le temps mis par un mâle de *B. fusca* pour retrouver une femelle de *B. segeta* et par un mâle de *B. segeta* pour retrouver une femelle de *B. fusca*. De même, les différences ne sont pas significatives dans le cas de *B. fusca* et de *B. phaia* quelque soit le sens du croisement. La variation intra-populationnelle est importante. Par exemple, un mâle *B. fusca* peut mettre de 11 secondes à une minute 45 secondes pour atteindre la source phéromonale. Ceci est vrai aussi pour *B. phaia* et *B. segeta*.

Les tests comportementaux avec des attractifs de synthèse montrent que seulement 10% (N=20) et 11% (N=18) de mâles *B. fusca* répondent et entrent en contact avec la capsule de phéromone synthétique K à laquelle sont ajoutés respectivement 5% et 10% de Z11-14:OH contenu dans les phéromones des femelles *B. segeta* et *B. phaia*.

*Accouplements croisés et étude des pièces génitales.* Tous les individus que nous avons placés en situation de croisement interspécifiques se sont accouplés. Malgré un effectif faible, l'accouplement interspécifique entre *B. segeta* et *B. fusca* est possible dans les deux sens. L'accrochage et le décrochage des pièces génitales se fait sans problème apparent. Les femelles des deux espèces accouplées avec les mâles de l'autre espèce ont toutes pondues, mais les œufs n'ont jamais éclos. Les dissections des abdomens des femelles accouplées n'ont pas montré la présence de spermatophore, ni de résidu de spermatophore, ce qui pose la question d'un transfert de spermatozoïdes. Les femelles sont disséquées plusieurs jours après l'accouplement et le spermatophore pourrait être alors en partie digéré et dégradé. Nos conditions de dissections ne nous ont cependant pas permis de voir les restes de ce spermatophore. Nous ne pouvons pas statuer sur cet événement de l'isolement reproducteur pré-zygotique.

Les dissections de pièces génitales montrent qu'il existe des différences entre les 3 espèces (Figure 25). Pour décrire les différences, nous avons observés plusieurs parties : l'*uncus*, le *saccus*, les valves et le *cucullus* divisé en trois parties pour des raisons pratiques (A, B et C). Les différences sont marquées entre *B. fusca* et les deux autres espèces (Figure 25), *B. segeta* et *B. phaia*. Les génitalias mâles de *B. fusca* sont plus grandes que celles de *B. segeta* et de *B. phaia* qui ont toutes deux des tailles similaires. Une fois étalée entre lame et lamelle, les génitalias de *B. fusca* mesurent environ 4,2 mm sur 5,4 mm, alors que celles de *B. segeta* et *B. phaia* mesurent 3 mm sur 4,4 mm. L'*uncus* des *B. fusca* est moins long et plus ramassé que celui des deux autres insectes et les bases de l'*uncus* sont plus rondes. *B. fusca* présente la partie C du *cucullus* plus grande et très sclérifiée. Les valves sont plus larges chez *B. fusca*. On observe aussi des différences entre les génitalias de *B. segeta* et *B. phaia* bien qu'elles soient plus semblables entre elles qu'elles ne le sont avec celles de *B. fusca*. Les valves ont des formes légèrement différentes, plus rebondies chez *B. phaia* au niveau du *sacculus*. Les bases de l'*uncus* sont différentes, plus étirées chez *B. segeta* et plus ramassées et épaisses chez *B. phaia*. Le *cucullus* est la partie la plus différente : la partie A est plus pointue chez *B. segeta*, la partie B est très épaisse et sclérifiée chez *B. phaia*. Le *cucullus* de *B. phaia* présente en partie C des sortes de crochets pointus et sclérifiés, partie beaucoup plus petite chez *B. segeta* et même absente chez certaines (N=4 sur 9 dissections). Nous n'avons pas pu distinguer les pièces génitales des *B. phaia* selon qu'elles proviennent de Kisii (N=2) ou de Kakamega (N=3).

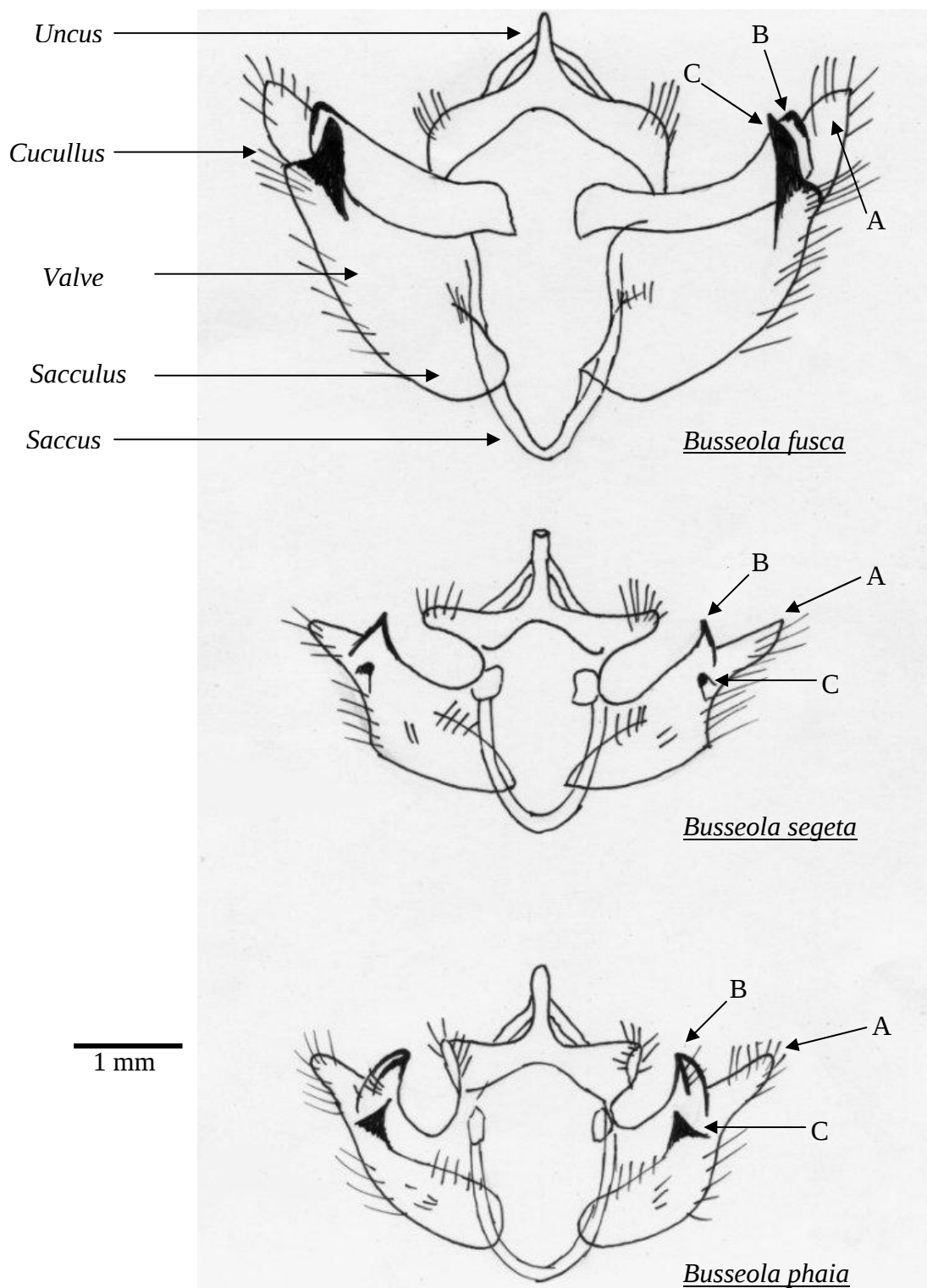


Figure 25 : Dessin des trois génitalias de *Busseola fusca*, *Busseola segeta* et *Busseola phaia* (agrandissement x 17).

### 3. Discussion et conclusion

Le premier facteur de l'isolement reproducteur entre ces espèces est la période de reproduction, qui se situe plus tôt dans la scotophase pour les *B. phaia*, qu'elles soient de Kisii ou de Kakamega. La différence observée entre les phéromones des femelles *B. fusca* d'une part et celles des femelles *B. phaia* et *B. segeta* d'autre part consiste en la présence d'un composé supplémentaire, le Z11-14:OH, dans le mélange attractif de *B. phaia* et *B. segeta*. Cette différence confirme la séparation entre *B. fusca* et *B. phaia* / *B. segeta*. Par contre, les phéromones de ces deux dernières sont constituées par les mêmes composés, ce qui confirme leur proximité. La différenciation phéromonale entre les femelles des trois populations de *B. phaia*, Kisii et Kakamega, et de *B. segeta* étudiées se réalise par des différences de ratio d'un ou plusieurs composés attractifs et non dans le nombre de composés présents dans le mélange phéromonal. Selon leur situation géographique, les différences dans les compositions phéromonales sont plus ou moins marquées.

L'interattraction des mâles de chaque espèce par les femelles d'une autre varie en fonction des espèces ou populations considérées, que ce soit dans les expériences en tunnel de vol ou lors du piégeage sur le terrain. Dans ces deux types d'expériences, nous remarquons que l'interattraction entre *B. fusca* et les deux autres espèces est possible et que le composé surnuméraire présent dans la phéromone de *B. phaia* et *B. segeta* n'est pas suffisant pour assurer un isolement reproducteur complet. Ceci est intéressant puisque s'il existe une allochronie du comportement sexuel entre *B. phaia* et *B. fusca*, ce n'est pas le cas entre *B. segeta* et *B. fusca*. De même, si on se réfère aux tests en tunnel de vol, nous remarquons que les mâles de *B. fusca* répondent mieux aux femelles *B. segeta* qu'aux femelles *B. phaia*. Cela est confirmé par les données du piégeage sexuel dans la nature. Les aspects comportementaux tendent à montrer que *B. fusca* est plus isolé de *B. phaia* que de *B. segeta*.

Si on s'intéresse à la composition des phéromones produites par les trois femelles et que l'on ne tient pas compte de la présence du Z11-14:OH, les deux mélanges phéromonaux de *B. fusca* et de *B. segeta* sont les plus ressemblants, avec le même ratio phéromonal pour trois composés, le Z11-14:Ac, le E11-14:Ac et le Z11-16:Ac, sur les quatre présents. Dans les phéromones des femelles de *B. phaia* des deux populations, Kakamega et Kisii, seuls les ratios des Z- et E11-14:Ac sont communs avec le mélange phéromonal de *B. fusca*.

Le composé Z11-14:OH, présent dans les phéromones de *B. phaia* et *B. segeta*, ou les différences de ratio des autres composés phéromonaux, ont un effet sur une fraction significative de la population de mâles *B. fusca*. Les mâles qui répondent, sont capturés dans les pièges ou entrent en contact avec la phéromone d'une autre espèce sont intéressants, puisqu'ils peuvent permettre d'expliquer la possibilité de réponse de certains individus mâles à des phéromones qui ne sont pas produites par des femelles de leur espèce. Cette plasticité de réponse peut entrer en jeu dans les phénomènes de spéciation.

En tunnel de vol, les mâles qui présentent les temps de latence les moins importants sont les mâles *B. fusca*. Ces insectes proviennent de l'élevage, par rapport aux mâles de *B. phaia* et *B. segeta* qui proviennent de la nature. L'élevage peut avoir un effet sur les mâles, qui deviennent moins sensibles aux variations des ratios phéromonaux ou aux manipulations dans des conditions expérimentales de laboratoire.

Nous regrettons de ne pas avoir pu obtenir des informations sur les capacités d'attraction entre *B. phaia* et *B. segeta*, du fait du manque de matériels biologiques. Cependant les expérimentations en tunnel de vol et les résultats des analyses physico-chimiques valident la séparation des deux populations de *B. phaia* effectuée sur des données géographiques.

Les expériences de piégeages ne sont pas concluantes en ce qui concerne l'attraction des mâles *B. segeta* et il serait nécessaire de les poursuivre pour pouvoir statuer sur l'efficacité de ces pièges. Ceci peut être due à plusieurs causes : (i) la population de *B. segeta* était trop faible lors des essais de piégeage, (ii) le mélange contenu dans le piège *B. segeta* n'est pas assez attractif pour les mâles *B. segeta*, (iii) les périodes de vol ont peut-être été mal définies ou (iiii) les pièges ne sont pas situés dans le biotope de *B. segeta*.

Les pièges formulés pour attirer les mâles *B. phaia* dans la région de Kakamega sont très efficaces, autant que les pièges utilisés pour *B. fusca*. Néanmoins, la formulation du piège *B. segeta* est plus attractive vis-à-vis des mâles de *B. phaia* de Kakamega que la formulation réalisée sur la base de l'identification phéromonale des femelles *B. phaia* Kakamega. Il semble qu'un plus faible ratio de Z11-14:OH et un plus fort ratio de Z11-16:Ac que ceux observés dans les analyses phéromonales de *B. phaia* Kakamega, soient nécessaires pour attirer les mâles. Nous pouvons attribuer ces différences au poids moléculaire des différentes molécules phéromonales (Figure 26). L'acétate à 16 atomes de carbone est plus lourd et donc moins volatile que les acétates à 14 atomes de carbone : la quantité qui s'échappe de la capsule peut être moins importante que celle que l'on a déposée. Le phénomène est inversé pour le composé Z11-14:OH puisque les alcools à 14 atomes de carbones sont moins lourds

que les acétates à 16 atomes de carbones. Ces effets ont été observés en faisant des prélèvements SPME des capsules utilisées pour le tunnel de vol. La composition de l'attractif qui s'échappe des capsules *B. segeta* correspond plus, au niveau des ratios de composés, à la composition des femelles *B. phaia* Kakamega. Ce phénomène peut expliquer la faible attraction des pièges *B. segeta* pour les mâles *B. segeta*.

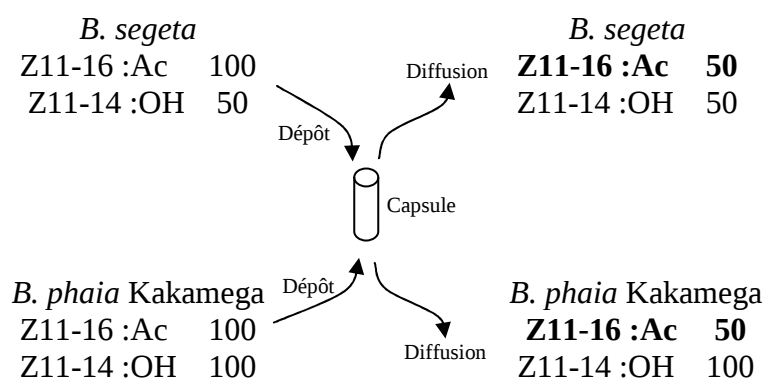


Figure 26 : Schéma des différences entre les quantités déposées et émises de composés phéromonaux sur les capsules utilisées en tunnel de vol.

L'isolement reproducteur entre ces espèces ou populations est le résultat de plusieurs modalités que nous pouvons résumer dans un schéma général en s'aidant d'une carte du Kenya (Figure 27). Par contre, avec nos données, nous ne pouvons pas statuer sur l'isolement reproducteur post-zygotique entre ces trois espèces. Les quelques expériences d'accouplement croisé et les comparaisons des pièces génitales mâles ne suffisent pas. De plus, la présence de la bactérie *Wolbachia*, voire de souches différentes et spécifiques de cette bactérie, n'est pas à exclure (Branca, Comm. Pers.). Ces bactéries pourraient provoquer un isolement post-zygotique entre les espèces ou les populations et des tests doivent être effectués pour pouvoir conclure. Les difficultés d'approvisionnement ou d'élevage des insectes ne nous ont malheureusement pas permis de tester les possibilités d'attraction et de croisement entre *B. segeta* et *B. phaia*. La composition phéromonale identique et la similitude des pièces génitales n'interdiraient pas une attraction et des accouplements croisés si ces taxons se retrouvaient en contact. A ce niveau cependant, l'allochronie des périodes d'activité reproductrice pourrait alors limiter les flux de gènes.

