

Rapport de stage

Etude des flux géniques chez le vecteur du nématode du pin, *Monochamus galloprovincialis*, à l'échelle d'un massif montagneux.

David N. Tellez¹, sous la direction de Géraldine Roux². Co-encadrement : Julien Haran²

¹Master II BOPE, Collegium sciences et techniques, 45067 Orléans, France ;

^{1,2}INRA, UR0633 (URZF, Zoologie Forestière), F-45075 Orléans, France ; ¹courriel

de l'auteur (tellez.david1@gmail.com)

Soumis le 9 juin 2014.

Dans le but d'étudier les processus de dispersion et les flux de gènes chez *Monochamus galloprovincialis*, vecteur du nématode du pin en Europe, une analyse génétique utilisant des marqueurs microsatellites a été menée à l'échelle d'un massif montagneux, sur des populations piégées dans les Alpes françaises. Les individus ont été échantillonnés dans 11 populations le long d'un gradient altitudinal. Dix loci microsatellites ont été examinés sur un total de 184 individus, le nombre d'allèles varie de 2 à 12 par locus. L'hétérozygotie moyenne observée est comprise entre 0.401 à 0.448 pour les 11 sites échantillonnés, avec une moyenne de 0.426. La faible différenciation observée entre les populations de plaine et d'altitude suggère la présence de flux de gènes. Cette étude a permis de confirmer la présence de flux de gènes entre les sous-espèces décrites chez *M. galloprovincialis*. D'autre part, nous n'avons pas mis en évidence de preuves d'hybridation avec l'espèce sœur *M. sutor*. Cette étude a pour objectif finalisé de bâtir des scénarios microévolutifs permettant de modéliser l'expansion potentielle du nématode du pin en Europe.

Mots clés: dispersion, espèce invasive, microsatellite, gradient altitudinal, taxonomie intégrative.

A mi esposa Nataly,
A Luciana, nuestra hija que está a punto de nacer,
A Elliott, nuestro hijo

Rapport de stage

Etude des flux géniques chez le vecteur du nématode du pin, *Monochamus galloprovincialis*, à l'échelle d'un massif montagneux.

David N. Tellez¹, sous la direction de Géraldine Roux². Co-encadrement : Julien Haran²

¹Master II BOPE, Collegium sciences et techniques, 45067 Orléans, France ;

^{1,2}INRA, UR0633 (URZF, Zoologie Forestière), F-45075 Orléans, France ; ¹courriel
de l'auteur (tellez.david1@gmail.com)

Soumis le 9 juin 2014.

Dans le but d'étudier les processus de dispersion et les flux de gènes chez *Monochamus galloprovincialis*, vecteur du nématode du pin en Europe, une analyse génétique utilisant des marqueurs microsatellites a été menée à l'échelle d'un massif montagneux, sur des populations piégées dans les Alpes françaises. Les individus ont été échantillonnés dans 11 populations le long d'un gradient altitudinal. Dix loci microsatellites ont été examinés sur un total de 184 individus, le nombre d'allèles varie de 2 à 12 par locus. L'hétérozygotie moyenne observée est comprise entre 0.401 à 0.448 pour les 11 sites échantillonnés, avec une moyenne de 0.426. La faible différenciation observée entre les populations de plaine et d'altitude suggère la présence de flux de gènes. Cette étude a permis de confirmer la présence de flux de gènes entre les sous-espèces décrites chez *M. galloprovincialis*. D'autre part, nous n'avons pas mis en évidence de preuves d'hybridation avec l'espèce sœur *M. sutor*. Cette étude a pour objectif finalisé de bâtir des scénarios microévolutifs permettant de modéliser l'expansion potentielle du nématode du pin en Europe.

Mots clés: dispersion, espèce invasive, microsatellite, gradient altitudinal, taxonomie intégrative.

Abstract To study dispersal processes and gene flow in *Monochamus galloprovincialis*, vector of the pine wood nematode in Europe, a microsatellite marker-based genetic analysis was conducted across a mountain range, on populations trapped in the French Alps. Individuals were collected from 11 sites along an altitudinal gradient. Ten microsatellite loci were examined on a total of 184 individuals, allele number ranged from 2 to 12. The mean observed heterozygosity varied from 0.401 to 0.448 in the 11 sites, with an overall mean of 0.426. The low differentiation observed between lowland and upland populations suggests the presence of gene flow. This study confirmed the presence of gene flow between the subspecies described in *M. galloprovincialis*. Furthermore, we have not revealed evidence of hybridization with the sister species *M. sutor*. The finalized objective of this study is to build microevolutionary scenarios in order to model the PWN potential expansion in Europe.

Key words: dispersal, invasive species, microsatellite, elevation, integrative taxonomy

INTRODUCTION

Contexte générale : Espèces invasives

Pendant des siècles, les humains ont déplacé de manière souvent non intentionnelle plantes, animaux, et autres organismes à travers le Monde. Jusqu'au 15^{ème} siècle les introductions d'espèces exogènes étaient limitées à l'échelle continentale, d'une zone à une autre et à un rythme relativement lent. Dès le 16^{ème} siècle, un tournant historique s'est produit. Avec le début des explorations et la colonisation de nouveaux territoires, marquant le début de la mondialisation des échanges, les barrières naturelles des différentes aires biogéographiques sont devenues de plus en plus perméables. Depuis, la mondialisation ne cesse de mener à toujours plus d'interdépendance entre pays et continents, les échanges se sont intensifiés, la nature et la direction de ces derniers s'est diversifiée. Bon nombre d'espèces animales et végétales ont été ainsi passivement transportées via différents moyens de transport anthropiques, toujours plus efficaces et rapides avec les avancées technologiques (Di Castri 1989). Ces espèces exogènes, lorsqu'elles survivent peuvent s'établir et devenir invasives, perturbant dans ce cas l'écosystème dans lequel elles ont été déplacées, ce qui dans certains cas a des répercussions économiques (Blackburn et al. 2014).

Le nématode du pin

Le nématode du pin (Pine wood nematode : PWN), *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Bührer, 1934) Nickle, 1970 (Nematoda : Aphelenchoidea) est une espèce possédant un potentiel invasif important. Ce nématode cause la maladie du flétrissement du pin ou « Pine Wilt Disease (PWD) » qui est probablement la menace la plus sérieuse pour les

pinèdes du globe (Webster and Mota 2008). Endémique des Etats-Unis, où il ne cause pas de dégâts sur les pins natifs, *B. xylophilus* est épidémique dans l'ensemble de l'Eurasie où il est responsable de sévères dommages économiques (Suzuki 2002, Rodrigues 2008). De ce fait, l'Union Européenne, menacée par ce dernier (Soliman et al. 2012) le considère comme un organisme de quarantaine, entraînant la mise en embargo du bois en provenance des pays touchés.

Ce sont principalement les transports de bois contaminés, mais aussi les transports accidentels non commerciaux qui lui ont permis d'étendre considérablement son aire de répartition (Robinet et al. 2009). En dehors de sa zone d'origine, une fois introduit dans un arbre sain (transmission primaire, cf. *Vecteurs naturels et transmission*), le nématode va se nourrir et détruire le xylème et commencer à se reproduire interrompant les flux de résine et d'eau et mener à la mort de l'arbre dans la plupart des cas. La mort de l'arbre survient généralement entre 2 et 8 semaines après l'infection, suivant la zone géographique. Dans le cas où l'arbre est dépérissant ou déjà mort (transmission secondaire, cf. *Vecteurs naturels et transmission*), les larves de nématodes se répandent aux alentours de la zone d'introduction et se nourrissent de champignons associés au bois (e.g. *Ceratocysis* sp.) (Linit 1988, Naves et al. 2007, Shröder et al. 2009, Suzuki 2002).



Figure 1. Historique de l'invasion de *Bursaphelenchus xylophilus* à travers le monde de 1905 à 2014. En rouge : pays où le nématode est épidémique.

Vecteurs naturels et transmission du nématode

La dispersion naturelle du nématode du pin est réalisée par des insectes xylophages systématiquement indigènes de la zone d'introduction et s'effectue à l'échelle locale, de proche en proche lorsque le vecteur recherche un arbre hôte. *B. xylophilus* entretient une

relation phorétique stricte avec ces derniers. Bien que le nématode soit présent au sein de plusieurs familles de coléoptères, seul le genre *Monochamus* (Coleoptera : Cerambycidae) est connu pour assurer sa transmission à un arbre hôte (Linit 1988). La dispersion est ainsi assurée par les adultes de *M. alternatus* (Hope) et *M. saltuarius* (Gebler) en Asie, *M. carolinensis* (Olivier) et *M. titillator* (Fabricius) en Amérique du Nord. En Europe, au Portugal (Shröder et al. 2009) et en Espagne (Robertson et al. 2011), le seul vecteur reconnu est l'espèce *M. galloprovincialis*, seul représentant du genre *Monochamus* au Portugal (Sousa et al. 2001). On ne peut pas cependant exclure que d'autres espèces européennes, *M. sutor* (Linnaeus), *M. saltuarius*, *M. urussovii* (Fisher), et *M. sartor* (Fabricius), puissent être de potentiels vecteurs.

