

Faculté des Sciences

Laboratoire de Lutte Biologique et d'Écologie Spatiale

ERRATUM

ESSAI DE MISE EN ÉVIDENCE D'UN MÉCANISME DE RÉSISTANCE COÉVOLUÉE À LA PRÉDATION

par une étude comparative du prédateur *Rhizophagus grandis* sur sa proie
spécifique, *Dendroctonus micans*, et sur une proie exotique, *Dendroctonus valens*

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de

Master en biologie des organismes et écologie par

Loïc Dohet

Promoteur : Jean-Claude Grégoire

Soutenance en septembre 2011 à l'Université Libre de Bruxelles

Corrections relatives au texte de la version du 26 août 2011

Section	Page	Lieu	Élément (italique)	Correction (gras)
I	1	§1, ligne 3	Pauly et Meurisse, 2008	Pauly et Meurisse, 2007
I	1	§2, ligne 9	Pauly et Meurisse, 2008	Pauly et Meurisse, 2007
I	3	§2, ligne 7	Pauly et Meurisse, 2008	Pauly et Meurisse, 2007
I	3	§2, ligne 12	Pauly et Meurisse, 2008	Pauly et Meurisse, 2007
III 1 c	13	§1, ligne 2	modèle de Vereecken	modèle de Nicolas Vereecken
III 2 a	21	§3, ligne 1	endurance très variable	endurance (durée de vie à débit constant après pleine charge) très variable
III 2 b	22	§2, ligne 2	(jour 21)	(jour 20)
III 2 b	22	Tableau 2, légende	jour 21	jour 20
III 2 c	25	§1, ligne 2	« <i>mesures</i> optimales »	« extractions optimales »
III 2 c	25	§1, ligne 5	de 10µg	de 5µg
III 2 c	25	§1, dernière phrase	contre 100µL lors des essais chimiques (<i>les analytes sont deux fois plus concentrés</i>).	contre 100µL lors des essais chimiques et de l'absence de diviseur de flux chez ces derniers.
III 3	27	§1, ligne 2	la méthode <i>Porapak en headspace</i> ,	la méthode headspace dynamique ,
III 3	27	§4, ligne 7	raréfaction de composés <i>de l'écorce</i>	raréfaction de composés émis par l'écorce
III 3	28	§3, ligne 2	de l'ordre de 5µg, <i>en tenant</i>	de l'ordre de 5µg.

*compte de la différence de
volume d'éluion.*

IV 2 a	38	Tableau 7, taux de survie des proies	Erreur dans les écarts-types, voir tableau 7 corrigé en fin de document	
IV 2 b	44	Tableau 10, légende	les traitements dans les <i>loadingplots</i>	les traitements dans les scoreplots
V	49	§2, ligne 6	les monoterpènes moins importante	les monoterpènes ou à éviter la résine moins importante
V	55	§1, ligne 2	contre ce scolyte <i>eurasien</i>	contre ce scolyte eurasiatique
V	56	§4, ligne 4	des pièges à <i>stimuli</i> permettent	des pièges à attractants permettent
VI	60	§2, ligne 1	<i>Sheuringer</i> B. T. (2010)	Scheuringer B. T. (2010)

Correction du Tableau 7 de la version du 26 août 2011

ÉLÉMENT À CORRIGER (ROUGE ITALIQUE)

Survie des proies et succès reproducteur des <i>R. grandis</i>						
Lot	n°	Série	n _i	Jour d'interruption de la ponte	Nombre de larves Rg	Taux de survie des proies
Chimie	1	<i>Dm</i>	5	20	0	77,69% ± <i>0,03%</i>
	2	<i>DmRg</i>	5	20	45 ± 24,07	1,54% ± <i>0,03%</i>
	3	<i>Dv</i>	10	20	0	38,46% ± <i>0,12%</i>
	4	<i>DvRg</i>	10	20	12,7 ± 11,93	11,92% ± <i>0,1%</i>
	5	<i>contrôle</i>	5	-	0	-
RS	1	<i>DvRg</i>	10	7	7,8 ± 10,77	25% ± <i>0,15%</i>
	2	<i>DvRg</i>	10	11	17,2 ± 14,88	15,77% ± <i>0,1%</i>
	3	<i>DvRg</i>	10	14	26,4 ± 18,32	10,38% ± <i>0,07%</i>
	4	<i>DvRg</i>	10	18	24,2 ± 20,1	11,15% ± <i>0,13%</i>

ÉLÉMENT CORRIGÉ (VERT GRAS)

Survie des proies et succès reproducteur des <i>R. grandis</i>						
Lot	n°	Série	n _i	Jour d'interruption de la ponte	Nombre de larves Rg	Taux de survie des proies
Chimie	1	<i>Dm</i>	5	20	0	77,69% ± 2,88%
	2	<i>DmRg</i>	5	20	45 ± 24,07	1,54% ± 3,08%
	3	<i>Dv</i>	10	20	0	38,46% ± 12,4%
	4	<i>DvRg</i>	10	20	12,7 ± 11,93	11,92% ± 9,65%
	5	<i>contrôle</i>	5	-	0	-
RS	1	<i>DvRg</i>	10	7	7,8 ± 10,77	25% ± 15,12%
	2	<i>DvRg</i>	10	11	17,2 ± 14,88	15,77% ± 9,8%
	3	<i>DvRg</i>	10	14	26,4 ± 18,32	10,38% ± 6,67%
	4	<i>DvRg</i>	10	18	24,2 ± 20,1	11,15% ± 13,26%

Faculté des Sciences

Laboratoire de Lutte Biologique et d'Écologie Spatiale

ESSAI DE MISE EN ÉVIDENCE D'UN MÉCANISME DE
RÉSISTANCE COÉVOLUÉE À LA PRÉDATION

par une étude comparative du prédateur *Rhizophagus grandis* sur sa proie
spécifique, *Dendroctonus micans*, et sur une proie exotique, *Dendroctonus valens*

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Master en biologie des organismes et écologie par

Loïc Dohet

Promoteur : Jean-Claude Grégoire

Soutenance en septembre 2011 à l'Université Libre de Bruxelles

Page de remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Jean-Claude Grégoire qui m'a permis de travailler en autonomie complète. Ton enthousiasme fut une source de motivation supplémentaire à chaque instant. Tu m'as également donné la rare opportunité d'effectuer un voyage scientifique au Canada qui fut enrichissant à tous points de vue.

Valérie Borghart mérite aussi une place importante dans ces remerciements. Tu n'as pas hésité à me prêter main forte quand la situation le demandait. Les journées en quarantaine passent bien plus rapidement en discutant avec toi.

Merci à Nicolas Vereecken et Nicolas Meurisse pour avoir apporté leur pierre à ce travail. Votre aide précieuse m'a permis de finalement maîtriser les bases de l'extraction en headspace et des analyses chimiques.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du LUBIES. Chacun participe à l'ambiance conviviale qui caractérise le laboratoire. En particulier, merci à Anai, François, Sylvie, Jean-Marc, et à Ludovic et Marceau récemment arrivés.

Bien sûr, ces remerciements ne seraient pas complets si je n'y mentionnais pas ma famille. Vous m'avez apporté votre soutien indéfectible le long de ce mémoire. Merci à mes parents et à mon frère.

Je tiens finalement à remercier toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à l'élaboration de mon mémoire.

Résumé

Dendroctonus micans est un scolyte paléarctique. Il s'attaque à des conifères dont les adultes et les larves consomment le phloème. Le principal facteur de régulation de ses populations est un prédateur hautement spécifique, *Rhizophagus grandis*. Celui-ci montre de bonnes capacités de recherche et une grande efficacité de la prédation.

Quand une femelle *R. grandis* trouve une galerie de *D. micans*, elle pond un nombre d'œufs limité qui dépend de la quantité de proies présentes. Cette réponse numérique réduit la compétition entre les larves prédatrices qui consommeront les proies. L'ajustement de la ponte dépend de médiateurs chimiques : des stimuli résultent de l'activité des proies et des inhibiteurs proviennent probablement des stades immatures du prédateur.

La coévolution entre un prédateur et une proie peut conduire au développement d'une résistance chez cette dernière. On suspecte un tel mécanisme chez *D. micans*, qui impliquerait des composés sémiochimiques diminuant la ponte de *R. grandis*, ou une réduction des stimuli. Afin de tester cette hypothèse, nous comparons les performances du prédateur sur sa proie spécifique et sur une proie exotique, *D. valens*, *a priori* dépourvue de toute résistance à son égard.

Pour mener à bien cette expérience, nous comptons le nombre de descendants produits par le prédateur sur chaque proie dans des chambres de ponte artificielles. Celles-ci sont munies d'un dispositif innovant d'extraction des composés volatils en « headspace dynamique », basé sur des filtres adsorbants, dont les analyses au GC-MS visent à mettre en évidence des différences de profil en fonction des insectes présents dans les chambres. La nouvelle méthode d'extraction chimique est optimisée préalablement aux analyses.

Les résultats montrent des performances supérieures de *R. grandis* sur sa proie spécifique. L'impact potentiel de la microflore associée à chaque scolyte est discuté, de même qu'un possible épuisement génétique dû à l'isolement en chambre de quarantaine de *D. valens* durant de nombreuses générations. Les analyses chimiques ne permettent pas de clairement relier des composés à une proie ou au prédateur. Les avantages et inconvénients de la nouvelle méthode d'extraction sont évalués comparativement aux fibres SPME précédemment utilisées. Des solutions sont dégagées pour améliorer les analyses chimiques et comparer les performances de *R. grandis* de manière plus fiable.

Abstract

Dendroctonus micans is a Eurasian bark beetle. Adults and larvae attack conifers and feed on the phloem. The main regulation factor of their populations is the highly specific predator *Rhizophagus grandis* which has a well-developed searching behaviour. It is also a very effective predator of bark beetles larvae.

R. grandis females fit their oviposition to prey availability in *D. micans* brood chambers. Such a numerical response decreases the competition among the predator's offspring. It probably relies on kairomones, with stimuli produced by the prey and inhibitors emitted by immature stages of *R. grandis*.

Coevolution in a predator-prey system may lead the prey to evolve resistance. Such a resistance could be that *D. micans* would produce kairomones decreasing oviposition by *R. grandis*. To test this hypothesis we compared the predators' reproductive success on their specific prey and on *D. valens* which is an exotic, North American bark beetle theoretically without any resistance.

During our experiment we counted the predators' offspring on each prey in artificial brood chambers on which chemical sampling devices were fitted. Volatile compounds were extracted using a novel "dynamic headspace" method, with adsorbent powder-based filters. GC-MS analyses were used to discriminate chemical patterns between insects in brood chambers. Before this we optimized the new extraction method.

Our results show a larger reproductive success of *R. grandis* on its specific prey. We discuss the potential effects of associated microflora and genetic isolation due to quarantine rearing of *D. valens*. Our chemical analyses do not clearly correlate any compound to a prey or to the predator. The advantages and weaknesses of this novel extraction method are further discussed in comparison with previously used SPME fibres. Solutions are proposed to improve future experiments on the coevolution of *D. micans* and *R. grandis*.

À mon grand-père,

Table des matières

Contenu

Chapitre I - INTRODUCTION	1
Chapitre II - BUTS DU TRAVAIL.....	10
Chapitre III – EXPÉRIENCE PRÉPARATOIRE	11
1. Matériel et méthodes	11
a. Insectes expérimentaux.....	11
b. Dispositif expérimental.....	11
c. Dispositif de mesure des composés volatils	13
d. Analyses chimiques	15
e. Analyses statistiques.....	19
2. Résultats	21
a. Observations préliminaires	21
b. Succès reproducteur	22
c. Analyses chimiques	23
3. Discussion	27
Chapitre IV – EXPÉRIENCE PRINCIPALE	30
1. Matériel et méthodes	30
a. Insectes expérimentaux.....	30
b. Dispositif expérimental.....	30
c. Dispositif de mesure des composés volatils	33
d. Analyses chimiques	34
e. Analyses statistiques.....	36
2. Résultats	38
a. Succès reproducteur.....	38

b. Écologie chimique	42
Chapitre V - DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	45
Chapitre VI – RÉFÉRENCES	57
ANNEXES	i
▪ Script R : test de permutations sur la survie des adultes <i>R. grandis</i> (<i>Rg</i>).....	i
▪ Tableau 11 : État des adultes <i>R. grandis</i> (<i>Rg</i>) retirés lors de l’interruption de la ponte (lot sur la cinétique de ponte).....	ii
▪ Tableau 12 : masse des composés extraits dans chaque série au jour 1	iii
▪ Tableau 13 : masse des composés extraits dans chaque série au jour 4	iv
▪ Tableau 14 : masse des composés extraits dans chaque série au jour 7	v
▪ Tableau 15 : masse des composés extraits dans chaque série au jour 11	vi
▪ Tableau 16 : masse des composés extraits dans chaque série au jour 14	vii
▪ Tableau 17 : masse des composés extraits dans chaque série au jour 18	viii
Figure 11 : Évolution de la masse des monoterpènes dans les séries	ix
Figure 12 : Évolution de la masse des monoterpènes oxygénés dans les séries	x
Figure 13 : Évolution de la masse des sesquiterpènes dans les séries.....	xi
Figure 14 : Évolution de la masse totale des terpénoïdes dans les séries.....	xii
▪ Figure 15 : Score- et loadingplots de l’ACP sur les masses extraites : jour 1 :.....	xiii
▪ Figure 16 : Score- et loadingplots de l’ACP sur les masses extraites : jour 4 :.....	xiv
▪ Figure 17 : Score- et loadingplots de l’ACP sur les masses extraites : jour 7 :.....	xv
▪ Figure 18 : Score- et loadingplots de l’ACP sur les masses extraites : jour 11 :.....	xvi
▪ Figure 19 : Score- et loadingplots de l’ACP sur les masses extraites : jour 14 :.....	xvii
▪ Figure 20 : Score- et loadingplots de l’ACP sur les masses extraites : jour 18 :.....	xviii

Chapitre I - INTRODUCTION

Dendroctonus micans (Kugelann) (Coleoptera : Curculionidae), l'hylésine géant ou dendroctone de l'épicéa (Richard, 1998), est un scolyte présent en Europe ainsi qu'en Asie (Grégoire, 1988 ; Pauly et Meurisse, 2008). Les scolytes sont la première cause des dommages occasionnés aux conifères (Lieutier, 2002), leur impact dépassant les conséquences liées aux feux, inondations, maladies et facteurs climatiques cumulées aux États-Unis (Anderson, 1960 *in* Wood, 1982).

D. micans s'installe dans l'écorce de conifères où les adultes et les larves consomment le phloème. Ils creusent des galeries dans lesquelles s'accumule le « frass », mélange de vermoulure et de déjections. Ses hôtes habituels sont les épicéas dont principalement *Picea abies* (L.) Karst (épicéa commun), *P. sitchensis* et *P. orientalis*, mais il lui arrive de s'attaquer à d'autres espèces du genre ainsi qu'à des pins, sapins, mélèzes et douglas (Grégoire, 1988). Aujourd'hui, *D. micans* ne cause plus de dégâts importants en Belgique (Grégoire, 1984), ses dernières pullulations remontant à la fin du 19^{ème} siècle dans nos régions (Grégoire, 1988). Il reste néanmoins une préoccupation à la limite de son extension géographique (Grégoire, 1988 ; Baisier et Grégoire, 1988), notamment en France (Pauly et Meurisse, 2008), mais aussi dans des zones d'introduction accidentelle comme au Royaume-Uni (Fielding et Evans, 1997).

Les scolytes attaquent généralement en masse dans le but de submerger les défenses des arbres (Wood, 1982). Chez les conifères, elles reposent principalement sur la résine en tant que défense mécanique, refoulant les assaillants vers l'extérieur, mais aussi chimique, par la grande toxicité des terpènes qui la composent (Everaerts *et al.*, 1988 ; Lieutier, 2002). Parmi les scolytes, *D. micans* fait figure d'exception. Il est l'un des rares représentants qui adopte plutôt une stratégie de résistance grâce à son aptitude à détoxifier la résine (Everaerts *et al.*, 1988). En tant que scolyte solitaire (par opposition aux attaques en masse), il n'utilise pas de phéromone agrégative au stade adulte, et accomplit son cycle de vie complet sur des arbres en apparente bonne santé (Grégoire, 1988).

Une autre particularité de *D. micans* est le comportement grégaire de ses larves. Après s'être posée sur un arbre, une femelle fécondée creuse une galerie sous l'écorce et y dépose ses œufs. Au cours de leurs cinq stades (L1-L5), les larves se nourrissent en groupes jusqu'à la nymphose, qui se déroule dans des logettes individuelles. Les jeunes adultes s'accouplent

dans la galerie (endogamie) avant la dispersion des femelles. Dans la nature, le cycle complet dure entre 1 et 3 ans (Grégoire, 1988).

L'agrégation des larves permet probablement une meilleure résistance face aux défenses locales de l'hôte (Grégoire *et al.*, 1981). Elle résulte d'une phéromone d'agrégation émise par les larves lorsqu'elles se nourrissent. Grégoire *et al.* (1981) ont mis en évidence que cette phéromone est composée de produits (*cis*- et *trans*-verbénol, verbénone, myrténol) de l'oxydation de l' α -pinène, un terpène important de l'écorce d'épicéa commun (Heemann et Francke, 1977) présent aussi chez de nombreux autres conifères (Kaiser, 2011). La défense de l'arbre est donc détoxifiée et finalement détournée à l'avantage des dendroctones (Baisier *et al.*, 1988). Les terpènes des conifères interviennent couramment dans les phéromones des scolytes (Seybold et Vanderwel, 2003), mais des études récentes montrent qu'il existe aussi des synthèses *de novo* chez ces insectes (Blomquist *et al.*, 2010).

Rhizophagus grandis Gyllenhal (Coleoptera : Monotomidae) est un prédateur spécifique de *D. micans* (Bergmiller, 1903 ; Grégoire, 1988). Ses adultes s'attaquent aux œufs, larves et nymphes de *D. micans*, tandis que ses larves s'alimentent en groupe sur les larves et nymphes éventuellement blessées par leurs parents (Baisier, 1990). À la fin de leur développement, les larves *R. grandis* sortent de la galerie et se nymphosent dans la litière. Le cycle complet dure entre trois mois et un an (Grégoire, 1988).

Comme sa proie, *R. grandis* montre une grande résistance aux monoterpènes. L'absence de compétiteur régulier semble résulter de sa spécialisation sur *D. micans*, en fonction des défenses de l'arbre hôte (système tritrophique ; Everaerts *et al.*, 1988). *R. grandis* réagit positivement au frass dont il utilise les composés volatils pour localiser les galeries et les proies qui y logent (Merlin *et al.*, 1984 ; Grégoire *et al.*, 1992). On ne l'a jamais observé que dans des galeries de *D. micans* (Baisier et Grégoire, 1988 ; Grégoire *et al.*, 1992). Une telle spécificité peut progressivement s'installer avec la coévolution des deux espèces. L'évolution des phénotypes de l'une modifie la pression de sélection sur l'autre (Dieckmann *et al.*, 1995). D'après Kawecki (1998), la spécialisation vers une proie permet d'éviter les « trade-offs » génétiques associés au comportement généraliste, et donc d'évoluer plus rapidement en fonction de cette unique proie. Il s'agit d'une illustration de la théorie de la Reine rouge (Van Valen, 1973), aussi appelée course à l'armement.

Régulièrement, l'action d'un prédateur a un effet stabilisateur sur les effectifs de la proie (Wood, 1982 ; Abrams, 2000). Cette régulation intervient par l'intermédiaire de deux mécanismes agissant à des niveaux différents. Le premier relève de la dynamique des

populations, qui peut s'expliquer par les modèles prédateur-proie, à une échelle de l'ordre de la génération (Abrams, 2000). Mais un second processus qui se place à une échelle évolutive nous intéresse d'avantage ici : le « feedback génétique », décrit par Pimentel (1961). Celui-ci souligne l'impact de la densité de prédateurs sur la pression de sélection subie par les proies, modifiant leur constitution génétique (gènes de résistance), qui en retour influence et stabilise la densité de prédateurs (Pimentel, 1961 ; Sydor et Pimentel, 1975). D'autres mécanismes ajoutent leurs effets dans la régulation des populations : la compétition et la variation des conditions environnementales (Pimentel, 1961 ; Pimentel et Al-Hafidh, 1965).