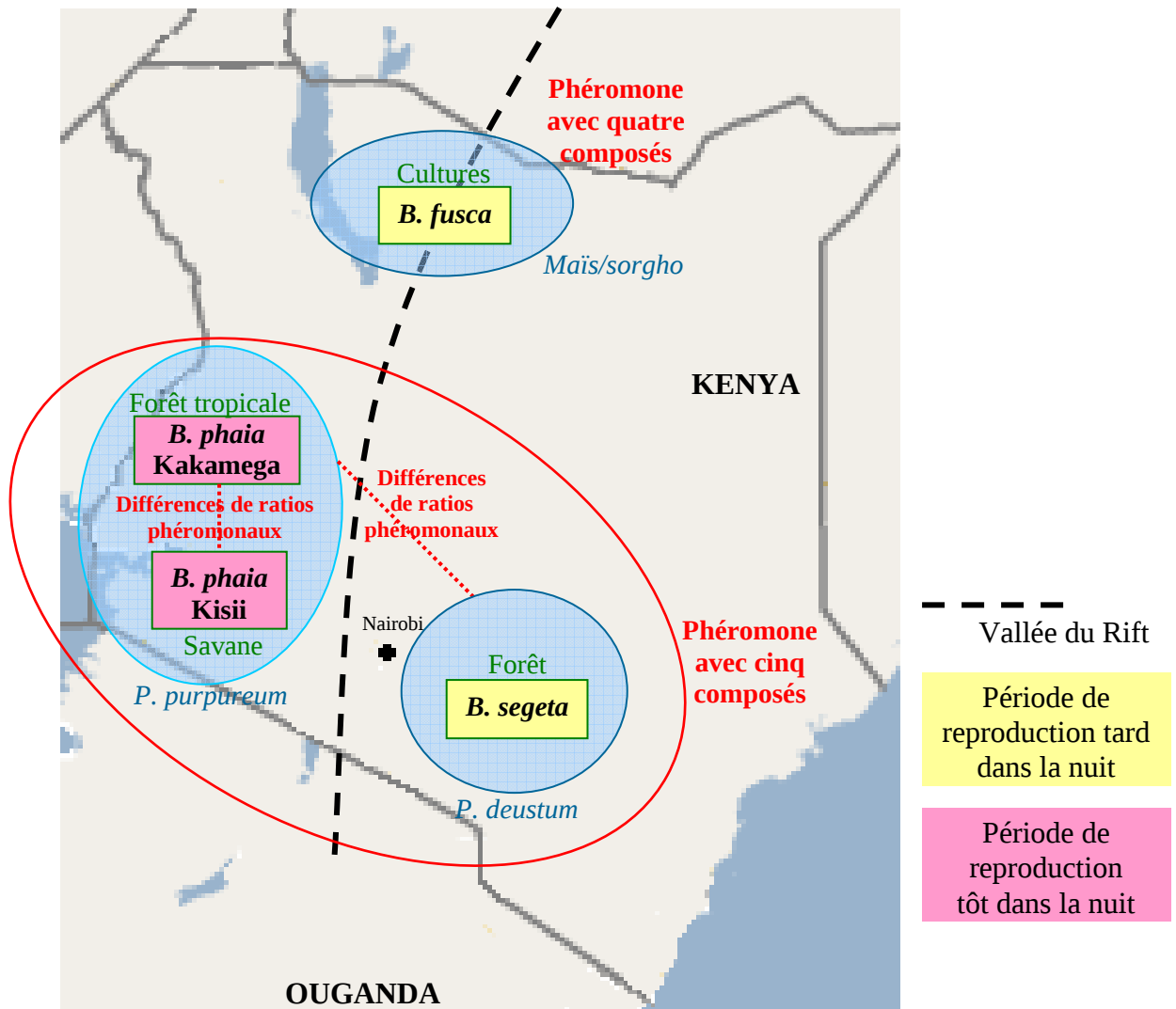


Figure 27 : Schéma représentant les caractéristiques intervenant dans l'isolement reproducteur entre les espèces du genre *Busseola*. Le trait pointillé noir représente la vallée du Rift.

## II. Approche moléculaire : étude du statut taxonomique de *Busseola phaia* et *Busseola segeta*

Au Kenya, les populations de *B. phaia* et de *B. segeta* sont séparées géographiquement par la vallée du Rift et écologiquement par la plante-hôte. *B. phaia* est présente à l'Ouest de la vallée du Rift sur une plante sauvage, *P. purpureum*, alors que *B. segeta* est présente à l'Est de la vallée du Rift sur une autre plante sauvage, *P. deustum* Bowden en 1956 les a décrites comme deux espèces sur la base de caractères morphologiques. Cependant, cette séparation en deux espèces est discutée par certains taxonomistes, qui posent l'hypothèse de deux sous-espèces (Le Rü et Moyal, Comm. Pers.). Il était donc nécessaire de revisiter la position systématique des deux espèces en s'appuyant sur les outils modernes de la biologie moléculaire.

Statuer sur l'existence de deux espèces versus un complexe de sous espèces peut permettre d'une part d'appréhender l'histoire phylogénétique des espèces appartenant au genre *Busseola*, et d'autre part, si on est face à des sous-espèces, d'étudier sur deux niveaux taxonomiques comment varie le système de reconnaissance : entre deux espèces avec *B. fusca* et au sein de sous-espèces dans le groupe *B. phaia/B. segeta*. La proximité taxonomique de *B. phaia* et de *B. segeta*, qui ne sont pas sympatriques entre elles mais qui le sont avec *B. fusca*, peut nous permettre de mieux comprendre comment le changement de plantes-hôtes ou la spécialisation à l'hôte ont pu agir sur les populations et sur la spéciation. L'isolement reproducteur associé à l'adaptation à des plantes-hôtes différentes est un des mécanismes impliqués dans la spéciation sympatrique. La différenciation populationnelle de l'espèce *B. fusca*, visible à l'aide de marqueurs mitochondriaux et nucléaires, est antérieure à l'introduction du maïs ou au début de la culture intensive du sorgho (Sezonlin *et al.*, 2006a). Cependant, si on émet l'hypothèse que la plante d'origine de *B. fusca* est le sorgho sauvage, *B. fusca*, *B. phaia* et *B. segeta*, ont pu se partager le compartiment sauvage, en se développant sur des plantes-hôtes différentes, et diverger l'une de l'autre via notamment une spécialisation sur des hôtes différents. La différenciation de ces espèces peut-être due aussi à l'apparition de discontinuités géographiques, comme l'apparition de la vallée du Rift. La datation des divergences respectives de *B. fusca*, *B. phaia* et *B. segeta* va nous permettre de discuter ces diverses hypothèses et d'envisager plusieurs scénarii évolutifs.

Pour cette approche, nous avons choisi d'utiliser un locus mitochondrial, un fragment du gène codant pour le *cytochrome b*. En effet, ce marqueur a déjà montré son utilité pour d'autres

espèces, notamment pour l'étude de la structuration des populations chez *B. fusca* (Sezonlin *et al.*, 2006a et b) et est un outil informatif lorsque l'on s'intéresse à des espèces au sein d'un même genre chez les Lépidoptères (Simmons et Weller, 2001). L'analyse à l'aide d'un marqueur mitochondrial est courante pour les études en systématique et en phylogéographie (Avisé *et al.*, 1987). L'ADN mitochondrial présente plusieurs avantages qui en font un marqueur de choix dans les analyses phylogénétiques: son taux de mutation moyen est connu et son taux d'évolution est suffisamment rapide pour que l'apparition de nouveaux caractères soit comprise dans la durée de vie de l'espèce ; il est transmis uniquement par la mère et est sélectivement neutre. Les études de systématique basées sur l'analyse des séquences d'ADN mitochondrial font l'hypothèse que la phylogénie obtenue représente l'histoire évolutive des espèces observées. Des populations, entre lesquelles on observe un flux de gènes, ne seront pas différenciées par un marqueur nucléaire variable, alors qu'on peut constater une divergence à l'aide du marqueur mitochondrial. Ceci indique que ces populations se sont séparées, ont divergé, puis ont été remises en contact secondairement. Par exemple, au Kenya, l'espèce *B. fusca* est séparée en deux clades d'haplotypes pour un marqueur mitochondrial (Sezonlin *et al.*, 2006a), mais ces deux clades ne sont plus différenciés lorsqu'on utilise les marqueurs nucléaires du type microsatellites. Le second marqueur que nous avons utilisé est nucléaire, le gène de la protéine ribosomale *L5* ou *RpL5*, qui contient deux régions introniques hautement variables. Le gène *RpL5* apparaît pertinent pour étudier les relations entre des taxons très proches (Mallarino *et al.*, 2005). Les locus microsatellites étant difficiles à obtenir et à mettre au point chez les Lépidoptères et non conservés au sein du même genre, nous n'avons pas pu nous servir des microsatellites identifiés chez *B. fusca* sur les deux autres espèces, *B. segeta* et *B. phaia*.

L'approche en systématique moléculaire et en phylogéographie des espèces chez les lépidoptères produit des résultats qui permettent de réviser des complexes d'espèces et de retracer leur histoire. Pour ne citer qu'un exemple, cette approche a permis de démontrer que *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera : Thaumetopoeidae) et *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams ont divergé il y a environ cinq millions d'années et que ce sont bien deux espèces distinctes (Salvato *et al.*, 2002), alors que leur morphologie sont peu différente et que les deux espèces ont gardées le même système de rencontre des partenaires sexuels, avec des phéromones sexuelles identiques (Frérot *et al.*, 1990 ; Frérot et Démolin, 1993).

## 1. Matériels et méthodes

Tous les protocoles de biologie moléculaire utilisés dans ce chapitre pour *B. phaia* et *B. segeta* sont identiques ou dérivent de ceux précédemment utilisés pour *B. fusca*.

**Extraction.** Les ADN des individus étudiés, conservés dans l'alcool absolu, sont extraits à partir du thorax et des pattes, par le kit d'extraction DNeasy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN). Tous les insectes provenant du Kenya caractérisés génétiquement par le marqueur mitochondrial ou le marqueur nucléaire correspondent à des insectes qui ont été testés précédemment, soit pour une identification phéromonale en ce qui concerne les femelles, soit lors de tests d'attraction croisée pour les mâles.

**Marqueur mitochondrial.** Les amplifications sur le fragment du gène mitochondrial codant pour le cytochrome *b* sont réalisées dans les conditions suivantes : une dénaturation initiale à 94°C, suivie par 40 cycles de 1min à 94°C, 1min30 à 46°C, 1min30 à 72°C, puis une extension finale à 72°C pendant 5min.

Pour obtenir l'intégralité du fragment du gène mitochondrial codant pour le cytochrome *b*, nous avons utilisé, des amorces internes au fragment du gène (figure 27). Ces amorces internes permettent de séquencer le fragment du gène en deux fois depuis l'intérieur du gène jusqu'aux extrémités. En couplant les deux séquences obtenues, nous obtenons la séquence complète du fragment étudié. En utilisant uniquement les amorces entourant le gène, il arrive que le séquençage des extrémités ne soit pas correct ou lisible. Les couples d'amorces utilisés sont les suivants (Figure 28). L'amorce *CB3H* : 5' AGC AAA TAA AAA ATA TCA TTC 3' est utilisée avec l'amorce *CP1* décrite pour *B. fusca* (page 119) et l'amorce *CB1* : 5'TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC 3' est utilisée avec l'amorce *Tser* décrite pour *B. fusca* (page 119).

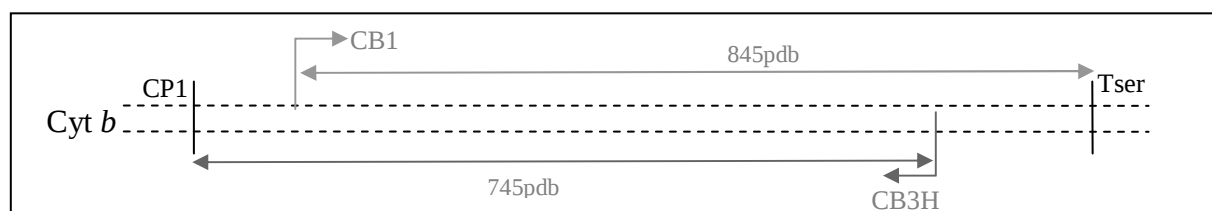


Figure 28 : Schéma du fragment du gène mitochondrial codant pour le cytochrome *b* avec les amorces internes utilisées lors des séquençages de *Busseola segeta* et *Busseola phaia*

Le séquençage est précédé d'une purification avec un kit QIAquick® (PROMEGA). Cette purification permet d'éliminer toutes les sources de pollutions, qui restent après la réaction de PCR et qui peuvent nuire au séquençage des fragments amplifiés: protéines liées à l'ADN, nucléotides libres. Les fragments purifiés du gène étudié sont solubilisés dans de l'eau.

Le séquençage du fragment du gène codant pour le cytochrome *b* des individus de *B. segeta* et de *B. phaia* est effectué au moyen de séquenceurs automatiques Applied Biosystems International PRISM®310 et 3100. Il faut préalablement déterminer la concentration d'ADN à séquencer pour vérifier qu'elle n'est pas inférieure aux limites acceptées par l'appareil : de 50 à 100 ng pour fournir un résultat optimal. Pour cela, une électrophorèse est réalisée sur les fragments issus de la PCR et purifiés, en plaçant en référence, un marqueur de quantité (Invitrogen) concentré à 25ng/μl. Sur le gel, si les bandes sont de taille et de brillance à peu près équivalentes au marqueur de quantité, elles ont la même concentration (1μl de la solution contient donc 25ng d'ADN). La réaction de séquençage se fait de la façon suivante. L'incorporation d'un didésoxyribonucléotide (ddNTP) à la place d'un désoxyribonucléotide (dNTP) provoque l'arrêt de l'allongement de la chaîne d'ADN. Les ddNTP sont marqués spécifiquement par des molécules fluorescentes différentes (A vert, C bleu, G jaune et T rouge). Les fragments synthétisés sont ensuite séparés par électrophorèse. Un système optique laser détecte la fluorescence portée par le fragment et l'on obtient un fluorogramme. Un logiciel d'analyse spécifique au séquenceur permet de faire la correspondance entre les courbes de fluorescence et le nucléotide incorporé.

Les séquences obtenues sont traitées avec le programme BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.4.1 (©1997-2005 Tom Hall, [www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)). Ces séquences seront alignées et comparées à l'aide de séquences d'individus de *B. fusca* : un haplotype Est I, un haplotype Est II et un haplotype Ouest, précédemment séquencés (Sezonlin *et al.*, 2006a). La construction de l'arbre phylogénétique en utilisant la méthode du maximum de parcimonie. Les valeurs de *bootstrap* ont été obtenues en effectuant 1000 répétitions. La construction de l'arbre en maximum de parcimonie et le calcul des degrés de divergence ont été réalisés avec le programme Mega version 4.0 (©1997-2005, Kumar *et al.*, 2004, <http://www.megasoftware.net/>). L'extragroupe utilisé est représenté par une séquence de *S. nonagrioides* (Lepidoptera : Noctuidae).

Les populations, qui ont été séquencées pour le marqueur mitochondrial (N=130 individus), sont les suivantes (Figure 29) : 29 individus de la population *B. phaia* prélevés sur *P. purpureum* dans la forêt tropicale humide de Kakamega à l'Ouest du Kenya ; 46 individus de la population *B. phaia* prélevés sur *P. purpureum* dans la savane de la région de Kisii à l'Ouest du Kenya ; 50 individus de la population de *B. segeta* prélevés sur *P. deustum* dans la forêt ombrophile dans la région de Race course à l'Est du Kenya ; 3 individus de *B. phaia* provenant de la localité d'Ordoto en Tanzanie et 3 individus de la population de *B. phaia* provenant de la localité de Kerere forest en Ouganda.



Figure 29 : Carte indiquant la position des prélèvements des populations de *Busseola segeta* et *Busseola phaia* au Kenya, en Ouganda et en Tanzanie.

**Marqueur nucléaire.** Nous avons utilisé un protocole mis au point au laboratoire (Capdevielle-Dulac *et al.*, résultats non publiés). Les conditions d'amplification du gène RpL5 sont les suivantes : une dénaturation initiale à 95°C pendant 6min, suivie par 35 cycles de 45 sec à 95°C, 50 sec à 63°C, 1min à 72°C, puis une extension finale pendant 10min à 72°C. La Taq polymérase utilisée est la Taq Gold d'Applied Biosystems. Le séquençage du gène nucléaire RpL5 se fait dans les mêmes conditions que celles décrites pour le marqueur mitochondrial. Certaines séquences ne sont pas exploitables directement : la quantité d'ADN obtenue par PCR est trop faible ou des fragments non cibles sont amplifiés à cause d'un

manque de spécificité des amorces. Il a alors été nécessaire d'utiliser une méthode de clonage par vecteur plasmidique pour certains individus. L'intégration du fragment RpL5 amplifié au vecteur PCR2 (ou ligation) est réalisée avec le kit de ligation Invitrogen (TA Cloning Dual Promoter). Les bactéries compétentes utilisées sont de la souche DH5  $\alpha$  d'*Escherichia coli* (2  $\mu$ l de ligation pour 100  $\mu$ l de bactéries compétentes). Le vecteur de clonage PCR2 porte un gène de résistance à l'ampicilline et un gène permettant de synthétiser la X-gal (coloration bleu en présence de X-gal, blanche sinon). Les bactéries résistantes à l'ampicilline (100  $\mu$ g par ml) et se colorant en blanc en présence de X-gal (80  $\mu$ g par ml) sont sélectionnées car elles possèdent le vecteur ayant intégré l'insert d'ADN cible. L'extraction et la purification de l'ADN du vecteur sont réalisées à l'aide du kit Promega Wizard SV PLUS Minipreps. Cette méthode consiste à détruire les bactéries par lyse chimique et séparer l'ADN du vecteur de l'ADN bactérien. La réaction de séquence sur les plasmides est faite en utilisant des amorces spécifiques du vecteur de clonage (SP6 et T7), qui encadrent la zone d'insertion du fragment d'ADN cloné.

Les populations, qui ont été séquencées pour le marqueur nucléaire (N=22 individus), sont les suivantes : cinq individus de la population de *B. phaia* provenant de la forêt de Kakamega, six individus de la population de *B. phaia* provenant de la région de Kisii, sept individus de la population de *B. segeta* provenant de la région de Race course, deux individus *B. phaia* provenant d'Ouganda et un individu *B. phaia* provenant de Tanzanie. L'arbre a été réalisé à l'aide du logiciel PAUP\* version 4.0 (Swofford (2003), Sinauer Associates, Massachusetts) en utilisant la méthode de parcimonie (1000 répétitions) et prenant comme extragroupe, la séquence de *Sesamia calamistis* (Hampson) (Lepidoptera : Noctuidae).

*Construction d'arbres phéromonaux.* Avec le logiciel *Mesquite* 1.0.6 (Maddison et Maddison, 2005 ; <http://mesquiteproject.org>) et la méthode de reconstruction par parcimonie, nous pouvons coder les ratios des composés phéromonaux comme des caractères et les inclure dans un arbre phylogénétique avec un code de couleur. Les analyses ont été réalisées par Branca *et al.* (Comm. Pers.).