Le nématode pénètre dans son vecteur juste avant que ce dernier n'émerge d'un bois contaminé. La transmission du nématode peut se faire de deux manières (cf. Figure 2). Elle a lieu soit au cours de la nutrition de maturation du vecteur sur les branches de pin (transmission primaire et à priori majoritaire) soit au cours de la ponte sur un arbre dépérissant ou fraîchement coupé (transmission secondaire) (Shröder et al. 2009, Naves et al. 2007, Linit 1988). Bien qu'apparemment minoritaire, la transmission secondaire pourrait être l'occasion d'une dispersion à plus longue distance. En effet, en condition normale, s'il est aisé pour le vecteur de trouver rapidement un pin sain pour se nourrir, il est plus difficile de trouver un arbre dépérissant pour pondre, ceux-ci étant généralement présents de manière éparse au sein des peuplements.

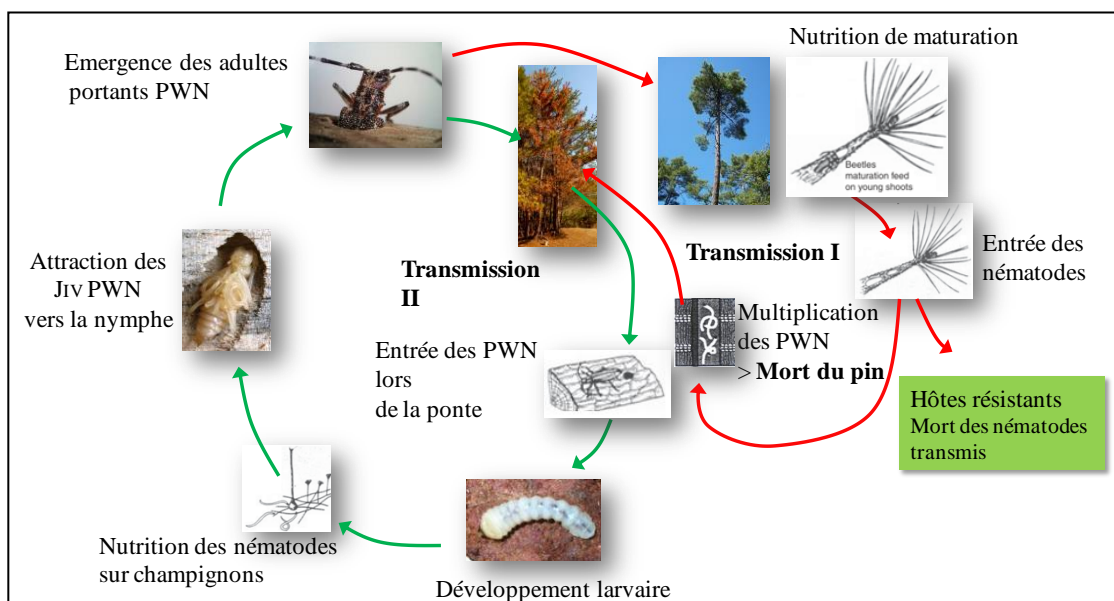


Figure 2. Cycle de transmission de *B. xylophilus* par ses vecteurs du genre *Monochamus*. D'après Schröder et al. (2009). PWN= Pine wood nematode, J_{IV}=larve de stade IV.

Monochamus galloprovincialis et sutor

La distribution de ces deux espèces comporte des différences résultant des exigences écologiques de chacune. Cependant, il existe des zones de moyenne altitude, dans les Alpes françaises notamment, où elles se maintiennent en sympatrie. Ces zones correspondent aux régions où *P. sylvestris* et *P. nigra* coexistent. La partie ouest des Alpes françaises est connue pour être une importante zone d'hybridation pour beaucoup d'espèces (Koutroumpa et al. 2012). Il est donc à priori possible que nous observions, dans les zones de contact, des traces d'hybridation entre *M. sutor* et *M. galloprovincialis* qui récemment séparées sont encore génétiquement proches (Cesari et al. 2005, Koutroumpa et al. 2012).

Chacune de ces espèces présentent deux morphotypes géographiques dont la validité taxonomique reste à préciser. Ainsi, *M. galloprovincialis* qui évolue plutôt en plaine et à basse altitude serait représenté par les formes *M. g. galloprovincialis* (Olivier) et *M. g. pistora* (Germar). Cependant, un polymorphisme morphologique important rend délicate la différenciation de ces deux formes (Hellrigl 1971, Koutroumpa et al. 2012). On peut retrouver *M. galloprovincialis* jusqu'à 1000 m (Hellrigl 1967) voir même d'avantage. Dans les Alpes-de-Haute-Provence, Rougon (1975) note sa présence à 1450 m dans une zone de transition à tendance méditerranéenne. *M. sutor*, est en revanche une espèce d'altitude (Hellrigl 1971, Koutroumpa et al. 2012, Schröder et al. 2009). Cette espèce présente les formes *M. s. sutor* (Linnaeus) et *M. s. pellio* (Germar) et a été contactée jusqu'à 1650 mètre dans les Alpes françaises (Rougon 1970).

La dispersion

La dispersion est un élément clé dans les processus d'invasion. Celle du nématode est intimement liée aux vecteurs du genre *Monochamus* sans lesquels elle ne serait possible. Il est donc important de connaître les capacités dispersives de ces vecteurs, afin de mieux appréhender l'invasion du nématode et mettre en place des stratégies de lutte adaptées. Toutefois, il est important de distinguer la dispersion efficace du nématode (i.e. transmission du nématode à un nouvel hôte) de la dispersion efficace de l'insecte (i.e. migration et flux de gènes entre populations, mais aussi d'une génération à l'autre). Dans notre étude, nous nous intéressons à la dispersion efficace du vecteur.

L'estimation de la dispersion des individus est complexe, en raison de contraintes liées aux techniques utilisées pour l'étudier. Son estimation, malgré son importance, constitue toujours un défi d'actualité en biologie. Pour étudier la dispersion d'un insecte, et plus largement d'un animal, deux approches sont possibles, les approches directes et les approches indirectes.

Les approches directes, dites démographiques, sont basées sur l'observation ou la mesure *in-situ* et en temps réel de la dispersion des individus. Elles ont pour objectif de mesurer les distances parcourues par les individus présents dans un espace donné (e. g. entre leur lieu de naissance et de reproduction) (Rieux 2011). Les principales méthodes utilisées dans ce cas sont la méthode de capture marquage recapture (CMR), de suivi par balise électronique et par radio-tracking. La méthode CMR qui est communément employée est la plus efficace pour mesurer les déplacements à courte distance, ce qui n'est pas vrai pour les déplacements à longue distance (Kim and Sappington 2013). Mesurer les événements de dispersion à longue distance est bien moins évident car cela nécessite une logistique lourde à mettre en place et bien souvent infaisable (Miller et al. 2009). Cette méthode a pour inconvénients d'être limitée par le nombre de piège et leur distance par rapport au point de relâché (Franzen and Nilsson 2007), les insectes pouvant être piégés à des distances plus courtes que celles qu'ils auraient effectivement parcourue sans être piégés. Il est aussi difficile de réaliser des observations sur des classes de distance rarement visitées. De ce fait, il est admis que cette méthode sous-estime les capacités de vol réelles des individus (Ranius 2006).

L'approche indirecte est basée sur la mesure *ex-situ* de la dispersion des individus. Elle peut être mesurée en temps réel, de manière expérimentale avec des individus vivants, en manège de vol (Vogt et al. 2000). D'après Edwards (2006), cette méthode surestimerait la distance de vol parcourue en raison du fait que les insectes, étant suspendus dans le vide, n'ont pas de contact avec le sol, ce qui les stimule à voler. Cependant cette surestimation peut être pondérée par le fait que selon Taylor et al. (2010), les expérimentations en manège de vol sous-estimeraient la vitesse de vol de 2-3 fois comparé à des individus en vol libre. Cette méthode apporte une information sur l'aptitude physiologique d'une espèce au vol. En revanche, elle ne permet pas de connaître la dispersion d'une espèce au sein de son environnement, qui peut être fortement affecté par le comportement de l'espèce et les caractéristiques du milieu.

Enfin, une autre méthode indirecte est l'étude des flux de gènes (Shoda-Kagaya 2007, Broquet and Petit 2009, Kim and Sappington 2013...). Cette méthode se base sur la distribution des fréquences alléliques pour estimer les niveaux de flux géniques ayant permis de générer un patron observé. L'étude de la dispersion basée sur les flux de gènes a pris un essor considérable durant la dernière décennie, en raison de la mise à disposition d'outils génétiques adaptés (Manel and Holderegger 2014). L'étude de la distribution spatiale de la diversité génétique est un moyen d'obtenir des informations sur la direction et l'importance des flux géniques en jeu, via la répartition des fréquences alléliques. Les marqueurs

microsatellites sont des marqueurs nucléaires hautement polymorphes largement utilisés pour estimer les flux de gènes chez une espèce (Bermond et al. 2013, Castillo et al. 2014).

Objectifs de l'étude

Cette étude s'insère dans le projet européen REPHRAME qui a pour objectif de caractériser les paramètres de l'invasion du nématode du pin en Europe. Au sein de ce projet, le Work Package 3 rassemble différentes méthodes pour estimer les capacités dispersives du vecteur. Ainsi, la dispersion est étudiée par la méthode de capture-marquage-recapture en Espagne (Mas et al. 2013), et à Bordeaux, en manège de vol par David et al. (2013).

Le laboratoire URZF de l'INRA d'Orléans, quant à lui, étudie les capacités de dispersion de *M. galloprovincialis* en se basant sur l'utilisation de marqueurs moléculaires. Une première étude basée sur l'utilisation de marqueurs mitochondriaux (le COI notamment) a permis de définir la structuration génétique de l'espèce à large échelle (Koutroumpa et al. 2012), mais a mis en évidence des problèmes liés aux pseudogènes mitochondriaux perturbant le signal infraspécifique (Haran et al. soumis).