R. grandis est un prédateur très efficace dans la régulation des effectifs de *D. micans* (Bergmiller, 1903). Il maintient la population à un niveau endémique à l'exception de la limite d'extension du ravageur, le prédateur nécessitant jusqu'à quelques dizaines d'années pour rejoindre sa proie (Baisier, 1990). Ces régions correspondent aux populations épidémiques de *D. micans*, où la question du contrôle biologique par *R. grandis* est posée. Il a par exemple été pratiqué en France – notamment en Bretagne, dans l'Aveyron et le Tarn (Pauly et Meurisse, 2008) –, mais aussi dans des régions où *D. micans* fut introduit accidentellement comme en Turquie et République de Géorgie (Grégoire *et al.*, 1991) et plus récemment au Royaume-Uni (Fielding et Evans, 1997). La spécificité de *R. grandis* permet d'écarter tout danger pour la diversité locale et en fait un choix idéal dans l'optique de la lutte biologique, qui reste actuellement la solution à la fois la plus efficace et la moins onéreuse pour contrôler les populations de *D. micans* (Pauly et Meurisse, 2008).

Merlin *et al.* (1984) et Grégoire *et al.* (1992) ont montré que *R. grandis* utilise des kairomones dans son orientation vers *D. micans*. Mais d'autres composés sémiologiques interviennent dans cette relation prédateur-proie. En particulier, les femelles de *R. grandis* ajustent leur volume de ponte au nombre de proies disponibles (Baisier, 1984 ; Baisier et Grégoire, 1988). Lorsque plusieurs femelles sont mises en présence, le nombre total de descendants reste le même (Baisier, 1990), avec une plus faible productivité par femelle (Merlin *et al.*, 1984). L'ajustement de la ponte en fonction des proies est appelé réponse numérique et résulte d'une balance entre les stimuli de ponte, signant l'activité des proies, et des inhibiteurs de ponte, qui s'accumulent en fonction des descendants (Baisier, 1990 ; Meurisse, 2008). L'avantage de ce processus est de maximiser le nombre de descendants tout en évitant la mortalité due au manque de ressources (Baisier, 1990) : il s'agit de « scramble competition », avec des ressources limitées équitablement partagées (*i.e.* les proies ; Merlin *et al.*, 1984). En l'absence de proies, ne pouvant se déplacer vers une autre galerie, les larves prédatrices pratiquent le

cannibalisme (Baisier, 1984 ; Merlin *et al.*, 1984), ce qui réduit le nombre de descendants atteignant la maturité et donc le succès reproducteur des parents.

Les expériences d'ablation de Baisier (1990) mettent en évidence que les femelles *R. grandis* pondent plus lorsque leurs antennes sont coupées ; les inhibiteurs de ponte seraient par conséquent détectés au niveau des antennes. Ses mesures électro-physiologiques tendent à montrer que les stimuli de ponte sont perçus grâce à des récepteurs gustatifs (ou olfactifs de contact) situés sur l'ovipositeur, et non au niveau des tarsi ou des antennes.

Baisier *et al.* (1988) et Baisier (1990) ont déterminé que les stimuli de ponte étaient des monoterpènes oxygénés, et très probablement un mélange de ces composés volatils. Ces stimuli sont présents dans le frass produit par les dendroctones, car celui-ci initie autant la ponte en absence qu'en présence des larves mêmes, tandis que l'écorce ne stimule pas la ponte. Bien qu'elle se poursuive moins longtemps avec le frass seul, le plus faible volume de ponte qui en résulte découle probablement du non-renouvellement des stimuli en l'absence de l'activité des larves, ces composés volatils disparaissant progressivement (Baisier *et al.*, 1988 ; Baisier, 1990). Le frass contient bien plus de monoterpènes oxygénés que l'écorce, qui ne contient pour l'essentiel que des monoterpènes simples (hydrocarbures ; Heemann et Francke, 1977 ; Baisier *et al.*, 1988).

À l'instar de la phéromone d'agrégation des larves *D. micans* (Grégoire *et al.*, 1981), il semble que les stimuli de ponte de *R. grandis* soient des produits de l'oxydation des terpènes de l'arbre (Baisier, 1990 ; Grégoire *et al.*, 1991) ; Grégoire *et al.* (1988) ont d'ailleurs suggéré que les constituants mêmes de cette phéromone participent à la régulation de la ponte. Les terpènes seraient métabolisés par les scolytes eux-mêmes, ou par leur microflore associée (Grégoire *et al.*, 1988 ; Blomquist *et al.*, 2010). Effectivement, des micro-organismes se montrent capables d'oxyder des terpènes, comme la bactérie *Bacillus cereus* dans le tube digestif du scolyte *Ips paraconfusus* (Brand *et al.*, 1975), et un champignon (SBJ-133) présent dans les mycétanges de *D. frontalis* (Brand *et al.*, 1976). Brand *et al.* (1975 ; 1976) ont suggéré que des bactéries et des champignons, internes ou externes à l'insecte, participaient à la synthèse de phéromones dans le genre *Dendroctonus*, sans rejeter l'intervention des enzymes du scolyte, une transformation séquentielle des composés terpéniques étant probable. La participation de tels micro-organismes fut rapidement confirmée par Byers et Wood (1981), alors que le rôle de la machinerie enzymatique des scolytes a depuis aussi été établi (Blomquist *et al.*, 2010).

Au cours du temps, en toute hypothèse, les stimuli de ponte décroissent avec la diminution des effectifs de dendroctones, due à la prédation, tandis que les inhibiteurs augmentent (Baisier et Grégoire, 1988 ; Baisier, 1990). La diminution seule des stimuli ne suffit pas à expliquer le plafonnement de la ponte car il se produit même lorsque des proies sont encore actives, et d'autant plus rapidement que plusieurs femelles participent à la ponte (Baisier et Grégoire, 1988). Mis en évidence, ces inhibiteurs de ponte, ou phéromone épидéictique, peuvent être associés aux œufs, larves ou adultes *R. grandis* (Baisier et Grégoire, 1988). Précisément, Baisier (1990) propose qu'il s'agisse de sécrétions glandulaires émises par les larves prédatrices, des substances présentes dans leurs exuvies ou dans leurs fèces. Les expériences de Meurisse (2008) ont permis de relier certains sesquiterpènes (indéterminés, trois principaux fragments ioniques : [161+105+119] (n°34), [161+105+119] (n°35), [119+161+105] (n°36)) au nombre de larves prédatrices, en tant que candidats inhibiteurs, ce que les résultats de Godefroid (2008) ne confirment pas.

D. valens LeConte, le dendroctone rouge du pin, est un scolyte largement distribué en Amérique du Nord (Smith, 1971). Il attaque toutes les espèces locales de pins (Wood, 1982), le pin ponderosa (*Pinus ponderosa*) étant son hôte principal, mais il s'installe occasionnellement sur des épicéas, mélèzes, sapins, et douglas (Smith, 1971). À la différence de *D. micans*, *D. valens* est un scolyte secondaire, choisissant préférentiellement les souches de pins fraîchement coupés ou des arbres attaqués précédemment par d'autres espèces dites primaires (Wood, 1982) dont *D. brevicomis* et *Ips* spp. (Smith, 1971). Néanmoins, il arrive qu'il s'installe sur des arbres en apparente bonne santé (Smith, 1971). Il fait peu de dommages aux États-Unis, où on considère qu'il a un faible impact économique, vu son statut de scolyte secondaire (Wood, 1982).

D. micans et *D. valens* possèdent plusieurs aspects écologiques communs : ils n'attaquent pas en masse (solitaires), leurs larves sont grégaires et se nymphosent dans des logettes individuelles (Smith, 1971 ; Wood, 1982). Mais, outre le caractère secondaire de *D. valens*, d'autres aspects les différencient. D'après Smith (1971), il n'est associé à aucun ennemi naturel efficace. Après dispersion, la femelle *D. valens* perce un trou dans l'écorce, bientôt rejointe par un mâle, et creuse une galerie où la fécondation a lieu. Le temps de génération varie beaucoup en fonction de la température, entre 3 mois et 2 ans (Smith, 1971), au cours desquels les larves connaissent quatre stades (L1-L4).

De distribution native restreinte à l'Amérique du Nord, *D. valens* a été introduit en Chine dans les années 1980, probablement par l'importation de bois d'emballage non traité (Yan *et al.*,

2005). Une pullulation s'est depuis produite dans la province du Shanxi en 1999 qui s'est rapidement étendue aux provinces adjacentes, profitant d'une faible pluviosité durant plusieurs années successives, ce qui a mené à l'infestation de plus de 500.000ha de pins et causé notamment la mort de plus de 10 millions de pieds de pin rouge de Chine (*Pinus tabuliformis* ; Yan *et al.*, 2005).

Le contrôle biologique de *D. valens* en Chine a été évoqué suite à l'observation en chambre de quarantaine du bon développement de *R. grandis* sur cette proie exotique (Grégoire *et al.*, 1991 ; Grégoire *et al.*, non publié (1997)), et de sa capacité à s'orienter, entrer et boucler son cycle dans les galeries sur différentes essences d'arbres (Grégoire et Dahlsten, non publié (1994) ; Meurisse, 2008). Depuis 2001, des lâchers de *R. grandis* ont été effectués dans la province de Shanxi, en fait peu éloignée de sa distribution actuelle associée à *D. micans* (Nord de la Chine ; Meurisse, 2008).

En 1984, Hokkanen et Pimentel proposent la théorie des « nouveaux associés ». Jusqu'alors, on prônait l'utilisation d'ennemis naturels associés de longue date aux ravageurs-cibles en lutte biologique ; Hokkanen et Pimentel (1984) montrent que des associés exotiques ont 75% de chances de succès supplémentaires de contrôler un ravageur. Les modèles et expériences sur le mécanisme de « feedback génétique » montrent que des relations prédateur-proie (*sensu lato*) évoluent vers un équilibre interspécifique, une certaine virulence amoindrie (Pimentel, 1961 ; Pimentel et Al-Hafidh, 1965 ; Olson et Pimentel, 1974 ; Pimentel *et al.*, 1978). Le recours à de nouveaux associés augmente également le répertoire de prédateurs disponibles, comparé aux ennemis naturels (Hokkanen et Pimentel, 1984). *R. grandis* correspond remarquablement bien aux critères de choix d'un bon « nouvel associé » (Hokkanen et Pimentel, 1984) sur *D. valens* : ennemi naturel d'une espèce proche phylogénétiquement (Kelley et Farrell, 1998) qui s'alimente sur des hôtes proches, d'une région climatique similaire, avec une haute spécificité (Bergmiller, 1903 ; Grégoire, 1988) et une bonne capacité de recherche (Merlin *et al.*, 1984 ; Grégoire *et al.*, 1992 ; Grégoire et Dahlsten, non publié (1994) ; Meurisse, 2008).

Afin de mettre en évidence cette baisse de virulence du prédateur sur sa proie indigène, des expériences ont été mises sur pied pour comparer le succès reproducteur de *R. grandis* sur *D. micans*, sa proie spécifique, et *D. valens*, comme proie exotique. D'un côté, Baisier (1990), Grégoire *et al.* (non publié (1997)) et Meurisse (2008) n'ont pas observé de différence en fonction de la proie. Par contraste, Grégoire *et al.* (1991) et Grégoire et Dahlsten (non publié (1994)) ont quant à eux obtenu plus de descendants du prédateur sur *D. valens*. Les résultats

ne sont donc pas concordants, ce qui s'explique au moins en partie par les conditions expérimentales divergentes, en particulier l'espèce d'arbre hôte, le stade et l'origine des proies. De plus, il existe une forte variabilité des rendements entre réplicats en élevage (observation personnelle), ce qui rend difficile la mise en évidence d'une différence statistique.

Au point de vue chimique, certaines divergences et convergences ont pu être mises en évidence entre *D. micans* et *D. valens* en situation de ponte de *R. grandis*. Par exemple, Baisier (1990) et Grégoire *et al.* (1991) ont mesuré une production commune de (-)-fenchone, alors qu'ils n'ont trouvé du camphre et de la verbénone que chez *D. valens*, et du pinocamphone seulement chez *D. micans*. De nombreux résultats se sont accumulés à ce sujet (voir aussi Grégoire, non publié (1998) ; Meurisse, 2008 ; Godefroid, 2008), mais il serait trop long de les détailler ici. À nouveau, tous ne concordent pas sur les divergences et convergences de chimie entre les deux proies. L'identité de chacun des intervenants dans les stimuli et inhibiteurs de ponte de *R. grandis* reste donc inconnue, bien que les précédentes expériences permettent de soupçonner certains composés plus particulièrement.

Puisque *R. grandis* pond en présence des deux proies, on s'attend à ce que certains composés communs participent à la stimulation de la ponte (Baisier, 1990 ; Grégoire *et al.*, 1991 ; Meurisse, 2008 ; observation personnelle). De plus, des différences entre les deux proies pourraient, éventuellement, être reliées à l'évolution d'une résistance de *D. micans* face au prédateur. Celles-ci pourraient se manifester sous la forme d'une diminution des stimuli, ou du développement d'antagonistes à ces stimuli, voire d'inhibiteurs de ponte « copiés » sur la phéromone épидéictique de *R. grandis* par mimétisme chimique (Vereecken et McNeil, 2010). De telles évolutions diminueraient la ponte (et donc le succès reproducteur) du prédateur, illustrant le principe de « virulence amoindrie » qui découle de l'équilibre interspécifique vers lequel tendent les relations prédateur-proie selon Pimentel (1961) et d'autres auteurs (Pimentel et Al-Hafidh, 1965 ; Olson et Pimentel, 1974 ; Pimentel *et al.*, 1978). À l'opposé, *D. valens* n'aurait développé aucune résistance, ne subissant pas l'impact d'un ennemi naturel spécifique (Smith, 1971).

Les stimuli et inhibiteurs de ponte semblent donc associés à la classe des terpénoïdes (Baisier *et al.*, 1988 ; Baisier, 1990 ; Grégoire *et al.*, 1991 ; Grégoire, non publié (1998) ; Meurisse, 2008), qui englobe les monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, ..., ainsi que leurs dérivés (notamment oxygénés ; Bouvier-Brown *et al.*, 2007). Les premières analyses chimiques sur le système *R. grandis*-*D. micans* impliquaient une méthode destructrice par extraction totale du

frass avec différents solvants (Baisier *et al.*, 1988 ; Baisier, 1990 ; Grégoire *et al.*, 1991). Bien qu'intéressante pour obtenir une mesure de l'ensemble des composés jusqu'aux plus lourds, cette méthodologie ne permet pas de suivre un même système au cours du temps.

Dans les années 1990 fut développée une nouvelle technique ne faisant intervenir aucun solvant : la microextraction en phase solide ou SPME (Pawliszyn, 1997). Constituée d'une fibre adsorbante, elle permet notamment la mesure de composés volatils en « headspace » (au-dessus de l'échantillon ; Bouvier-Brown *et al.*, 2007 ; Risticovic *et al.*, 2010). La désorption est thermique (Risticovic *et al.*, 2010 ; Kaiser, 2011). Cette méthode non destructive permet de suivre l'évolution d'un échantillon par des mesures successives, sans impact sur les organismes vivants (Meurisse, 2008 ; Godefroid, 2008 ; Risticovic *et al.*, 2010), ce qui est intéressant dans la mesure où l'atmosphère chimique des galeries varie quantitativement et qualitativement dans le temps (Meurisse, 2008). Ces qualités en font une technique régulièrement utilisée, notamment pour l'échantillonnage des terpénoïdes (Bouvier-Brown *et al.*, 2007 ; Bouvier-Brown *et al.*, 2009a ; Bouvier-Brown *et al.*, 2009b). La SPME a été utilisée dans les expériences plus récentes sur la chimie du système *R. grandis-D. micans* (Meurisse, 2008 ; Godefroid, 2008).

Des études récentes (Jürgens, 2004 ; Johnson *et al.*, 2007 ; Jürgens *et al.*, 2008 ; Johnson *et al.*, 2009 ; Kaiser, 2011) utilisent le « headspace dynamique », avec le pompage de l'air au-dessus de l'échantillon vers un filtre, pour capturer les composés volatils. Cette méthode permet de concentrer les analytes sur une poudre adsorbante – typiquement Porapak®, Tenax®, charbon actif –, tandis que l'air et l'humidité traversent le filtre (Kaiser, 2011). Comme le SPME, la technique est non destructive et permet de suivre l'évolution de l'échantillon. L'usage d'un flux d'air n'est pas une nouveauté en soi, puisque la possibilité existe également avec les fibres SPME (Bouvier-Brown *et al.*, 2007). Toutefois, une différence importante distingue les deux méthodes : les filtres à poudre adsorbante peuvent être élués par un solvant (Kaiser, 2011). L'avantage principal est le caractère moins agressif de la désorption par solvant, par comparaison avec la désorption thermique en SPME (Kaiser, 2011), pour les composés semi-volatils très réactifs que sont les terpénoïdes (Bouvier-Brown *et al.*, 2007). Un autre avantage est la possibilité d'analyser plusieurs fois un éluat (Kaiser, 2011), ou encore d'y ajouter un étalon interne dans l'optique d'une quantification.

Dans leurs expériences respectives, Meurisse (2008) et Godefroid (2008) n'ont pu exprimer leurs résultats sous forme quantitative absolue, et avaient donc opté pour des mesures relatives. Les causes sont d'une part une intolérance des fibres SPME à certains solvants

(pentane) utilisés pour les dilutions d'un étalon externe, d'autre part une erreur standard relative de 20% dans les tests de reproductibilité (Godefroid, 2008). À l'instar des méthodes non destructives, l'utilisation de mesures quantitatives serait par conséquent une innovation importante car ces dernières permettent de comparer les résultats entre les différents traitements et au fil de l'expérience, chose impossible sans poser d'hypothèse avec des mesures relatives.

Chapitre II - BUTS DU TRAVAIL

L'objectif du présent travail est de mettre en évidence la coévolution de *R. grandis* et *D. micans* sous deux aspects complémentaires. Le premier concerne le succès reproducteur du prédateur, qui est comparé entre sa proie spécifique (*D. micans*) et la proie exotique *D. valens*. Le second est l'analyse de l'atmosphère chimique de ponte de *R. grandis* sur chaque proie, afin de mettre en exergue les éventuelles similitudes et différences, et les relier aux rôles de stimuli et inhibiteurs de ponte. Selon la théorie des nouveaux associés (Hokkanen et Pimentel, 1984), *D. micans* pourrait avoir évolué une résistance qui diminue le succès reproducteur de son prédateur spécifique. L'étude de ces deux aspects devrait apporter des connaissances nouvelles à ce sujet grâce à l'utilisation d'une nouvelle méthode de capture des composés chimiques, les filtres à poudre adsorbante, et à leur analyse quantitative absolue.

Étant donné le caractère novateur des filtres à poudre adsorbante dans l'étude d'un prédateur spécifique de scolyte, je conduis une première expérience – qualifiée de « préparatoire » – qui a pour but de calibrer cette méthode pour le cas qui nous occupe. Avant tout, cette expérience vise à observer si le flux d'air qui implique le « headspace dynamique » influence la survie ou le succès reproducteur des insectes. Le second objectif est d'optimiser les paramètres liés au pompage, et d'améliorer les analyses chimiques. Il s'agit donc de définir une méthodologie solide et cohérente pour la suite du travail.

Les prochains chapitres du travail s'organisent comme suit. L'objectif du mémoire est d'abord expliqué, suivi d'un plan, dans la rubrique « buts du travail » (chapitre II). Ensuite, une première grande partie est consacrée à l'expérience préparatoire (III), en ce compris la méthodologie, les résultats et les conclusions qu'elle permet de tirer. La manipulation ayant pour but de répondre à la question de la coévolution *R. grandis*-*D. micans* est enfin abordée sous les termes « expérience principale », avec le protocole et les résultats d'une part (IV), et la discussion et les perspectives d'autre part (V). Les derniers chapitres recensent les références bibliographiques mentionnées au fil du travail (VI), et illustrent des analyses et résultats trop volumineux pour être intégrés dans le corps du texte (annexes).