## 2. Résultats

*Marqueur mitochondrial.* L'arbre phylogénétique construit en maximum de parcimonie à partir des séquences d'un fragment du gène mitochondrial codant pour le cytochrome *b* est représenté sur la Figure 30. Nous avons regroupé les individus de la population de *B. segeta* dans un triangle pour réduire la taille de l'arbre phylogénétique. Le détail de la population de *B. segeta* est présenté sur la Figure 30. Le cladogramme montre que le groupe comprenant les populations de *B. fusca* se distingue parfaitement des autres populations. Les populations de *B. phaia* provenant de Kakamega, de *B. phaia* provenant de Kisii, de *B. segeta* provenant de Race course et les *B. phaia* provenant d'Ouganda et de Tanzanie sont situées dans le même groupe phylétique. Au sein de ce groupe, on distingue trois clades. Un premier clade rassemble les individus de la population des *B. phaia* provenant de Kakamega, mais contient aussi trois individus de la population des *B. phaia* de Kisii (individus soulignés). Le second clade regroupe les individus *B. phaia* provenant de la localité Kerere forest en Ouganda. Le troisième clade se partage en deux. Premièrement, se regroupent les individus de la population des *B. phaia* provenant de Kisii, ainsi qu'un individu *B. phaia* de Kakamega (souligné). Deuxièmement, un clade contient tous les individus de *B. segeta*, ainsi que les deux individus *B. phaia* provenant de la localité d'Ordoto en Tanzanie. Les valeurs de *bootstrap* obtenues sont assez importantes (>97), sauf pour la séparation entre les *B. phaia* de Kisii et les *B. segeta* (valeur du nœud = 48). L'arbre obtenu montre que *B. phaia* ne constitue pas une entité monophylétique, mais s'avère paraphylétique compte tenu de la présence de la population *B. segeta*.

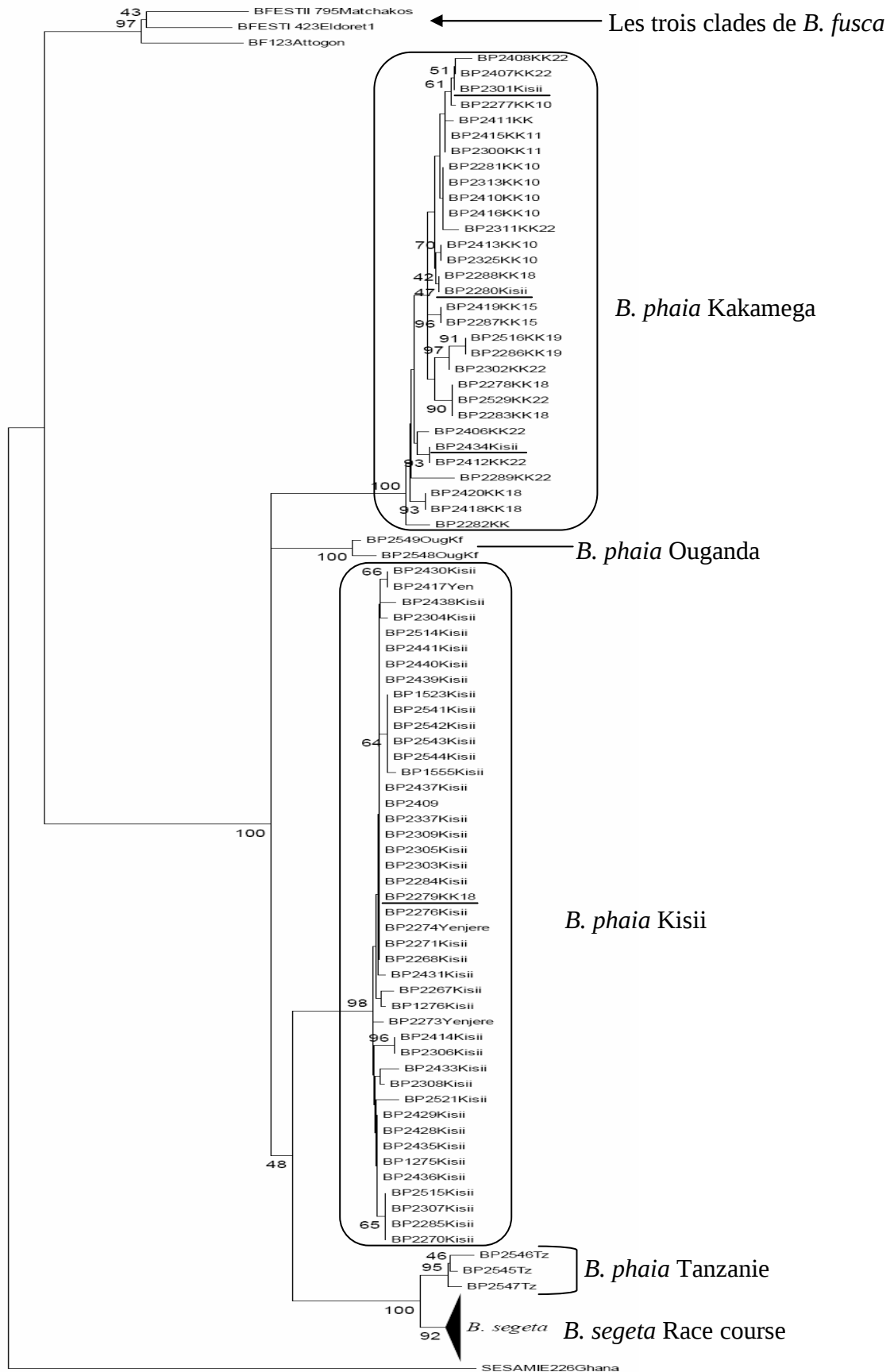


Figure 30 : Arbre phylogénétique réalisé en maximum de parcimonie (1000 répétitions) avec le logiciel Mega 4 à partir des individus de *B. fusca* appartenant aux trois clades d'haplotypes et des individus de *B. phaia* et de *B. segeta* d'origines différentes. L'extragroupe est *S. nonagrioides*.

Les pourcentages de divergence sont décrits dans le tableau 6. En moyenne, le pourcentage de divergence entre les *B. fusca* et l'ensemble *B. phaia/B. segeta* est de 7%. Cette valeur, qui se situe dans la moyenne basse des distances observées entre deux espèces de Lépidoptères Noctuidae (Silvain, Comm. Pers.), nous servira de référence lors de la discussion portant sur le statut spécifique de *B. phaia* et *B. segeta*. En comparaison, les divergences entre l'extragroupe, *S. nonagrioides*, et les espèces du genre *Busseola* est de 9,7% en moyenne et de 8% avec *B. fusca*.

La divergence génétique est de 4.5% entre *B. segeta* et *B. phaia* Kakamega et de 3.5% entre *B. segeta* et *B. phaia* Kisii. Les populations de *B. phaia* Kakamega et de *B. phaia* Kisii présentent entre elles un degré de divergence de 3.6%. Ces valeurs sont significativement plus faibles que la référence correspondant à la divergence entre *B. fusca* et l'ensemble *B. phaia/B. segeta* (7%). Le clade qui diverge le plus fortement est celui qui contient les *B. segeta* et c'est aussi celui qui est le plus homogène, c'est-à-dire qu'il ne contient que des individus identifiés comme étant des *B. segeta*. Les *B. phaia* provenant de Tanzanie, qui sont proches de ce clade *B. segeta* (1.2% de divergence), ont peut-être été mal identifiées. De plus, les *B. phaia* provenant d'Ouganda sont les plus proches du clade contenant les *B. phaia* de Kisii (2.4%) de divergence.

|                          | <i>B. fusca</i> | <i>B. phaia</i><br>Kisii | <i>B. phaia</i><br>Ouganda | <i>B. phaia</i><br>Kakamega | <i>B. segeta</i> | <i>B. phaia</i><br>Tanzanie |
|--------------------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------------|
| <i>B. phaia</i> Kisii    | 7.3%            |                          |                            |                             |                  |                             |
| <i>B. phaia</i> Ouganda  | 7.1%            | 2.4%                     |                            |                             |                  |                             |
| <i>B. phaia</i> Kakamega | 7.1%            | 3.6%                     | 3.4%                       |                             |                  |                             |
| <i>B. segeta</i>         | 6.5%            | 3.4%                     | 3.9%                       | 4.5%                        |                  |                             |
| <i>B. phaia</i> Tanzanie | 7.1%            | 3.5%                     | 3.7%                       | 4.3%                        | 1.2%             |                             |
| <i>S. nonagrioides</i>   | 8%              | 9.6%                     | 9.8%                       | 9.7%                        | 10.4%            | 10.4%                       |

Tableau 6 : Taux de divergence calculés avec le programme Mega 4 et suivant le modèle de Kimura à deux paramètres.

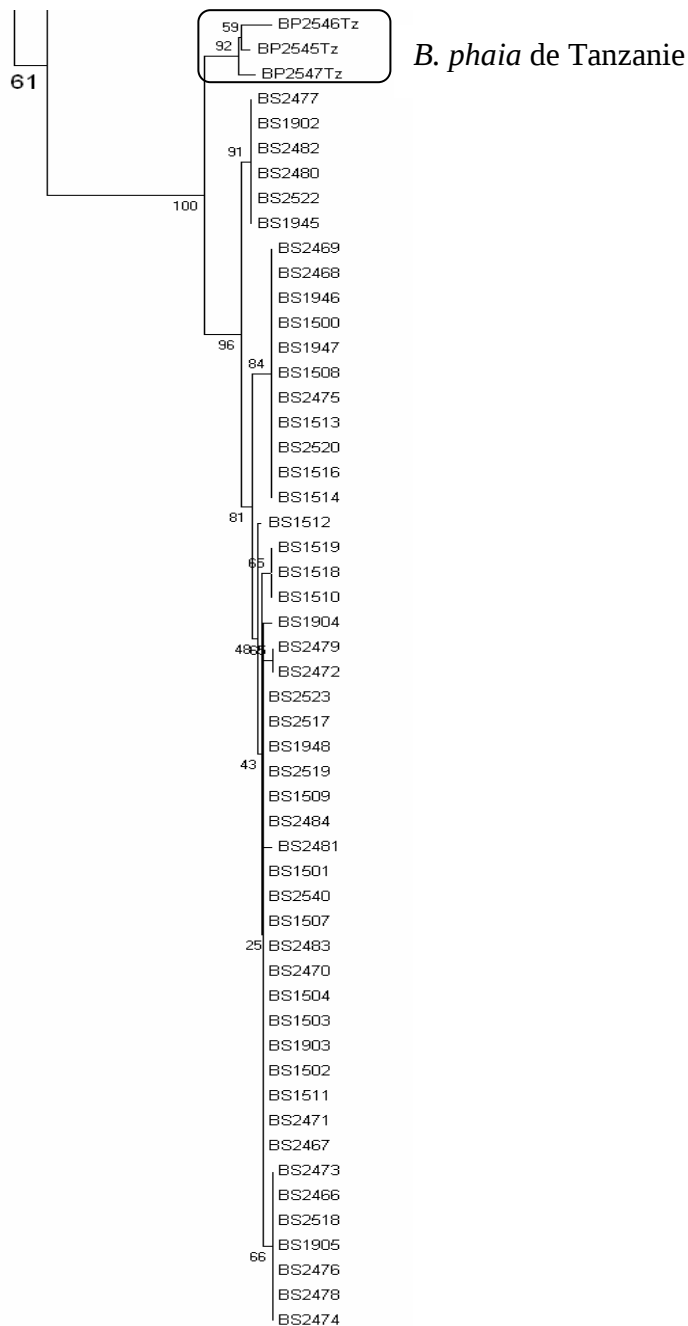


Figure 31 : Détail de l'arbre phylogénétique : la population homogène des *B. segeta*, associée aux *B. phaia* de Tanzanie.

**Marqueur nucléaire.** L'arbre phylogénétique (Figure 32) présentant les données du marqueur nucléaire RpL5 permet aussi de distinguer des clades d'individus, même si les populations apparaissent beaucoup moins homogènes que précédemment. Quelques groupes se séparent, comme pour les clades mitochondriaux, et ces séparations suivent les données géographiques. Un premier clade regroupe quatre des cinq individus de la population de *B. phaia* provenant de Kakamega (groupe mitochondrial des *B. phaia* de Kakamega, Figure 30). Le cinquième individu est isolé. Les six individus de la population de *B. phaia* de Kisii sont regroupés dans

un même clade et, présents avec eux, se trouvent les deux individus prélevés en Ouganda. Dans cet arbre, les *B. phaia* de Kisii et ceux d'Ouganda sont mélangés. La population de *B. segeta* est séparée en deux groupes : un qui comprend cinq individus de *B. segeta* et l'autre deux individus de *B. segeta* et un *B. phaia* provenant de Tanzanie. Ce rapprochement est congruent avec l'information apportée par la topologie obtenue avec le marqueur mitochondrial (Figure 30).

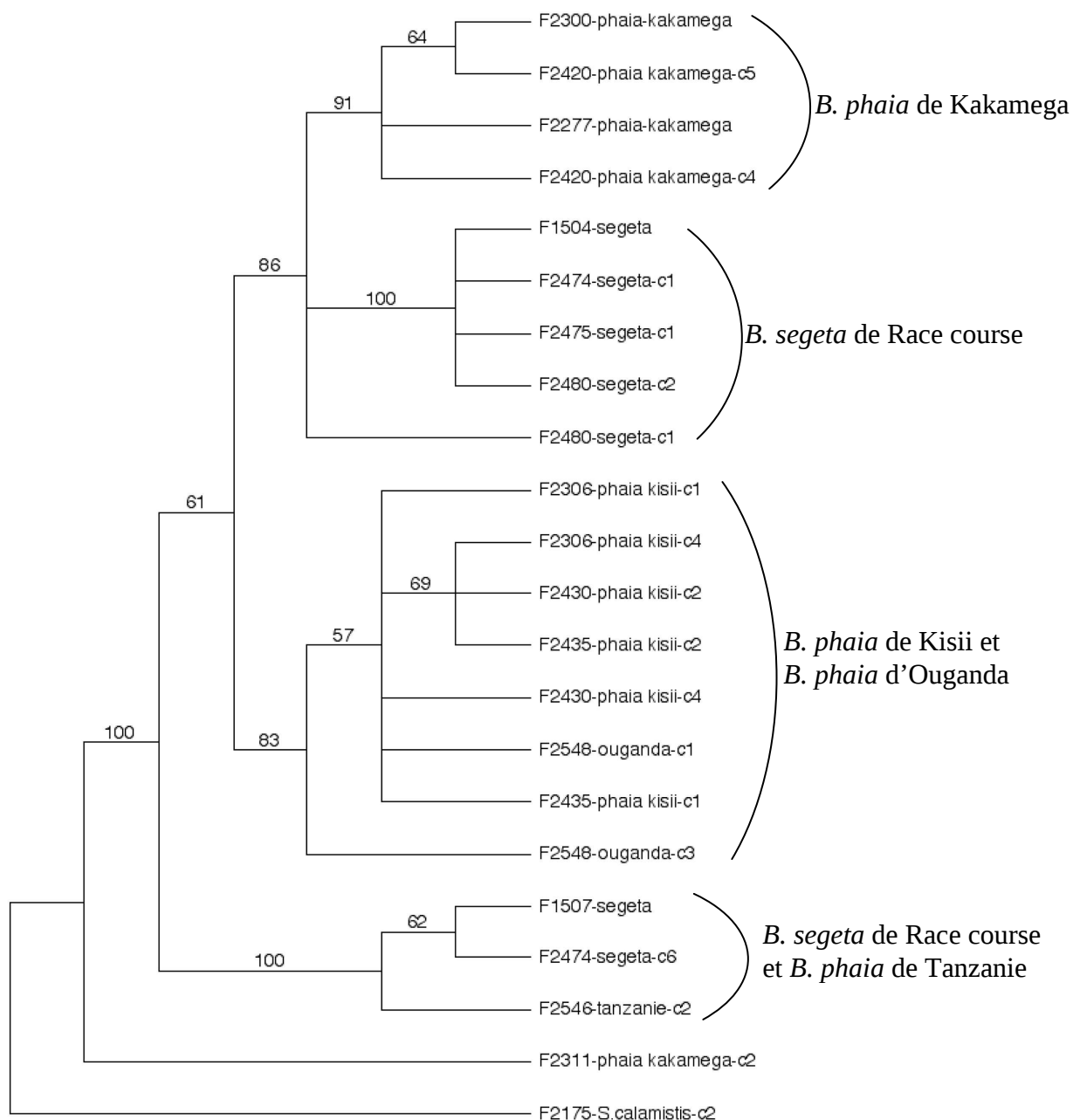


Figure 32 : Arbre phylogénétique réalisé avec la méthode de parcimonie (1000 répétitions) avec le logiciel Paup 4 à partir des individus de *B. phaia* et de *B. segeta* d'origines différentes. L'extragroupe est *S. calamistis*.