Mon étude propose de quantifier les flux de gènes s'exerçant entre des populations de cette espèce à fine échelle, en utilisant des outils hautement polymorphes que sont les microsatellites.

Mes objectifs sont les suivants : **(i)** étudier l'effet de l'altitude sur les flux de gènes s'exerçant entre les populations de *M. galloprovincialis* selon un gradient altitudinal dans les Alpes ; **(ii)** clarifier la distribution altitudinale et les flux de gènes entre les deux formes présentes chez *M. galloprovincialis* et **(iii)** vérifier l'existence d'hybrides avec l'espèce sœur *M. sutor* dans les zones de sympatrie.

Cette étude combine deux approches : (a) la taxonomie intégrative, en intégrant des paramètres morphologiques, écologiques et génétiques dans le but de caractériser le statut infraspécifique des individus échantillonnés ; (b) la génétique des populations, majoritaire dans mon stage, a permis d'appréhender les mouvements d'individus le long d'un gradient altitudinal.

MATERIEL & METHODES

Dispositif d'échantillonnage

Les individus utilisés pour cette étude proviennent d'échantillonnages réalisés dans les Alpes françaises en 2012 et 2013, durant la période d'activité de l'espèce, soit de juin à octobre. Les sites de collecte, au nombre de 11 (cf. Tableau I), ont été disposés le long d'un transect orienté Sud / Ouest – Nord / Est. Ce dernier, long de près de 240 km est à cheval sur les départements des Hautes-Alpes, des Alpes-de-Haute-Provence et des Bouches-du-Rhône. Ce transect a été conçu de manière à tester l'effet de l'altitude sur la structuration des populations. Ainsi, les points d'échantillonnage ont été disposés à différentes altitudes, allant de 260 à 1950 mètres. Un effort d'échantillonnage a été réalisé entre 1000 et 1400 mètres, zone de sympatrie des deux morphotypes de *M. galloprovincialis* et de *M. sutor*. Une portion du transect, des populations 5 à 10b, offre un gradient altitudinal allant de 843 à 1900 m. (cf. Figure 3).

Sur chaque site, le dispositif de piégeage était constitué de 3 pièges Multifunnel® disposés au sein de peuplements de pins. Chaque piège a été amorcé avec le pack Galloprotect® qui est, à priori, attractif pour les deux espèces, *M. galloprovincialis* et *M. sutor*. Ce pack est composé de trois diffuseurs, un pour une phéromone d'agrégation (2-undecyloxy-1-ethanol (Pajares et al. 2013) et les deux autres pour les kairomones ipsenol, 2-méthyl-3-buten-1-ol et alpha-pinène. Les pièges ont été relevés toutes les deux semaines.

Les individus collectés ont été stockés en chambre froide (+4°C) dans des tubes d'alcool à 96%.

Identification des espèces

La première étape a consisté en une identification spécifique du matériel collecté. Pour cela, j'ai utilisé une loupe binoculaire Leica MZ 6 (6:1, 6, 3x> 40x). L'étude des critères relatifs aux particularités des organes internes de chaque espèce (génitalia, spermathèque...) n'était pas indispensable dans notre cas et n'a pas été réalisée. Cette partie est donc uniquement basée sur des critères morphologiques externes qui ont été choisis en s'appuyant sur des études morphologiques et systématiques (Wallin et al. 2013, Koutroumpa et al. 2013). Ainsi, les principaux caractères observés pris en compte ont été le patron et la couleur de la pubescence élytrale, la pubescence du scutellum, la couleur des pattes et antennes, la pubescence de l'épine latérale du pronotum, la granulation de la base des élytres et la forme globale de l'abdomen. *M. sutor* présente un scutellum généralement traversé par une ligne

Tableau I. Caractéristiques des populations utilisées pour l'étude. Localisation, nombre d'individus génotypés, caractéristiques génétiques de base des populations. *M. g. g* = *M. g. galloprovincialis*, *M. g. p* = *M. g. pistora*, Rich. all. = Richesse allélique, H_O = Hétérozygotie observée, H_E = Hétérozygotie attendue, F = indice de fixation.

Code pop.	Localité	Lat.	Long.	Alt. (m)	Orientation	Essence dominante	<i>M.g. g.</i>	<i>M. g. p.</i>	Rich. all.	H_O	H_E	F
Pop1	Meyrargues	43.63N	5.52E	260	X	<i>P. halepensis</i>	30	0	3,24	0,43	0,463	0,071
Pop2	Vergons	43.91N	6.58E	1128	NO	?	5	0	3,23	0,418	0,413	-0,032
Pop3	St André les Alpes	43.98N	6.50E	1226	SE	<i>P. sylvestris</i>	4	0	X	X	X	X
Pop4	Verdaches	44.25N	6.33E	1444	O	<i>P. sylvestris</i>	4	0	X	X	X	X
Pop5	Serre Ponçon	44.53N	6.34E	843	SO	<i>P. sylvestris et P. n. laricio</i>	5	0	X	X	X	X
Pop6	Merdanel	44.69N	6.62E	1000	SO	<i>P. sylvestris</i>	46	3	3,22	0,432	0,456	0,032
Pop7	Fournel	44.79N	6.52E	1300	Talweg	<i>P. sylvestris</i>	13	10	3,04	0,401	0,437	0,187
Pop8	Villar St Pancrace	44.86N	6.60E	1220	NE	<i>P. sylvestris</i>	5	4	3,31	0,426	0,468	0,07
Pop9	Les Partias	44.88N	6.58E	1550	NNE	<i>P. sylvestris</i>	15	4				
Pop10	Ayes	44.85N	6.65E	1600-1900	N	<i>P. sylvestris</i>	6	0				
Pop11	Montgenèvre	44.92N	6.70E	1436-1950	N	<i>P. sylvestris et P. uncinata</i>	14	11	3,17	0,448	0,473	0,034

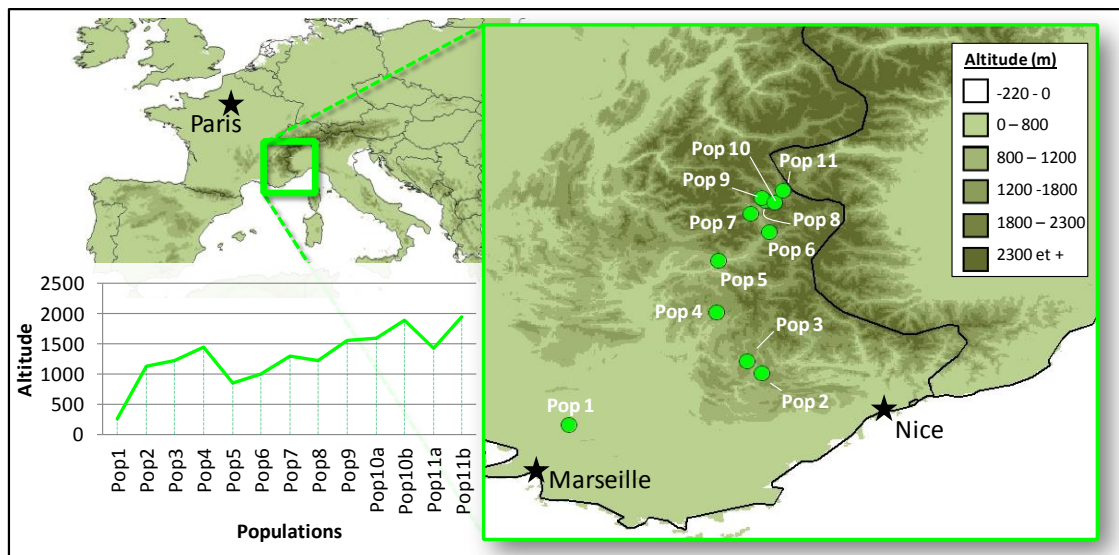


Figure 3. Localisation des populations échantillonnées et profil altitudinal. Pop=population.

médiane glabre, une pubescence élytrale jaunâtre regroupée en tâches réparties de manière plus ou moins hétérogène, et des pattes et antennes noires. *M. galloprovincialis* au contraire possède un scutellum sans ligne médiane complète, sa pubescence élytrale est de couleur blanchâtre à jaunâtre et forme une bande transversale au milieu des élytres. Les pattes et les

antennes de ce dernier sont généralement rougeâtres, bien que celles-ci soient noires chez certains individus d'altitude (*M. g. pistor*).

Extraction d'ADN et génotypage microsatellite

Pour chaque individu, l'ADN a été extrait de deux pattes à l'aide d'un kit utilisant des colonnes d'extraction, le kit Nucleospin® (Macherey-Nagel, Düren, Germany). L'avantage d'utiliser les pattes pour cette étape permet de minimiser les contaminations liées à la présence d'autres organismes comme des nématodes. D'autre part, l'ADN y est en général bien conservé. La concentration d'ADN de chaque échantillon a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop® 1000 et équilibrée à 25 ng/μL par dilution.

Le génotypage microsatellite repose sur l'utilisation de 10 marqueurs polymorphes développés par la société Genoscreen (Haran et al. *in prep.*). Les multiplexes ont été optimisés par cette dernière. Ainsi, les 10 loci ont été séparés en trois multiplexes (Tableau II). Un colorant fluorescent (6'FAM, NED, PET VIC) a été attaché à l'amorce forward de chaque paire pour la discrimination des pics (Haran et al. *in prep.*).