J'ai opté pour cette structure de travail afin de faciliter la compréhension des choix impliqués dans le design expérimental de l'expérience principale. Cette démarche chronologique favorise la clarté et la cohérence du discours. Elle évite de la sorte certaines redondances dans les justifications et des renvois plusieurs sections en arrière dans le texte.

Chapitre III – EXPÉRIENCE PRÉPARATOIRE

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

a. Insectes expérimentaux

Pour des raisons logistiques, cette expérience s'est entièrement réalisée sur les proies exotiques *Dendroctonus valens*. L'écologie de cette espèce est très proche de celle de *D. micans* (larves grégaires, cycle bouclé sur un hôte vivant, long temps de génération ; Wood, 1982), toutes deux visées par l'expérience principale. Les *D. valens* sont issus d'un élevage en laboratoire de quarantaine sur des rondins de pin noir d'Autriche (*Pinus nigra*), à la base duquel les géniteurs ont été récoltés en Chine en 2007.

Les prédateurs *Rhizophagus grandis* sont des F2 dont les géniteurs ont été récoltés au stade larvaire à Saint-Hernin (Finistère, Bretagne, France) en juillet 2010. Ils ont quant à eux été élevés dans des boîtes se rapprochant des conditions naturelles pour la ponte (en présence de proies et d'écorce), en alternance avec des conditions de pré-nymphose (avec diètes à base d'asticots de *Calliphora vicina*).

L'ensemble des élevages, de proies comme de prédateurs, sont réalisés en chambre de quarantaine, à l'Université Libre de Bruxelles (ULB), avec une température ambiante maintenue à 20 ± 1 °C.

b. Dispositif expérimental

Les insectes, proies et prédateurs, sont insérés dans des dispositifs appelés « boîtes de ponte ». Elles sont qualifiées de la sorte en raison de leur utilisation en élevage pour la ponte des *R. grandis*. Les boîtes de ponte sont des récipients fermés en polystyrène cristal transparent (Caubère, 77390 Yebles, France), de 49mm de diamètre et 23,5mm de hauteur pour un volume interne de 44,3cm³. Pour les besoins de l'expérience, les boîtes sont percées d'un trou d'aération et d'un trou d'extraction (analyses chimiques). Le trou d'aération est réalisé sur la face inférieure de toutes les boîtes, au moyen d'une épingle d'entomologiste chauffée de 0,4mm de diamètre. L'orifice d'extraction est percé sur le couvercle grâce à une foreuse Black & Decker DN420S (SL1 3YD Berkshire, Royaume-Uni) équipée d'une mèche à métaux de 2,5mm de diamètre, ensuite poncé sur les 2 faces ; il est absent des boîtes de la série contrôle, car aucune mesure chimique n'y est exécutée. Ce dernier trou est refermé entre deux extractions (voir section c).

Les boîtes sont remplies le 17 février 2011. Y sont disposés deux disques d'écorce d'épicéa commun de 42mm de diamètre, découpés à l'emporte-pièce et débarrassés du lichen et des écailles extérieurs. L'écorce a été prélevée la veille sur des arbres vivants au lieu-dit les Blancs-Bâtis (50° 3' 16,68" N 5° 10' 4,04" E, Wellin, Belgique). Les disques sont insérés en « sandwich », faces internes accolées. Pour combler le volume de la boîte est ajoutée de l'écorce d'épicéa commun broyée et réhumidifiée (poudre d'écorce), tout autour du sandwich d'écorce.

Les *D. valens* sont insérés dans les boîtes le jour-même au nombre de 21 larves, à raison de 10 larves de stades L1-L2, et 11 L3-L4. Cette date du 17 février marque le début de l'expérience (jour 0). Les prédateurs ne sont ajoutés que le lendemain (jour 1) pour laisser le temps aux proies de s'installer dans l'écorce. Un couple de *R. grandis* adultes (double vérification du sexage) est introduit dans chaque boîte. Des accouplements ont pu avoir lieu avant la mise en boîte. À aucun moment les boîtes ne sont ouvertes, à partir de l'ajout des *R. grandis* jusqu'au terme de l'expérience. Ceci afin d'éviter le stress lié à la manipulation et la modification de l'atmosphère régnant dans les boîtes.

Quatre séries de six boîtes correspondent à différentes durées de pompage pour la mesure des composés volatils : 30, 60, 90 et 120min. Une série supplémentaire de 6 répliqués (contrôle) ne subit aucune extraction. Ces boîtes restent dans la chambre de quarantaine sur l'ensemble de l'expérience, à l'obscurité et à 20°C. Elles ne reçoivent la lumière artificielle que le temps des extractions, pour les besoins de la manipulation, toujours en quarantaine.

Les extractions sont exécutées deux fois par semaine : jours 1, 4, 7, 11, 14, et enfin 18, date de la dernière extraction. L'expérience préparatoire prend fin le 9 mars, soit après 20 jours, avec le décompte manuel systématique des larves *D. valens* vivantes (stades immatures et nymphes cumulés) et des larves *R. grandis* vivantes (tous stades) dans chacune des boîtes des quatre traitements et de la série contrôle. Cette étape permet d'estimer la survie des *D. valens* et le succès reproducteur des *R. grandis* pour différents temps de pompage.

Remarquons que le pin constitue l'hôte habituel de *D. valens* (Smith, 1971 ; Bright, 1976). J'ai ici utilisé de l'écorce et de la poudre d'épicéa commun pour des raisons à la fois logistiques, et de proximité avec l'expérience principale, sachant que cette essence est acceptée par les *D. valens* (Bright, 1976 ; Wood, 1982) et n'affecte pas leur cycle de vie (Grégoire et Dahlsten, non publié (1994) ; observations en élevage à l'ULB).

c. Dispositif de mesure des composés volatils

La capture des composés volatils se fait au moyen de filtres artisanaux, à base de Porapak SQ. J'ai réalisé ces filtres suivant le modèle de Vereecken (non publié), inspiré par Kaiser (2011). La figure 1 illustre la composition d'un filtre avec, du centre vers les extrémités : poudre Porapak Super Q 80/100 (Müller, 0261 Zürich, Suisse), laine de verre et billes de verre de 0,4mm de diamètre (Supelco, 1196 Gland, Suisse). La structure externe du filtre consiste en un tube capillaire en verre de 0,9mm de diamètre interne et 1,5mm externe (BGB Analytik, 4461 Boeckten, Suisse).

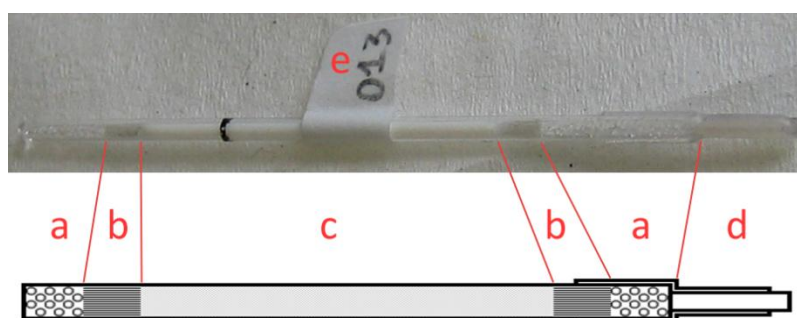


Figure 1. Filtre à Porapak : photo (supérieur) et schéma (inférieur) avec (a) billes de verre, (b) laine de verre, (c) poudre Porapak SQ, (d) raccord d'insertion de seringue, (e) étiquette d'identification.

Le Porapak est le matériau adsorbant pour les composés volatils. Il occupe une longueur moyenne de 23mm dans les capillaires. Chaque filtre est numéroté (figure 1) et une base de données reprend les longueurs de poudre Porapak pour ajuster les mesures quantitatives suivant une règle de proportionnalité directe. La laine de verre et les billes de verre, soudées au capillaire par chauffage, participent ensemble au maintien de la poudre Porapak dans le filtre. Elles occupent respectivement une longueur moyenne de 2mm (laine) et 9mm (billes) de chaque côté des filtres.

Le filtre se termine d'un côté par un raccord (figure 1) constituée de la fusion par chauffage de deux tuyaux en polytétrafluoroéthylène (PTFE), enchâssés l'un dans l'autre, respectivement avec des diamètres interne-externe de 0,40-0,90mm (Bola, 97947 Grünsfeld, Allemagne) et 1,19-1,79mm (Maagtechnik, 8600 Dübendorf, Suisse). Cette raccord permet l'insertion d'une micro-seringue 705RN 50 μ L de Hamilton (7402 Bonaduz, Suisse) pour l'élution et le nettoyage du filtre.

Un joint assure l'étanchéité du trou d'extraction situé sur le couvercle des boîtes de ponte. Il s'agit d'un morceau (8mm) de tuyau en silicone de 1mm de diamètre interne et 3mm externe (Fisherbrand, Leicestershire LE11 5RG, Royaume-Uni). Ce joint peut recevoir un filtre lors d'une mesure chimique (figure 2A), ou être rebouché par un capillaire en verre aux extrémités fondues (identique à ceux composant les filtres ; figure 2B) entre deux extractions.

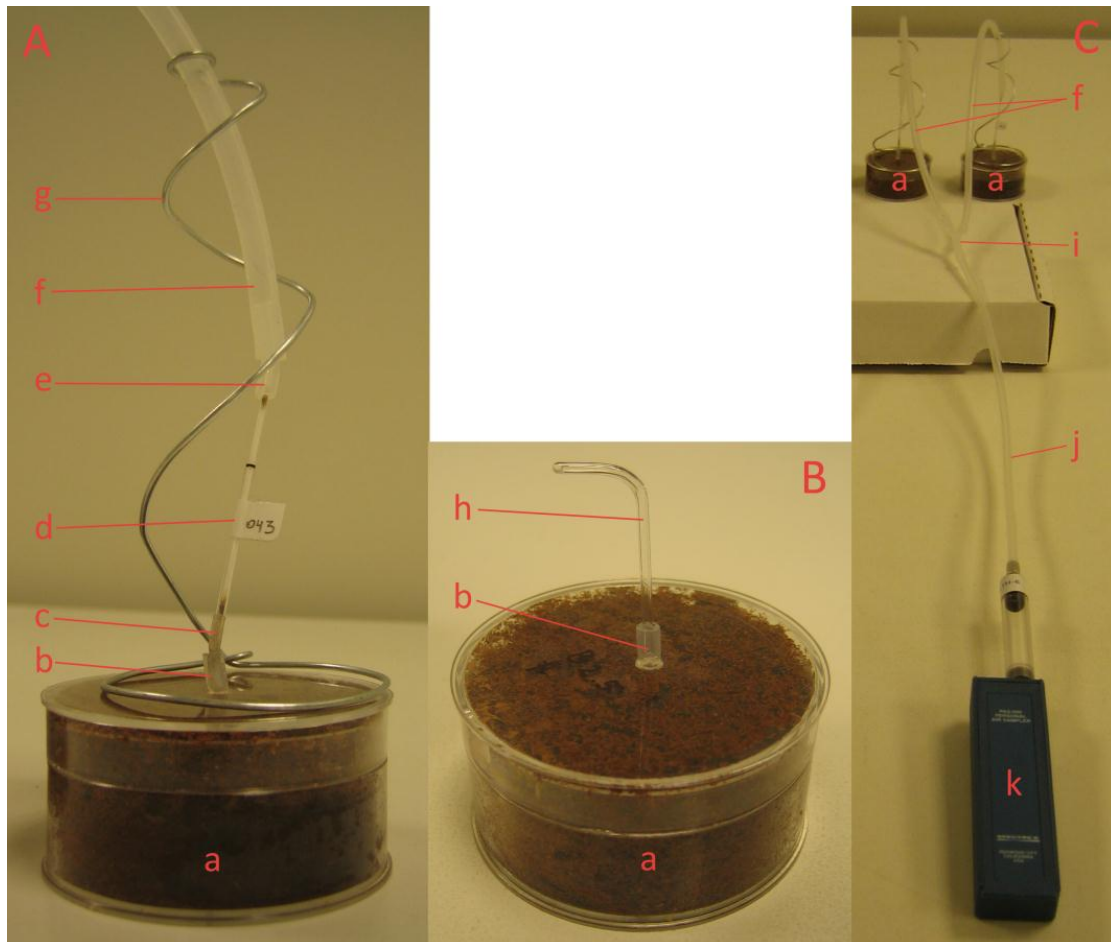


Figure 2. (A) Boîte de ponte lors d'une mesure chimique, (B) boîte de ponte entre deux mesures chimiques, et (C) pompage avec séparateur de flux en Y (largeur de la pompe : 30mm). (a) Boîte de ponte d'extraction, (b) joint du trou d'extraction, (c) raccord d'insertion de seringue, (d) filtre Porapak, (e) joint de filtre, (f) tuyau vers diviseur de flux, (g) structure de soutien en fer, (h) bouchon d'extraction, (i) séparateur de flux en Y, (j) tuyau vers pompe, (k) pompe. Trou d'aération non visible (face inférieure de la boîte de ponte).

Lors d'une extraction, un filtre est placé dans le joint du couvercle de la boîte (figure 2A), et est relié par l'autre extrémité à une pompe, via un premier tuyau. Il s'agit d'un tuyau de silicone de 30cm de long, de 3mm de diamètre interne et 5mm externe (Versilic, 89120 Charny, France). Un joint assure l'étanchéité entre le filtre et le tuyau, et est identique à celui utilisé dans le trou d'extraction. Une structure externe en fil de fer maintient le filtre en position verticale au-dessus de la boîte. Ce premier long tuyau est raccordé à un diviseur de flux en Y (figure 2C), en polypropylène de 3mm de diamètre interne et 5mm externe (Kartell, 20082 Noviglio, Italie), branché en parallèle à un second ensemble tuyau-filtre-boîte.

À l'autre bout du diviseur en Y est raccordé un tuyau long de 30cm (de même caractéristiques ; figure 2C), finalement connecté à une pompe PAS-500 (Spectrex, Redwood City 94063, USA). J'ai calibré les six pompes utilisées dans l'expérience préparatoire au moyen d'un fluxmètre BFM-10 (Spectrex), sur un débit de $269\text{cm}^3/\text{min} \pm 1,6\%$ (écart maximal). Un tel flux permettrait de pomper le volume d'une boîte de ponte vide en 9,8s, mais est divisé par deux à la sortie du séparateur en Y. Ce débit correspond au flux moyen sur l'amplitude réellement disponible sur les pompes. J'ai assigné à chaque pompe un seul accumulateur 9V 175mAh NiMH (Energizer, 63141 Saint-Louis, USA) complètement chargé, pour le calibrage et toute utilisation ultérieure, afin d'éviter au maximum toute différence d'impact de l'âge des batteries sur le débit.

Après confection, chaque filtre a été passé au four à 150°C pendant 5min, élué avec au moins 1mL d'hexane (suivant les filtres), et la structure extérieure nettoyée par ce même solvant. Les filtres sont conservés dans des flacons en verre propres et scellés (Parafilm®). Avant toute utilisation, un filtre est lavé par $300\mu\text{L}$ de cyclohexane grâce à la seringue décrite précédemment.

d. Analyses chimiques

Lors d'une extraction, les composés volatils, présents dans l'atmosphère des boîtes de ponte, sont pompés et adsorbés par la poudre Porapak SQ. L'élué du filtre permet de récupérer ces composés chimiques dans une solution qualifiée d'éluat. L'élué est réalisé dans les minutes qui suivent l'extraction par $50\mu\text{L}$ de cyclohexane, dans un insert en verre placé dans un flacon d'analyse. Ces éluats sont directement analysés ou, à défaut, stockés à -20°C .

L'analyse est conduite au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse (GC) Trace GC Ultra, couplé à un spectromètre de masse (MS) Polaris Q (Thermo Electron Corporation, Interscience, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique). L'injection se déroule à 240°C en mode splitless, et la colonne est de type DB-5MS de 30m, 0,25mm de diamètre interne, et $0,25\mu\text{m}$ d'épaisseur de phase stationnaire (polymère phényl-arylène ; Agilent Technologies, 95051 Santa Clara, USA). Le gaz porteur est l'hélium dont le flux est fixé à $1,2\text{mL}/\text{min}$. La fenêtre d'analyse des ions couvre les rapports m/z de 20 à 500. Le four du GC est programmé de la façon suivante : de 50°C à 110°C à la vitesse de $3^\circ\text{C}/\text{min}$, de 110°C à 320°C à $15^\circ\text{C}/\text{min}$, et finalement le maintien des 320°C pendant 3min. La détection du MS débute à 4min, après le passage du solvant. La source du MS est chauffée à 250°C , tandis que la ligne de transfert est

à 310°C. Ces paramètres correspondent à ceux utilisés par Meurisse (2008) et Godefroid (2008) pour optimiser la séparation des terpénoïdes.

Le chromatogramme obtenu en sortie de l'analyse est traité par le logiciel XCalibur 1.4 SR1 (Thermo Electron Corporation). Il permet l'identification sur base du spectre de masse, et la quantification par l'intégration des pics correspondant aux composés. J'ai opté pour les paramètres d'intégration par défaut du programme durant l'expérience préparatoire. Les données relatives aux surfaces attribuées aux composés sont ensuite importées dans Excel 2010 (Microsoft, 98052 Redmond, USA). Dans l'expérience préparatoire, seuls les pics d'aire relative supérieure à 1% du plus grand pic sont pris en compte, dans le but d'éviter le bruit de fond et les contaminants.

Des injections de références de synthèse (Sigma-Aldrich, 2880 Bornem, Belgique ; pureté supérieure à 80% ; tableau 1), diluées au pentane, m'ont permis de créer une base de données reprenant leurs temps de rétention et spectre de masse. Ces références sont essentiellement des monoterpènes, monoterpènes oxygénés et autres terpénoïdes sélectionnés par Meurisse (2008) dans la littérature scientifique (Baisier *et al.*, 1988 ; Baisier, 1990 ; Grégoire *et al.*, 1991 ; Grégoire, non publié (1998)). Les composés des échantillons sont identifiés par comparaison avec le temps de rétention et le spectre de ces références. D'autres composés sont identifiés uniquement sur base de leur spectre de masse, au moyen des bibliothèques de références du logiciel MS Search 2.0 (NIST, 20877 Gaithersburg, USA).

Composés de référence pour GC-MS (classés par poids moléculaire)		
Composés	Formule brute	Poids moléculaire
1,3-butanediol	C ₄ H ₁₀ O ₂	90
3-hydroxy-3-méthyl-2-butanone	C ₅ H ₁₀ O ₂	102
3-carène	C ₁₀ H ₁₆	136
α-pinène	C ₁₀ H ₁₆	136
α-terpinène	C ₁₀ H ₁₆	136
β-pinène	C ₁₀ H ₁₆	136
camphène	C ₁₀ H ₁₆	136
γ-terpinène	C ₁₀ H ₁₆	136
limonène	C ₁₀ H ₁₆	136
myrcène	C ₁₀ H ₁₆	136
p-cymène	C ₁₀ H ₁₆	136
[terpinolène]	C ₁₀ H ₁₆	136
[pityol]	C ₈ H ₁₆ O ₂	144
myrténal	C ₁₀ H ₁₄ O	150
[périllaldéhyde]	C ₁₀ H ₁₄ O	150
verbénone	C ₁₀ H ₁₄ O	150
[amitinol]	C ₁₀ H ₁₆ O	152
camphre	C ₁₀ H ₁₆ O	152
fenchone	C ₁₀ H ₁₆ O	152
[isopinocampone]	C ₁₀ H ₁₆ O	152
[trans-pinocarvéol]	C ₁₀ H ₁₆ O	152
verbénol	C ₁₀ H ₁₆ O	152
α-terpinéol	C ₁₀ H ₁₈ O	154
bornéol	C ₁₀ H ₁₈ O	154
fenchol	C ₁₀ H ₁₈ O	154
isobornéol	C ₁₀ H ₁₈ O	154
myrtanol	C ₁₀ H ₁₈ O	154
terpinène-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154
farnésol	C ₁₅ H ₂₆ O	222

Tableau 1. Références de synthèse pour les injections au GC-MS : calcul de leur temps de rétention et spectre de masse. Les composés entre crochets n'ont pas été injectés dans cette étude, leur temps de rétention est estimé par la loi parabolique établie sur les références communes avec Meurisse (2008).