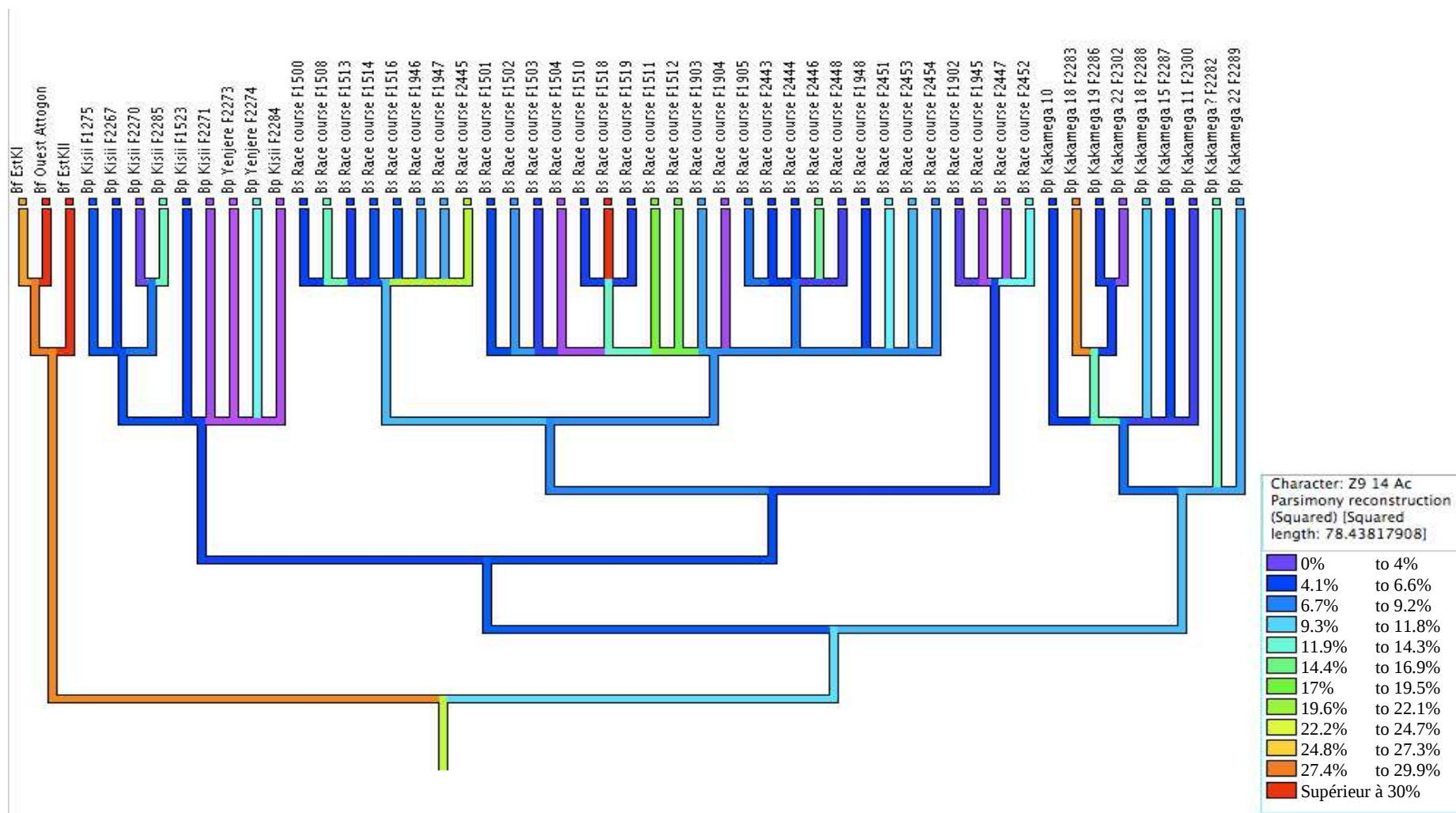


Figure 33 : Arbre représentant les ratios du composé phéromonal par rapport à l'arbre phylogénétique construit à l'aide du marqueur mitochondrial.

*Arbres phéromonaux.* Les arbres phéromonaux sont représentatifs des différences significatives observées entre les espèces ou populations dans la partie d'écologie chimique. Nous allons décrire un seul arbre, qui correspond au composé Z9-14:Ac dont la différence de ratios est significative entre les femelles de *B. fusca* et les femelles de *B. phaia* et *B. segeta*. L'arbre phéromonal (Figure 33) montre que les individus de *B. fusca* diffèrent des autres individus par les couleurs orangées correspondant à un fort ratio.

### 3. Discussion et conclusion

Les résultats obtenus confirment le statut de bonne espèce de *B. fusca* et suggèrent, compte tenu principalement de la non monophylie de *B. phaia*, qu'il convient de redéfinir le statut taxonomique de *B. phaia* et *B. segeta*. Si l'on se réfère à Brower (1994), les pourcentages de divergence observés entre les séquences du gène mitochondrial codant pour le cytochrome *b* situent la séparation entre *B. fusca* et l'ensemble *B. phaia* / *B. segeta*, il y a environ trois millions d'années (Figure 34).

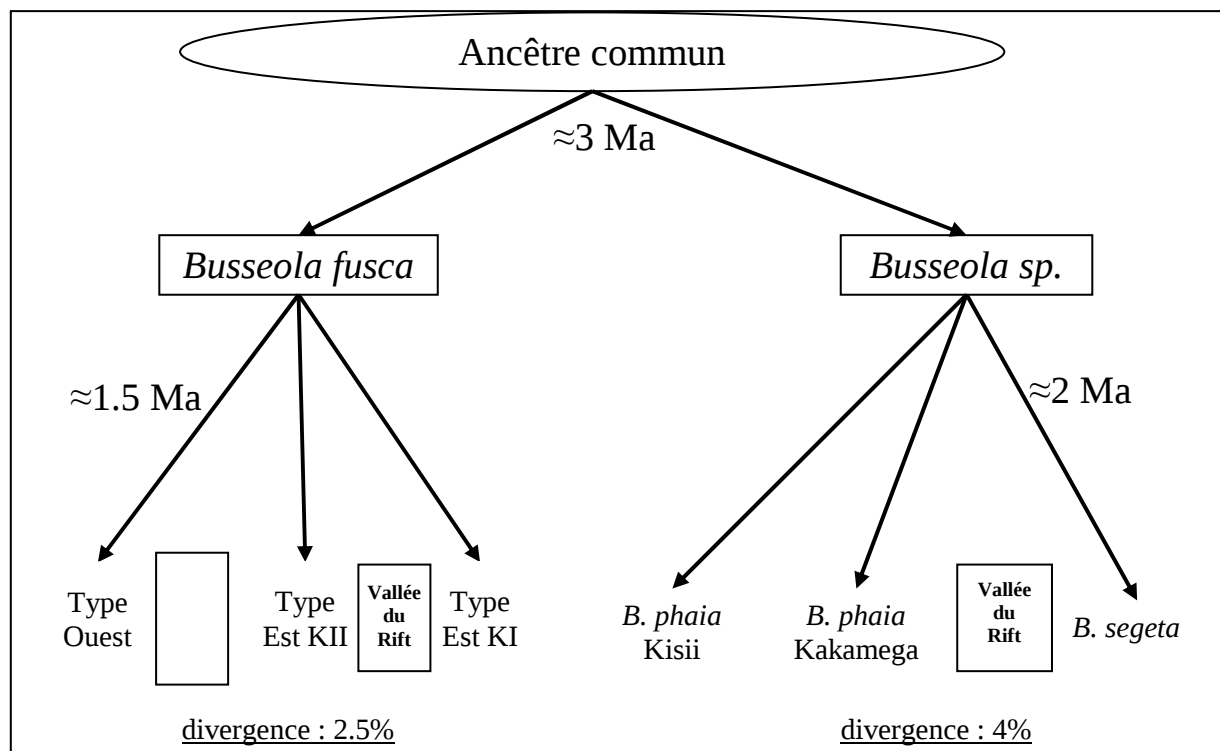


Figure 34 : Schéma d'une hypothèse évolutive réalisée à partir des données de phylogénie entre les espèces du genre *Busseola*. LVC = Ligne Volcanique du Cameroun et Ma = millions d'années.

Deux résultats importants vont dans le sens d'une redéfinition du statut spécifique de *B. phaia* et *B. segeta*. D'une part la paraphylie de *B. phaia* pourrait inciter à la définition d'une seule espèce constituée de plusieurs populations. D'autre part, les taux de divergence observés entre les différents clades regroupant les individus considérés comme appartenant à l'une ou l'autre de ces espèces, dans leur acceptation taxonomique initiale, peuvent donner lieu à une discussion. Pour cela, nous pouvons prendre en compte d'autres genres de Lépidoptères, dont les espèces ou populations ont été antérieurement définies. Il ne nous appartient pas ici de procéder à un acte de nomenclature, nous pouvons cependant préciser quelles pourraient être les options à considérer pour redéfinir le statut taxonomique de *B. phaia* et *B. segeta*, en nous basant sur la topologie des arbres mitochondrial et nucléaire. Dans notre cas, les taux de divergence sont observés pour le fragment du gène mitochondrial codant pour le cytochrome *b*, qui évolue sensiblement plus vite que le gène mitochondrial codant pour la cytochrome oxydase *I* (COI) chez les Lépidoptères Noctuidae. Les taux de divergence entre les principaux clades définis au sein du groupe *B. phaia* / *B. segeta* sont de l'ordre de 4%. Cette valeur est supérieure à ce qui est observé entre les trois clades mitochondriaux de *B. fusca* (2,5%) ou à ce qui est observé entre les races d'hôtes de *S. frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae), qui présentent un taux de divergence de 2.3% (Prowell *et al.*, 2004 ; Lewter *et al.*, 2006). Ce taux de divergence dans le groupe *B. phaia* / *B. segeta* est pourtant inférieur à ce qui est couramment observé pour le même fragment de gène mitochondrial entre deux espèces dans le genre *Busseola* : 7% entre *B. fusca* et le groupe *B. phaia/B. segeta*. Cette divergence est aussi inférieure à celle trouvée entre deux espèces de genre différent : 8% entre *B. fusca* et *S. nonagrioides* ; ou encore entre deux espèces éloignées du même genre : 8% dans le genre *Spodoptera*, entre par exemple *S. litura* et *S. descoinsi* (Silvain, Comm. Pers.).

Cependant, la divergence de 4% observée dans le groupe *B. phaia* / *B. segeta* est légèrement inférieure ou identique à celle observée entre des espèces cette fois phylogénétiquement proches dans le genre *Spodoptera* : *S. littoralis* et *S. litura* (Fabricius) (Silvain, comm. pers.). D'autres exemples montrent (i) soit des taux de divergence très faibles entre deux espèces, seulement 2,3% de divergence pour le gène mitochondrial codant pour le COI entre des espèces du genre *Ostrinia* (Roelofs *et al.*, 2002) ; (ii) soit des taux de divergence très élevés entre des populations écologiques (Salvato *et al.*, 2002).

Dans notre cas, si on considère qu'une distance génétique de 4% peut, chez les Lépidoptères Noctuidae, constituer un seuil de divergence spécifique, on se trouverait alors devant cinq taxons différents, qu'il conviendrait de redéfinir ultérieurement et de nommer. En particulier, le terme de l'espèce *B. phaia* perdrait sa signification en raison de la paraphylie du groupe et

correspondrait alors à plusieurs taxons différents. Ce seuil de 4% demande toutefois à être validé dans le cas du genre *Busseola* et des genres voisins comme le genre *Sesamia*.

Alternativement, une autre hypothèse ne doit pas être négligée. Nous pouvons être face à l'existence d'une seule espèce rassemblant cinq populations différenciées qui, compte tenu des degrés de divergence observés, pourraient être considérées comme des sous-espèces géographiques et écologiques proches. Il est clair que nous nous trouvons ici face soit à des populations très divergentes en voie de spéciation, soit à des espèces étroitement apparentées. Nos résultats nécessitent l'augmentation de l'échantillonnage à d'autres régions géographiques au Kenya ou dans d'autres pays, pour pouvoir statuer sur les valeurs des taux de divergence. Comme pour *B. fusca* (Sezonlin *et al.*, 2006a et 2006b), les clades de *B. segeta* et *B. phaia* diffèrent par leur situation géographique. Plusieurs populations géographiques se définissent selon que les individus proviennent de la région de Race course (*B. segeta*), de Kisii (*B. phaia*), de Kakamega (*B. phaia*) ou de pays proches du Kenya (Ouganda et Tanzanie). Les résultats de l'analyse à l'aide du marqueur nucléaire du gène RpL5 tendent à confirmer le fait que *B. segeta* et *B. phaia* doivent plutôt être considérées comme des sous-espèces ou des populations au sein de la même espèce, comme le suggéraient Le Rü et Moyal (Comm. Pers.) sur la base des caractères morphologiques.

Le code international de nomenclature zoologique (<http://www.iczn.org/iczn/index.jsp>) nous indique que dans le cas d'un regroupement de deux espèces en une seule, il faut donner à cette espèce le plus ancien nom validé par la commission internationale, selon le principe de priorité. Pour *B. phaia* et *B. segeta*, l'auteur (Bowden) a nommé ces espèces dans le même article en 1956, ce qui ne nous permet pas de faire un choix de priorité du nom *phaia* par rapport au nom *segeta*.

La présence d'haplotypes de *B. phaia* de Kisii dans la population de Kakamega et inversement, peut résulter de flux de gènes entre ces deux populations. Ces flux sont à mettre en relation soit avec des capacités de déplacement propres à certains insectes, soit avec l'action de l'homme qui, par le transport de plantes pour l'alimentation du bétail, déplace les populations d'une zone géographique à une autre. Ces flux ont été montrés entre trois clades d'haplotypes mitochondriaux de *Ips pini* (Say) (Coleoptera : Scolytidae) aux Etats-Unis à l'aide d'un marqueur mitochondrial. Des haplotypes du clade I sont présents dans les clades II et III et prouvent l'existence d'un flux de gène de l'Est vers l'Ouest, probablement dû à la proximité des régions refuges pendant les périodes glaciaires (Cognato *et al.*, 1999). Dans le cas de *S. frugiperda*, l'existence de tels déplacements d'individus de la lignée « riz » vers le compartiment maïs a été montrée (Prowell *et al.*, 2004).

### III. Discussion générale du chapitre

En se fondant sur nos résultats à la fois d'écologie chimique et de phylogénie, nous pouvons observer des corrélations entre ces deux disciplines. Si nous prenons en compte les individus femelles dont nous avons pu identifier la phéromone sexuelle, les différentes espèces du genre *Busseola* se distinguent au niveau phylogénétique et aussi au niveau des composés et ratios des composés phéromonaux. *B. fusca* se distingue du groupe *B. phaia* / *B. segeta* par une phéromone à quatre composés, mais aussi par des différences de ratio de ces composés, la phéromone de *B. fusca* contient un ratio important de Z9-14:Ac.

Aux vues des différences de milieu de vie et de plantes-hôtes, des variations phéromonales, de la paraphylie de l'espèce *B. phaia* et des faibles degrés de divergence (distances génétiques inférieures à 4%), *B. phaia* Kisii, *B. phaia* Kakamega et *B. segeta* semblent être des « races » écologiques ou géographiques, voire phéromonales. Les mélanges phéromonaux des femelles *B. phaia* Kisii et des femelles *B. segeta* présentent la même quantité du composé alcool, Z11-14:OH, et d'un point de vue phylogénétique, ces deux espèces sont les plus proches. Par contre, elles sont plus éloignées génétiquement des femelles de *B. phaia* Kakamega, dont la phéromone comporte une grande quantité de Z11-14:OH. Les femelles *B. segeta* se séparent génétiquement des deux autres *B. phaia*, Kisii ou Kakamega, en formant un clade homogène et se distinguent aussi au niveau phéromonal par un ratio plus important du composé acétate Z11-16:Ac, ratio qui les rapprochent des femelles *B. fusca* (Figure 35).

La phylogénie réalisée à partir d'un fragment de gène mitochondrial est congruente avec la différenciation des espèces ou des populations sur la base de la composition de la phéromone sexuelle femelle. Ce type de corrélation a été démontré chez d'autres genres de Lépidoptères et a permis d'établir des hypothèses de scénarii évolutifs.

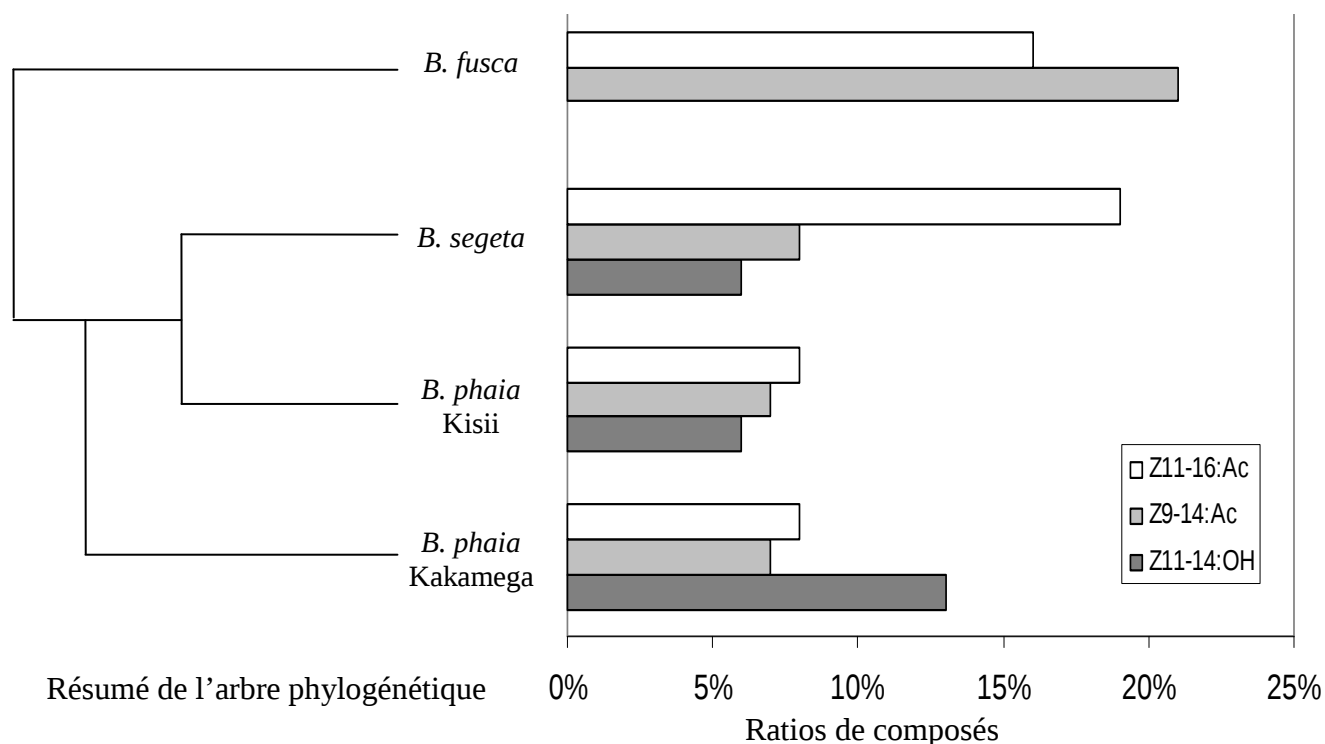


Figure 35 : Corrélations entre les données moléculaires et les données phéromonales entre les espèces du genre *Busseola*.