Les PCRs (polymerase chain reaction) ont été réalisées dans un volume de 25 μL contenant 1μL d'ADN (~25 ng/μL), 1.875 μL de Dream Taq Green Buffer (Thermo Scientific), 0.5 μL de Betaine, 0.6 μL de dNTP (10 μM), les amorces (à une concentration de 20μmol/L), de l'eau deionisée et 0.2 μL de DreamTaq. Les détails relatifs aux proportions des amorces de chaque multiplexe sont mentionnés dans le tableau II.

Les amplifications PCR ont été réalisées avec un thermocycleur Veriti® 96 well fast Thermal cycler (Applied biosystems®). Le programme d'amplification est le suivant : une première étape de dénaturation de 10 minutes à 95°C, 40 cycles de dénaturation (30 sec. chacun à 95°C), une étape d'hybridation (30 sec à 55°C) et d'élongation (1 minute à 72°C), et pour finir une élongation finale de 10 minutes cette fois, à 72 °C. Pour chaque échantillon amplifié, 1μL du produit de la PCR a été dénaturé dans 10μL de formamide et 0.3μL de marqueur de taille 600 Liz avant d'être analysé par électrophorèse capillaire (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems ®)). Le produit du génotypage a été traité avec la version 4.1 du logiciel GeneMapper ® qui est développé par la société Applied biosystems.

Analyses des données

Pour définir la structure génétique des populations, nous avons utilisé deux approches : la première, « populations centrée », basée sur les fréquences des allèles et requière un nombre suffisant d'individus par populations. La seconde, « individus centrée », se base sur la

clusterisation de chaque individu séparément. Pour effectuer les analyses, nous n'avons pas jugé nécessaire de séparer les deux formes de *Monochamus galloprovincialis*, car l'approche « individus centrée » nous permet de distinguer chaque individu séparément et par conséquent d'identifier une base génétique pour ces formes.

- Paramètres génétiques des marqueurs microsatellites

L'objectif est ici de caractériser la différenciation des populations en se basant sur l'étude des fréquences alléliques. Ce type d'analyse fréquentiste, requiert des populations d'effectifs suffisants. Or, en raison de difficultés d'échantillonnage, il est parfois difficile d'obtenir un nombre suffisant par populations. Nous considérerons, dans cette étude une population valide si son effectif est au moins égale à 9 individus. En effet, il est possible de s'affranchir de travailler avec des populations de fort effectif lorsque l'on travaille à faible échelle (Prunier et al. 2013). Certaines populations géographiquement très proches peuvent être regroupées pour augmenter les effectifs et la robustesse des tests. Les regroupements ont été effectués uniquement lorsque les nouvelles populations formées étaient à l'équilibre d'Hardy-Weinberg.

Pour les analyses suivantes, seules 9 des 11 populations initiales ont été utilisées, les populations 4 et 5 n'ayant pas été prises en compte à cause de leurs effectifs trop faibles et de l'impossibilité de les regrouper (cf. Tableau I). Parmi les 9 populations restantes, les populations 2 et 3 ont été regroupées, ainsi que les populations 8, 9 et 10. Ces dernières figureront entre crochets lorsqu'elles seront mentionnées en tant que populations regroupées (e. g. [8,9 et 10]). Au final, les analyses basées sur les fréquences alléliques ont été menées sur 6 populations.

Dans un premier temps nous avons testé l'équilibre de Hardy Weinberg en calculant l'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e), le F_{is} à l'aide de la version en ligne de Genepop 4.2 (Raymont et Rousset 1995, Rousset 2008). Ensuite, les fréquences allélique ont été quantifiées via le package multi-plateforme GeneAIEx 6.5 (Genetic Analysis in Excel) (Peakall and Smouse 2012) (cf. Tableau II).

Les allèles nuls résultent de problème d'amplifications dans certains loci et peuvent gravement biaiser les estimations de distances génétiques. Les allèles nuls ont été détectés et corrigés à l'aide du logiciel FreeNA (Chapuis and Estoup 2007), supposant l'existence d'un seul allèle nul pour les loci concernés et pour toutes les populations. La liaison physique entre deux loci et la covariation qu'elle entraîne peut également biaiser les analyses basées sur les

fréquences alléliques. La présence de déséquilibre de liaison entre les 12 loci a été testée à l'aide de Genepop 4.2 (Raymont et Rousset 1995, Rousset 2008).

Tableau II: Caractéristiques des loci et paramètres génétiques de bases sur l'ensemble des 6 populations Alpines (N=170), incluant le multiplexage des primers "Multiplexe" la quantité relative de chaque primer "Amount". (*) = présence potentielle d'allèles nuls au locus concerné, Na= nombre d'allèle, H_O = Hétérozygotie observée, H_E = Hétérozygotie attendue, F_{IS} = (H_E moyen- H_O moyen) / H_E moyen.

Locus	Sequences des Primers 5' -> 3'	Multiplexe	Amount (pmol)	Motif	Taille	Na	H _O	H _E	F _{IS}
Mon 08	F: TGGTGTCTGTAGAACGCTTCA R:GCTTATTAGCTCTCATCAGTATGCTC	3	2,5	(tata)5	192-196	2	0,3	0,307	0,023
Mon 17*	F: TAGTTTTACTGGGGCCAATG R:GAACTCATGAACGGATATAAATGAA	3	4	(gt)6	149-153	4	0,069	0,070	0,006
Mon 23	F: ATTTATTCCAAATTGCCAATACTACA R:GTGTAAGGTGGAAGTGTCAAAGC	1	5	(ca)7	142-144	6	0,261	0,283	0,079
Mon 30*	F: TTTCTAGTTTGCCTGTATCCCG R:AAAGCGGGTGTGAAGTACCA	1	4	(ag)8	236-248	12	0,627	0,599	0,046
Mon 31	F: GTAAGAGAACCCAACCACCG R:TTATCCTCACCGACCGTTA	2	1,6	(ag)8	146-150	5	0,454	0,502	0,095
Mon 35*	F: TTTCATCTGACTTAATTTTCTTTCTCA R:AGGGACGTGCAGATTAGGAA	2	18	(tc)8	110-126	12	0,799	0,8	0,001
Mon 36	F: ACGGTGCAGAACTAAAGTTAGCC R:GACTCGGACGGAGCTTCT	2	2	(tg)8	196-200	5	0,476	0,488	0,024
Mon 41	F: ACGGTAGCGCAATCTTGAGT R:ACGTGAGCAGTCCTGTTGC	3	2	(ct)9	116-120	7	0,102	0,122	0,166
Mon 42	F: CCTTATTTAGGTCAAGAATTCGC R:GCGTGTCATTATTCCAAGGAC	1	4	(gt)9	138-146	8	0,596	0,726	0,18
Mon 44	F: AACCTGGACCTAGCTCGGAA R: TAGGAGAAGGTGGAGCAGGA	2	1,6	(act)10	98-113	6	0,577	0,619	0,067

- Structure génétique des populations

La richesse allélique d'un échantillon est affectée par la taille de celui-ci, les grands échantillons étant susceptibles d'avoir plus d'allèles que les petits. Le calcul de la richesse allélique par raréfaction est une méthode statistique qui prend en compte les différences d'effectif (Kalinowski 2004). Cette méthode nous permet d'obtenir une estimation non biaisée de la richesse allélique. Nous l'avons donc utilisé pour calculer la richesse allélique de nos populations. Pour cela nous avons eu recours au logiciel HP-RARE 1.0 (Kalinowski 2004).

Une des manières d'évaluer les flux de gènes entre populations est d'estimer leur niveau de structuration. Pour cela nous avons tout d'abord calculé les pairwise F_{ST} . Cette estimation de la distance génétique entre populations repose sur la fréquence et la répartition des hétérozygotes. Les pairwise F_{ST} ont été calculés à l'aide du logiciel Fstat 2.9.3.2 (Goudet 2002) (cf. tableau III). D'autre part, par un test de Mantel nous avons cherché à voir si cette différenciation génétique suivait une loi d'isolement par la distance. Plus précisément, le test de Mantel correspond à une corrélation entre deux matrices de distances, dans notre cas, une matrice de distances génétiques [$F_{ST}/(1 - F_{ST})$] et une matrice de distances géographiques (linéaire) séparant les populations. Cette corrélation a été calculée à l'aide du logiciel Genepop (10000 permutations, seuil $P < 0.05$).

La structure des populations le long du transect a été effectuée avec des approches bayésiennes de type clusterisation. Pour cela nous avons utilisé le logiciel STRUCTURE 2.3.4 (Hubisz et al. 2009) qui assigne les individus à un nombre prédéfini de cluster (K). Ce type d'analyse assignant chaque individu, nous avons pris en compte la totalité des individus échantillonnés (179). Le K optimal a été défini à partir de la valeur Delta K (Evanno et al. 2005) obtenue avec le logiciel STRUCTURE Harvester (Earl et al. 2012). Afin de déterminer ce K optimal, dix répétitions pour K=1 à K=6 ont été réalisées en utilisant les paramètres suivants: un burn-in de 100000 répétitions, et 200000 itérations de Markov Chain Monte Carlo. Pour toutes les simulations nous avons utilisé les paramètres suivants : « model d'admixture » puisque l'espèce est supposée disperser au moins sur de courtes distances et « population location as prior » puisque l'on connaît l'origine géographique des individus échantillonnés qui composent les populations. Nous avons également testé l'assignation des individus sans ce dernier paramètre.