Certaines références, utilisées par Meurisse (2008) et Godefroid (2008), sont depuis devenues indisponibles (tableau 1). Par manque de temps, aucune nouvelle injection n'a pu être conduite pour ces composés. Néanmoins, leur spectre de masse reste connu à partir des bibliothèques de spectres de référence de ces auteurs. Afin de faciliter leur identification, j'ai prédit leur temps de rétention dans les nouvelles conditions de fonctionnement du GC-MS. J'ai établi une courbe prédictive basée sur la comparaison des temps de rétention actuels avec ceux de Meurisse (2008) pour des références communes (figure 3). Cette courbe, de type parabolique (équation $y = -0,0198x^2 + 0,2789x + 1,459$, coefficient de détermination $R^2 = 0,9826$), est le résultat d'une régression polynomiale d'ordre 2 effectuée dans Excel. La vérification

des temps de rétention prédits, pour les références communes, montre une précision correcte jusqu'au dixième de minute. Seuls 2 composés (*cis*-myrtonol, (-)-périllaldéhyde) présentent une plus grande incertitude sur leur temps de rétention, nécessitant une extrapolation de la courbe.

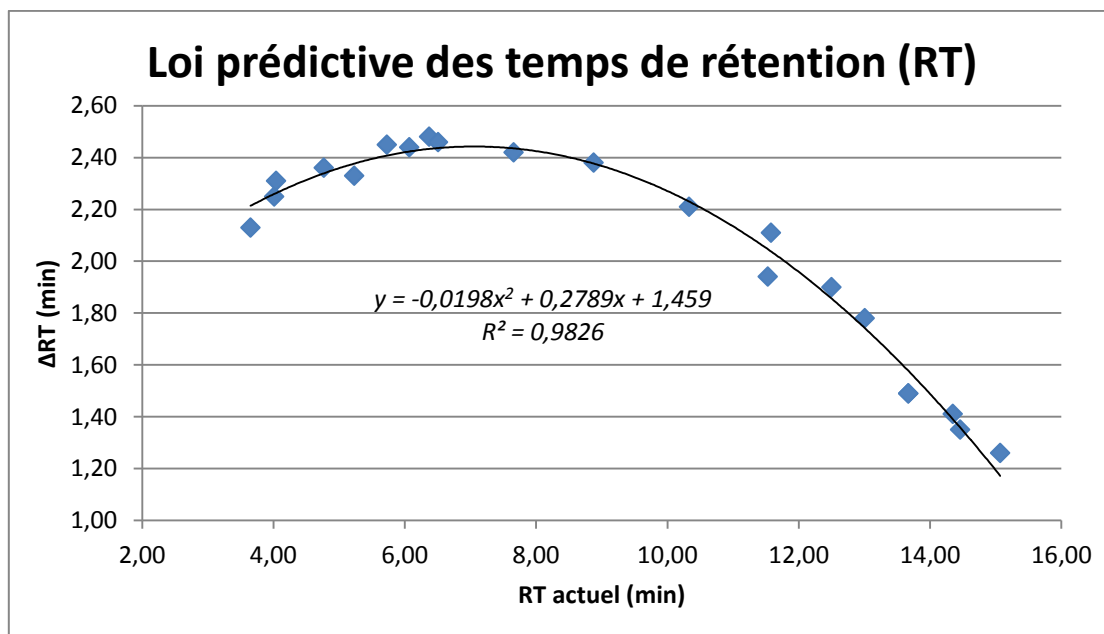


Figure 3. Différence (ΔRT) entre le temps de rétention selon Meurisse (2008) et le RT actuel, en fonction du RT actuel, pour les références communes. Loi parabolique prédictive : équation et coefficient de détermination.

Afin d'obtenir des mesures quantitatives dans les analyses chimiques de l'expérience principale, j'opte pour l'utilisation d'un étalon interne unique. Cela consiste en l'addition d'un volume connu de solution étalon dans chacun des éluats analysés. On peut de la sorte calculer la masse des composés en comparant la surface de leur pic à celle de l'étalon. Cependant, cette méthode n'est valide que si la nature de l'étalon est proche de celle des analytes, afin d'obtenir une réponse identique au GC-MS. L'usage d'un étalon interne a l'avantage de ne pas interférer avec le matériel biologique étudié, et d'être relativement simple à réaliser. La méthode est toutefois moins précise qu'un étalon interne multiple, nécessitant l'ajout de nombreuses molécules couvrant différents domaines de propriétés physico-chimiques, ou l'étalonnage externe, lorsqu'une courbe de réponse est établie pour chaque composé analysé ; méthodes beaucoup plus lourdes logistiquement aussi.

Par conséquent, j'entreprends des essais avec les composés de synthèse. Il s'agit de créer des mélanges de références de façon à éviter un recouvrement des pics de l'étalon et des composés d'intérêt, afin d'obtenir des surfaces clairement définies, tout en conservant des propriétés physico-chimiques proches (ce qui a tendance à rapprocher les pics). Bien sûr,

aucun composé d'intérêt potentiellement présent dans les échantillons analysés ne peut être utilisé, car la droite d'étalonnage serait faussée et ledit composé passerait inaperçu. J'éviterai donc soigneusement les molécules détectées lors de l'expérience préparatoire et dans les manipulations de Meurisse (2008) et Godefroid (2008).

Certains des mélanges de références sont extraits par la même méthode headspace qu'utilisée pour les tests *in vivo*, afin d'optimiser le pompage (débit et durée d'extraction) et l'analyse chimique des extraits (intensité des chromatogrammes, séparation des composés). Notons tout de même deux différences de méthodologie pour ces tests chimiques. D'abord, les mélanges sont ici injectés sur de la ouate dans les boîtes d'extraction. Deuxièmement, les éluions sont réalisées avec un volume double (100 μ L) de cyclohexane pour garantir la possibilité de réaliser plusieurs analyses. Enfin, une extraction d'une boîte de ponté neuve vide est effectuée pour identifier d'éventuels contaminants.

e. Analyses statistiques

Le seuil de significativité α (erreur de première espèce) est défini à 5% pour l'ensemble des tests statistiques de cette étude, à partir duquel un résultat (valeur p) sera dit « significatif ». Les qualificatifs « très significatif » et « très hautement significatif » sont réservés à des valeurs p respectivement inférieures ou égales à 1% et 1‰. Tous les tests statistiques sont exécutés dans le logiciel R 2.11.1 (Gnu Project, 1142 Auckland, Nouvelle-Zélande).

La survie des *D. valens*, en fonction du temps de pompage, est évaluée au moyen d'une régression linéaire simple (Galton, 1885 et 1886 *in* Dagnelie, 2008). Celle-ci implique un test t de Student (1908) sur la significativité de la pente de la droite de régression, l'hypothèse nulle (H_0) étant : « la pente ne diffère pas de zéro ». Je calcule sur ces mêmes données le coefficient de corrélation de Pearson (1896). Cette statistique descriptive quantifie le lien de proportionnalité entre les deux variables, et a donc l'avantage d'intégrer des informations à la fois sur la pente de la droite de régression et sur la dispersion des points autour de celle-ci. En complément, je procède à une analyse de la variance (ANOVA ; Fisher, 1924 et Snedecor, 1934 *in* Dagnelie, 2008) à un facteur, afin d'évaluer si d'autres facteurs ont affecté différemment chaque série. En effet, l'ANOVA teste l'égalité des moyennes entre traitements, indépendamment de la durée d'extraction en tant que variable quantitative. Son hypothèse nulle est : « les traitements suivent la même loi (distribution) ».

Étant donnée la nature paramétrique du test t de Student, de l'ANOVA (test de Fisher), et du coefficient de Pearson, les données doivent respecter les conditions suivantes : les résidus

suivent une loi normale (gaussienne), leur variance est constante (homoscédasticité), et ils sont indépendants entre eux. Ces conditions sont vérifiées avant toute utilisation des tests. Si la normalité ou l'homoscédasticité n'est pas respectée, les données sont transformées (typiquement une transformation logarithmique) et les conditions d'application sont à nouveau vérifiées. Dans le cas contraire, j'opte pour un test non paramétrique équivalent, alors clairement mentionné dans le texte.

La normalité de la distribution des données est évaluée par un histogramme des fréquences et un graphe quantile-quantile. Cette observation est objectivée par un test de Shapiro (Shapiro et Wilk, 1965), dont l'hypothèse nulle est : « les résidus suivent une distribution normale ». L'homoscédasticité des données est soumise au test de Bartlett (1937) avec l'hypothèse H_0 : « homogénéité des variances des résidus ».

L'échantillonnage aléatoire se rajoute aux conditions précédentes. S'agissant d'une manipulation entièrement réalisée en laboratoire, toutes les boîtes sujettes aux mesures sont échantillonnées. Afin d'éviter tout biais, j'ai procédé à des randomisations pour les tâches suivantes : ajout de l'écorce, des larves *D. valens* et des adultes *R. grandis* dans les boîtes de ponte (mélange des boîtes), attribution des filtres aux boîtes extraites (fonction *alea()* dans Excel), et décompte des *D. valens* et *R. grandis* à l'ouverture des boîtes (mélange).

L'impact de la durée de pompage sur le succès reproducteur des *R. grandis* est estimé au moyen d'une régression linéaire simple, aux test et conditions identiques à celle appliquée sur la survie des *D. valens*, ainsi que d'une ANOVA et du coefficient de corrélation linéaire de Pearson.

Le logiciel XCalibur fournit une mesure de l'intensité des chromatogrammes, qui est proportionnelle à la somme de la surface des pics. Au fil des jours d'extraction, l'évolution de cette intensité est abordée statistiquement. Aucun test paramétrique n'est appliqué car les données s'éloignent fortement d'une distribution normale et de l'homoscédasticité, malgré diverses tentatives de transformation (logarithme, puissance, racine, exponentielle, inverse). J'opte donc pour un test d'égalité des médianes de Kruskal et Wallis (1952), avec l'hypothèse H_0 : « les données appartiennent à la même population ». J'utilise cette fois le coefficient de corrélation de Spearman (1904), statistique descriptive adaptée aux données s'écartant de la normale.

De la même manière, j'analyse l'intensité des chromatogrammes, suivant la série de boîtes (donc indirectement la durée d'extraction), au moyen d'un test de Kruskal-Wallis et de la corrélation de Spearman.

2. RÉSULTATS

a. Observations préliminaires

Selon leur constructeur (Spectrex), les pompes ont une amplitude de pompage de 5 à 200cm³/min. Les mesures montrent des valeurs comprises entre 50 et 500cm³/min (avec accumulateurs, $n=10$). Néanmoins, toutes les pompes ne fournissent pas un débit maximal aussi élevé dans le lot utilisé. J'estime que le débit maximal commun est de 414cm³/min, en tenant compte de l'ensemble des pompes avec une marge de sécurité.

Les accumulateurs 9V des pompes ont une endurance très variable, s'étalant de 240 à 540min à débit moyen (269cm³/min). La cause est certainement l'âge et le nombre de charges précédentes. Les batteries délivrent un flux constant, qui s'effondre en quelques minutes quand elles sont déchargées. Lorsque la pompe est connectée à un filtre, l'endurance chute à 90-180min à puissance maximale (414cm³/min), ce qui conditionne le nombre d'accumulateurs et de chargeurs nécessaires pour l'expérience principale.

Afin d'éviter les déperditions de flux, j'ai procédé à des tests à débit moyen sur deux longueurs de tuyaux en silicone : 8,5 (court) et 30cm (long). Lorsque directement reliés à une pompe, les tuyaux courts donnent un débit 17 à 22% ($n=15$) moins élevé que les longs. L'effet est exacerbé quand on branche deux tuyaux d'un même type à un diviseur en Y (connecté à une pompe via un tuyau long), comme dans l'expérience préparatoire : les courts sont alors 26 à 28% ($n=10$) moins efficaces. Par conséquent, seuls des tuyaux de 30cm sont employés dans les expériences préparatoire et principale.

D'autres essais m'ont permis d'évaluer les pertes liées à l'utilisation de séparateurs de flux (débit moyen). Pour un diviseur en Y (une pompe vers deux extractions), les déperditions sont de 4 à 13% (tuyaux longs, $n=15$), voire 27% (tuyaux courts, $n=5$). Avec trois séparateurs (dont 2 en parallèle, une pompe vers quatre extractions), on atteint 46% de pertes (tuyaux courts, $n=5$). Le choix des tuyaux longs étant clair, et le nombre de pompes limité, j'opte pour l'utilisation d'un diviseur par pompe (vers deux boîtes) dans l'expérience préparatoire.

La connexion d'un filtre à une pompe réduit considérablement le flux. Réglée sur un débit maximal (414cm³/min), une pompe ne délivre plus qu'un flux à hauteur de 10% ($n=10$) de

cette valeur à la sortie du filtre. La résistance offerte par le filtre provoque donc une perte de 90% de l'efficacité de pompage.

b. Succès reproducteur

Le tableau 2 et la figure 4 présentent le nombre moyen de *D. valens* survivants dans chaque série, à l'ouverture des boîtes (jour 21). Sur l'ensemble des traitements, en moyenne 3,27 individus sont récupérés par boîte, soit une survie de 15,6% sur les 21 larves introduites. Les données brutes de survie des *D. valens* montrent un écart significatif à la distribution normale (test de Shapiro : $W=0,867$, $p=0,0015$), bien que l'homoscédasticité soit respectée (test de Bartlett : $K^2_4=2,017$, $p=0,73$). Le coefficient de corrélation de Spearman est de $r=0,011$.

Survie des <i>D. valens</i> et succès reproducteur des <i>R. grandis</i>				
Série	Réplicats	Temps d'extraction (min)	Nombre de <i>D. valens</i>	Nombre de larves <i>R. grandis</i>
1	6	30	4,00 ± 2,77	31,00 ± 20,12
2	6	60	2,17 ± 3,24	34,50 ± 20,04
3	6	90	2,33 ± 2,05	43,67 ± 30,28
4	6	120	4,67 ± 3,86	46,00 ± 18,61
5	6	0	3,17 ± 2,61	49,17 ± 18,17
Toutes	30	variable	3,27 ± 3,12	40,87 ± 22,98

Tableau 2. Survie des *D. valens* (nombre d'individus, tous stades) et succès reproducteur des *R. grandis* (nombre de larves) dans les différentes séries, moyenne ± écart-type, au jour 21 de l'expérience préparatoire.

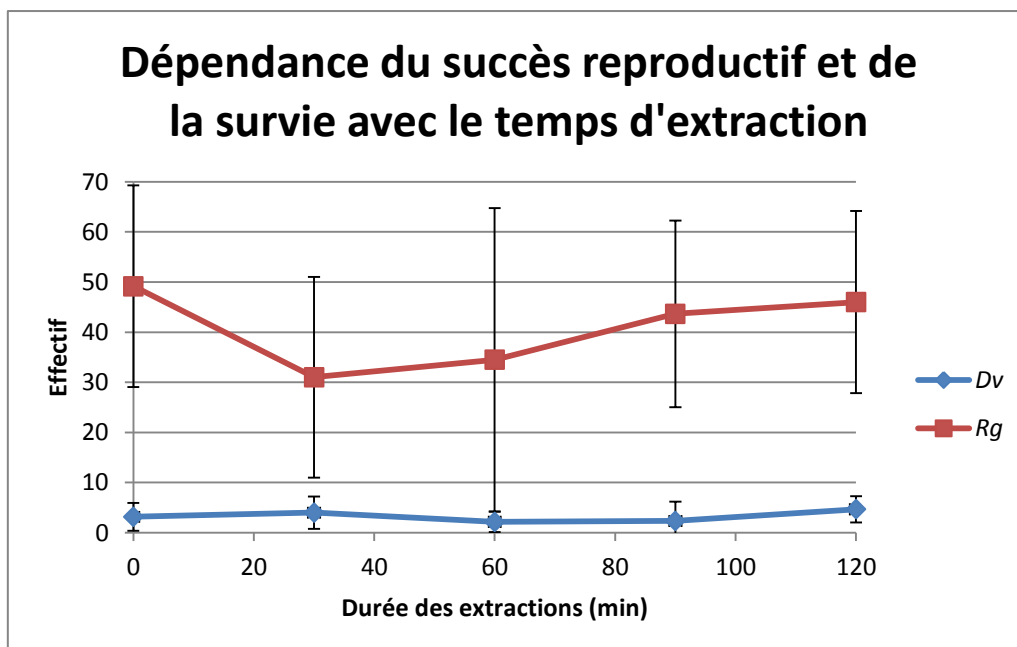


Figure 4. Succès reproducteur des *R. grandis* (*Rg*, nombre de larves produites) et survie des *D. valens* (*Dv*, nombre d'individus survivants, tous stades confondus) pour les différents temps d'extraction : moyenne et écart-type.

La transformation logarithmique de ces données améliore grandement leur distribution ($y = \log(x + 1)$) ; test de Shapiro : $W=0,946$, $p=0,14$; test de Bartlett : $K^2_4=2,118$, $p=0,71$). Ceci autorise le recours à la régression linéaire simple, qui ne décèle aucune corrélation de la survie des *D. valens* en fonction de la durée d'extraction (test de Student : $t_{28}=0,182$, $n=30$, $p=0,86$). La corrélation de Pearson s'élève à $r=0,034$. L'ANOVA ne trouve pas de différence entre les cinq traitements (test de Fisher : $F_{4; 25}=1,170$, $n_i=6$, $p=0,35$).

Le nombre moyen de larves de *R. grandis* produites dans chaque série sont présentés dans le tableau 2 et la figure 4, avec une moyenne de 40,9 larves par couple sur l'ensemble des traitements. Aucune transformation des données n'est nécessaire pour le succès reproducteur des *R. grandis* (test de Shapiro : $W=0,964$, $p=0,38$; test de Bartlett : $K^2_4=1,859$, $p=0,76$). La régression linéaire ne décèle pas de corrélation avec la durée d'extraction (test de Student : $t_{28}=0,206$, $n=30$, $p=0,84$). Le coefficient de corrélation de Pearson est de $r=0,039$. Le résultat de l'ANOVA n'est pas significatif (test de Fisher : $F_{4; 25}=0,628$, $n_i=6$, $p=0,65$).

c. Analyses chimiques

L'analyse des chromatogrammes, dans leur ensemble, révèle qu'il n'y a pas de lien entre la surface d'un pic et sa pertinence biologique : des pics inférieurs au seuil d'analyse (défini à 1%) peuvent correspondre à des composés d'intérêt, alors que certains pics très importants sont en réalité des contaminants (à l'instar des siloxanes dérivant de la colonne de chromatographie).

L'intensité des chromatogrammes, parmi les six jours d'extraction, est analysée au moyen d'un test non paramétrique d'égalité des médianes (les résidus d'une régression s'éloignant de la normale et de l'homoscédasticité ; test de Shapiro : $W=0,9608$, $p=4,2E-4$; test de Bartlett : $K^2_5=211,365$, $p<2,2E-16$). Celui-ci révèle une différence significative dans les données (test de Kruskal-Wallis : $\chi^2_5=74,648$, $n_i=24$, $p=1,1E-14$). Je procède par conséquent à un test *post-hoc* de comparaisons multiples après Kruskal-Wallis (Siegel et Castellan, 1988) afin d'identifier les différences au fil des jours. Le tableau 3 reprend l'ensemble des résultats. Remarquons le dernier jour (jour 18) qui diffère de tous les autres. La corrélation de Spearman est négative avec $r=-0,67$.