Par exemple, la phylogénie fondée sur l'analyse d'un fragment du gène mitochondrial codant pour la cytochrome *oxydase II* montre une séparation nette entre les espèces du genre *Ostrinia* dont la phéromone est composée d'isomères de  $\Delta 11-14:Ac$  : *O. orientalis* (Mutuura et Munroe) et *O. nubilalis*, et celle dont la phéromone est composée d'isomères de  $\Delta 12-14:Ac$  : *O. furnacalis* (Ishikawa *et al.*, 1999). *O. furnacalis* est la seule pyrale connue qui utilise des isomères de  $\Delta 12-14:Ac$ . Une hypothèse évolutive a été proposée : l'ancêtre de toutes les espèces du genre *Ostrinia* possédait la capacité de synthétiser les  $\Delta 11-14:Ac$  (Ishikawa *et al.*, 1999). De plus, Roelofs *et al.* (2002) ont découvert que la glande phéromonale des femelles *O. nubilalis* contient le gène de l'enzyme  $\Delta 11-14$  désaturase, qui permet la production des isomères  $\Delta 11-14:Ac$ , et aussi le gène de l'enzyme  $\Delta 14-16$  désaturase utilisée par *O. furnacalis* pour synthétiser les isomères  $\Delta 12-14:Ac$ .

Les études sur les désaturases mettent en avant la possibilité qu'un changement dans la communication phéromonale peut résulter d'un changement dans le système de régulation contrôlant l'expression des gènes codant pour les enzymes de biosynthèse. L'hypothèse avancée par les auteurs est que l'ancêtre commun de ces deux espèces devait posséder les gènes de synthèse pour les deux mélanges phéromonaux. Cependant, il faut garder présent à

l'esprit que toute modification du système de communication phéromonale, due à un changement de ratios des composés, ou même à un changement qualitatif des produits phéromonaux, ne peut être effective que si les mâles sont capables de répondre à la nouvelle phéromone.

Dans notre étude, *B. fusca* et le groupe *B. phaia* / *B. segeta*, qui appartiennent au même genre, descendent d'un même ancêtre commun. Cependant, on ne peut pas dire si cet ancêtre produisait ou non du Z11-14:OH dans son mélange phéromonal. Les femelles de *B. fusca* et du groupe *B. phaia* / *B. segeta* produisent une phéromone sexuelle complexe et originale, qui représente un facteur important dans l'isolement reproducteur chez ces insectes. La production d'un tel mélange est le résultat de mécanismes complexes, mettant en jeu un certain nombre d'enzymes (Tillman *et al.*, 1999 ; Strandh, 2005). Dans notre cas, on peut alors envisager plusieurs hypothèses sur l'évolution de la production de ces phéromones (Figure 36)<sup>a</sup>. L'acide gras à 14 atomes de carbone (14:Acide) se transforme après l'action d'une  $\Delta 11$  désaturase en E et Z11-14:Acides, puis en alcools (E et **Z11-14:OH**) par réduction et enfin en acétates : **E11-14:Ac** et **Z11-14:Ac** par acétylation. L'acide gras à 16 atomes de carbone se transforme après l'action d'une  $\Delta 11$  désaturase en Z11-16:Acide. A ce moment, le Z11-16:Acide s'engage dans deux réactions : (i) une réduction le transforme en alcool Z11-16:OH et une acétylation le transforme en **Z11-16:Ac** ; (ii) perte de deux carbones (Z9-14:Acide) suivie d'une réduction puis une acétylation, il donne le **Z9-14:Ac**.

Nous ne savons pas si les mécanismes de synthèse phéromonale ont commencé à transformer la totalité du Z11-14:OH, présent chez l'ancêtre commun, en Z11-14:Ac parallèlement à la séparation de *B. fusca* ; ou si au contraire, ces mécanismes ont permis de conserver un taux variable de Z11-14:OH, absent dans la phéromone de l'ancêtre commun, dans le groupe *B. phaia* / *B. segeta*, où il est devenu un composé phéromonal. Les résultats sur la présence ou l'absence de cet alcool sont dus au jeu de l'enzyme d'acétylation qui utilise ou non la totalité du substrat dont elle dispose. L'alcool étant l'intermédiaire de la biosynthèse des acétates. Nous pouvons penser que l'ancêtre commun de *B. fusca* et du groupe *B. phaia* / *B. segeta* possédait cet alcool.

<sup>a</sup> les noms de composés en gras sont les composés de la phéromone des femelles étudiées du genre *Busseola*

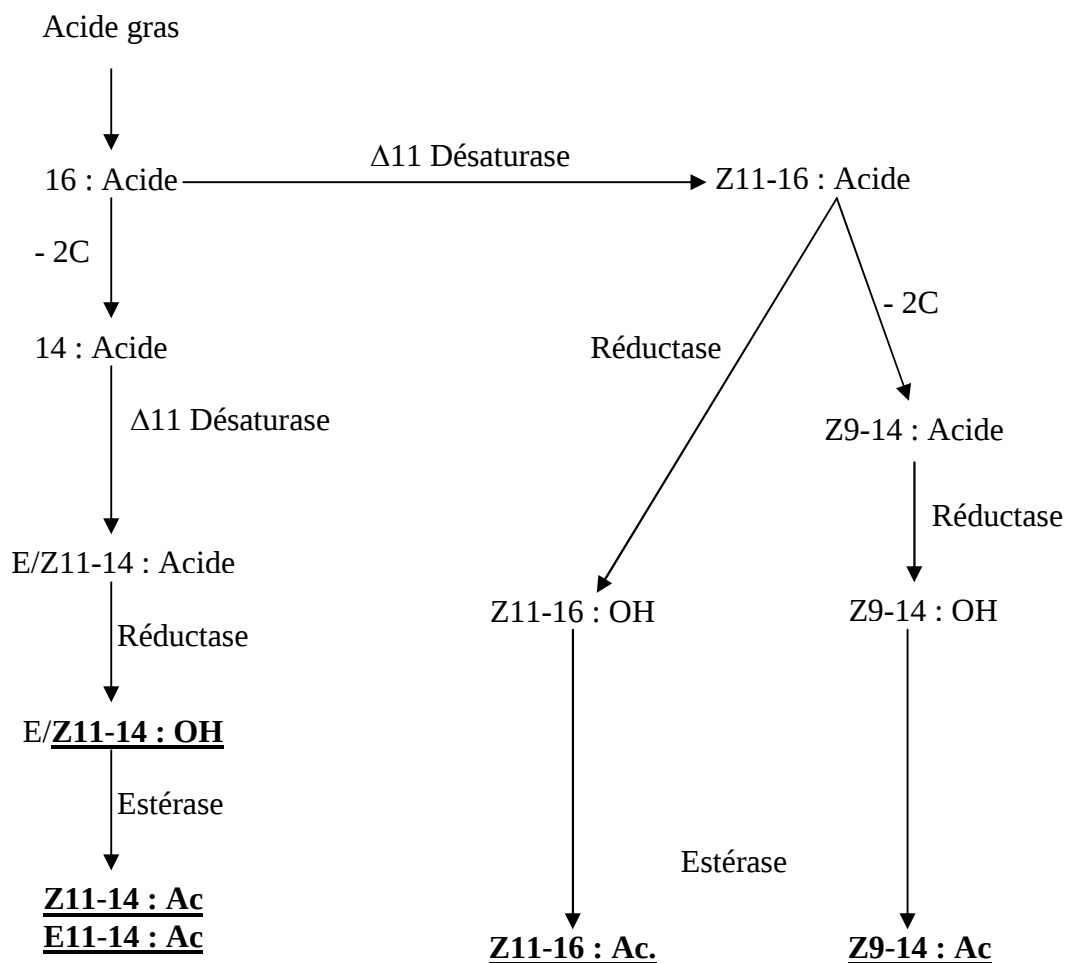


Figure 36 : Synthèse phéromonale des quatre composés produits par les espèces du genre *Busseola* : le Z11-14:Ac, le E11-14:Ac, le Z9-14:Ac, le Z11-16:Ac et le Z11-14:OH.

Les variations de ratio des différents composés phéromonaux produit par une femelle doivent avoir une signification comportementale chez les mâles de la même espèce. C'est à ce niveau que sont utiles les résultats de nos expérimentations en tunnel de vol sur le comportement croisé entre *B. fusca*, *B. segeta* et *B. phaia*. Les attractions interspécifiques entre *B. fusca* et les populations du groupe *B. phaia* / *B. segeta* sont significativement inférieures à l'attraction intraspécifique observée chez *B. fusca*, mais existe. Le composé supplémentaire présent dans la phéromone de *B. segeta* et de *B. phaia* ne bloque pas le comportement des mâles de *B. fusca*, mais le diminue. Ce résultat mérite toute notre attention car, chez certains Lépidoptères, l'ajout d'un composé dans la phéromone femelle engendre l'arrêt complet du comportement d'attraction du mâle : on parle « d'arrestment » en anglais. Par exemple, *Lymantria dispar* Linné et *L. fumida*, deux espèces de Lépidoptères Lymantriidae, vivent en sympatrie dans de nombreuses localités au Japon. La phéromone de *L. dispar* est constituée de la disparlure (Cardé, 1977), alors que chez *L. fumida*, s'ajoute à la disparlure, le 2-méthyl-

Z7-octadecene. Ce composé bloque l'attraction des mâles de *L. dispar* en agissant comme en antagoniste et donc en diminuant les croisements interspécifiques. La diminution du taux d'attraction interspécifique des mâles permet à chaque espèce de conserver son système spécifique de reconnaissance (Schaefer *et al.*, 1999).

Dans d'autres exemples, comme entre les espèces et sous-espèces du genre *Busseola*, les mâles d'une espèce de Lépidoptères répondent à la phéromone de femelles d'une autre espèce. C'est le cas pour les deux espèces du genre *Ostrinia* : des expériences de comportement croisé en tunnel de vol ont montré que quelques mâles (15%) d'*O. nubilalis* répondent à la phéromone d'*O. furnacalis* et quelques mâles (3%) d'*O. furnacalis* répondent à la phéromone de l'autre espèce (Linn *et al.*, 2003 ; Linn *et al.*, 2007). Les phéromones étant différentes, il est surprenant que les mâles d'une espèce entrent en contact avec les femelles de l'autre espèce. Les mâles de ces espèces doivent posséder la capacité d'intégrer et de traiter aux niveaux de leurs récepteurs antennaires les informations produites par la phéromone des femelles appartenant à une autre espèce.

Dans notre étude, même si la réponse interspécifique est plus faible (environ 20% en moyenne) que la réponse intraspécifique chez *B. fusca* (80%), elle existe. Certains mâles d'une espèce peuvent détecter et traiter l'information olfactive produite par la phéromone d'une autre espèce du même genre. Plusieurs cas sont possibles : soit les mâles de *B. fusca*, qui répondent à la phéromone de *B. segeta* et de *B. phaia*, ne sont pas perturbés par la présence d'alcool, soit ils intègrent seulement les produits qui correspondent à la phéromone de leur partenaire sexuelle, c'est-à-dire qu'ils ne présenteraient pas de récepteurs antennaires au composé alcool. La diminution de réponse laisse penser qu'ils enregistrent l'information donnée par l'alcool, mais qu'ils répondent quand même au mélange phéromonal. La diminution de réponse peut aussi être due à la différence de ratio des autres composés que l'alcool. Les mâles qui manifestent l'ensemble de la séquence comportementale sont moins discriminants quant à ces variations.

La réponse des mâles d'une espèce, *B. fusca*, à la phéromone d'une autre espèce, le groupe *B. phaia* / *B. segeta*, au sein du genre *Busseola* montre que ces mâles n'ont pas une fenêtre de réponse aussi étroite et stricte que chez d'autres espèces de Lépidoptères. Au sein du groupe *B. phaia* / *B. segeta*, les attractions croisées n'ont pas pu être réalisées et il serait intéressant de voir si les populations se reconnaissent, se répondent et se croisent. La plasticité de réponse d'une espèce ou sous-espèce de *Busseola* à la phéromone d'une autre espèce ou sous-espèce peut permettre de comprendre pourquoi certains mâles ont pu répondre à une composition phéromonale différente produite par un petit nombre de femelles et comment a pu se produire la divergence entre *B. fusca* et le groupe *B. phaia* / *B. segeta* et comment ont pu se créer les races phéromonales observées dans le groupe *B. phaia* / *B. segeta*. La divergence observée au niveau phéromonale entre *B. fusca* et le groupe *B. phaia* / *B. segeta* a pu se mettre en place par l'action d'une spéciation sympatrique ou écologique, par exemple par une spécialisation à une plante-hôte différente. Nous savons que l'introduction du maïs en Afrique est trop récente pour agir sur cette séparation en deux espèces qui datent d'environ trois millions d'années. Les plantes-hôtes concernés pourraient être *P. purpureum* pour *B. phaia*, *P. deustum* pour *B. segeta* et *S. bicolor* pour *B. fusca*. Nous ne pouvons pas dire, aux vues de nos résultats de biologie moléculaire et des datations qu'ils nous permettent de faire, qui de *B. fusca* ou du groupe *B. phaia* / *B. segeta* a divergé en premier. Nous ne pouvons donc pas donner la plante ancestrale de ces espèces, sachant que les plantes-hôtes citées plus haut sont toutes d'origine africaine.

L'absence de données sur l'attraction croisée entre *B. phaia* et *B. segeta* est regrettable parce que ces données auraient apporté un élément supplémentaire à la proposition de révision du statut taxonomique des deux espèces. Il est important de noter la séparation à la fois au niveau physico-chimique et au niveau génétique des deux populations géographiques de *B. phaia*. Le mélange phéromonal étant moins variable entre *B. phaia* et *B. segeta* qu'entre le groupe *B. phaia* / *B. segeta* et *B. fusca*, la plasticité de réponse des mâles pourrait être plus grande dans le groupe *B. phaia* / *B. segeta*. L'importance de la fenêtre de réponse des mâles et une modification au niveau de la synthèse de la phéromone sexuelle femelle peuvent expliquer la possibilité de formation de races phéromonales. Nous pouvons penser que ces populations sont en cours de spéciation. La séparation de *B. segeta* pourrait être due à une spéciation allopatrique provoquée par la présence de la vallée du Rift qui peut empêcher un flux de gènes constant ou par un changement de plante-hôte, plus en rapport avec le phénomène de la spéciation sympatrique. La divergence entre *B. phaia* Kisii et *B. phaia* Kakamega peut être

due à un phénomène de spéciation sympatrique par une adaptation à un milieu de vie différent, savane ou forêt tropicale humide.

A partir de l'ensemble des résultats concernant le système spécifique de reconnaissance au sein de l'espèce *B. fusca* et des données sur l'isolement reproducteur entre les espèces du genre *Busseola*, nous pouvons envisager plusieurs hypothèses évolutives.

*B. fusca* s'est séparé en trois groupes regroupant les haplotypes Ouest, Est **KI** et Est **KII**. La séparation Est – Ouest est probablement due à la présence de la ligne volcanique du Cameroun et la séparation à l'Est à la formation de la vallée du Rift (Sezonlin *et al.*, 2006a). Les deux groupes d'haplotypes mitochondriaux de l'Est de l'Afrique sont de nouveau en sympatrie et sont interféconds.

Le groupe d'haplotypes Ouest se trouve toujours en allopatrie par rapport aux deux autres, mais, aux vues des analyses phéromonales et des expériences de comportement, il n'y a pas eu de différenciation du SMRS entre ces deux groupes de populations géographique. La composition phéromonale ainsi que les ratios des différents composés sont les mêmes et les mâles et les femelles sont fortement interattractifs. Si les individus des deux populations géographiques sont remis en contact, il est très probable qu'ils se reconnaissent comme partenaires sexuels. Nous pouvons émettre une hypothèse pouvant expliquer pourquoi le SMRS n'a pas divergé entre ces populations, malgré la séparation ancienne. Nous sommes en présence de Lépidoptères ravageurs des cultures, contrairement à *B. phaia* et *B. segeta*. Les conditions de vie pour *B. fusca* dans les cultures de maïs et de sorgho sont proches entre l'Est et l'Ouest de l'Afrique, en tout cas plus proches que les différences de milieu de vie observées entre *B. phaia* et *B. segeta*.

Une hypothèse évolutive (Figure 37) pour le groupe *B. phaia* / *B. segeta* est décrite ci-après. Si nous prenons en compte les individus analysés, l'aire de répartition d'origine de *B. phaia* et de *B. segeta* se situait de l'Ouganda en Tanzanie en passant par le Kenya, où elle s'étendait au moins de la forêt de Kakamega à la région de Race Course. Dans le mélange phéromonal, les ratios de Z11-14:OH et de Z11-16:Ac étaient faibles. Une barrière géographique marquée, la vallée du Rift se met en place et entraîne la séparation de *B. phaia* et de *B. segeta*, il y a environ deux millions d'années. Le ratio de Z11-16:Ac a augmenté, par le jeu des enzymes de synthèse, chez les femelles de *B. segeta*. En cas de remise en contact, elles se distingueront alors des femelles de *B. phaia*. De plus, les individus de *B. segeta* colonisent une nouvelle

plante-hôte, *P. deustum*. Cette colonisation peut se faire aussi par les individus de *B. phaia* depuis *P. deustum* sur *P. purpureum*. Nous ne pouvons pas savoir, à l'aide de nos données, quelle est la plante originelle de l'ancêtre commun. De plus, la période de reproduction change pour avoir lieu plus tard dans la scotophase chez *B. segeta* ou plus tôt chez *B. phaia*. De leur côté, à l'Ouest de la vallée du Rift, certains individus de *B. phaia* se sont adaptés à un milieu différent, représenté par la forêt tropicale de Kakamega située de l'autre côté de la portion du lac Victoria présent au Kenya et le ratio de Z11-14:OH a augmenté chez les femelles : la séparation de la population *B. phaia* de Kakamega a eu lieu.