- Détection des événements de migrations

Les flux de gènes entre populations créent de l'admixture. Le niveau d'admixture des populations du transect peut nous renseigner sur l'origine et le sens des flux de gènes. Nous avons évalué le niveau d'admixture en calculant le coefficient d'admixture entre les populations du transect à l'aide du logiciel LEA (Langella et al. 2001) utilisant la vraisemblance (likelihood) (11000 répétitions). Les populations du transect sont considérées comme des populations hybrides des populations des deux extrémités du transect (populations 1 et 11). Les valeurs ont été calculées en pourcentage de proximité avec la population 1). La population [2 et 3] n'a pas été prise en compte ici, considérée comme ayant un trop faible effectif pour cette analyse.

Nous avons également cherché à évaluer la présence de migrants de première génération entre les populations du transect. Pour cela, nous avons utilisé les tests d'assignation des individus calculés par le logiciel GENECLASS 2 (Piry et al. 2004). Ces tests évaluent la proportion de génotype de chaque individu qui est issue d'une des populations du jeu de données. Les assignations des individus ont été faites par calcul de vraisemblance (Paetkau et al. 1995) et assignations bayésiennes partielles (Rannala and Montagne 1997) (10000 répétitions, seuil de détection des migrants : $P < 0.001$).

RESULTATS

Approche morphologique

Sur les 252 individus capturés 55 furent identifiés comme *M. sutor* et 197 comme *M. galloprovincialis*. Parmi ces derniers 33 possèdent des caractères de *M. g. pistor* (cf. Tableau I). *M. sutor* a été piégé de 843 à 1950 mètres. *M. galloprovincialis* quant à lui a été capturé de la plaine (260 m) jusqu'à 1800 mètres, avec observation de *M. g. galloprovincialis* jusqu'à 1800 mètres et *M. g. pistor* de 1000 à 1800 mètres. Concernant les hypothétiques sous-espèces, nous n'avons pas constaté de polymorphisme morphologique au sein des populations de *M. sutor* échantillonnées. En revanche, *M. galloprovincialis* montre un fort polymorphisme chez les individus des populations 6 à 11 (d'une altitude ≥ 1000 m). Au sein de cette espèce, nous avons pu reconnaître non pas deux formes clairement identifiables, mais plutôt un gradient de mélanisation allant de la forme *M. g. galloprovincialis* à la forme *M. g. pistor*.

Approche moléculaire

- Diversité génétique

Au total, 179 individus de *M. galloprovincialis* et 5 individus de *M. sutor* ont été génotypés pour chaque locus microsatellite. Les individus de *M. sutor* appartiennent à la population 9 et n'ont servi qu'à la recherche d'allèle commun avec *M. galloprovincialis*. L'hétérozygotie moyenne observée (H_O) pour tout les loci variait de 0.401 à 0.448 (cf. Tableau I) parmi les 6 populations avec une moyenne de 0.426 pour l'ensemble.

Parmi tous les loci, Mon 35 a la plus forte hétérozygotie attendue ($H_E = 0.800$) et Mon 17 la plus faible ($H_E = 0.07$), Mon 42 présente le F_{IS} le plus important (0.18) et Mon 35 le plus faible (0.001) (cf. Tableau II). Les tests de présence d'allèles nuls ont été positifs pour les loci Mon 30 et Mon 35. Par conséquent les calculs basés sur les fréquences alléliques ont été fait à partir d'un jeu de données corrigé pour ces deux loci.

L'hypothèse nulle de l'équilibre de Hardy-Weinberg n'a été rejetée pour aucune populations ou locus ($P < 0.01$). Ainsi, aucune des populations dévient significativement de l'équilibre de Hardy-Weinberg. Parmi les populations, des déséquilibres de liaisons ont été détectés pour les paires de locus 31-36, 30-44, 36-44 mais aucun n'était significatif à $P < 0.01$. On peut également ajouter qu'aucun déséquilibre n'est observé à l'échelle d'un plus grand nombre de populations françaises (Données non présentées). Le nombre d'allèles trouvés par locus variait de 2 (Mon 08) à 12 (Mon 30 et 35) (cf. tableau II).

La richesse allélique des populations qui était en moyenne de 3.2, varie de 3.04 (population 7) à 3.31 (population [8, 9 et 10]). La distribution des allèles des populations pour les loci Mon 30 et 35 est présentée figure 4 et 5 respectivement. Des variations de fréquences alléliques aux loci Mon 30 et Mon 35 ont pu être observées le long du transect (cf. Figures 4 et 5). Ainsi, certains allèles tels que celui de 244 paires de bases (pb) (Mon 30), et de 102 pb (Mon 35) diminuent en fréquence à partir de la population 6. D'autres au contraire augmentent en fréquence tels que celui de 108 pb (Mon 35) à partir de cette population.

Les deux espèces sœur, *M. galloprovincialis* et *M. sutor*, ont amplifié avec succès 4 loci en commun. Certains des allèles de ces loci distinguent nettement les deux espèces. Parmi les 184 individus génotypés, nous n'avons pas retrouvé d'individus hybrides partageant ces allèles.

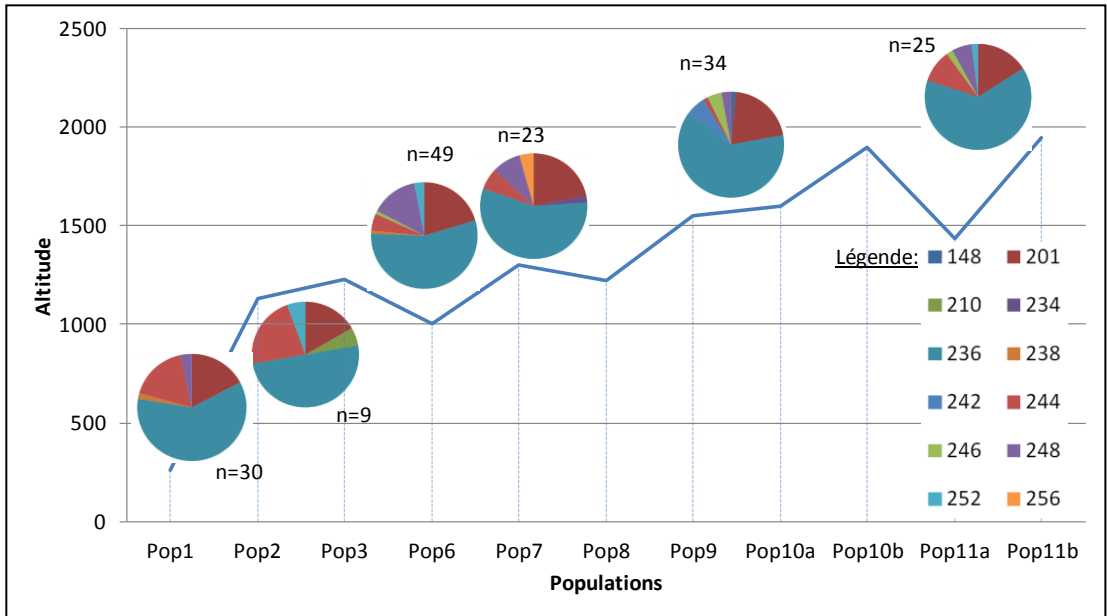


Figure 4. Variation des fréquences alléliques au loci Mon 30 en fonction des populations et de l'altitude (N=170). Pop=population.

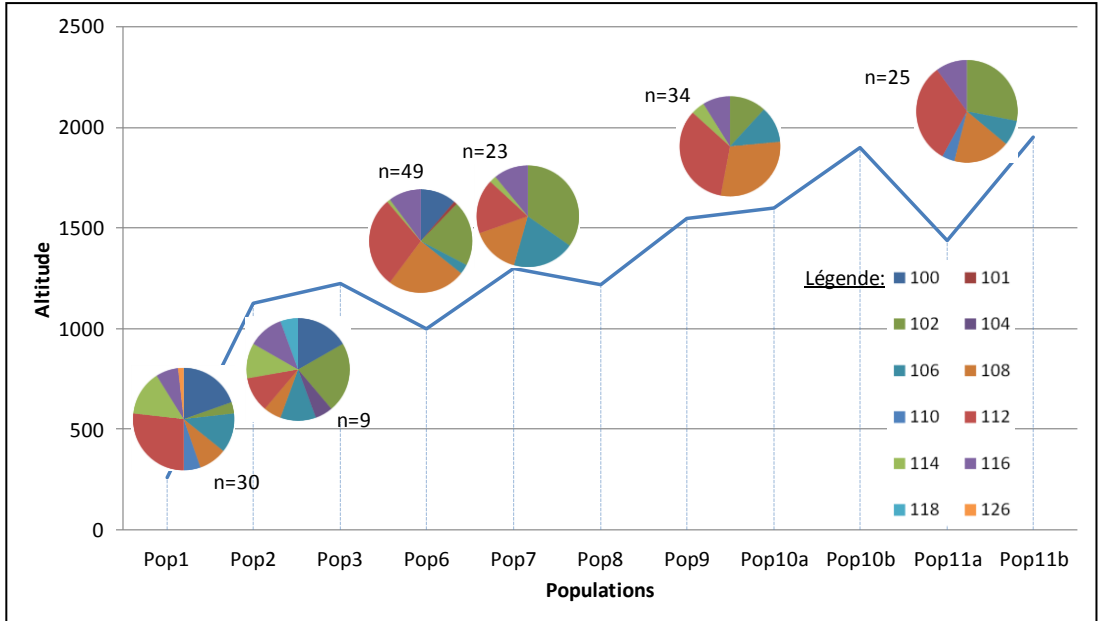


Figure 5. Variation des fréquences alléliques au loci Mon 35 en fonction des populations et de l'altitude (N=170). Pop= population.