Comparaisons multiples après Kruskal-Wallis : intensité au fil des jours			
Paires de jours	Différence	Seuil	Significativité
1-4	42,52	35,10	p<0,05
1-7	30,47	35,48	NS
1-11	51,81	35,10	p<0,05
1-14	59,15	35,10	p<0,05
1-18	98,73	35,10	p<0,05
4-7	12,05	35,48	NS
4-11	9,29	35,10	NS
4-14	16,63	35,10	NS
4-18	56,21	35,10	p<0,05
7-11	21,34	35,48	NS
7-14	28,68	35,48	NS
7-18	68,26	35,48	p<0,05
11-14	7,33	35,10	NS
11-18	46,92	35,10	p<0,05
14-18	39,58	35,10	p<0,05

Tableau 3. Résultats du test *post-hoc* de comparaisons multiples après Kruskal-Wallis sur l'intensité des chromatogrammes au fil des jours de l'expérience préparatoire. (NS) non significatif.

Le même test (la distribution s'éloignant d'une gaussienne ; test de Shapiro : $W=0,872$, $p=8,7E-10$; test de Bartlett : $K^2_3=15,319$, $p=0,0016$) sur l'intensité des chromatogrammes, mais cette fois appliqué suivant la série de boîtes, ne décèle aucune différence (test de Kruskal-Wallis : $\chi^2_3=0,357$, $n_i=36$, $p=0,95$). Le coefficient de corrélation de Spearman est de $r=0,038$.

En ce qui concerne la dépendance entre l'intensité des chromatogrammes et la quantité de poudre Porapak SQ, la corrélation de Spearman s'élève à $r=0,10$.

Lors de l'extraction de la boîte de ponte neuve, l'analyse au GCMS n'a révélé aucun pic. Par conséquent, ces boîtes semblent idéales pour les extractions headspace puisqu'elles ne dégagent (à vide) aucun contaminant volatil.

L'extraction des mélanges de références m'a permis d'optimiser l'intensité des chromatogrammes en fonction du débit des pompes et de la quantité de composés extraits. J'ai ainsi défini une « extraction optimale » de $132\text{mg}\cdot\text{cm}^3$ pour des composés volatils, bien que cela varie d'un analyte à l'autre. Cette quantité correspond à un débit de pompage appliqué pendant une certaine durée sur une boîte contenant une masse donnée de chaque composé (sur de la ouate). Afin d'obtenir un chromatogramme avec de grands pics non saturés, il convient par exemple d'extraire durant 64min, au moyen d'une pompe réglée sur $414\text{cm}^3/\text{min}$, des composés présents à hauteur de $5\mu\text{g}$ ($64\cdot 414\cdot 5\approx 132.000\mu\text{g}\cdot\text{cm}^3=132\text{mg}\cdot\text{cm}^3$).

Les chromatogrammes obtenus lors des tests *in vivo* montrent de grands pics non saturés (sauf en fin d'expérience, voir plus haut) se rapprochant des « mesures optimales ». En comparant durée et débit de pompage avec ceux obtenus lors des essais chimiques, une règle de proportionnalité directe permet d'estimer que les composés majoritaires extraits sont présents à hauteur de 10µg (ordre de grandeur) dans les boîtes de ponte, en tenant compte que le volume d'élution est de 50µL dans les tests *in vivo* contre 100µL lors des essais chimiques (les analytes sont deux fois plus concentrés).

À la suite des tests *in vivo*, j'ai sélectionné une série de candidats étalons parmi les références à disposition. Ceux-ci, absents des chromatogrammes, présentent néanmoins des défauts qui les écartent du rôle d'étalon : molécule d'intérêt trouvée par Meurisse (2008 ; *trans*-myrtanol, verbénone), proximité de temps de rétention avec un autre composé (3-hydroxy-3-méthyl-2-butanone), propriétés physico-chimiques très différentes (polarité, volatilité ; 1,3-butanediol, farnésol), ou molécule innovante par rapport à Meurisse (2008) et Godefroid (2008) (3-hydroxy-3-méthyl-2-butanone). J'ai donc entrepris des recherches sur des composés proches chimiquement, et qui respectent l'ensemble de ces conditions. J'ai finalement trouvé un bon candidat dans le monoterpène oxygéné (*S*)-ipsdiénol (C₁₀H₁₆O ; pas de recouvrement des pics avec les références, surface clairement définie, propriétés physico-chimiques proches).

Bien qu'une variabilité existe étant données les légères différences de longueur des filtres, le volume mort, stagnant dans le capillaire, est d'environ 10µL. Pour un volume d'élution de 100µL (cyclohexane), on obtient donc un éluat de 90µL, auquel il convient d'ajouter l'étalon interne. L'addition de 10µL de solution de (*S*)-ipsdiénol à 1g/L (dilué au pentane) permet d'obtenir un pic de surface intermédiaire, parmi les références extraites en condition « d'extraction optimale », qui correspond à une masse de 10µg dans l'éluat. Ces paramètres seront utilisés dans l'expérience principale.

Par ailleurs, au moyen des pics du chromatogramme de cette dernière extraction, j'ai établi (tableau 4) la surface des références (pour une certaine masse extraite), en fonction de celle de l'étalon interne (de masse connue dans l'éluat). Le rapport de la surface de chaque référence à l'étalon me donne une information sur le taux de recouvrement de la molécule dans le filtre, par rapport à sa quantité réelle dans la boîte (en d'autres termes, la sensibilité de la méthode Porapak à ce composé). J'ai appelé ce rapport « corrélation de surface », qui est donc défini par l'expression $\gamma = \frac{\text{surface d'étalon} / \mu\text{g dans l'éluat}}{\text{surface de composé} / \mu\text{g extrait}}$. Ce coefficient γ est spécifique à chaque composé et n'est calculé que pour les références disponibles lors de l'expérience préparatoire.

Corrélation de surface des composés de référence avec l'étalon interne (classés par poids moléculaire)

Composés	Surface (uds)	Masse extraite (µg)	Surface (uds)/µg extrait ^(a)	$\gamma = b/a$
3-hydroxy-3-méthyl-2-butanone	2,80E+09	500	5,60E+06	19,83
(-)-β-pinène	2,80E+09	5	5,60E+08	0,20
(+)-3-carène	1,55E+09	5	3,10E+08	0,36
(+/-)-camphène	2,09E+09	10	2,09E+08	0,53
(+/-)-α-pinène	1,66E+09	5	3,33E+08	0,33
(S)-(-)-limonène	1,31E+09	5	2,62E+08	0,42
myrcène	7,42E+08	5	1,48E+08	0,75
p-cymène	5,35E+08	5	1,07E+08	1,04
α-terpinène	7,43E+08	5	1,49E+08	0,75
γ-terpinène	4,58E+08	5	9,15E+07	1,21
(-)-myrténal	1,18E+09	15	7,88E+07	1,41
(1S)-(-)-verbénone	4,76E+08	15	3,18E+07	3,49
(-)-fenchone	5,61E+08	5	1,12E+08	0,99
camphre	1,06E+09	15	7,06E+07	1,57
cis-verbénol	1,06E+09	15	7,06E+07	1,57
(+/-)-terpinène-4-ol	1,68E+09	30	5,59E+07	1,98
endo(-)-bornéol	8,48E+08	15	5,65E+07	1,96
(+)-fenchol	1,15E+09	15	7,69E+07	1,44
(+/-)-isobornéol	1,33E+09	15	8,85E+07	1,25
(+/-)-α-terpinéol	5,61E+06	5	1,12E+06	98,84
(-)-trans-myrtanol	1,30E+08	15	8,67E+06	12,80
(S)-ipsdiénol (étalon interne)	1,11E+09	10 (éluat)	1,11E+08 ^(b)	1,00

Tableau 4. Surface (exprimée en unités de surface, uds) des pics dans le chromatogramme et masse des composés de référence lors de l'extraction avec l'étalon interne ((S)-ipsdiénol). Corrélation de surface (γ) des références avec l'étalon interne. Le ou les isomères (séparés par des « / ») analysés sont précisés. Deux références ne figurent pas dans le tableau dans l'impossibilité de calculer leur corrélation de surface : 1,3-butanediol et farnésol, étant donné leur caractère respectivement polaire (non miscible au mélange) et non volatil (non extrait).

Appliqué aux données quantitatives en sortie de chromatogramme, la « corrélation de surface » me permet de corriger cette première analyse qui considère la nature de l'étalon et de tous les analytes comme identique. Cette généralisation est clairement abusive : le coefficient γ prend des valeurs qui s'étendent de 0,20 à 100 parmi les références (tableau 4), et j'ai effectivement dû employer des concentrations très différentes (facteur 100) lors des injections pour obtenir des pics de surface comparable entre composés. L'algorithme présenté ici, à mes yeux, améliore la méthode de base de l'étalon interne unique, et se rapproche du traitement sélectif des composés propre à l'étalonnage interne multiple. Notons que pour les composés ne figurant pas dans la liste des références, le calcul n'étant pas possible, je fixe $\gamma=1$ (soit une réponse identique à l'étalon).

3. DISCUSSION

Avant tout, l'expérience préparatoire démontre que le flux d'air, impliqué par la méthode Porapak en headspace, n'affecte ni la survie des *D. valens*, ni le succès reproducteur des *R. grandis*. Je peux donc conserver ce dispositif expérimental pour l'expérience principale.

Je décide d'utiliser une autre méthode de traitement des chromatogrammes pour l'expérience principale. Je définis une hauteur minimale de pic deux fois supérieure au niveau de bruit de fond du chromatogramme, au lieu d'utiliser un seuil de rejet à 1% du plus grand pic. Chaque pic est ensuite identifié par les méthodes présentées dans le protocole, afin de discriminer les contaminants des molécules d'intérêt. Cette nouvelle approche, qualitative, a le double avantage de traiter équitablement tous les chromatogrammes, indépendamment d'un composé majoritaire qui pouvait biaiser l'analyse des autres composés.

Les chromatogrammes des tests *in vivo* montrent (en fin d'analyse) de forts taux de contamination aux siloxanes, influençant beaucoup leur intensité. Ceci explique, au moins en partie, que les tests statistiques ne décèlent pas d'effet de la durée de pompage. Il ne s'agit pas d'une conséquence de la saturation des filtres car d'une part on n'obtient pas de « front peaks » (pics penchés caractéristiques, observés lors d'extractions beaucoup plus concentrées) au GC-MS, et d'autre part il n'y a pas de dépendance stricte de l'intensité des chromatogrammes en fonction de la quantité de Porapak SQ.

Au vu du test de Kruskal-Wallis, il n'y a pas de tendance claire dans l'évolution des intensités au fil de l'expérience préparatoire, bien qu'au dernier jour d'extraction correspondent des chromatogrammes moins intenses. Il est probable qu'il existe une diminution progressive des composés les plus volatils dans les boîtes ; la corrélation de Spearman aborde en tout cas dans ce sens. En effet, on assiste vraisemblablement à une baisse d'activité des larves *D. valens*, liée à la nymphose et à la prédation par *R. grandis*, ajoutée à la raréfaction de composés de l'écorce (liée à son vieillissement). Une telle diminution avait été observée dans les expériences de Meurisse (2008) pour les monoterpènes, qui sont les terpénoïdes les plus légers dans les boîtes de ponte.

À la lecture des résultats sur la survie des *D. valens*, particulièrement faible (et variable), je conclus que je devrai utiliser un nombre de proies supérieur aux 21 larves insérées dans chaque boîte de l'expérience préparatoire (la disponibilité en *D. valens* était alors limitée). Qui plus est, les larves de dendroctones introduites seront plus précoces, afin d'éviter la baisse

d'activité liée à la proximité de la nymphose. Ceci permettra d'écarter un facteur de diminution des stimuli de ponte pour *R. grandis*, dans l'expérience principale.

Des mesures quantitatives imposent de réduire au maximum les sources d'erreur et la variabilité entre réplicats. Le choix de longs tuyaux (en silicone) a permis d'augmenter l'efficacité de pompage. D'autre part, nous avons vu que les diviseurs de flux en Y sont source de pertes, mais aussi de variabilité. Je décide donc de ne plus les employer pour l'expérience principale ; les filtres seront individuellement connectés aux pompes.

Les estimations montrent que la masse des composés majoritaires dans les boîtes des tests *in vivo* est de l'ordre de 5µg, en tenant compte de la différence de volume d'élution. En conditions « d'extraction optimale », cela revient à extraire chaque boîte durant 64min à 414cm³/min, sans séparateur de flux et avec un volume d'élution de 100µL. Il s'agisse d'un débit plus élevé que dans l'expérience préparatoire (269cm³/min avec diviseur de flux), mais le temps d'extraction est quant à lui intermédiaire. Bien que la règle de « l'extraction optimale » ne reproduise probablement pas exactement la cinétique de capture des composés volatils, y recourir permet d'améliorer les paramètres de pompage en vue de l'expérience principale. J'utiliserai donc ces paramètres afin d'optimiser l'intensité des chromatogrammes, tout en garantissant la possibilité d'analyser plusieurs fois un même échantillon.

Le (*S*)-ipsdiénol est le meilleur candidat à la fonction d'étalon. Il s'agit d'un composant fréquent de la phéromone d'agrégation des scolytes du genre *Ips* (Zhang *et al.*, 2008). Il a été montré que les mâles de certains dendroctones (*D. brevicomis*, *D. frontalis*, *D. ponderosae*) étaient capables de produire de l'ipsdiénol en présence de myrcène (Seybold et Vanderwel, 2003). Tømmerås *et al.* (1984) avaient observé (« single-cell recording ») la réaction des antennes de femelle *D. micans* à ce composé. Plus récemment, Zhang *et al.* (2008) ont aussi détecté (GC-EAD) une réponse des antennes de *D. valens*. Mais on n'a jamais pu préciser sa possible implication dans une communication phéromonale, ou allomonale avec des *Ips* spp. vivant en sympatrie (en Europe ou en Amérique du Nord), que ce soit pour *D. micans* ou *D. valens*.

Néanmoins, une production d'ipsdiénol n'a jamais été observée chez *D. valens* ni chez *D. micans* (Grégoire *et al.*, 1991 ; Meurisse, 2008 ; Godefroid, 2008). De plus, mes tests *in vivo* ne font intervenir que des larves de scolytes et jamais des adultes, seuls à avoir montré une production chez certains dendroctones (espèces précitées). Par conséquent, l'utilisation de cette molécule comme étalon interne ne semble pas poser de problème au point de vue de l'indépendance des pics des chromatogrammes. Et le fait que l'ipsdiénol dérive lui-même des monoterpènes de l'arbre hôte (monoterpène oxygéné ; Blomquist et Vogt, 2003) le rapproche d'autant plus de la nature des composés analysés dans cette étude, ce qui contribue à la validité de cet étalon.

Chapitre IV – EXPÉRIENCE PRINCIPALE

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Étant données les similitudes avec l'expérience préparatoire, je détaillerai principalement les spécificités de l'expérience principale et les différences de *modus operandi*. Les convergences seront quant à elles brièvement rappelées.

a. Insectes expérimentaux

Les *D. micans* sont des larves sauvages, prélevées à Merdrignac (Côtes d'Armor, Bretagne, France) en juillet 2011, et directement utilisées dans l'expérience. Les proies exotiques, *D. valens*, sont issues d'un élevage en quarantaine (ULB) de géniteurs récoltés en Chine en 2007. Les *R. grandis* sont des F3 descendant de larves sauvages récoltées en juillet 2010 à Saint-Hernin (Finistère, Bretagne, France).

Les conditions d'élevage des *D. valens* et *R. grandis* sont les mêmes que celles décrites dans le protocole de l'expérience préparatoire. Les *D. micans* sont quant à eux élevés sur rondins d'épicéa commun.

b. Dispositif expérimental

L'expérience porte sur deux lots distincts de boîtes de ponte (telles que décrites dans le chapitre précédent). Un premier lot de cinq séries concerne les analyses chimiques, avec des boîtes de ponte pourvues d'un trou d'extraction. Quatre autres traitements sont regroupés dans un second lot qui se rapporte aux analyses de succès reproducteur et de cinétique de ponte de *R. grandis*. Les boîtes de ce dernier lot ne comportent pas de trou d'extraction. Le tableau 5 présente le contenu des boîtes de chaque série.

Caractéristiques des séries de l'expérience principale				
Lot	Série	Réplicats	Proie	Prédateur
Analyses chimiques	1	5	<i>Dm</i>	-
	2	5	<i>Dm</i>	<i>Rg</i>
	3	10	<i>Dv</i>	-
	4	10	<i>Dv</i>	<i>Rg</i>
	5	5	-	-
Succès reproducteur	1	10	<i>Dv</i>	<i>Rg</i>
	2	10	<i>Dv</i>	<i>Rg</i>
	3	10	<i>Dv</i>	<i>Rg</i>
	4	10	<i>Dv</i>	<i>Rg</i>

Tableau 5. Contenu des boîtes des différentes séries de l'expérience principale. (Dm) *D. micans*, (Dv) *D. valens*, (Rg) *R. grandis*, (-) aucun.

Les cinq séries de boîtes d'extraction sont réalisées dans le but d'identifier les différences dans la chimie des *D. micans* et *D. valens*, en présence ou non du prédateur *R. grandis*. Ces analyses chimiques se feront par comparaison avec la série contrôle qui ne comporte que de l'écorce, sans insecte, où l'on devrait observer une moindre (voire inexistante) production de stimuli de ponte. Les séries avec prédateur devraient montrer une production commune d'inhibiteurs. Les différences entre chaque proie pourraient relever de l'évolution d'une résistance chez *D. micans*.

Dans le lot de boîtes qui se rapporte au succès reproducteur de *R. grandis*, les séries sont différenciées par différentes durées de ponte du prédateur. Effectivement, la ponte de *R. grandis* est interrompue après 7, 11, 14 et 18 jours afin d'établir sa cinétique de ponte sur *D. valens*. Des contraintes logistiques sont à l'origine du nombre réduit de réplicats de certaines séries (tableau 5). Cette même raison explique l'absence de séries entièrement consacrées au succès reproducteur de *R. grandis* sur *D. micans*. Ce dernier sera donc estimé à partir des boîtes d'extraction (détails au paragraphe e).

Le remplissage des boîtes se déroule le 14 juillet 2011 (jour 0). Dans toutes les boîtes sont rajoutés deux disques d'écorce et de la poudre d'écorce réhumidifiée d'épicéa commun, à l'instar de l'expérience préparatoire. L'écorce a été entièrement récoltée sur un arbre vivant de la parcelle située à Wellin, le 12 juillet. Pour rappel, bien que l'épicéa ne constitue pas l'hôte de choix de *D. valens*, son utilisation généralisée permet d'homogénéiser les analyses chimiques et d'avoir une base commune pour comparer le succès reproducteur du prédateur. Je procède à des mesures à la balance de précision (au centième de gramme près ; Sartorius 2443 T0, 37075 Göttingen, Allemagne) de la quantité d'écorce introduite dans chaque boîte. Je contrôle de la sorte l'égalité de la masse des disques et de la poudre entre les différentes séries des deux lots au moyen de tests statistiques (tableau 6). Aucune série ne diffère significativement des autres. Cette vérification permet d'une part une distribution équitable de la ressource des proies, et d'autre part l'homogénéité de l'écorce en tant que producteur de composés volatils et potentiels précurseurs.

Masse d'écorce (poudre et disques) dans les différentes séries						
Lot	Série	n _i	Disques (g)	Test : Kruskal-Wallis	Poudre (g)	Test : ANOVA
Analyses chimiques	1	5	13,44 ± 0,59 ^a	$\chi^2_{8}=3,849$ $p=0,87$	5,97 ± 0,30 ^b	$F_{8;66}=1,511$ $p=0,17$
	2	5	13,36 ± 0,59 ^a		6,44 ± 0,44 ^b	
	3	10	13,67 ± 0,76 ^a		6,01 ± 0,53 ^b	
	4	10	13,48 ± 0,68 ^a		5,66 ± 0,61 ^b	
	5	5	13,80 ± 0,46 ^a		6,10 ± 0,22 ^b	
Succès reproducteur	1	10	13,40 ± 0,63 ^a		5,96 ± 0,36 ^b	
	2	10	13,41 ± 0,90 ^a		6,25 ± 0,40 ^b	
	3	10	13,41 ± 0,50 ^a		6,22 ± 0,60 ^b	
	4	10	13,70 ± 0,58 ^a		6,02 ± 0,46 ^b	
Toutes		75	13,52 ± 0,68	-	6,05 ± 0,52	-

Tableau 6. Masse (grammes) des deux disques d'écorce ensemble et de la poudre d'écorce réhumidifiée, moyenne ± écart-type par boîte parmi les séries de l'expérience principale. La masse des disques ne suivant pas une loi normale (test de Shapiro : $W=0,965$, $p=0,037$; test de Bartlett : $K^2_8=4,412$, $p=0,82$), j'ai procédé à un test non paramétrique d'égalité des médianes (Kruskal-Wallis). La distribution des données concernant la poudre suit bien la normalité (test de Shapiro : $W=0,983$, $p=0,43$; test de Bartlett : $K^2_8=7,699$, $p=0,46$), j'ai donc effectué une ANOVA à un facteur (test de Fisher). Les valeurs accompagnées d'une même lettre (a, b) ne diffèrent pas significativement entre elles. (n_i) Nombre de répétitions.