Dans un deuxième cas, le ratio initial du Z11-14:OH était élevé au sein du groupe *B. phaia* / *B. segeta*. Une barrière géographique marquée (vallée du Rift) a séparé les *B. phaia* des *B. segeta* il y a environ deux millions d'années comme dans le premier cas. A peu près au même moment, une population de *B. phaia* a investi un nouvel habitat représenté par la savane de Kisii. Le ratio du composé Z11-14:OH des deux populations, *B. phaia* de Kisii et *B. segeta*, ainsi séparées a diminué et leurs mélanges phéromonaux se distinguent alors de la population de *B. phaia* de la forêt tropicale de Kakamega

Les données moléculaires nous indiquent que les individus situés en Ouganda sont plus proches de la population des *B. phaia* de Kisii. Il semblerait donc plus probable que les *B. phaia* de Kakamega aient divergé par rapport à la population initiale. Pour aller plus loin dans cette hypothèse évolutive, il faudrait recueillir plus de données à la fois moléculaire, phéromonales et comportementales d'autres populations de l'espèce *B. phaia*, ainsi que des données biogéographiques de l'étendue de la forêt de Kakamega ou de l'étendue de la savane de Kisii à l'époque de la divergence.

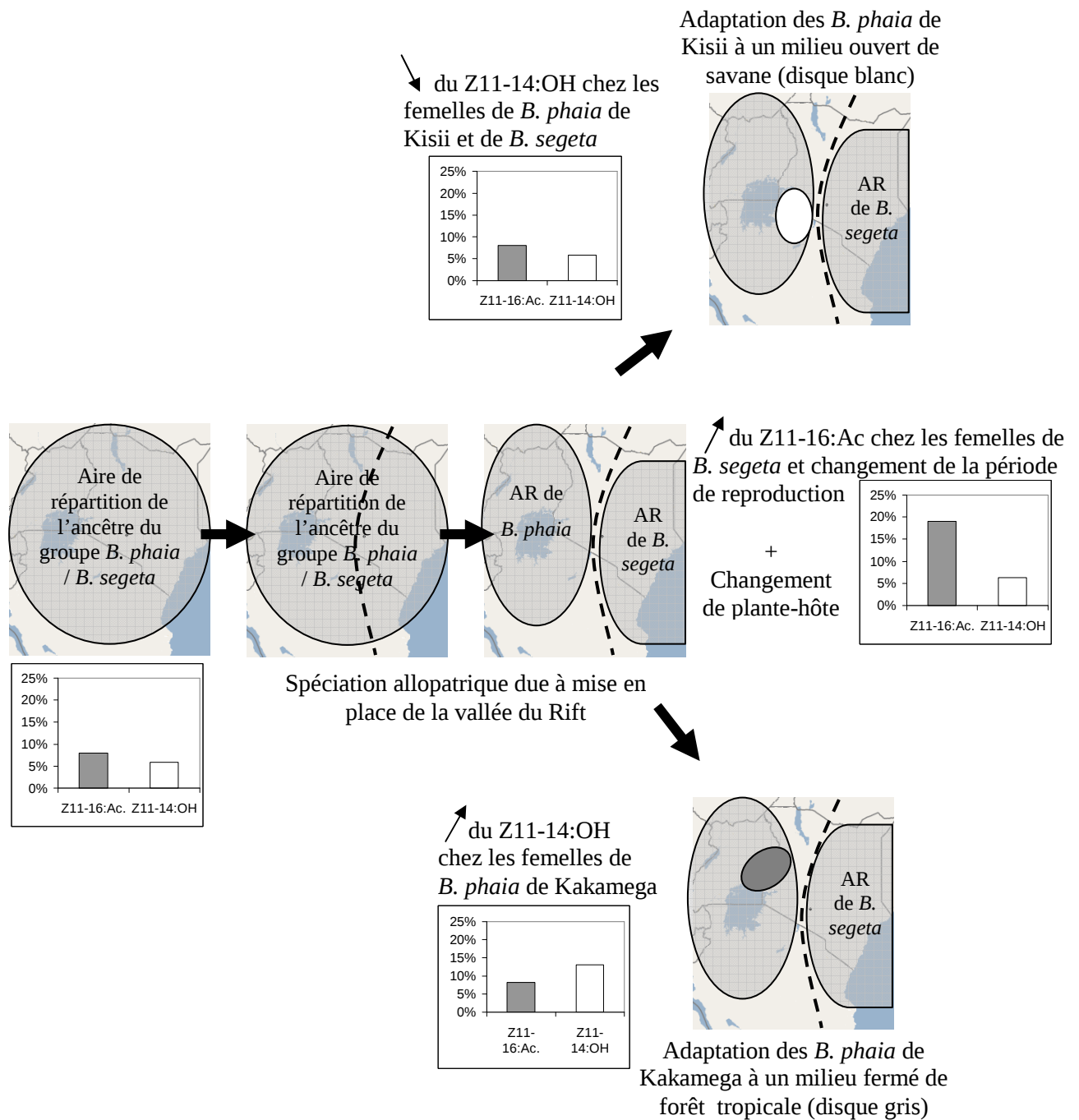


Figure 37 : Schéma des hypothèses évolutives pour *B. phaia* et *B. segeta* (AR : aire de répartition).

## Conclusion

---



Lorsque nous avons débuté ce travail de thèse, un des objectifs était d'étudier le SMRS de *B. fusca*, son éventuel variabilité intraspécifique et son action sur la structuration et la répartition des populations géographiques et définies génétiquement. L'identification phéromonale de nombreux individus, typés génétiquement comme appartenant à différentes populations de *B. fusca*, nous a permis de constater que le mélange phéromonal ne diffère pas en fonction de l'origine géographique des insectes étudiés et que la mise en place de pièges phéromonaux pourra se faire avec la même composition de synthèse, aussi bien à l'Est qu'à l'Ouest de l'Afrique. L'étude génétique à l'aide de marqueurs mitochondriaux et nucléaires n'a pas permis d'observer une corrélation entre l'écologie chimique ou comportementale et l'appartenance à des populations différenciées par ces marqueurs.

Après la partie qui concernait les populations d'une même espèce, nous avons abordé l'étude au sein du genre *Busseola*. Cette étude a révélé la complexité des facteurs qui isolent ces espèces au niveau reproducteur et des leurs relations phylogénétiques. Consécutivement, nous avons proposé plusieurs alternatives pour résoudre le problème taxonomique de *B. phaia* et de *B. segeta*. La diminution des échanges de gènes entre ces espèces et populations est due à de nombreux facteurs, géographiques et écologiques, mais aussi comme nous l'avons démontré, phéromonaux et comportementaux. Ce système complexe permet d'observer la mise en place d'un isolement reproducteur à la fois entre des espèces et aussi entre des populations au sein d'une espèce et de faire l'hypothèse d'un mécanisme de spéciation en cours.

Un des points important de cette étude a été de montrer la validité d'une approche multidisciplinaire lorsque l'on s'intéresse à une communauté d'espèces et de populations. L'utilisation de marqueurs moléculaires, soumis à différentes contraintes évolutives, nous a permis de retracer le passé évolutif des espèces et de proposer des hypothèses évolutives. Nous avons aussi étudié le système de reproduction entre des individus sur plusieurs niveaux, à la fois au sein d'une espèce et aussi entre différentes espèces. Une telle approche des relations entre ces individus, fondée sur la combinaison de plusieurs caractères indépendants, aussi bien comportementaux, biochimiques et moléculaires, se révèle importante pour la compréhension des mécanismes de la spéciation et du rôle de l'environnement sur l'évolution du système de reproduction. Dans ce travail, nous avons réalisé que la définition d'une espèce et des processus de la spéciation peuvent se complexifier lorsque l'on enrichit des analyses phylogénétiques avec des données de type comportemental.

Cette étude fondée sur des espèces appartenant au même genre et ayant le même ancêtre commun nous a permis de discuter sur l'évolution des systèmes de reproduction au cours du temps, afin d'engendrer la séparation d'une espèce par rapport à une autre. Nous retrouvons ici un exemple de l'évolution des systèmes de synthèse phéromonale, qui permet de jouer sur différents facteurs selon le niveau de différenciation : l'ajout d'un composé entre deux espèces éloignées ou des différences de ratios entre des populations ou des espèces proches. A priori, la composition phéromonale tient un rôle majeur dans la séparation de ces espèces et populations, même si elles se distinguent aussi par des facteurs temporels et géographiques. Les données obtenues à partir de telles recherches procurent une base contextuelle sur laquelle s'appuyer pour reprendre des études sur d'autres Lépidoptères ou d'autres insectes, afin de comprendre les mécanismes de la spéciation, aussi bien allopatrique que sympatrique. Les études fondées sur l'identification phéromonale ou le comportement pourront être argumentées avec des données moléculaires, afin de mieux comprendre les liens pouvant exister entre les espèces ou entre les individus d'une même espèce.

D'un point de vue appliqué, ce travail a permis l'identification de trois phéromones sexuelles femelles dont on a démontré l'efficacité sur le terrain. L'utilisation de la phéromone sexuelle de *B. fusca* peut permettre d'adapter la lutte chimique contre ce ravageur ou de développer d'autres méthodes de lutte plus respectueuse de l'environnement et de la santé humaine. L'utilisation des phéromones du groupe *B. phaia* / *B. segeta* peut permettre de gérer les risques d'un éventuel passage du compartiment sauvage au compartiment cultivé.

# Bibliographie

---

- AVISE, J. C., ARNOLD, J., BALL, R. M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J. E., REEB, C. A. and SAUNDERS, N. C. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 18: 489-522.
- BABILIS, N. A. and MAZOMENOS, B. E. 1992. Mating behaviour of the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 65 (3): 199-204.
- BAKER, G., FADAMIRO, H. Y. and COSSE, A. A. 1998. Moth uses fine tuning for odour resolution. *Nature* 393: 530-531.
- BAKER, T. C. 1985. Chemical control of behavior, 621-672, in *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, Pergamon Press, Oxford.
- BAKER, T. C. 1990. Upwind flight and casting flight: complimentary phasic and tonic systems used for location of sex pheromone sources by male moths, 18-25, in *International Symposium on Olfaction and Taste X*, K. B. Doving, Graphic Communication Systems, Oslo.
- BAKER, T. C. and CARDE, R. T. 1979. Endogenous and exogenous factors affecting periodicities of female calling and male sex pheromone response in *Grapholitha molesta* (Busck). *Journal of Insect Physiology* 25: 943-950.
- BAKER, T. C., CARDE, R. T. and ROELOFS, W. L. 1976. Behavioural responses of male *Argyrotaenia velutinana* (Lepidoptera: Tortricidae) to components of its sex pheromone. *Journal of Chemical Ecology* 2 (3): 333-352.
- BAKER, T. C. and HAYNES, K. F. 1987. Manoeuvres used by flying male oriental fruit moths to relocate a sex pheromone plume in an experimentally shifted wind-field. *Physiological Entomology* 12: 263-279.
- BAKER, T. C. and HAYNES, K. F. 1996. Pheromone-mediated optomotor anemotaxis and altitude control exhibited by male oriental fruit moths in the field. *Physiological Entomology* 21: 20-32.
- BAKER, T. C. and LINN, C. E., JR. 1984. Wind tunnels in pheromone research, 75-110, in *Techniques in pheromone research*, H. E. Hummel and T. A. Miller, Springer-Verlag, New York.
- BAKER, T. C., MEYER, W. and ROELOFS, W. L. 1981. Sex pheromone dosage and blend specificity of response by oriental fruit moth males. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 30 (3): 269-279.
- BAKER, T. C. and ROELOFS, W. L. 1981. Initiation and termination of oriental fruit moth male response to pheromone concentrations in the field. *Environmental Entomology* 10: 211-218.
- BALTENSWEILER, W. and PRIESNER, E. 1988. A study of pheromone polymorphism in *Zeiraphera diniana* Gn. (Lep., Tortricidae). 3. Specificity of attraction to synthetic pheromone sources by different male response types from two host races. *Journal of Applied Entomology* 106 (3): 217-231.
- BETHENOD, M. T., THOMAS, Y., ROUSSET, F., FREROT, B., PELOZUELO, L., GENESTIER, G. and BOURGUET, D. 2005. Genetic isolation between two sympatric host plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hubner. II: assortative mating and host-plant preferences for oviposition. *Heredity* 94 (2): 264-270.

- BIRCH, M. C., GRANT, G. G. and BRADY, U. E. 1976. Male scent brush of *Peridroma saucia*: chemistry of secretion. *Annals of the Entomological Society of America* 69 (3): 491-492.
- BIRCH, M. C. and HEFEZT, A. 1987. Extrusible organs in male moth and their role in courtship behavior. *Bulletin of Entomological Society of America* 33 (4): 222-229.
- BIRCH, M. C., LUCAS, D. and WHITE, P. R. 1989. The courtship behavior of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae), and the role of male hair-pencils. *Journal of Insect Behavior* 2 (2): 227-239.
- BLUM, M. S. 1987. Biosynthesis of arthropod exocrine compounds. *Annual Review of Entomology* 32: 381-413.
- BROWER, A. V. Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (14): 6491-6495.
- BYERS, J. A. 2005. Chemical constraints on the evolution of olfactory communication channels of moths. *Journal of Theoretical Biology* 235: 199-206.
- CALATAYUD, P. A., GUENEGO, H., LE RU, B., SILVAIN, J. F. and FREROT, B. 2007. Temporal patterns of emergence, calling behaviour and oviposition period of the maize stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera : Noctuidae). *Annales De La Societe Entomologique De France* 43 (1): 63-68.
- CALLAHAN, P. S. and CHAPLIN, J. B. 1960. Morphology of the reproductive systems and mating in two representative members of the falikky Noctuidae, *Pseudaletia unipuncta* and *Peridroma margaritota*, with comparison to *Heliothis zea*. *Annals of the Entomological Society of America* 53: 763-782.
- CAMPION, D. G. and NESBITT, B. F. 1983. The utilisation of sex pheromones for the control of stem-borers. *Insect Science and its Application* 4 (1/2): 191-197.
- CARDE, R. T., BAKER, T. C. and ROELOFS, W. L. 1975. Ethological function of components of a sex attractant system for oriental fruit moth males, *Grapholitha molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Chemical Ecology* 1 (4): 475-491.
- CARDE, R. T., COMEAU, A., BAKER, T. C. and ROELOFS, W. L. 1974. Moth mating periodicity: temperature regulates the circadian gate. *31* (1): 46-48.
- CARIOU, M. L., SILVAIN, J. F., DAUBIN, V., DA LAGE, J. L. and LACHAISE, D. 2001. Divergence between *Drosophila santomea* and allopatric or sympatric populations of *D. yakuba* using paralogous amylase genes and migration scenarios along the Cameroon volcanic line. *Molecular Ecology* 10 (3): 649-660.
- CHARLAT, S., HORNETT, E. A., DYSON, E. A., HO, P. P. Y., LOC, N. T., SCHILTHUIZEN, M., DAVIES, N., RODERICK, G. K. and HURST, G. D. D. 2005. Prevalence and penetrance variation of male-killing *Wolbachia* across Indo-Pacific populations of the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Molecular Ecology* 14 (11): 3525-3530.
- CHARLAT, S., HURST, G. D. D. and MERCOT, H. 2003. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics* 19 (4): 217-223.
- CLAYTON, W. D., HARMAN, K. T. and WILLIAMSON, H. 2006. GrassBase - The Online World Grass Flora., 08 November 2006; 15:30 GMT, <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>

- COGNATO, A. I., SEYBOLD, S. J. and SPERLING, F. A. H. 1999. Incomplete barriers to mitochondrial gene flow between pheromone races of the North American pine engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266 (1431): 1843-1850.
- COOK, P. A. 1999. Sperm numbers and female fertility in the moth *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera; Pyralidae). *Journal of Insect Behavior* 12 (6): 767-779.
- COOK, S. M., KHAN, Z. R. and PICKETT, J. A. 2007. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology* 52: 375-400.
- COYNE, J. A. and ORR, H. A. 2004. Speciation, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- CRITCHLEY, B. R., HALL, D. R., FARMAN, D. I., MCVEIGH, L. J., MULAA, M. A. O. A. and KALAMA, P. 1997. Monitoring and mating disruption of the maize stalkborer, *Busseola fusca*, in Kenya with pheromones. *Crop Protection* 16: 541-548.
- DALLERAC, R., LABEUR, C., JALLON, J. M., KNIPPIE, D. C., ROELOFS, W. L. and WICKER-THOMAS, C. 2000. A Delta 9 desaturase gene with a different substrate specificity is responsible for the cuticular diene hydrocarbon polymorphism in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (17): 9449-9454.
- DARWIN, C. 1859. L'origine des espèces, F. 1992. Paris.
- DAVID, C. T., KENNEDY, J. S. and LUDLOW, A. R. 1983. Finding of a sex pheromone source by gypsy moths released in the field. *Nature* 303 (5920): 804-806.
- DELISLE, J. and HARDY, M. 1997. Male larval nutrition influences the reproductive success of both sexes of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Functional Ecology* 11 (4): 451-463.
- DESCOINS, C. and FREROT, B. 1979. Sex pheromone specificity in the tortricid fauna of apple-orchards, 181-185, in Chemical ecology: Odour communication in animals, F. J. Ritter, Elsevier.
- DOBZANSKY, T. 1935. A critique of the species concept in biology. *Philosophical Sciences* 2: 344-355.
- DOPMAN, E. B., BOGDANOWICZ, S. M. and HARRISON, R. G. 2004. Genetic mapping of sexual isolation between E and Z pheromone strains of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Genetics* 167 (1): 301-309.
- DRES, M. and 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): 471-492.
- DUNKELBLUM, E., KEHAT, M., GOTHILF, S., GREENBERG, S. and SKLARSZ, B. 1982. Optimized mixture of sex pheromonal components for trapping of male *Spodoptera littoralis* in Israel. *Phytoparasitica* 10 (1): 21-26.
- ELLIS, P. E. and BRIMACOMBE, L. C. 1980. The mating behaviour of the egyptian cotton leafworm moth, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Animal Behaviour* 28: 1239-1248.
- EL-SAYED, A. M. and TRIMBLE, R. M. 2002. Relative attractiveness of natural and synthetic pheromone of three tortricid tree fruit pests. *Environmental Entomology* 31 (6): 960-964.