- Différenciation des populations, clusterisation et tests d'assignements

Les F_{ST} calculés sur les 6 populations varient de -0.0073 (Pop1/Pop [2 et 3]) à 0.0322 (Pop1/Pop6) pour une moyenne de 0.01572. Les populations 6, 7 et [8, 9,10] montrent une différence très significativement par rapport à la population 1 (cf. Tableau III). La population [2, 3] est significativement différente de la population 6 de même que la population 7 de la [8,

9,10]. Le test de mantel n'a pas détecté de corrélation significative ($P= 0.641$) entre la distance génétique et la distance géographique (cf. Figure 6).

Tableau III. Valeurs Pairwise F_{ST} . NS=non significatif, * = $P < 0.05$, *** $P= 0.001$. $N=170$

Populations	1	[2 et 3]	6	7	[8, 9, 10]	11
1		-0,0073	0,0322	0,0287	0,0203	0,0189
[2 et 3]	NS		0,0293	0,0264	0,0297	0,0148
6	***	*		0,0086	0,0022	0,0048
7	***	NS	NS		0,0118	0,0104
[8, 9, 10]	***	NS	NS	*		0,005
11	NS	NS	NS	NS	NS	

Nous avons obtenu un nombre optimal de 2 clusters pour ce jeux de données (Delta K pour $K=2$, cf. Figure 7). L'analyse faite avec le logiciel STRUCTURE pour ce nombre de cluster a permis de mettre en évidence une répartition géographique de l'appartenance au cluster sur la zone étudiée (cf. Figure 8). Il est à noter que cette structuration été détectée uniquement en présence du paramètre « population location as prior ». C'est-à-dire lorsqu'on laissait le logiciel associer chaque individu à la population dans laquelle il avait été échantillonné. L'analyse sans ce prior n'a pas permis d'observer de structure au sein de nos populations.

Ainsi, nous avons pu distinguer deux groupes, le premier constitué des populations 1 et [2, 3], le deuxième constitué des populations 3 à 11. Les individus du premier groupe sont assignés au cluster 1 (rouge) à 61.58% (± 4.67) en moyenne contre 38.42% (± 8.48) au cluster 2 (vert). L'assignation des individus du deuxième groupe au cluster 1 est de 9.59% (± 4.67) en moyenne contre 90.41% (± 8.48) au cluster 2.

- Coefficient d'admixture et détection des évènements de migration

La figure 7 représente le taux d'apparement des populations 6, 7 et [8, 9 et 10] à la population 1. Le taux d'apparement à la population 1 décroît plus on s'éloigne de celle-ci. Ainsi, nous avons pu observer un taux de 82.2% pour la population 6, 74.8% pour la population 7 et 23.1% pour la population [8, 9 et 10]. Le niveau d'apparement des populations du transect à la population parente 11 est de 1 moins le coeficient d'admixture précédemment cités. Nous avons détecté un nombre de 3 migrants de première génération sur l'ensemble du jeu de données. Un individu en provenance de la population 4 a été détecté dans la population 1 ($P=0.0009$), un autre en provenance de la population 5 a été détecté dans

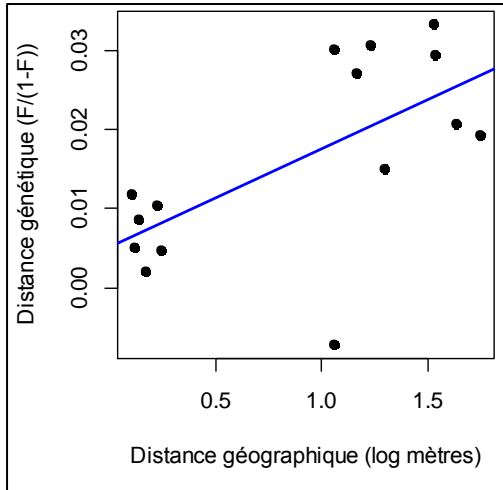


Figure 6. Relation entre la distance génétique ($F/(1-F)$) et la distance géographique chez *M. galloprovincialis* (0.0123433, $P=0.641$). $N=170$

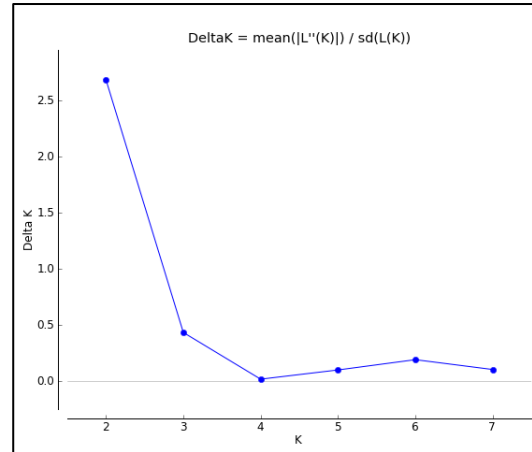


Figure 7. Structure harvester output. Evolution de Delat K (vraisemblance moyenne de K/ écart-type de la vraisemblance) pour un nombre croissant de K.

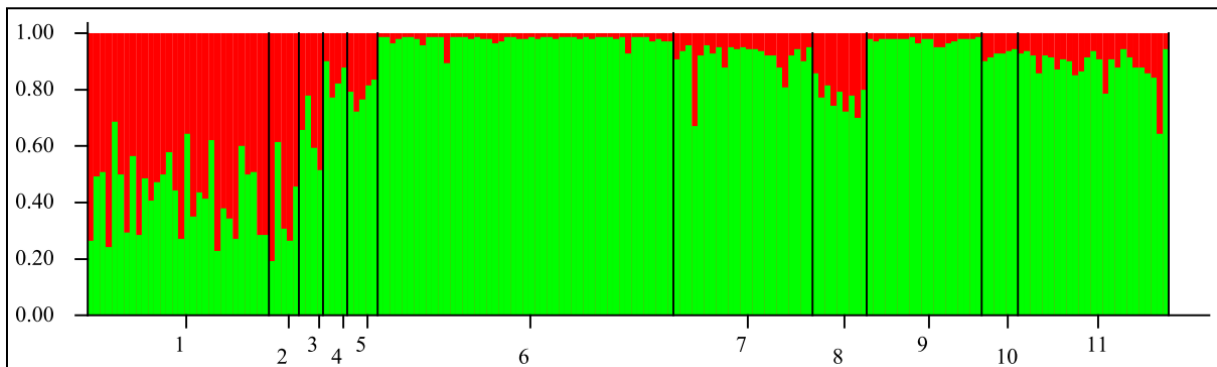


Figure 8. Structure output. Représentation de l'appartenance aux clusters des 179 individus analysés (nombre de clusters : $K=2$).

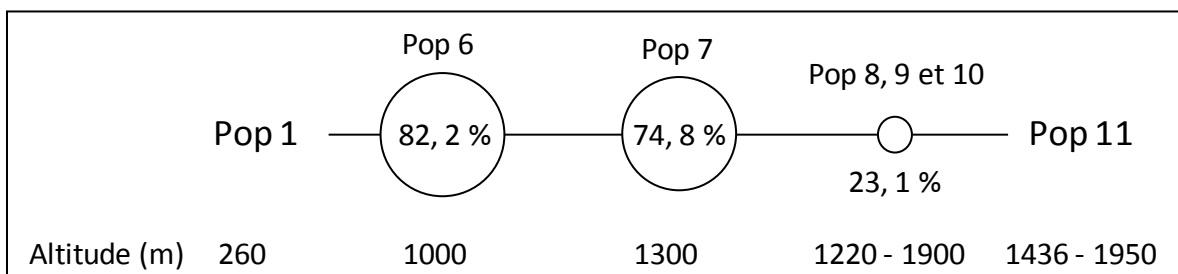


Figure 9. Coefficient d'admixture des populations 6 à 10 par rapport aux populations parentes des deux extrémités. Les pourcentages représentent les niveaux d'apparement à la population 1. Pop= population. $N=161$.

la population 4 ($P=0.0074$) et un dernier en provenance de la population 6 a été détecté dans la population 1 ($P=0.0058$).

DISCUSSION

- Approche morphologique

De toute évidence, il semble que *M. galloprovincialis* ait étendu son aire de distribution en altitude au cours des dernières décennies. En effet, alors que dans les Alpes, il n'était signalé qu'à 1000 mètres en 1967 (Hellrigl 1967), et à 1450 mètres en 1975 (Rougon 1975), nous l'avons trouvé jusqu'à 1800 mètres en 2012. La forme *M. g. pistor* n'a pas été observée en dessous de 1000 m, et semble bien avoir des exigences plus strictes en terme de fraîcheur (Vives 2000) que la forme *M. g. galloprovincialis*, dont la présence a été détectée de la plaine jusqu'à 1800 mètres (Pop 11, versant nord, un seul individu). Par ailleurs, cela nous montre que sur la zone étudiée, *M. g. galloprovincialis* n'est pas limité aux basses altitudes, et qu'il n'y a pas de remplacement d'une forme par une autre lorsqu'on atteint 800 mètres. *M. sutor*, quant à lui, a été trouvé en sympatrie avec *M. galloprovincialis* à partir de 843 mètres. Les piégeages réalisés pour cette étude ont montré que cette espèce était présente jusqu'à une altitude de 1950 mètres, soit 300 mètres plus haut qu'en 1970 (Rougon 1970).