Suivant le schéma du tableau 5, des proies sont introduites à la même date (jour 0) dans toutes les boîtes, à l'exception de la série contrôle des analyses chimiques. Il s'agit de 26 larves *D. micans* de stades L1-L2 et L3-L4, au prorata de 17 et 9 individus respectivement, ou de 17 larves L1-L2 et 9 L3 de *D. valens*, pour un total de 26 proies également. Le choix de ce nombre de proies repose sur les observations de l'expérience préparatoire et sur le mode opératoire de Meurisse (2008). Dans les boîtes concernées, un couple de prédateurs est ajouté le lendemain (jour 1) afin de permettre l'installation préalable des proies. Les adultes *R. grandis* utilisés sont vigoureux et le sexage a été vérifié trois fois.

Parmi les boîtes désignées pour les analyses de succès reproducteur, j'interromps la ponte de *R. grandis* après 7, 11, 14 et 18 jours, dépendant de la série. Le choix de ces dates repose sur la possible corrélation de la cinétique de ponte (densité en larves prédatrices) avec les mesures chimiques (composés quantifiés). Aucune série n'est arrêtée avant la première semaine car Baisier (1990) avait déterminé que la ponte démarrait après environ cinq jours. L'interruption consiste en le retrait des adultes *R. grandis* des boîtes de ponte. Les extractions chimiques sont réalisées les jours 1, 4, 7, 11, 14 et 18 de l'expérience. Au jour 20, soit le 3 août, la ponte du prédateur est interrompue dans les boîtes d'extraction où il est présent. L'état des prédateurs adultes est noté afin d'estimer leur survie pour chaque traitement.

Une fois les adultes *R. grandis* retirés, je procède à un « écrémage » de leurs larves en disposant tous les deux jours un asticot blessé (*Calliphora vicina*) au sommet des boîtes de ponte, et ce durant 10 jours à l'issue desquels les boîtes sont vidées. L'objectif est de faciliter

la récupération des larves prédatrices, agrégées sur l'asticot, tout en évitant un possible cannibalisme lorsque leurs proies se raréfient. Le délai de 10 jours permet le développement des œufs dont le temps d'incubation moyen est de 7 à 8 jours (Baisier, 1990).

L'écrouissage a pour but d'estimer au mieux le succès reproducteur de *R. grandis* en décomptant le nombre de larves produites à partir des œufs pondus durant un laps de temps déterminé. À la vidange des boîtes, les dendroctones survivants sont aussi comptabilisés (tous stades confondus). Remarquons que, pour les séries interrompues le plus tardivement, j'ai procédé à la vidange plus précocement pour deux raisons. D'une part, la ponte atteint un plateau après une dizaine de jours (Merlin *et al.*, 1984 ; Baisier, 1990). D'autre part, le dernier adulte *R. grandis* femelle vivant a été retiré au jour 11 dans le lot consacré à la cinétique de ponte. En ajoutant dix jours d'incubation pour la quasi-totalité des œufs (plus de 99%, Baisier, 1990), cela amène à la date de vidange des dernières boîtes au jour 22 (5 août).

c. Dispositif de mesure des composés volatils

Le dispositif de pompage des composés volatils est identique à celui de l'expérience préparatoire, à l'exception des éléments qui suivent. Chaque filtre Porapak est directement relié à une pompe via un tuyau long en silicone (figure 5), sans séparateur de flux. Les pompes sont au préalable calibrées au débit de $414\text{cm}^3/\text{min} \pm 3,0\%$ (écart maximal). Ce flux permet l'extraction du volume d'une boîte de ponte en 64,2s, en considérant 10% du débit en raison de la résistance offerte par le filtre. L'extraction dure 60 minutes.

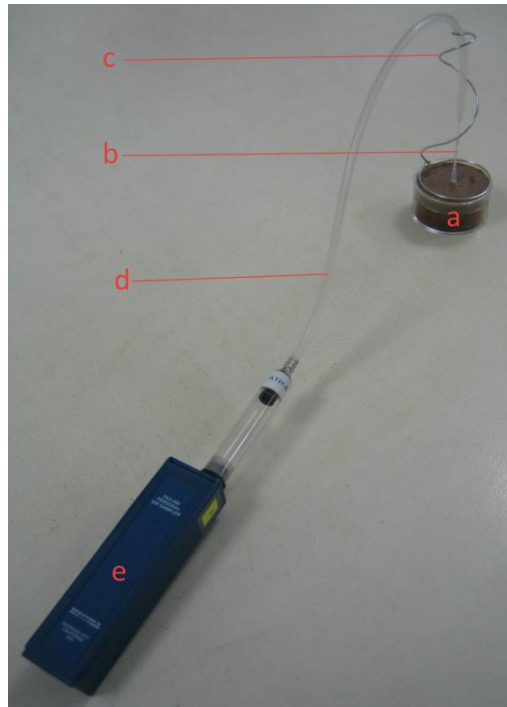


Figure 5. Dispositif de capture des composés volatils en pompage direct (sans diviseur de flux). (a) Boîte de pont d'extraction, (b) filtre Porapak, (c) structure de soutien en fer, (d) tuyau vers pompe, (e) pompe. Trou d'aération non visible (face inférieure de la boîte de pont), joints et raccord présents mais non légendés. Largeur de la pompe : 30mm.

d. Analyses chimiques

Une fois l'extraction terminée, le filtre est élué par 100 μ L de cyclohexane au moyen d'une micro-seringue 710RN 100 μ L de Hamilton. 10 μ L d'étalon 1g/L ((S)-ipsdiénol dilué au pentane) sont ajoutés à l'éluat. Les analyses sont conduites au moyen du même appareillage GC-MS que précédemment. Seul le programme du four du GC diffère : de 50°C à 110°C à la vitesse de 2°C/min, de 110°C à 320°C à 20°C/min, maintien des 320°C pendant 3min. La détection du MS débute à 3,1min, qui s'est expérimentalement avéré correspondre à la fin du passage du solvant. Il s'agit d'une amélioration des paramètres de Meurisse (2008) et Godefroid (2008), avec une meilleure séparation et détection des composés volatils situés dans la gamme des temps de rétention associés aux terpénoïdes. La figure 6 fait la comparaison entre les deux programmations. Après analyse, les éluats sont conservés à -20°C.

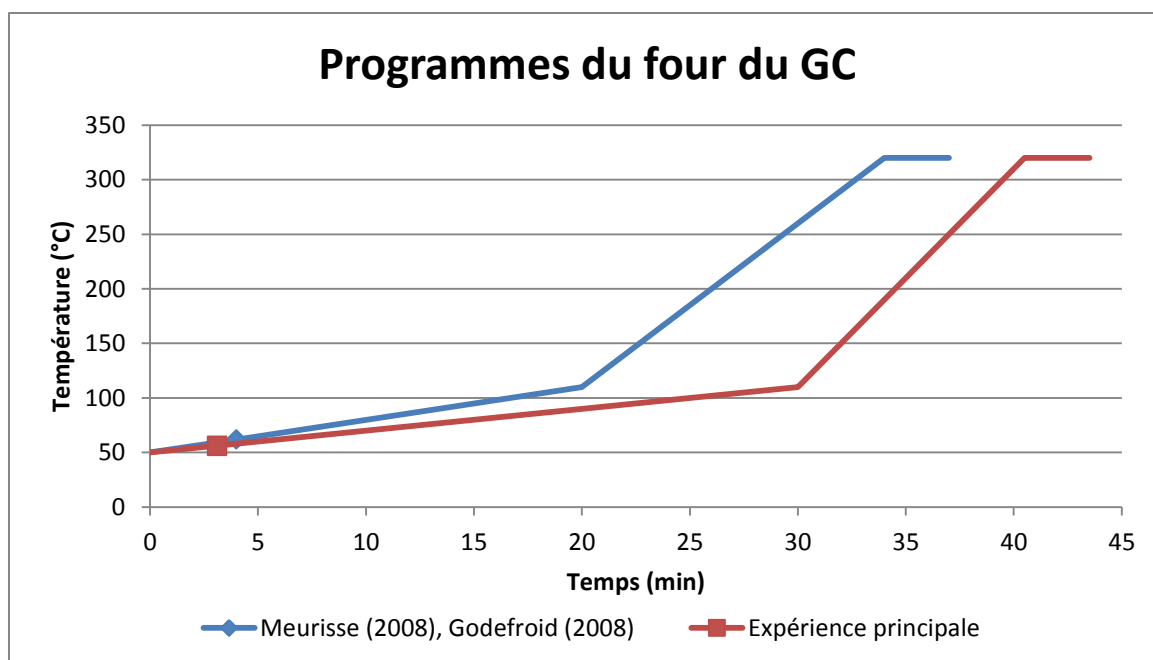


Figure 6. Comparaison des programmations du GC-MS selon Meurisse (2008) et Godefroid (2008), et d'après les paramètres de la présente expérience (principale). La température concerne le four du GC. Le point de chaque courbe indique le début de la détection par le MS.

Les analyses (qualitatives et quantitatives) sont ici effectuées au moyen de la procédure automatique Merlin du logiciel XCalibur, avec des paramètres d'intégration des pics optimisés sur base des chromatogrammes de l'expérience préparatoire. Seuls les pics au moins deux fois plus grands que le bruit de fond sont considérés. L'analyse s'interrompt à 30min de temps de rétention car seuls des contaminants ont été retrouvés au-delà. L'identification des composés est jugée fiable lorsque les indices de correspondance des spectres de masse dépassent 800%. De plus, pour les références, le temps de rétention doit être compris dans une fenêtre d'une demi-minute à gauche et à droite du temps établi dans l'expérience préparatoire. À défaut, le composé est considéré comme différent, son spectre est ajouté à la base de données, et il sera dénommé suivant ses cinq principaux fragments ioniques. Recourir à un traitement automatisé permet d'objectiver les résultats. J'élimine ensuite les éventuels pics contaminants.

Une fois encodées dans une feuille Excel, les données quantitatives sont corrigées par trois traitements successifs. Tout d'abord, d'après le filtre associé à l'extraction, les surfaces des pics sont modifiées suivant une règle de proportionnalité directe en fonction de la longueur de poudre Porapak SQ (surfaces ramenées sur la longueur moyenne de 23mm parmi tous les filtres, ± 1 mm d'imprécision de mesure). Dans un deuxième temps, la surface est convertie en masse dans l'éluat grâce au pic de l'étalon interne. Finalement, la « corrélation de surface »

est appliquée à toutes les références (et considérée comme unitaire pour les autres composés ; tableau 4) afin de calculer la masse présente dans la boîte d'extraction.

e. Analyses statistiques

Les analyses statistiques de ce chapitre sont toujours exécutées dans le logiciel R, et soumises aux mêmes conventions, références et hypothèses que décrites dans le protocole de l'expérience préparatoire. Les éléments nouveaux sont particulièrement détaillés. Je compare en premier lieu le succès reproducteur, la survie et l'impact de la prédation dans les différents traitements. Dans un deuxième temps, j'analyse les résultats relatifs aux composés volatils, pour enfin tenter de les relier à la présence de chaque insecte. En raison d'un écart avec la distribution normale et/ou l'homogénéité des variances, les données sont régulièrement transformées : logarithme des nombres, arc sinus des proportions. Ces cas sont explicitement mentionnés dans le protocole ou les résultats.

Tout d'abord, je compare la survie de *D. valens*, les performances et la survie des *R. grandis* adultes, en situation d'extraction chimique et en absence de pompage. Cette première étape vise à vérifier l'absence d'impact du protocole expérimental entre les deux lots de boîtes, à l'instar de l'expérience préparatoire. Je procède à deux tests *t* de Student afin de comparer d'une part le taux de survie de *D. valens*, et d'autre part le nombre de larves prédatrices produites, entre la série 4 des analyses chimiques et la série 4 du lot sur la cinétique de ponte. Ces deux séries ont en commun leur contenu initial (*D. valens* en présence de *R. grandis*) et le moment d'interruption de la ponte (après 2 semaines et demi), et ne diffèrent que par les mesures chimiques (série « chimie » seulement). Concernant le taux de survie des adultes *R. grandis*, j'aurai systématiquement recours à des tests de permutations (randomisation) pour les raisons évoquées au paragraphe suivant. Ici, je le compare entre les mêmes séries par un test bilatéral de permutations à 10.000 itérations.

En dépit des nombreuses transformations, la distribution du taux de survie des prédateurs adultes s'éloigne toujours d'une gaussienne et ne respecte pas la condition d'homoscédasticité, empêchant l'utilisation de tests paramétriques. De plus, des tests non paramétriques ne sont pas envisageables étant donné le nombre important d'*ex aequo* inter et intra-groupes. Dans cette situation, les tests de permutations sont une bonne alternative car ils permettent de générer la distribution de probabilité sous H_0 , sans condition sur celle des données même, en ré-échantillonnant aléatoirement parmi les observations (Fisher, 1935). Le script utilisé à cette fin dans R est inséré en annexe.

Afin de comparer le succès reproducteur de *R. grandis* sur les deux proies, je procède à un test *t* de Student. Les données visées sont le nombre de larves prédatrices produites dans les séries 2 et 4 du lot d'analyses chimiques, avec respectivement *D. micans* et *D. valens*.

L'impact de la prédation des *R. grandis* sur chaque proie est estimé au moyen d'une ANOVA à deux facteurs (espèce proie et présence du prédateur, avec interaction) sur le taux de survie des larves *D. micans* et *D. valens*, respectivement dans les séries 1-2 et 3-4 soumises aux extractions chimiques. L'analyse se poursuit au moyen d'un test *post-hoc* de comparaisons multiples HSD de Tukey (1953, Tukey's Honest Significant Differences). Une régression linéaire simple quantifie l'effet du nombre de larves prédatrices sur le taux de survie des proies à l'ouverture des boîtes de la série 4 (*D. valens*) associée aux analyses chimiques. Je calcule enfin le coefficient de corrélation de Pearson. La régression n'est pas pratiquée pour *D. micans* (série 2) étant donné la faible variabilité des résultats, le taux de survie ne prenant que deux valeurs différentes parmi les cinq réplicats. Pour la même raison, je ne calcule pas la corrélation non paramétrique de Spearman.

Pour clôturer le premier volet d'analyses, le taux de survie des adultes *R. grandis* est comparé sur chaque proie au moyen d'un test de permutations entre les séries 2 et 4 soumises aux extractions (avec respectivement *D. micans* et *D. valens*). Le test est bilatéral avec 10.000 itérations (script en annexe).

La masse de chaque composé détecté dans les boîtes de ponte est analysée au moyen d'un test de Kruskal-Wallis afin de la relier à chaque série. L'analyse est suivie d'un test *post-hoc* de comparaisons multiples après Kruskal-Wallis. Ces tests sont préférés à une ANOVA étant donnée la différence très significative des données avec la distribution gaussienne et l'homoscédasticité, malgré de nombreuses transformations. Ces résultats seront décrits en parallèle avec la cinétique de ponte, estimée à partir des quatre séries de boîtes sans extraction, afin de les relier à la densité de proies et de prédateurs. Remarquons que seuls les composés apparaissant dans au moins la moitié des réplicats d'une série, lors du même jour d'extraction, sont conservés pour les analyses statistiques.

Je pratique une analyse multivariée sur la masse des composés volatils. Je procède à une analyse en composantes principales (ACP ; Pearson, 1901 ; Hotelling, 1933a, 1933b) qui permet la visualisation des données le long d'axes (composantes) expliquant une certaine proportion de leur variabilité. À cette fin, les données sont préalablement linéarisées (transformation $y = \log(x + 1)$), centrées (moyenne nulle) et réduites (écart-type unitaire).

2. RÉSULTATS

a. Succès reproducteur

Le tableau 7 reprend l'essentiel des résultats relatifs aux moyennes de survie et de succès reproducteur pour *R. grandis*, *D. micans* et *D. valens* dans l'expérience principale. La figure 7 illustre la cinétique de ponte du prédateur sur *D. valens*, en parallèle avec la survie de cette proie au fil des jours (pour rappel, une pénurie en larves de *D. micans* a empêché un suivi équivalent sur le couple *R. grandis*-*D. micans*). J'ai plusieurs commentaires importants à propos de ces chiffres. Premièrement, 11 des 110 adultes *R. grandis* (mâle ou femelle) n'ont pas été retrouvés lors de l'interruption de la ponte (tableau 11 en annexe). Ce fut le cas dans des boîtes (des deux lots) interrompues après au moins deux semaines. Ces adultes sont considérés comme morts pour trois raisons. D'abord, leur survie est quasi nulle dans les séries concernées à partir du 14^{ème} jour. De plus, un cadavre se décompose en quelques jours seulement dans les boîtes de ponte, laissant des éléments sclérifiés plus difficilement détectables que les insectes vivants. Enfin, aucun reste d'adulte *R. grandis* n'a été observé lors de la vidange finale des boîtes.

Survie des proies et succès reproducteur des <i>R. grandis</i>						
Lot	n°	Série	n _i	Jour d'interruption de la ponte	Nombre de larves Rg	Taux de survie des proies
Chimie	1	<i>Dm</i>	5	20	0	77,69% ± 0,03%
	2	<i>DmRg</i>	5	20	45 ± 24,07	1,54% ± 0,03%
	3	<i>Dv</i>	10	20	0	38,46% ± 0,12%
	4	<i>DvRg</i>	10	20	12,7 ± 11,93	11,92% ± 0,1%
	5	<i>contrôle</i>	5	-	0	-
RS	1	<i>DvRg</i>	10	7	7,8 ± 10,77	25% ± 0,15%
	2	<i>DvRg</i>	10	11	17,2 ± 14,88	15,77% ± 0,1%
	3	<i>DvRg</i>	10	14	26,4 ± 18,32	10,38% ± 0,07%
	4	<i>DvRg</i>	10	18	24,2 ± 20,1	11,15% ± 0,13%

Tableau 7. Succès reproducteur de *R. grandis* (Rg ; nombre de larves), et survie des proies (pourcentage sur les 26 larves introduites, tous stades) *D. micans* (Dm) ou *D. valens* (Dv), moyenne ± écart-type, dans chaque série des deux lots de boîtes. (n_i) nombre de répliqués.