- EMELIANOV, I., DRES, M., BALTENSWEILER, W. and MALLET, J. 2001. Host-induced assortative mating in host races of the larch budmoth. *Evolution* 55 (10): 2002-2010.
- EMELIANOV, I., MALLET, J. and BALTENSWEILER, W. 1995. Genetic differentiation in *Zeiraphera diniana* (Lepidoptera, Tortricidae, the larch budworm): polymorphism, host races or sibling species? *Heredity* 75: 416-424.
- EMELIANOV, I., SIMPSON, F., NARANG, P. and MALLET, J. 2003. Host choice promotes reproductive isolation between host races of the larch budmoth *Zeiraphera diniana*. *Journal of Evolutionary Biology* 16 (2): 208-218.
- FALUSH, D., STEPHENS, M. and PRITCHARD, J. K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7 (4): 574-578.
- FARINE, J. P., FRÉROT, B. and ISART, J. 1981. Facteurs d'isolement chimique dans la secretion pheromonale de deux noctuelles Hadeninae: *Mamestra brassicae* (L.) et *Pseudaletia unipuncta* (Haw.). *Compte-Rendu de l'Académie des Sciences de Paris* 292: 101-104.
- FAURE, N. and SILVAIN, J. F. 2005. Characterization of eight microsatellite loci in the maize stalk borer *Busseola fusca* Fuller, 1901 (Lepidoptera: Noctuidae). *Molecular Ecology Notes* 5 (4): 846-848.
- FOSTER, S. P. 1993. Neural inactivation of sex pheromone production in mated lightbrown apple moths, *Epiphyas postvittana* (Walker). *Journal of Insect Physiology* 39 (3): 267-273.
- FOSTER, S. P., DUGDALE, J. S. and WHITE, C. S. 1991. Sex pheromones and the status of greenheaded and brownheaded leafroller moths in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology* 18: 63-74.
- FREROT, B. and DEMOLIN, G. 1993. Sex pheromone of the processionary moths and biosystematic considerations within the genus *Thaumetopoea* (Thaumetopoeidae, Thaumetopoeinae). *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura* 25 (1): 33-40.
- FREROT, B. and FOSTER, S. P. 1991. Sex pheromone evidence for two distinct taxa within *Graphania mutans* (Walker). *Journal of Chemical Ecology* 17 (11): 2077-2093.
- FREROT, B., MALOSSE, C. and CAIN, A. H. 1997. Solid-Phase Microextraction (SPME): A New Tool in Pheromone Identification in Lepidoptera. *Journal of High Resolution Chromatography* 20: 340-342.
- FREROT, B., MALOSSE, C., MILAT, M. L., DEMOLIN, G., MARTIN, J. C., KHEMICI, M., ZAMOUN, M. and GACHI, M. 1990. Chemical analysis of the sex pheromone glands of *Thaumetopoea bonjeani* (Lep., Thaumetopoeidae). *Journal of Applied Entomology* 109 (2): 210-212.
- FREROT, B., RENOU, M., DESCOINS, C. and GALLOIS, M. 1984. (Z)-11- And (E)-11-tetradecenyl acetates (Z 11 TDA and E 11 TDA), components of the sex pheromone of *Argyrotaenia pulchellana* (Haw.) (Lepid., Tortricinae, Archipini). *Agronomie* 4 (6): 565-572.
- FREROT, B., RENOU, M., GALLOIS, M. and DESCOINS, C. 1983. A sex attractant for the bud tortricid: *Archips xylosteana* L. (Lepid., Tortricidae, Tortricinae). *Agronomie* 3 (2): 173-178.
- GAGE, M. J. G. and COOK, P. A. 1994. Sperm size or numbers? Effects of nutritional stress upon eupyrene and apyrene sperm production strategies in the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Functional Ecology* 8 (5): 594-599.

- GASTON, L. K. and SHOREY, H. H. 1964. Sex pheromone of noctuid moths. IV An apparatus for bioassaying the pheromones of six species. *Annals of the Entomological Society of America* 57: 779-780.
- GRANT, G. G., SMITHWICK, E. B. and BRADY, U. E. 1975. Courtship behavior of Phycitid moths. II. Behavioral and pheromonal isolation of *Plodia interpunctella* and *Cadra cautella* in the laboratory. *Canadian Journal of Zoology* 53 (6): 827-832.
- GUILLOT, G., MORTIER, F. and ESTOUP, A. 2005. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5 (3): 712-715.
- HAILE, A. and HOFVSANG, T. 2002. Host plant preference of the stem borer *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop Protection* 21: 227-233.
- HALL, D. R., BEEVOR, P. S., CORK, A., LESTER, R., NESBITT, B. F., NYIRENDA, G. K. C., NOTA PHIRI, D. D., BLAIR, B. W. and TANNOCK, J. 1981. The female sex pheromone of the maize stalk-borer, *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae): identification and initial field trials. *Zimbabwe Journal of Agricultural Research* 19: 111-122.
- HALL, J. P. W. and HARVEY, D. J. 2002. The phylogeography of Amazonia revisited: New evidence from rioidinid butterflies. *Evolution* 56 (7): 1489-1497.
- HARRY 2001. Génétique moléculaire et évolutive, Maloine. Pollina s.a., Paris.
- HENDRICKS, D. E., LEONHARDT, B. A. and SHAVER, T. N. 1989. Development of optimized blends of two sex pheromone components impregnated in PVC dispensers for tobacco budworm bait. *Southwestern Entomologist* 14 (1): 17-25.
- HIGASHI, M., TAKIMOTO, G. and YAMAMURA, N. 1999. Sympatric speciation by sexual selection. *Nature* 402 (6761): 523-526.
- HU, W. and DU, J. 2005. Sex pheromone secondary components of Indian meal moth *Plodia interpunctella* in China. *Chinese Journal of Applied Ecology* 16: 1751-1755.
- INOMATA, S., TSUCHIYA, S., IKEDA, K., SAITO, O. and ANDO, T. 2002. Identification of the sex pheromone components secreted by female moths of *Peridroma saucia* (Noctuidae: Noctuidae). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66 (11): 2461-2464.
- ISAAC, N. J. B., MALLET, J. and MACE, G. M. 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 19 (9): 464-469.
- ISHIKAWA, Y., TAKANASHI, T., KIM, C., HOSHIZAKI, S., TATSUKI, S. and HUANG, Y. 1999. *Ostrinia* spp. in Japan: their host plants and sex pheromones. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91: 237-244.
- JACQUIN, E., NAGNAN, P. and FRÉROT, B. 1991. Identification of hairpencil secretion from male *Mamestra brassicae* (L.) (Lepidoptera, Noctuidae) and electroantennogram studies. *Journal of Chemical Ecology* 17 (1): 239-246.
- JARNE, P. and LAGODA, P. J. L. 1996. Microsatellites from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.
- JIGGINS, C. D., LINARES, M., NASBIT, R. E., SALAZAR, C., YANG, Z. H. and MALLET, J. 2001. Sex-linked hybrid sterility in a butterfly. *Evolution* 55 (8): 1631-1638.
- KAGEYAMA, D., NISHIMURA, G., HOSHIZAKI, S. and ISHIKAWA, Y. 2002. Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera : Crambidae). *Heredity* 88: 444-449.

- KARLSON, M. and LUSCHER, M. 1959. Pheromones : a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183: 55-56.
- KENNEDY, J. S. 1983. Zigzagging and casting as a programmed response to wind-borne odour: a review. *Physiological Entomology* 8: 109-120.
- KENNEDY, J. S. 1986. Some current issues in orientation to odour sources, 11-25, in *Mechanisms in insect olfaction*, T. L. Payne, T. C. Birch and C. E. J. Kennedy, Clarendon Press, Oxford.
- KHAN, Z. R., PICKETT, J. A., VAN DEN BERG, J., WADHAMS, L. J. and WOODCOCK, C. M. 2000. Exploiting chemical ecology and species diversity: stem borer and striga control for maize and sorghum in Africa. *Pest Management Science* 56 (11): 957-962.
- KLUN, J. A., CHAPMAN, O. L., MATTES, K. C., WOJTKOWSKI, P. W., BEROZA, M. and SONNET, P. E. 1973. Insect sex pheromones: minor amount of opposite geometrical isomer critical to attraction. 181: 661-663.
- KORNFIELD, I. and SMITH, P. F. 2000. African cichlid fishes: Model systems for evolutionary biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31: 163-196.
- KRISTENSEN, N. P. 1999. Volume 1: Evolution, systematics and biogeography, in *Handbook of zoology, Volume IV: Arthropodia: Insecta*, D. Gruyter, Berlin, New-York.
- KROKOS, F. D., AMELINE, A., BAU, J., SANS, A., KONSTANTOPOULOU, M., FREROT, B., GUERRERO, A., EIZAGUIRRE, M., MALOSSE, C., ETCHEPARE, O., ALBAJES, R. and MAZOMENOS, B. E. 2002. Comparative studies of female sex pheromone components and male response of the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* in three different populations. *Journal of Chemical Ecology* 28 (7): 1463-1472.
- KUMAR, S., TAMURA, K. and NEI, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5 (2): 150-163.
- LACHAISE, D., HARRY, M., SOLIGNAC, M., LEMEUNIER, F., BENASSI, V. and CARIOU, M. L. 2000. Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new melanogaster sister species from Sao Tome. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267 (1452): 1487-1495.
- LALANNE-CASSOU, B., SILVAIN, J. F., MONTI, L. and MALOSSE, C. 1999. Reproductive isolation mechanisms between members of the *Spodoptera latifascia* - *S-cosmioides* - *S-descoinsi* (Lepidoptera : Noctuidae) neotropical species complex. *Annales De La Societe Entomologique De France* 35: 109-116.
- LE RU, B. P., ONG'AMO, G. O., MOYAL, P., NGALA, L., MUSYOKA, B., ABDULLAH, Z., CUGALA, D., DEFABACHEW, B., HAILE, T. A., MATAMA, T. K., LADA, V. Y., NEGASSI, B., PALLANGYO, K., RAVOLONANDRIANINA, J., SIDUMO, A., OMWEGA, C. O., SCHULTHESS, F., CALATAYUD, P. A. and SILVAIN, J. F. 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 (6): 555-563.
- LEWTER, J. A., SZALANSKI, A. L., NAGOSHI, R. N., MEAGHER, R. L., OWENS, C. B. and LUTTRELL, R. G. 2006. Genetic variation within and between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *Florida Entomologist* 89 (1): 63-68.

- LINN, C. E., CAMPBELL, M. G. and ROELOFS, W. L. 1988. Temperature modulation of behavioural thresholds controlling male moth sex pheromone response specificity. *Physiological Entomology* 13: 59-67.
- LINN, C. E. J., MUSTO, C. J. and ROELOFS, W. L. 2007. More rare males in *Ostrinia*: Response of asian corn borer moths to the sex pheromone of the european corn borer. *Journal of Chemical Ecology* 33 (1): 199-212.
- LINN, C. E. J., O'CONNOR, M. and ROELOFS, W. 2003. Silent genes and rare males: A fresh look at pheromone blend response specificity in the European corn borer moth, *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Insect Science* 3: 15, Available online: [insectscience.org/3.15](http://insectscience.org/3.15).
- LINN, C. E. J. and ROELOFS, W. L. 1989. Response specificity of male moths to multicomponent pheromones. *Chemical Senses* 14 (3): 421-437.
- LOFSTEDT, C., VICKERS, N. J., ROELOFS, W. L. and BAKER, T. C. 1989. Diet related courtship success in the Oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Tortricidae). *Oikos* 55 (3): 402-408.
- LOSOS, J. B. and GLOR, R. E. 2003. Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 18 (5): 220-227.
- LUKHTANOV, V. A., KANDUL, N. P., PLOTKIN, J. B., DANTCHENKO, A. V., HAIG, D. and PIERCE, N. E. 2005. Reinforcement of pre-zygotic isolation and karyotype evolution in *Agrodiaetus* butterflies. *Nature* 436 (7049): 385-389.
- MALLARINO, R., BERMINGHAM, E., WILLMOTT, K. R., WHINNETT, A. and JIGGINS, C. D. 2005. Molecular systematics of the butterfly genus *Ithomia* (Lepidoptera : Ithomiinae): a composite phylogenetic hypothesis based on seven genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34 (3): 625-644.
- MALLET, J. 2001. The speciation revolution - Commentary. *Journal of Evolutionary Biology* 14 (6): 887-888.
- MALLET, J., BELTRAN, M., NEUKIRCHEN, W. and LINARES, M. 2007. Natural hybridization in heliconiine butterflies: the species boundary as a continuum - art. no. 28. *Bmc Evolutionary Biology* 7: 28-28.
- MARCON, P., TAYLOR, D. B., MASON, C. E., HELLMICH, R. L. and SIEGFRIED, B. D. 1999. Genetic similarity among pheromone and voltinism races of *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera : Crambidae). *Insect Molecular Biology* 8 (2): 213-221.
- MAYR, E. 1942. Systematics and the Origin of Species, Colombia University Press, New York.
- MAYR, E. 1970. Populations, Species and Evolution, Harvard University Press, Cambridge.
- MING, Q. L., YAN, Y. H. and WANG, C. Z. 2007. Mechanisms of premating isolation between *Helicoverpa armigera* (Hubner) and *Helicoverpa assulta* (Guenee) (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of Insect Physiology* 53 (2): 170-178.
- MONTI, L., LEMEUNIER, F. and LALANNE-CASSOU, B. 1998. A chromosomal investigation of two closely related species of *Spodoptera*. *Comptes Rendus De l'Academie Des Sciences, Serie III-Sciences De La Vie-Life Sciences* 321 (4): 275-282.
- MURLIS, J., WILLIS, M. A. and CARDE, R. T. 2000. Spatial and temporal structures of pheromone plumes in fields and forests. *Physiological Entomology* 25 (3): 211-222.

- NDEMAH, R., SCHULTHESS, F., KORIE, S., BORGEMEISTER, C. and CARDWELL, K. F. 2001. Distribution, relative importance and effect of lepidopterous borers on maize yields in the forest zone and mid-altitude of Cameroon. *Journal of Economic Entomology* 94 (6): 1434-1444.
- NESBITT, B. F., BEEVOR, P. S., CORK, A., HALL, D. R., LESTER, R., BLAIR, B. W. and TANNOCK, J. 1980. Identification of the female sex pheromone of the maize stalk borer, *Busseola fusca*: a preliminary note. *Tropical Pest Management* 26 (3): 327.
- NEWTON, P. J., THOMAS, C. D., MASTRO, V. C. and SCHWALBE, C. P. 1993. Improved two-component blend of the synthetic female sex pheromone of *Cryptophlebia leucotreta*, and identification of an attractant for *C. peltastica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 66 (1): 75-82.
- OCHIENG, S. A., PARK, K. C. and BAKER, T. C. 2002. Host plant volatiles synergize responses of sex pheromone-specific olfactory receptor neurons in male *Helicoverpa zea*. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology* 188 (4): 325-333.
- ONO, T. 1985. Search behavior of pheromone-stimulated potato tuber moth males (Lepidoptera, Gelechiidae). *Journal of Ethology* 3: 1-4.
- PASDANSCHAMPS:
- PASHLEY, D. P., HAMMOND, A. M. and HARDY, T. N. 1992. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America* 85 (4): 400-405.
- PATERSON, H. E. H. 1985. The recognition concept of species, 21-29, in Species and speciation, E. S. VRBA, Pretoria.
- PELOZUELO, L., MALOSSE, C., GENESTIER, G., GUENEGO, H. and FREROT, B. 2004. Host-plant specialization in pheromone strains of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* in France. *Journal of Chemical Ecology* 30 (2): 335-352.
- POLASZEK, A. and KHAN, Z. R. 1998. Host plants. *CAB international*: 3-10.
- PROWELL, D. P., MCMICHAEL, M. and SILVAIN, J. F. 2004. Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera : Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America* 97 (5): 1034-1044.
- RAINA, A. K., KINGAN, T. G. and MATTOO, A. K. 1992. Chemical signals from host plant and sexual behavior in a moth. *Science* 255 (5044): 592-594.
- RATNADASS, A., TRAORE, T., SYLLA, M. and DIARRA, D. 2001. Improved techniques for mass-rearing *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) on an artificial diet. *African Entomology* 9 (2): 167-175.
- RENSBURG, J. B. J. V. 1997. Seasonal moth flight activity of the maize stalk borer, *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae) in small farming areas of South Africa. *Applied Plant Science* 11 (1): 20-23.
- ROELOFS, W. 1979. Production and reception of lepidopterous pheromone blends, in Chemical ecology: odour communication in animals. Scientific aspects, practical uses and economic prospects, Elsevier/North-Holland Biomedical Press., Amsterdam, The Netherlands.
- ROELOFS, W. L. and BROWN, R. L. 1982. Pheromones and evolutionary relationships of Tortricidae. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 395-422.