La progression en altitude de *M. galloprovincialis*, de ses morphotypes et de *M. sutor*, révélée par les altitudes, ici plus élevées que celles mentionnées dans la littérature peut être discutable. En effet, il semble évident qu'au cours des dernières décennies, les espèces et sous-espèces en question aient progressé plus en altitude, voire qu'elles aient déplacé leur aire de distribution plus en altitude (*M. g. pistor*). Cependant, il faut noter que la méthode d'échantillonnage utilisée dans notre étude est très différente des méthodes de prospections utilisées au cours du dernier siècle (chasse « à vue »...). L'utilisation de pièges couplés à des attractifs chimiques (dont le rayon d'action est estimé à environ 150 m, Jactel *com. pers.*) durant toute la période de vol des espèces, ont considérablement modifié l'effort d'échantillonnage et l'efficacité de capture. Il est donc tout à fait probable que, par le passé, *M. galloprovincialis* et *sutor* évoluaient jusqu'à des altitudes supérieures à celles mentionnées dans la littérature.

Le fort polymorphisme constaté chez les individus de *M. galloprovincialis* et le gradient progressif de mélanisation observé entre les populations de plaine et d'altitude révèlent une plasticité phénotypique importante au sein de cette espèce.

- *Approche génétique*

Les paramètres de différenciation (pairwise F_{ST}) calculés entre les populations du transect sont faibles (e. g. Pop 1/6, $F_{ST} = 0.0322$). Cependant, celles observées entre la population de plaine et la plupart des populations de montagne (Pop. 6, 7 et [8, 9, 10]) sont très significatives. (F_{ST} : différenciation faible si <0.1 , modérée si <0.2 , forte si >0.2). Le calcul des coefficients d'admixture montrent clairement une diminution de l'apparentement à la population. 1 lorsque l'on s'éloigne de celle-ci, indique la présence d'un isolement par la distance au sein de notre transect. Ce que le test de Mantel n'avait pas détecté significativement, probablement en raison d'une insuffisance du nombre de points échantillonnés pour observer une corrélation significative. En comparaison, Shoda-Kagaya (2007) avait trouvé un isolement par la distance significatif entre les populations de la préfecture d'Akita alors que le terrain, en plaine, sans relief et sans barrières géographiques évidentes, semblait être plus propice à la dispersion. Shoda-Kagaya (2007) suggérait qu'un contact secondaire était à l'origine de cet isolement, ce qui n'est pas le cas pour notre transect à priori.

Les populations d'altitude échantillonnées se sont révélées être faiblement différenciées entre elles. Notamment entre des populations de moyenne et haute altitude (e.g. Pop. 7 / [8, 9, 10] : différenciation significative de 0,0118). Lors d'une étude de la dispersion de *Monochamus alternatus* au Japon, Shoda-Kagaya (2007) a obtenu des valeurs F_{ST} très similaires aux nôtres entre les populations de la préfecture d'Akita qui étaient situées en plaine, bien qu'il s'agisse d'une zone bien plus restreinte que dans notre cas. Elle n'a observé aucune différenciation significative et suggère donc la présence d'important flux de gènes entre les populations de cette espèce.

Les résultats obtenus avec STRUCTURE corroborent le niveau de différenciation observé. Ce dernier ayant trouvé une différence peu marquée entre les trois premières populations du transect, en plaine et moyenne montagne, et les autres populations d'altitude moyenne à haute. Pour expliquer cette faible structuration, plusieurs hypothèses sont possibles. Tout d'abord, il est tout à fait probable que les flux de gènes entre populations créent un brassage assez important pour empêcher la différenciation de ces dernières et donc la mise en place d'une structuration génétique marquée. L'hypothèse d'un fort brassage génétique entre les populations concorde avec les distances trouvées lors d'évaluation des capacités de dispersion de *M. galloprovincialis* en manège de vol (David et al. 2013) et par la méthode CMR (Mas et al. 2013). David et al. (2013) ont trouvé une distance moyenne parcourue de 16 km sur le

temps de vie de cette espèce et Mas et al. (2013) ont trouvé qu'un nombre significatif d'adulte dispersaient au-delà de 3000 mètres.

De même, nous pouvons supposer qu'il y ait eu une colonisation récente des zones d'altitude, et qu'il serait trop tôt à l'échelle de l'évolution de nos marqueurs pour qu'une structuration altitudinale ait pu se mettre en place à la suite du front de colonisation. Cette dernière hypothèse paraît être tout à fait possible au vu des comparaisons faite précédemment entre les altitudes auxquelles nous avons trouvés les deux formes de *M. galloprovincialis* et celles mentionnées dans la littérature. Par ailleurs, il a été montré qu'au cours de la phase d'expansion d'une espèce la structure génétique se déterminait sur un petit nombre de générations (qui constituent la phase d'expansion-colonisation) et mettait un grand nombre de générations à s'estomper une fois que l'espace est rempli et que la population fonctionne à l'équilibre démographique (Rieux 2011). Ce qui va dans le sens de la seconde hypothèse que nous avons formulé.

Enfin, cette absence de structuration peut être due aux choix des marqueurs sélectionnés pour l'étude. Les marqueurs microsatellites utilisés ici n'étaient pas aussi polymorphes que nous aurions pu l'espérer. Il pourrait être utile de redéfinir un plus grand nombre de loci, microsatellites, ou de type nouvelle génération, comme les SNPs.

L'important polymorphisme observé chez *M. galloprovincialis* et la faible structuration des populations le long du transect altitudinal suggère que *M. g. pistor* et *M. g. galloprovincialis* ne soit pas des sous-espèces mais seulement des morphotypes. Ainsi, à notre échelle, il ne semble pas que l'altitude ou l'essence hôte qui lui est associée ait un effet sur la structuration des populations de *Monochamus galloprovincialis*. Mais il est important de rappeler que notre échantillonnage est relativement faible pour certaines populations et nécessiterait un plus grand nombre d'individus, sur un plus grand nombre de sites.

Au regard de la distance génétique très faible (divergence de 3 % avec l'ADN mitochondrial COI) séparant *M. sutor* avec *M. galloprovincialis* (Koutroumpa et al. 2012) et le fait que ces espèces soient présentes en sympatrie, il était envisageable d'observer des hybrides de ces deux espèces sœurs. Cependant, l'absence d'allèles partagés par les deux espèces ne conforte pas cette hypothèse. Koutroumpa et al (2012) qui avaient trouvé des pièces copulatoires morphologiquement différentes entre les mâles des deux espèces émettaient déjà l'hypothèse que ces dernières ne s'hybrideraient pas en zone de sympatrie. Cependant, le faible nombre de loci communs et d'individus analysés de l'espèce *sutor*, ne permet pas de conclure. Il serait judicieux d'envisager des croisements expérimentaux pour confirmer l'impossibilité d'hybridation de ces deux espèces, comme l'a proposé Koutroumpa et al (2012)

CONCLUSION

La structuration génétique faiblement marquée tend à indiquer un brassage génétique notable dans les populations d'altitude de *M. galloprovincialis*. Les flux de gènes seraient donc importants, et la propagation de *B. xylophylus* au sein de populations d'une même vallée ou d'un même versant pourrait être rapide. D'autant plus que les flux géniques ne sont pas les seuls déterminants de la structure génétique spatiale et qu'ils ne reflètent que la dispersion des individus ayant laissé une descendance dans la population dans laquelle ils ont migré (i.e. la dispersion efficace). Sachant que la transmission de *B. xylophylus* a lieu majoritairement lors de la nutrition de maturation du *Monochamus*, ce dernier peut avoir assuré une dispersion efficace au nématode sans pour autant avoir lui-même assuré la sienne. Ainsi, la probabilité d'une propagation du nématode resterait non négligeable, même en l'absence de flux de gènes. Cependant, Haran et al. (*in prep.*) a montré que les Pyrénées constituaient une barrière au flux de gènes, en la quasi-absence de flux de gènes directes entre les populations de *M. galloprovincialis* des deux versants. Cela pourrait aussi être testé dans les Alpes. Par ailleurs, il est possible que si le nématode arrive jusqu'aux zones où *M. galloprovincialis* et *M. sutor* sont en sympatrie, il puisse utiliser *sutor* comme vecteur via un hôte commun, *Pinus sylvestris*. Ainsi, *M. sutor* prendrait le relais de la dispersion du nématode et permettrait à celui-ci de progresser plus en altitude et en latitude, et de coloniser d'autres arbres-hôtes. Mais les conditions climatiques moins favorables au développement du nématode ou de la maladie pourraient freiner, voire stopper, la progression du nématode, comme cela a déjà été montré avec la montagne Ohu, au Japon, par Shoda-Kagaya (2007).

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Alain Roques de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je remercie toute l'équipe de l'URZF pour son accueil chaleureux et pour les bons moments que nous avons passé ensemble. Je remercie les personnes qui ont récolté le matériel biologique de cette étude : notamment Alexis Bernard, Jacques Garcia, Olivier Denux et Alain Roques. De même je remercie Claudine Courtin, Emmanuelle Magnoux et Béatrice Courtial pour leurs conseils en biomol ou pour avoir passé mes plaques pour le génotypage.

Je remercie aussi Marie Millier, Carlos Lopez-Vaamonde, Jérôme Rousselet, Rodolphe Rougerie, Vincent Lesieur, Natalia Kirichenko et Fan, pour les discussions que nous avons eu ensemble, les conseils, les five fingers...

Je remercie tout particulièrement mes encadrants de stage, Géraldine Roux et Julien Haran.