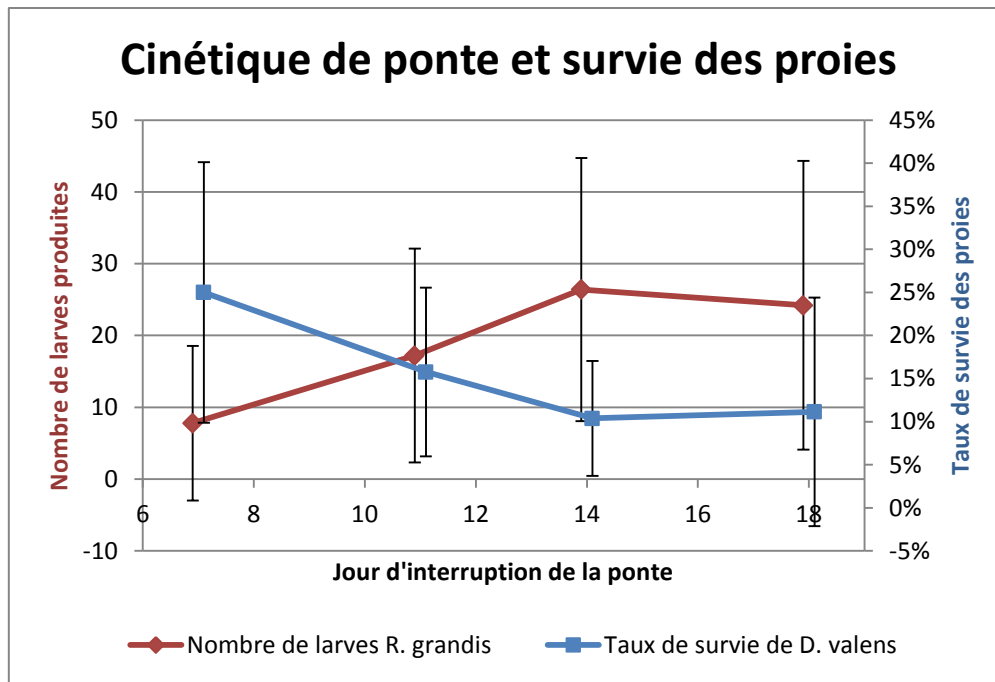


Figure 7. Cinétique de ponte de *R. grandis* (en présence de *D. valens*, nombre de larves écrémées), et survie de *D. valens* (pourcentage des 26 larves introduites, tous stades), au fil des jours d'interruption de la ponte : moyenne \pm écart-type.

La seconde observation vise l'absence d'œuf de prédateur lors de la vidange des boîtes, aux dates d'ouverture respectives. Ceci laisse supposer que tous les œufs avaient terminé leur incubation. En fin d'expérience, aucune larve *D. micans* ou *D. valens* n'avait atteint la nymphose, avec des stades majoritaires L3 à L5, et L3-L4, respectivement. De même, aucune nymphe *R. grandis* n'a été trouvée. Les larves prédatrices avaient une longueur de 2 à 8mm, les plus jeunes larves n'avaient donc que quelques jours. En tenant compte du temps d'incubation, on peut estimer que la ponte s'est poursuivie jusqu'une dizaine de jours avant le terme de l'expérience (jour 22). Ceci conforte les chiffres relatifs à la cinétique de ponte (tableau 7 ; figure 7), où l'on observe le plafonnement de la ponte entre les 11^{ème} et 14^{ème} jours.

Le succès reproducteur de *R. grandis* (test de Student : $t_{17,45} = -1,397$, $n_i = 10$, $p = 0,18$), la survie de *D. valens* (test de Student : $t_{16,826} = 0,347$, $n_i = 10$, $p = 0,73$) et la survie des prédateurs adultes (test de permutations : $\Delta = 0,15$, $n_i = 10$, 10.000 itérations, $p = 0,17$) ne sont pas affectés par le protocole entourant les extractions chimiques. La figure 8a reprend la distribution sous H_0 de la survie des adultes prédateurs (test de permutations, données brutes). J'ai procédé à la transformation des données concernant la survie des *D. valens* ($y = \arcsin(\sqrt[3]{x^2})$) ; test de Shapiro : $W = 0,917$, $p = 0,086$; test de Bartlett : $K^2_1 = 0,617$, $p = 0,43$) et le succès reproducteur du prédateur ($y = \log(x + 1)$) ; test de Shapiro : $W = 0,936$, $p = 0,20$; test de Bartlett :

$K^2_1=0,273$, $p=0,60$) pour qu'elles suivent une distribution gaussienne et respectent l'homoscédasticité.

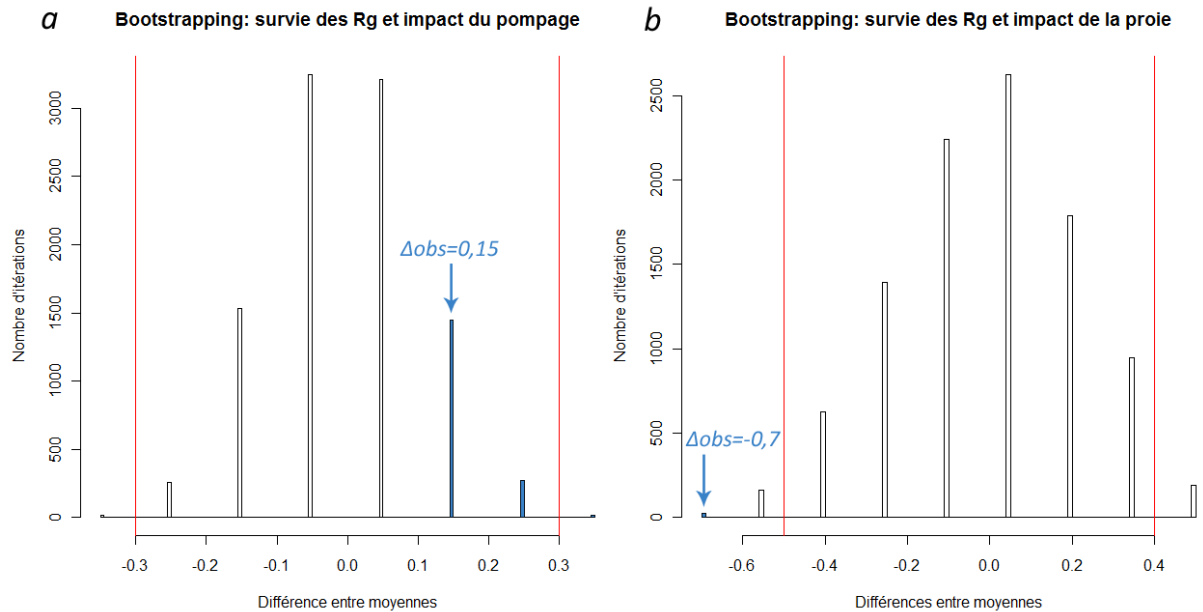


Figure 8. Distributions de probabilité sous l'hypothèse nulle du taux de survie des adultes *R. grandis* (Rg) après permutations (10.000 itérations) en fonction (a) de la présence d'extractions chimiques, (b) de l'espèce proie (*D. micans*/*D. valens*). Chaque barre représente une valeur exacte de différence entre les moyennes des groupes ré-échantillonnés aléatoirement (voir script en annexe pour les détails). Les lignes rouges délimitent le seuil de significativité à gauche et à droite (2,5% en test bilatéral) de la distribution sous H_0 . La différence observée (Δ_{obs}) entre les deux vrais groupes est affichée sur l'histogramme. Les barres colorées en bleu représentent la probabilité cumulée p associée à Δ_{obs} et au rejet de H_0 .

Le succès reproducteur de *R. grandis* est significativement plus élevé en présence de *D. micans* qu'avec *D. valens* (test de Student unilatéral : $t_{12,077}=2,892$, $n_1=5$, $n_2=10$, $p=0,0067$). Les données ont dû être transformées ($y = \log(x + 1)$) ; test de Shapiro : $W=0,921$, $p=0,20$; test de Bartlett : $K^2_1=0,994$, $p=0,32$) pour respecter la condition de normalité et l'homogénéité des variances.

Le tableau 8 détaille les résultats des comparaisons multiples suite à l'ANOVA à deux facteurs sur l'impact du prédateur sur la survie de *D. micans* et *D. valens*. Le « boxplot » (boîtes de dispersion ; figure 9) illustre ces données. Remarquons que toutes les comparaisons diffèrent significativement, à l'exception de la survie de chaque proie en présence du prédateur. Les données ont été transformées ($y = \arcsin(\sqrt[3]{x^2})$) ; test de Shapiro : $W=0,960$, $p=0,32$; test de Bartlett : $K^2_3=7,046$, $p=0,070$) pour appliquer ces tests paramétriques. La survie est différente entre proies (test de Fisher : $F_{1; 26}=6,929$, $n_1= n_2=5$, $n_3= n_4=10$, $p=0,014$) et la présence du prédateur affecte significativement cette survie (test de Fisher : $F_{1; 26}=128,511$, $n_1= n_2=5$, $n_3= n_4=10$, $p=1,5E-11$). Il y a une interaction significative entre

les effets liés d'une part à l'espèce proie, et d'autre part à la présence du prédateur (test de Fisher : $F_{1;26}=38,927$, $n_1=n_2=5$, $n_3=n_4=10$, $p=1,3E-6$).

La régression linéaire simple, exécutée sur les données brutes (test de Shapiro : $W=0,941$, $p=0,57$), ne décèle pas de corrélation entre le nombre de larves prédatrices et le taux de survie de *D. valens* (test de Student : $t_8=-0,340$, $n=10$, $p=0,74$). Le coefficient de Pearson est de $r=-0,12$.

Comparaisons multiples après ANOVA : Survie des proies suivant la présence du prédateur			
Comparaison		Différence	p ajusté
Dm	Dv	-0,453385	7,0E-6
Dm	DmRg	0,9713649	<1E-7
Dv	DvRg	0,3336486	3,4E-5
DmRg	DvRg	0,1843312	0,075
Dm	DvRg	0,7870337	<1E-7
Dv	DmRg	0,5179798	8E-7

Tableau 8. Comparaisons multiples HSD de Tukey, *post-hoc* après ANOVA à 2 facteurs : taux de survie des proies selon l'espèce proie, *D. micans* (Dm) ou *D. valens* (Dv), en présence ou absence des adultes *R. grandis* (Rg).

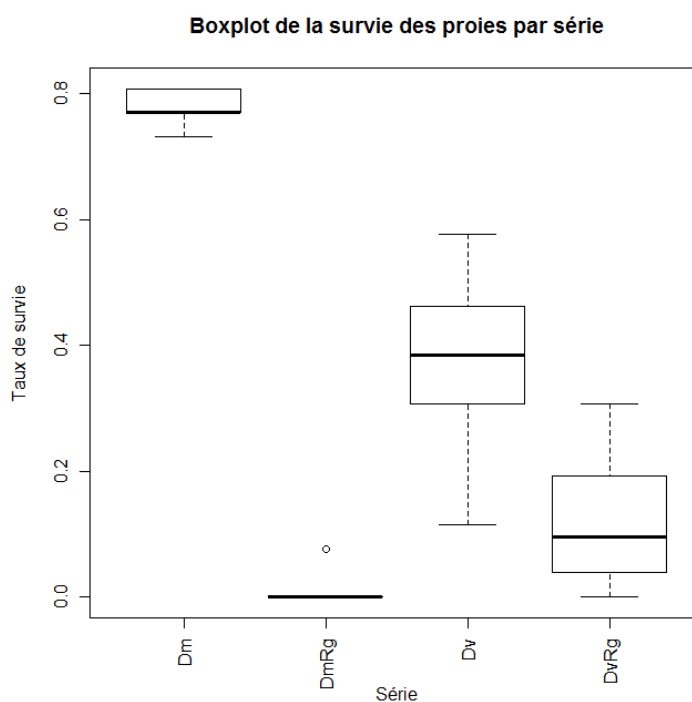


Figure 9. Boîtes de dispersion (boxplot) de la survie des proies, *D. micans* (Dm) et *D. valens*, en présence ou absence du prédateur *R. grandis* (Rg) dans les boîtes du lot soumis aux extractions chimiques. Le résultat des comparaisons multiples est détaillé dans le tableau 8.

Le taux de survie des adultes *R. grandis* est différent suivant l'espèce proie en présence (test de permutations : $\Delta=-0,7$, $n_1=5$, $n_2=10$, 10.000 itérations, $p=0,0023$). Le test a été exécuté sur les données brutes, et la distribution de probabilité sous H_0 est tracée sur la figure 8b.

b. Écologie chimique

La liste des molécules extraites et analysées est présentée dans le tableau 9. La figure 10 illustre un chromatogramme-type. En annexe, les tableaux 12 à 17 reprennent leur masse au fil des jours. Y figurent également les résultats des comparaisons multiples *post-hoc* au test de Kruskal-Wallis sur chaque composé. Il s'agit principalement de monoterpènes et monoterpènes oxygénés. Quelques sesquiterpènes complètent la liste. Les figures 11 à 14 (annexe) illustrent l'évolution des masses pour les composés majoritaires de chaque classe, ainsi que le total pour chaque classe.

Globalement, notons une grande variabilité des mesures qui rend difficile leur interprétation. À l'exception de la série contrôle, la quantité de monoterpènes diminue au fil de l'expérience. Les monoterpènes oxygénés suivent la tendance inverse et augmentent avec le temps. Il n'y a pas de tendance claire concernant les sesquiterpènes : croissance légère en présence du prédateur, importante avec *D. micans* seul, et stagnation ailleurs bien qu'il y ait d'importantes variations dans la série *D. valens*. La quantité totale de terpénoïdes volatils s'amenuise au cours de l'expérience, sauf dans le contrôle.

Les émissions de monoterpènes, et de monoterpènes oxygénés ensuite, semblent supérieures en présence de *D. valens* comparativement à *D. micans*. Elles tendent aussi à être plus élevées en l'absence de prédateur. Les sesquiterpènes apparaissent également en quantité supérieure avec les proies seules. La série contrôle présente le moins d'émissions pour toutes les classes de composés. En début d'expérience, la quantité totale de terpénoïdes semble supérieure dans la série avec *D. valens* seul, mais l'écart se résorbe ensuite.

Composés extraits et analysés (classés par temps de rétention croissant)			
n°	Composé	Formule brute	Poids moléculaire
1	[91+93+77+92+79]	C ₁₀ H ₁₆	136
2	α-pinène	C ₁₀ H ₁₆	136
3	camphène	C ₁₀ H ₁₆	136
4	β-pinène	C ₁₀ H ₁₆	136
5	myrcène	C ₁₀ H ₁₆	136
6	[91+39+77+41+93]	C ₁₀ H ₁₆	136
7	3-carène	C ₁₀ H ₁₆	136
8	p-cymène	C ₁₀ H ₁₆	136
9	limonène	C ₁₀ H ₁₆	136
10	[43+39+79+67+114]	C ₁₀ H ₁₆	136
11	γ-terpinène	C ₁₀ H ₁₆	136
12	[85+41+39+43+55]	C ₁₀ H ₁₆ O	152
13	fenchone	C ₁₀ H ₁₆ O	152
14	fenchol	C ₁₀ H ₁₈ O	154
15	[93+91+77+108+67]	C ₁₀ H ₁₆ O	152
16	[77+39+83+55+79]	C ₁₀ H ₁₆ O	152
17	cis-verbénol	C ₁₀ H ₁₆ O	152
18	camphre	C ₁₀ H ₁₆ O	152
20	[55+39+41+83+95]	C ₁₀ H ₁₆ O	152
21	[53+79+77+107+135]	C ₁₀ H ₁₄ O	150
22	bornéol	C ₁₀ H ₁₈ O	154
23	(isopinocampone (-14,7°))	C ₁₀ H ₁₆ O	152
24	terpinène-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154
25	myrténal	C ₁₀ H ₁₄ O	150
26	[93+95+91+67+121]	C ₁₀ H ₁₈ O	154
27	[119+105+91+79+77]	C ₁₅ H ₂₄	204
28	[105+91+79+119+77]	C ₁₅ H ₂₄	204
29	[91+105+79+161+119]	C ₁₅ H ₂₄	204
19	(S)-ipsdiénol	C ₁₀ H ₁₆ O	152

Tableau 9. Liste des molécules extraites dans les boîtes de l'expérience principale, et utilisées dans le test de Kruskal-Wallis et l'analyse multivariée (ACP). Formule brute et poids moléculaire. Les composés entre parenthèses sont identifiés sur base de leur spectre et de leur temps de rétention prédit par la loi parabolique décrite au point III-1-d. Les composés entre crochets sont identifiés exclusivement sur leur spectre, et dénommés par leurs cinq principaux fragments ioniques (par ordre décroissant d'importance relative). Toutes les autres molécules sont identifiées en fonction de leur spectre et de leur temps de rétention mesuré durant l'expérience préparatoire. Les numéros identifient les composés pour les ACP. Le composé 19 est l'étalon interne et n'est pas repris dans les analyses statistiques. Les composés 1-11 sont représentants de la classe des monoterpènes, 12-26 des monoterpènes oxygénés, et 27-29 des sesquiterpènes.

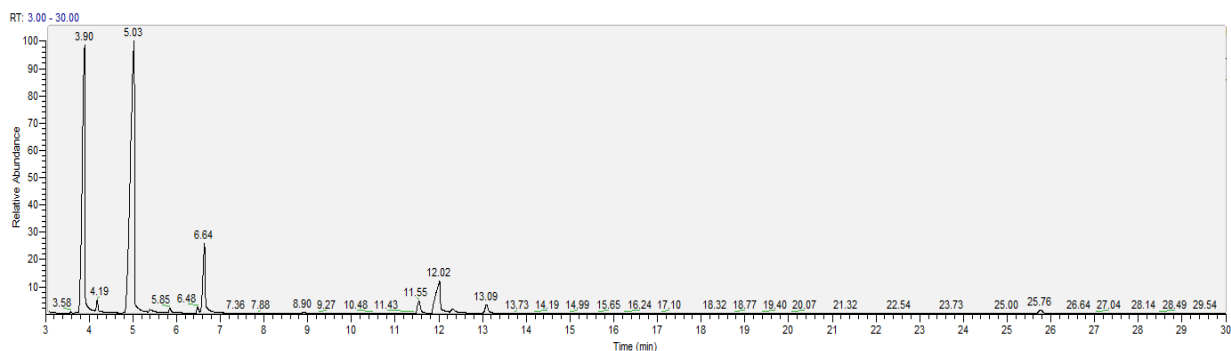


Figure 10. Chromatogramme-type de l'expérience principale (boîte 5, série 3, jour 11). En abscisses : temps de rétention (minutes). En ordonnées : abondance relative (pourcents). Le pic en 12,02min est attribué à l'étalon interne.

Les graphes des objets (« scoreplot ») et graphes des variables (« loadingplot ») avec les trois composantes principales des ACP sont repris en annexe (figures 15 à 20) pour chaque jour d'extraction. Le long de ces composantes, les traitements se séparent d'après le schéma repris dans le tableau 10.

Séparation des traitements suivant les CP des ACP			
Jour	activité	proie	prédateur
1	-	-	1+3
4	1+2	-	-
7	1	1:2	-
11	-	2	1
14	1	2+3	-
18	1:2	2	-

Tableau 10. Composantes principales (CP) qui séparent les traitements dans les loadingplots des ACP au fil des jours d'extraction. Séparation suivant la présence d'activité dans la boîte (série 5 vs. 1 2 3 4), suivant l'espèce proie (1 2 vs. 3 4), ou suivant la présence du prédateur (1 3 vs. 2 4). (-) Pas de séparation, (+) séparation le long de plusieurs composantes indépendamment, (:) séparation le long de plusieurs composantes conjointement.

Sur base de la comparaison visuelle des score- et loadingplots, les composés sont associés à certains traitements. En l'occurrence, le composé 6 ([91+39+77+41+93]) n'est retrouvé que dans les boîtes où des scolytes sont actifs au jour 4, et n'est détecté que dans les boîtes avec *D. valens* à l'extraction suivante (jour 7). Le jour 11, les composés 3 (camphène) et 18 (camphre) sont en quantité supérieure dans les séries avec *D. valens*. Au 14^{ème} jour, les composés 4 (β -pinène), 5 (myrcène) et 9 (limonène) sont plus importants en présence de *D. micans*, alors que la quantité du 18 (camphre) est plus élevée avec *D. valens*. Enfin, les composés 7 (3-carène) et 9 (limonène) sont plus présents dans les séries *D. micans* à la dernière extraction (jour 18). Remarquons que ces différences visuelles ne sont pas appuyées par les comparaisons multiples après Kruskal-Wallis.

Chapitre V - DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'absence de nymphe de proie, d'œuf et de nymphe de prédateur en fin d'expérience signifie que le timing était correct dans l'optique de capturer les composés chimiques intervenant dans la ponte de *R. grandis*. Malgré la vidange précoce des dernières boîtes, tous les œufs du prédateur semblent avoir terminé leur incubation, sur *D. micans* comme sur *D. valens*, en accord avec les observations de Merlin *et al.* (1984) et Baisier (1990) quant au plafonnement de la ponte après une dizaine de jours d'une part, et au temps d'incubation de la quasi-totalité des œufs d'autre part.