- ROELOFS, W. L., LIU, W. T., HAO, G. X., JIAO, H. M., ROONEY, A. P. and LINN, C. E. 2002. Evolution of moth sex pheromones via ancestral genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (21): 13621-13626.
- SALVATO, P., BATTISTI, A., CONCATO, S., MASUTTI, L., PATARNELLO, T. and ZANE, L. 2002. Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa* - *wilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology* 11: 2435-2444.
- SANS, A., RIBA, M., EIZAGUIRRE, M. and LOPEZ, C. 1997. Electroantennogram, wind tunnel and field responses of male Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, to several blends of its sex pheromone components. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 82 (2): 121-127.
- SASAKI, T., MASSAKI, N. and KUBO, T. 2005. *Wolbachia* variant that induces two distinct reproductive phenotypes in different hosts. *Heredity* 95 (5): 389-393.
- SCHAEFER, P. W., GRIES, G., GRIES, R. and HOLDEN, D. 1999. Pheromone components and diel periodicity of pheromonal communication in *Lymantria fumida*. *Journal of Chemical Ecology* 25 (10): 2305-2312.
- SCHLUTER, D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution* 16 (7): 372-380.
- SEZONLIN, M., DUPAS, S., LE RU, B., FAURE, N., LE GALL, P. and SILVAIN, J. F. 2006b. Phylogeographic pattern and regional evolutionary history of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera : Noctuidae) in sub-Saharan Africa. *Annales De La Societe Entomologique De France* 42 (3-4): 339-351.
- SEZONLIN, M., DUPAS, S., LE RU, B., GALL, P. L., MOYAL, P., CALATAYUD, P. A., GIFFARD, I., FAURE, N. and SILVAIN, J. F. 2006a. Phylogeography and population genetics of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Lepidoptera, Noctuidae) in sub-Saharan Africa. *Molecular Ecology* 15 (2):
- SHOREY, H. H. 1964. Sex pheromones of noctuid moths. II Mating behavior of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) with special references to the role of sex pheromone. *Annals of the Entomological Society of America* 57: 371-377.
- SHOREY, H. H. and GASTON, L. K. 1965. Sex pheromones of noctuid moths. V Circadian rhythm of pheromone-responsiveness in males of *Autographa californica*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera exigua*, and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera, Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 58 (5): 597-603.
- SHOREY, H. H., MORIN, K. L. and GASTON, L. K. 1968. Sex pheromones of noctuid moths. XV Timing of development of pheromone responsiveness and other indicators of reproductive age in males of eight species. *Annals of the Entomological Society of America* 61 (4): 857-861.
- SIMMONS, R. B. and WELLER, S. J. 2001. Utility and evolution of cytochrome *b* in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20 (2): 196-210.
- SOWER, L. L. and DATERMAN, G. E. 1985. Premating searching activity of male western spruce budworm moths *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera, Tortricidae). *The Canadian Entomologist*: 1273-1274.
- STRANDH, M. 2005. Evolution of sex pheromone production in moths, Departement of Ecology, Lund University.

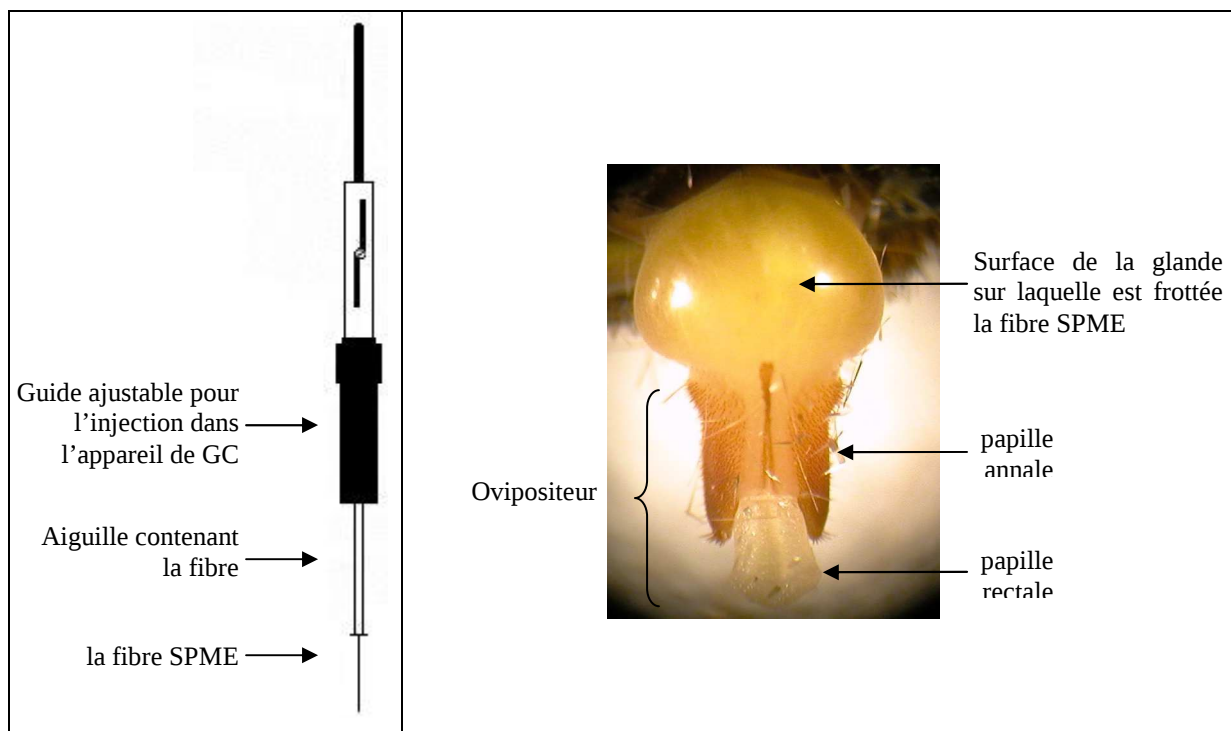
- SUBCHEV, M. A., STANIMIROVA, L. S. and MILKOVA, T. S. 1987. The effect of compounds related to cis-11-hexadecenyl acetate on its attractiveness to the males of *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) and some other noctuid species. *Folia Biologica, Poland* 35 (3-4): 143-150.
- SWOFFORD, D. L. 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAMHANKAR, A. J. 1994. Influence of host presence, age and mating on the calling behaviour of female *Earias vitella* (Fabricius) (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Science and its Application* 15 (3): 275-280.
- TEAL, P. E. A., MCLAUGHLIN, J. R. and TUMLINSON, J. H. 1981. Analysis of the reproductive behavior of *Heliothis virescens* (F.) under laboratory conditions. *Annals of the Entomological Society of America* 74 (3): 324-330.
- TEMPLETON, A. R. 1979. The theory of speciation via the founder principle. *Genetics* 94 (4): 1011-1038.
- THIBOUT, E. 1978. L'activité sexuelle et le rôle de l'accouplement sur la reproduction d'un Lépidoptère à distribution géographique étendue : *Acrolepiopsis assectella* Zell., Université François Rabelais, Tours.
- THOMAS, Y., BETHENOD, M. T., PELOZUELO, L., FREROT, B. and BOURGUET, D. 2003. Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hubner. I. sex pheromone, moth emergence timing, and parasitism. *Evolution* 57 (2): 261-273.
- TILLMAN, J. A., SEYBOLD, S. J., JURENKA, R. A. and BLOMQUIST, G. J. 1999. Insect pheromones - an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29 (6): 481-514.
- TORRES-VILA, L. M., STOCKEL, J. and RODRÍGUEZ-MOLINA, M. C. 1997. Physiological factors regulating polyandry in *Lobesia botrana* (Lepidoptera : Tortricidae). *Physiological Entomology* 22: 387-393.
- TOTH, M. 1982. Male produced pheromone of *Mamestra brassicae* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae): its possible role in courtship behaviour and study of other effects. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 17 (1/2): 123-132.
- UNNITHAN, G. C. and PAYE, S. O. 1990. Factors involved in mating, longevity, fecundity and egg fertility in the maize stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology* 109 (3):
- VIA, S. 2001. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology & Evolution* 16 (7): 381-390.
- VIA, S., BOUCK, A. C. and SKILLMAN, S. 2000. Reproductive isolation between divergent races of pea aphids on two hosts. II. Selection against migrants and hybrids in the parental environments. *Evolution* 54 (5): 1626-1637.
- VIA, S. and HAWTHORNE, D. J. 2002. The genetic architecture of ecological specialization: correlated gene effects on host use and habitat choice in pea aphids. *American Naturalist* 159 (Supplement): 77-88.
- WITZGALL, P. and FRÉROT, B. 1989. Pheromone emission by individual females of carnation tortrix, *Cacoecimorpha pronubana*. *Journal of Chemical Ecology* 15 (2): 707-717.

ZAGATTI, P. and CASTEL, Y. 1987. Courtship behaviour of the false codling moth, *Cryptophlebia leucotreta* (Meyrick): androconial display and mating success (Lepidoptera, Tortricidae). *Annales De La Societe Entomologique De France* 23 (2): 113-123.

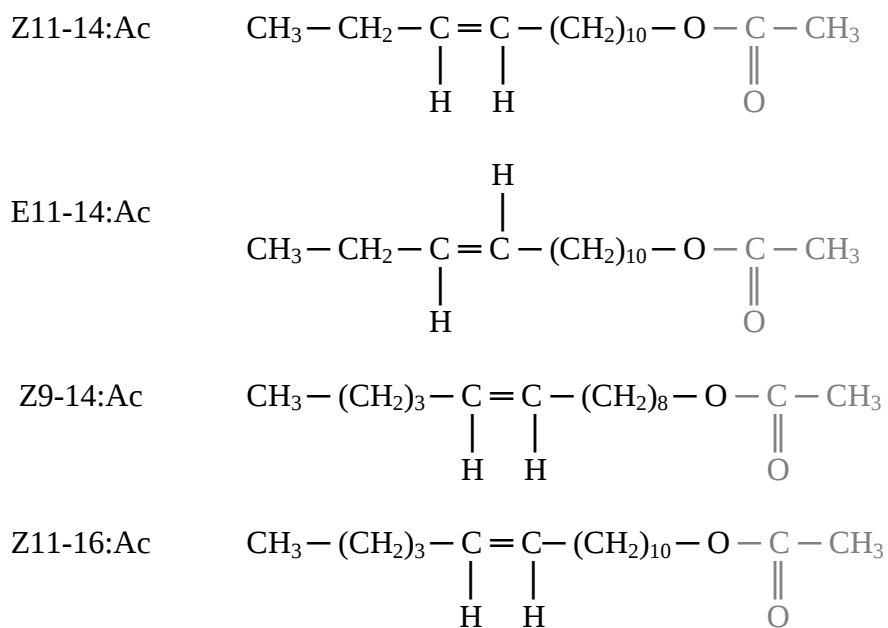
# Annexes

---

### Annexe 1 : Schéma de la fibre SPME et de son support et photographie d'une glande phéromonale (loupe binoculaire x 50)



### Annexe 2 : Les composés de la phéromone sexuelle femelle de *Busseola fusca*



fonction acétate

### Annexe 3 : Protocoles pour les locus microsatellites

#### Amplification PCR

|                 |                 |              |         |
|-----------------|-----------------|--------------|---------|
| ADN dilution 10 | 1µL             |              |         |
| Tampon 10X      | 1µL             |              |         |
| Qsol            | 2µL             |              |         |
| dNTP            | 0,5µL           |              |         |
| Amorce F        | 0,2µL           | Sauf pour le | 0,4 µL  |
| Amorce R        | 0,2µL           | locus B2.67  | 0,4 µL  |
| Taq             | 0,05µL (=0,25U) |              |         |
| H2O             | 5,05µL          |              | 4,65 µL |

#### Programme PCR Touch down (Thermocycleur Eppendorf)

|      |        |                                    |
|------|--------|------------------------------------|
| 95°C | 15 min |                                    |
| 94°C | 30 s   | } - 0,5°C/cycle X16 (de 58 à 50°C) |
| 58°C | 30 s   |                                    |
| 72°C | 30 s   |                                    |
| 94°C | 30 s   |                                    |
| 55°C | 30 s   | } X 30                             |
| 72°C | 30 s   |                                    |
| 72°C | 10min  |                                    |

#### Dilutions et plex

|        |        |        |      |           |
|--------|--------|--------|------|-----------|
| Plex 1 |        | Plex 2 |      | Plex 3    |
| B1.65  | d200   | B1.29  | d50  | B2.67 pur |
| B2.41  | À voir | B1.70  | d100 |           |
| B3.21  | d100   | B3.117 | d150 |           |

| Nom du locus | Motif   | Code de GenBank | Séquence de l'amorce 5'-3'                                  | Nombre d'allèles | Taille de l'Allèle |
|--------------|---------|-----------------|-------------------------------------------------------------|------------------|--------------------|
| B1.29        | (TCT)8  | AY884595        | F: TCAAACACGGCAACTCTTAC<br>R: TAGAAAGCCTTGGGGGAG            | 4                | 106-130            |
| B1.65        | (GAA)9  | AY884596        | F: CTGGGATGGGTAGTTTGCATAGTG<br>R: CTTCGATATCAAGATCTGCATGTTC | 5                | 168-183            |
| B1.70        | (AAG)8  | AY884597        | F: CGGTCGTTGTGAAAATCCTTGG<br>R: GTGAAGATGGTAGCGCAGCTGT      | 5                | 120-132            |
| B2.41        | (CTT)10 | AY884598        | F: AGGGCACGGCTTCTTTAG<br>R: TGGCGTCGCATGATTGAG              | 4                | 159-171            |
| B2.67        | (GAA)7  | AY884599        | F: TCGTTTTGGAAAGCCTTG<br>R: TTTATTTTGGGGTGGACC              | 5                | 158-176            |
| B3.21        | (CA)10  | AY884601        | F: GGACGATTTTCACGACTT<br>R: AGCAGTCAGGGTCACTAA              | 10               | 126-178            |
| B3.117       | (AG)13  | AY884602        | F: CAAGGATACCACCTCACGCCAAG<br>R: GATGGTAGTTGTCGCAGCGAAGC    | 10               | 159-187            |

Caractéristiques des locus microsatellites (Faure et Silvain, 2005).

## Annexe 4 : Composition du liquide de Faure

### Composition :

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| - eau distillée         | 50 cc. |
| - hydrate de chloral    | 50 g.  |
| - glycérine             | 20 cc. |
| - Gomme arabique blonde | 30 g.  |

### Protocole :

- 1) Mélanger à froid l'eau distillée et l'hydrate de chloral. Ajouter la glycérine quand l'hydrate est totalement dissout
- 2) Mettre la gomme arabique dans un sachet de tulle très fin
- 3) Laisser tremper à froid et à l'air libre ce sachet dans le liquide obtenu
- 4) Agiter fréquemment pour faciliter la diffusion lente
- 5) Recouvrir pour éviter les poussières

Le système de reconnaissance du partenaire sexuel (SMRS) développé par Paterson est un critère important dans la caractérisation des espèces. Dans ce cadre, l'étude d'un complexe d'espèces de Lépidoptères trouve son intérêt. Au Kenya, le genre *Busseola* est représenté par trois espèces. *B. fusca* offre un cas intéressant de passage quasi absolu du compartiment sauvage au compartiment cultivé ; *B. phaia* et *B. segeta* s'apparentent à un cas de fidélité à l'hôte endémique. *B. phaia* et *B. segeta* partagent leurs aires de répartition avec *B. fusca*, mais sont isolées par la vallée du Rift et par les plantes-hôtes. *B. segeta* et *B. phaia* montre une grande proximité systématique. Nous avons étudié ces taxa au travers d'une approche d'écologie chimique et de phylogénie. La diversité génétique observée chez *B. fusca* au niveau populationnel n'est pas corrélée avec une variabilité du SMRS. Chez *B. phaia* et *B. segeta*, l'étude du SMRS a permis de caractériser les composantes de l'isolement reproducteur. L'analyse phylogénétique combinée à l'écologie chimique a permis d'émettre différentes hypothèses quant au statut d'espèce de *B. phaia* et *B. segeta*.

Mots-clés : spéciation, SMRS, population, isolement reproducteur, phylogénie, haplotype, phéromone, attraction, comportement de cour, relation plante-insecte, *B. fusca*, *B. segeta*, *B. phaia*, cytochrome *b*, microsatellites, GC, GC-MS, SPME, tunnel de vol

Title: Chemical ecology and phylogenetic approaches in three African  
Lepidoptera species of genus *Busseola* (Noctuidae)

Specific mate recognition system (SMRS) described by Paterson is an important factor in species characterization. In this context, study of Lepidoptera species complex is interesting. In Kenya, genus *Busseola* is represented by three species. *B. fusca* is an interesting case of a practically complete shift from wild compartment to cultivated area whereas *B. phaia* and *B. segeta* are likely to be an example of host fidelity. *B. phaia* and *B. segeta* share their range with *B. fusca*, but are separated from each other by the Rift valley and host-plants. *B. phaia* and *B. segeta* are very close related by taxonomy criteria. We studied these taxa through chemical ecology and phylogenetic approaches. Genetic diversity observed in *B. fusca* populations is not correlated with SMRS variability. In *B. phaia* and *B. segeta*, the study of SMRS led to the characterization of the reproductive isolation components. The phylogenetic analysis combined with chemical ecology contributed to make different assumptions on the species status of *B. phaia* and *B. segeta*.

Key-words: speciation, SMRS, population, reproductive isolation, phylogeny, haplotype, pheromone, attraction, courtship behaviour, plant-insect relationship, *B. fusca*, *B. segeta*, *B. phaia*, cytochrome *b*, microsatellites, GC, GC-MS, SPME, wind tunnel