Je vous remercie tout les deux pour m'avoir permis d'effectuer ce stage dans les meilleures conditions possibles, pour avoir toujours été présents lorsque j'avais besoin de vous, pour votre patience et vos conseils. Merci Julien pour toutes ces discussions que nous avons eu, pour les fourmis d'Israël et pour ces moments passés à chercher insectes ou champignons.

REFERENCES

- Bermond G, Blin A, Vercken E, Ravigné V, Rieux A, Mallez S, Morel-Journel T, Guillemaud T (2013) Estimation of the dispersal of a major pest of maize by cline analysis of a temporary contact zone between two invasive outbreaks. *Mol Ecol* 22:5368-5381.
- Blackburn TM, Essl F, Evans T, Hulme PE, Jeschke JM, Kühn I, Kumschick S, Marková Z, Mrugała A, Nentwig W, Pergl J, Pyšek P, Rabitsch W, Ricciardi A, Richardson DM, Sendek A, Vilà M, Wilson JR, Winter M, Genovesi P, Bacher S (2013) A unified classification of alien species based on the magnitude of their environmental impacts. *PLoS Biol* 12:e1001850.
- Broquet T, Petit E (2009) Molecular estimation of dispersal for ecology and population genetics. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:193-216.
- Castillo J A, Epps CW, Davis AR, Cushman SA (2014) Landscape effects on gene flow for a climate-sensitive montane species, the American pika. *Mol Ecol* 23:843-856.
- Cesari M, Marescalchi O, Francardi V, Mantovani B (2005) Taxonomy and phylogeny of European *Monochamus* species: first molecular and karyological data. *J Zool Syst Evol Res* 43: 1-7.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* 24:621-631.
- David G, Giffard B, Piou D, Jactel H (2013) Dispersal capacity of *Monochamus galloprovincialis*, the European vector of the pine wood nematode, on flight mills. *J. Appl. Entomol.*doi: 10.1111/jen.12110.
- Di Castri F (1989) History of biological invasions with special emphasis on the old world. In Drake JA (eds) *Biological invasions: a global perspective*. Wiley, Hoboken, pp 1-30.
- Dropkin VH, Foudin A, Kondo E, Linit M, Smith M, Robbins K (1981) Pinewood nematode: a threat to US forests? *Plant Disease* 65:1022-1027.
- Earl D, vonHoldt B (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4: 359-361.

- Earl DA, von Holdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359-361.
- Edwards JS (2006) The central nervous control of insect flight. *J. Exp. Biol* 209: 4411-4413.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620.
- Franzen M, Nilsson SG (2007) What is the required minimum landscape size for dispersal studies? *J Anim Ecol* 76:1224-1230.
- Goudet J. FSTAT Software, v. 2.9.3.2.in 2002 : FSTAT.
<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (6 juin 2014, date last accessed).
- Hellrigl KG (1967) Die Cerambyciden: Fauna Südtirols. *Koleopterol Rundschau* 45:1-71.
- Hellrigl KG (1971) La bionomie des espèces de *Monochamus* (Coleoptera, Cerambycidae) et leur importance pour la sylviculture et l'économie du bois. *Redia* 52:367-511.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resour* 9:1322-1332.
- Kalinowski ST (2004) Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv Genet* 5:539-543.
- Kim KS, Sappington TW (2013) Population genetics strategies to characterize long-distance dispersal of insects. *J Asia Pac Entomol* 16:87-97.
- Koutroumpa F, Rougon D, Bertheau C, Lieutier F, Roux-Morabito G (2013) Evolutionary relationships within European *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) highlight the role of altitude in species delineation. *Biological J Linn Soc* 109:354-376.
- Langella O, Chikhi L, Beaumont MA (2001) LEA (likelihood-based estimation of admixture): a program to estimate simultaneously admixture and time since the admixture event. *Mol Ecol Notes* 1:357-358.
- Linit MJ (1988) Nematode-vector relationships in the pine wilt disease system. *J Nematol* 20:227-235.
- Mamiya Y (1988) History of pine wilt disease in Japan. *J. Nematol* 20:219-226.
- Manel S, Holderegger R (2014) A reply to Kershaw and Rosenbaum. *Trends Ecol Evol.* 28:70-71.
- Mas H, Hernández R, Villaroya M, Sánchez G, Pérez-Laorga E, González E, Ortiz A, Lencina JL, Rovira J, Marco M, Pérez V, Gil M, Sánchez-García FJ, Bordón P, Pastor C, Biel M, Montagud L, Gallego D (2013) Dispersal behavior and long distance flight capacity of

- Monochamus galloprovincialis* (Olivier 1795). In: Schröder, T. (eds) Pine Wilt Disease Conference 2013. JKI, FRCCP, INIPH, Braunschweig, pp. 22.
- Miller NJ, Guillemaud T, Giordano R, Siegfried BD, Gray ME, Meinke LJ Sappington TW (2009) Genes, gene flow and adaptation of *Diabrotica virgifera virgifera*. *Agric. For. Entomol* 11:47-60.
- Mota MM, Braasch H, Bravo MA, Penas AC, Burgermeister W, Metge K, Sousa E (1999) First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematol* 1:727-734.
- Naves P (2007) Biology of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae) and its role as vector of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda, Parasitaphelenchidae) in Portugal. Thèse : biologie. Université de Lisbonne.
- Naves P, Camacho S, Sousa E, Quartau JA (2007) Transmission of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* through feeding activity of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae). *J App Entomol* 131: 21-25.
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Mol. Ecol.* 13:55-65.
- Pajares JA, Álvarez G, Hall DR, Douglas P, Centeno F, Ibarra N, Schroeder M, Teale SA, Wang Z, Yan S, Millar JG, Hanks LM (2013) 2-(Undecyloxy)-ethanol is a major component of the male-produced aggregation pheromone of *Monochamus sutor*. *Entomol Exp Appl*, 149:118-127.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288-95.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudoin L, Estoup A (2004) GENECLASS2 : a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *J Hered* 95:536-539.
- Prunier JG, Kaufmann B, Fenet S, Picard D, Pompanon F, Joly P, Lena JP (2013) Optimizing the trade-off between spatial and genetic sampling efforts in patchy populations: towards a better assessment of functional connectivity using an individual-based sampling scheme. *Mol Ecol* 22: 5516-5530.
- Ranius T (2006) Measuring the dispersal of saproxylic insects: a key characteristic for their conservation. *Pop Ecol* 48:177-188.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9197-9201.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered* 86:248-249.

- Rieux A (2011) Etude des processus de dispersion et des flux géniques chez un champignon phytopathogène : le cas de *Mycosphaerella fijiensis* à l'échelle d'un bassin de production Camerounais. Thèse : biologie. Soutenue le 17 juin 2011 à Montpellier SupAgro.
- Robertson L, Cobacho Arcos S, Escuer M, Santiago Merino R, Esparrago G, Abelleira A, Navas A (2011) Incidence of the pinewood nématode *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner, 1934 (Nickle, 1970) in Spain. *Nematol* 13:755-757.
- Robinet C, Roques A, Pan H, Fang G, Ye J, Zhang Y, Sun J (2009) Role of human-mediated dispersal in the spread of the pinewood nematode in China. *PLoS ONE* 4: e4646
- Rodrigues JM (2008) National eradication programme for the pinewood nématode. In: Mota MM, Vieira P (eds) *Pine Wilt Disease: A worldwide threat to forest ecosystems*. Springer, Houten, pp 5-14.
- Rougon D (1970) Contribution à l'étude des Coléoptères Cerambycidae de la Vallée de la Blanche. *L'Entomologiste* 26:111-117.
- Rougon D (1975) Contribution à l'étude des Coléoptères Cerambycidae de la Vallée de la Blanche. *L'Entomologiste* 31:102-106.
- Rousset F, (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour* 8:103-106.
- Schröder T; McNamara DG, Gaar V (2009) Guidance on sampling to detect pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. *EPPO Bull* 39:179-188.
- Shoda-Kagaya E (2007) Genetic differentiation of the pine wilt disease vector *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) over a mountain range - revealed from microsatellite DNA markers. *Bull Entomol Res* 97:167-174.
- Soliman T, Mourits MCM., van der Werf W, Hengeveld GM, Robinet C, Oude Lansink AGJM (2012) Framework for Modelling Economic Impacts of Invasive Species, Applied to pine wood nematode in Europe. *PLoS ONE* 7: e45505.
- Sousa E, Bravo MA, Pires J, Naves, Penas AC, Bonifácio L, Mota MM (2001) *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematol* 3:89-91.
- Suzuki K (2002) Pine wilt disease: a threat to pine forest in Europe. *Dendrobiol* 48:71-74.
- Taylor RAJ, Bauer LS, Poland TM, Windell KN (2010) Flight performance of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) on a flight mill and in free flight. *J Insect Behav* 23:128-148.
- VIVES, E. (ed) (2000) *Fauna Ibérica Vol.12- Coleoptera, Cerambycidae*. Museo Nacional de Madrid, Madrid.

- Vogt JT, Appel AG, S West M (2000) Flight energetics and dispersal capability of the fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. *J Insect Physiol* 46:697-707.
- Wallin H; Schroeder M, Kvamme T (2013) A review of the European species of the genus *Monochamus* Dejean, 1821 (Coleoptera: Cerambycidae, Lamiinae, Monochamini) with a description of the genitalia characters. *Norwegian J Entomol* 60: 11-38.
- Webster J, Mota MM (2008) Pine wilt disease: global issues, trade and economic impact. In: Mota MM, Vieira P (eds) *Pine Wilt Disease: A worldwide threat to forest ecosystems*. Springer, Houten, pp 5-14.