L'expérience principale démontre que le succès reproducteur de *R. grandis* est supérieur en présence de sa proie spécifique par rapport à la proie exotique, *D. valens*. En moyenne, la ponte du prédateur est 3,5 fois plus importante sur *D. micans*. Néanmoins, j'apporte un bémol à ce résultat. D'un côté, les larves *D. valens* sont issues d'un élevage en quarantaine perpétué depuis 2007. De l'autre, des *D. micans* sauvages ont été récoltés quelques jours seulement avant leur utilisation. Deux facteurs importants peuvent dès lors intervenir : la microflore associée et l'épuisement génétique. Le lien potentiel entre ces facteurs et la ponte du prédateur sont abordés dans les prochains paragraphes.

La microflore associée comprend les micro-organismes vivant en symbiose avec les dendroctones, à l'intérieur de l'insecte (notamment dans le tube digestif) ou sur sa cuticule. À travers les générations, il peut y avoir transmission directe (transovarienne) de cette microflore, ou réensemencement par exemple en s'alimentant dans la galerie maternelle. À défaut d'une transmission transovarienne, les micro-organismes sont perdus au fil du temps dans un milieu aseptisé comme un élevage en quarantaine. Les larves *D. valens* utilisées étaient probablement (majoritairement) dépourvues de symbiotes, là où les larves *D. micans* étaient sauvages et donc richement ensemencés.

Comme nous l'avons vu, de tels micro-organismes peuvent modifier les composés sémiochimiques suspectés de jouer un rôle dans la ponte de *R. grandis* (Grégoire *et al.*, 1988 ; Blomquist *et al.*, 2010). Par conséquent, leur présence peut directement influencer la ponte, indépendamment de la coévolution entre la proie et le prédateur. La microflore associée peut également intervenir au niveau intraspécifique. Scheuringer (2010) et Becker (2010) ont notamment identifié des lignées de *Wolbachia* chez *R. grandis* et *D. micans* (respectivement), bactéries qui peuvent modifier la reproduction de leurs hôtes.

En fonction du mode de transmission de ces micro-organismes, les individus obtenus après de nombreuses générations d'élevage ont une certaine probabilité d'avoir perdu leurs symbiotes. Dans cette étude, *R. grandis* connaît de meilleures performances reproductives sur sa proie spécifique, *D. micans*, dont les individus ont été récoltés juste avant l'expérience. Ces performances peuvent dès lors découler de la présence de leur microflore associée : parce que les stimuli font directement intervenir des micro-organismes, et/ou parce que la survie de la proie s'en trouve modifiée et le prédateur réajuste sa ponte en fonction de l'activité résultante.

L'épuisement génétique est une hypothèse avancée par Godefroid (2008) pour expliquer l'activité réduite de *D. valens* dans les expériences de Meurisse (2008). Ici, l'épuisement relève de la conjonction de plusieurs phénomènes : l'effet « bottleneck », l'isolement et la dérive génétique. Les géniteurs à la base de la lignée élevée en quarantaine ont été localement prélevés dans des populations chinoises de *D. valens*, en 2007. À cet effet « bottleneck » se rajoutent l'isolement (absence de migrants) et la dérive génétique sur de nombreuses générations (de 13 à 17 générations suivant les individus).

Au fil des générations, la petite population de *D. valens* maintenue en élevage (environ 120 géniteurs par génération) voit sa diversité génétique diminuer en raison des fluctuations aléatoires des fréquences alléliques et de la fixation indéterministe d'allèles qui s'ensuit, à cause de la dérive génétique (Ellstrand et Elam, 1993). La dérive est d'autant plus forte que la population est réduite. Ses conséquences les plus importantes sont la perte de diversité et l'augmentation de la consanguinité dans la population (Ellstrand et Elam, 1993). La consanguinité est à prendre en considération sachant que *D. valens* n'est pas endogame (Smith, 1971), contrairement à *D. micans* (Grégoire, 1988), et a donc une dépression de consanguinité *a priori* plus grande.

À l'image de la perte de la microflore associée, un épuisement génétique pourrait diminuer le taux intrinsèque de survie de la proie, la production de stimuli décroissant vu la moindre activité générale. Dans le cas qui nous occupe, ceci pourrait expliquer la moindre performance de *R. grandis* sur la proie exotique *D. valens*. Bien que les deux hypothèses ne soient pas mutuellement exclusives, la perte de symbiotes est plus probable qu'un épuisement génétique car cette dernière intervient sur une échelle de temps de l'ordre de l'effectif de la population, en nombre de générations (120 générations ; Ellstrand et Elam, 1993).

Dans cette expérience, les deux proies ont été introduites dans des boîtes contenant de l'écorce d'une même essence, l'épicéa commun, afin de faciliter les comparaisons chimiques. Rappelons que le pin est l'hôte de choix de *D. valens* (Bright, 1976). Bien que l'épicéa

commun soit accepté par *D. valens* (Bright, 1976 ; Wood, 1982) et ne modifie pas son cycle de vie (Grégoire et Dahlsten, non publié (1994) ; observations en élevage à l'ULB), l'atmosphère chimique qui règne dans les galeries est très probablement différente (au moins quantitativement) sur le pin. Or les tests de ponte où l'on a observé une performance supérieure de *R. grandis* sur la proie exotique ont tous été pratiqués sur de l'écorce de *Pinus lambertiana* pour *D. valens*, comparativement à *Picea abies* pour *D. micans* (Grégoire *et al.*, 1991 ; Grégoire et Dahlsten, non publié (1994)). Il se pourrait donc que des stimuli de ponte de *R. grandis* soient surreprésentés sur *Pinus lambertiana*, spécifiquement avec *D. valens* (et sa microflore associée) ou non, ou au contraire que certains inhibiteurs s'en trouvent diminués (par manque de précurseurs ou de certains micro-organismes).

La survie des prédateurs adultes est étonnamment basse sur *D. valens*, en moyenne huit fois moins importante qu'en présence de *D. micans*, au bout des 20 premiers jours d'expérience. Cet élément pourrait expliquer le volume de ponte moins important sur la proie exotique. Cependant, cette première hypothèse n'explique pas la mortalité précoce des adultes *R. grandis* en présence de *D. valens*, alors que la survie de chaque proie au terme de l'expérience est identique en présence du prédateur. Je penche plutôt pour l'hypothèse suivante : le nombre de larves *D. valens* a rapidement décliné – plus vite que pour *D. micans* – en raison de sa mauvaise survie intrinsèque, à cause des facteurs génétiques et/ou relatifs à la microflore. La baisse d'activité progressive dans ces boîtes s'est ressentie sur la production de stimuli de ponte, le prédateur adaptant le volume de ponte au nombre de proies disponible au cours des 10 premiers jours (durant lesquels la ponte a lieu). Les proies venant à manquer, les prédateurs adultes dépérissent, tandis que leurs descendants subsistent grâce à des besoins énergétiques moindres et/ou ont accès à des proies éventuellement inaccessibles à leurs parents, voire pratiquent le cannibalisme lorsqu'elles ne trouvent plus de proie.

Deux éléments expliquent vraisemblablement l'absence de corrélation entre le nombre de larves prédatrices et la survie des proies *D. valens*. Le premier est la présence d'un couple d'adultes au sein de chaque boîte. Bien que leur survie soit faible, surtout en fin d'expérience, ils tuent pour leur propre consommation et blessent pour faciliter celle de leurs descendants (Baisier, 1990). Le second élément est le taux de survie intrinsèque de *D. valens*, très bas même en l'absence du prédateur. Ces effets rendent plus difficile la mise en évidence d'une corrélation avec le nombre de larves.

Comme l'ont constaté Meurisse (2008) et Godefroid (2008), la quantité de monoterpènes diminue au cours de l'expérience alors que les monoterpènes oxygénés augmentent, résultat

de l'oxydation des premiers. La série contrôle fait figure d'exception dans ce schéma, avec des émissions de monoterpènes et monoterpènes oxygénés plus constantes et surtout plus faibles, en raison de l'absence d'activité de scolytes dans ces boîtes. Avec leur bagage enzymatique (Blomquist *et al.*, 2010), en creusant des galeries et par leur consommation, ceux-ci oxydent des composés, augmentent la surface d'oxydation de l'écorce et la mettent en contact intime avec d'éventuels microbes (Grégoire *et al.*, 1988). Remarquons que la production de monoterpènes oxygénés avait fini par chuter au 22^{ème} jour chez Meurisse (2008) et Godefroid (2008), alors qu'elle se poursuit ici jusqu'au 18^{ème} jour.

Globalement, les émissions de terpénoïdes sont supérieures en présence de la proie exotique. Les monoterpènes oxygénés suivent vraisemblablement la tendance des monoterpènes, après leur oxydation. La grande quantité de monoterpènes sur *D. valens* reste néanmoins une question en début d'expérience. Peut-être est-ce une conséquence du fait que l'épicéa n'est pas son hôte principal, avec qui la coévolution fut moins forte et donc la capacité à détoxifier les monoterpènes moins importante. Rien n'est moins sûr.

Les monoterpènes et monoterpènes oxygénés sont plus abondants en l'absence du prédateur, ce qui est en cohérent avec l'impact de la prédation sur l'activité des scolytes dans les autres séries. Par contre, les sesquiterpènes mesurés dans cette étude sont présents en quantité supérieure sans prédateur, ce qui les écarte de leur rôle potentiel d'inhibiteurs de ponte, alors que Meurisse (2008) avait corrélé d'autres sesquiterpènes ([161+105+119] (n°34), [161+105+119] (n°35), [119+161+105] (n°36)) au nombre de descendants produits. Cependant, toutes ces mesures présentent une forte variabilité ; il convient donc de considérer les précédentes observations comme des commentaires et non des conclusions.

Dans cette expérience, les sesquiterpènes ne suivent aucune tendance claire ; Meurisse (2008) et Godefroid (2008) avaient quant à eux mesuré leur augmentation au cours du temps. La différence provient peut-être du fait que ces deux auteurs avaient trouvé entre 14 et 15 sesquiterpènes, et quelques composés plus lourds (notamment diterpènes), alors que seuls trois sesquiterpènes et aucun composé plus lourd sont mis en évidence dans la présente expérience. Deux facteurs ont pu jouer un rôle à ce niveau : la méthodologie et l'analyse.

Au point de vue de la méthode, Meurisse (2008) et Godefroid (2008) ont utilisé la SPME en « headspace statique », alors que mon expérience s'articule sur le « headspace dynamique » avec des filtres à poudre adsorbante. La comparaison de ces méthodes est approfondie plus loin. Il est en tout cas possible que chaque méthode soit plus sensible à certains composés. Du côté de l'analyse, rappelons que Meurisse (2008) et Godefroid (2008) avaient opté pour des

mesures relatives, qui ne représentent pas forcément l'évolution des quantités absolues. Nous observons d'ailleurs une diminution de la masse totale de terpénoïdes sur l'ensemble de l'expérience. Enfin, j'ai éprouvé des difficultés à identifier et quantifier les composés les moins abondants – tels que les sesquiterpènes – en raison d'une contamination résiduelle en siloxanes, principalement localisée en fin de chromatogrammes.

L'identification de composés sémiocchimiques sur base des comparaisons multiples est loin d'être optimale. Le test *post-hoc* après Kruskal-Wallis détecte très peu de différences sur base des médianes, alors que certains résultats semblent clairement significatifs (exemple : composé 23 au jour 7, série contrôle). Comme expliqué dans le protocole, le recours à une ANOVA n'était malheureusement pas possible étant donné l'écart très significatif à la distribution gaussienne et à l'homogénéité des variances. Bien que l'ANOVA ne soit pas très sensible à la non-normalité des résidus, l'homoscédasticité est quant à elle vivement recommandée lorsque les effectifs des échantillons diffèrent, en particulier en opérant ensuite des comparaisons multiples (Dagnelie, 2006). Par conséquent, je recommande vivement d'utiliser des séries disposant du même nombre de réplicats.

Parmi les résultats, remarquons les monoterpènes oxygénés 14 (fenchol) et 25 (myrténal) qui ne sont absents au premier jour que de la série contrôle, ainsi que de la série 2 pour le fenchol. Ceci en fait des candidats-stimuli pour la ponte de *R. grandis*. Néanmoins, la masse retrouvée est très faible et l'on ne peut donc pas tirer de conclusion sur leur absence de la série contrôle. Aucun composé n'est d'autre part présent exclusivement dans les séries avec prédateur, ce qui aurait pu indiquer des candidats-inhibiteurs.

Les ACP n'ont permis de relier les traitements qu'à peu de composés. Les résultats ne concordent pas toujours entre deux extractions successives, ce qui tient à la modification rapide de l'atmosphère chimique qui règne dans les boîtes. En particulier, le monoterpène 6 ([91+39+77+41+93]), absent des expériences de Meurisse (2008) et Godefroid (2008), est majoritairement trouvé dans les boîtes où des scolytes sont actifs les premiers jours. Bien que Baisier (1990) n'ait pas écarté le rôle de composés différents des monoterpènes oxygénés dans la stimulation de la ponte, cette molécule ne semble pas être un bon candidat dans la mesure où elle est retrouvée en quantité similaire dans toutes les séries à la première extraction.

Alors que Godefroid (2008) mesurait une quantité moindre de camphre (monoterpène oxygéné) dans les boîtes de *D. valens* à la moitié de son expérience, mes résultats montrent la tendance inverse aux 11^{ème} et 14^{ème} jours. Le camphène (monoterpène) est ici également en

quantité supérieure avec la proie exotique (jour 11). À la lumière des résultats sur la survie des larves de *D. valens* et le rapide déclin de leur nombre, les composés croissant pourraient constituer de bons candidats-inhibiteurs de ponte, le volume de ponte optimal étant rapidement atteint. Ce n'est pas le cas de ces deux molécules, que l'on retrouve aussi en l'absence du prédateur.

Vers la fin de l'expérience (14 et 18^{èmes} jour), certains monoterpènes sont présents en quantité supérieure dans les boîtes de *D. micans* : β -pinène, myrcène, limonène et 3-carène. Étant donnée la survie supérieure des larves de cette proie, il n'est pas étonnant de constater que les émissions de monoterpènes se poursuivent plus longtemps avec le creusement de nouvelles galeries et la libération de résine fraîche qui l'accompagne (Godefroid, 2008).

Les résultats des ACP ne sont pas concluants, comme dans l'expérience de Godefroid (2008). Ils ne me permettent pas de clairement relier la quantité de certains composés à la présence de scolytes, à l'une des espèces-proies, ou au prédateur. Il serait opportun d'approfondir ces résultats par une analyse discriminante basée sur la méthode des moindres carrés partiels (aussi appelée projection sur variables latentes, PLS-DA ; Wold, 1966) pour relier la composition chimique des boîtes en fonction des insectes qu'elles contiennent. La PLS-DA est une analyse « supervisée » et prend donc en considération les classes (groupes) pour mieux les séparer, par opposition à l'ACP qui représente les observations dans l'espace indépendamment de leurs groupes (« analyse non supervisée » ; Bidault, 2007). Serait également profitable une régression PLS (PLS-R ; Wold, 1994) en fonction du nombre de larves *R. grandis* produites. Il s'agit d'une alternative à la régression linéaire multiple lorsqu'il y a beaucoup de variables explicatives (ici, masse des composés) par rapport au nombre d'observations (réplicats), ou quand ces variables sont corrélées entre elles (colinéarité ; Mevik et Wehrens, 2007).

En procédant de cette manière (ACP, PLS-DA, PLS-R), Meurisse (2008) a réussi à mettre en évidence les relations suivantes. Fenchone, isopinocampone, camphre, alcanphre, *cis*- et *trans*-myrtanol étaient les monoterpènes oxygénés les plus reliés à l'activité des proies (par ordre d'importance), ce qui en fait de potentiels stimuli de ponte. Des sesquiterpènes inconnus étaient corrélés au nombre de *R. grandis* produits ([161+105+119] (n°34), [161+105+119] (n°35), [119+161+105] (n°36)), probables inhibiteurs.

Parmi les études moins récentes, Grégoire *et al.* (1982) avaient identifiés des composants de la phéromone agrégative des larves de *D. micans*. Ceux-ci n'ont pas été retrouvés dans la présente étude (*trans*-verbénol, verbénone, myrténol), à l'exception du *cis*-verbénol, alors que

leurs spectres sont connus. Meurisse (2008), avec une autre méthode « headspace », n'avait aussi détecté qu'un seul de ces composés (verbénone). Baisier *et al.* (1988) avaient démontré que ces constituants induisaient la ponte de *R. grandis*, qu'ils soient utilisés en mélange ou de façon isolée, mais pas aussi efficacement que le frass seul.

D'autres bioessais entrepris par Baisier (1990) et Grégoire *et al.* (1991) ont montré qu'un mélange de monoterpènes oxygénés (fenchone, pinocamphone, camphre, terpinène-4-ol, bornéol, fenchol et verbénone) induisait autant de pontes que du frass seul, bien que le frass stimule moins la ponte que les proies en elles-mêmes (à hauteur de 30%). Parmi ces composés, mon expérience souligne l'intérêt du fenchol, et la plupart des autres composés sont également extraits. Remarquons que ces bioessais ont été pratiqués avec 220mg du mélange par boîte, incorporés progressivement (Baisier, 1990 ; Grégoire *et al.*, 1991), soit environ 100.000 fois la masse de monoterpènes oxygénés extraite ici en « headspace » en 18 jours. Comme le soulignent les auteurs, des stimuli manquent certainement au mélange, tandis que certains composés sont éventuellement antagonistes, et la forte dose peut également jouer un rôle (Baisier, 1990 ; Grégoire *et al.*, 1991).

Nos résultats montrent que la méthode expérimentale n'a pas d'impact sur les insectes, proies comme prédateurs. Le flux d'air imposé par les pompes pourrait causer la dessiccation des boîtes d'extraction, ou modifier leur atmosphère chimique, mais aucun effet n'a été relevé sur la survie (*D. micans*, *D. valens*, *R. grandis*) ou les performances des insectes (*R. grandis*). Ceci montre que le « headspace dynamique » est applicable à l'étude de ces scolytes et de leurs interactions avec un prédateur apte à coloniser leurs galeries.

Les filtres à poudre adsorbante permettent la désorption par solvant qui a le double avantage d'être potentiellement moins agressif vis-à-vis de composés réactifs et de permettre plusieurs analyses d'une même élution (Kaiser, 2011). L'étalonnage interne est une pratique simple pour quantifier les analytes, et son utilisation est ici rendue possible grâce au solvant. En SPME, l'utilisation d'un étalon interne impliquerait son ajout dans les boîtes d'extraction, interférant potentiellement avec le comportement des insectes et la chimie qui s'y déroule (Godefroid, 2008).

Les essais chimiques lors de l'expérience préparatoire soulèvent un point important quant à la méthode des filtres adsorbants : il y a une forte variabilité de détection des composés pourtant extraits à une même concentration. En particulier, trois composés présentent un grand écart dans leur réponse : α -terpinéol ($\gamma=98,84$), *trans*-myrtanol ($\gamma=12,80$) et 3-hydroxy-3-méthyl-2-butanone ($\gamma=19,83$), alors que les autres références ont une corrélation de surface de

$\gamma=1,18\pm0,78$ (moyenne \pm écart-type) avec l'étalon. Vu la rareté des composés présentant un tel écart, il est raisonnable d'envisager qu'il s'agisse d'un problème de concentration dans leurs solutions de stock, datant de plusieurs années, suite par exemple à une forte dégradation des molécules. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par l'injection d'une nouvelle solution, ce qui n'a pas pu être effectué ici par manque de temps.

Parmi les trois molécules montrant une réponse extravagante, aucune n'est retrouvée dans l'expérience principale ; par conséquent, il n'y a pas de biais dans le calcul des masses et les analyses sont fiables. L'étalon interne a donc permis de quantifier avec succès l'ensemble des composés détectés. L'utilisation de la corrélation de surface a certainement amélioré la précision des résultats, en adaptant la réponse de chaque composé connu. Pour les molécules inconnues, l'hypothèse d'une réponse identique à l'étalon ($\gamma=1,00$) semble *a posteriori* très bonne, étant proche de la corrélation moyenne observée sur la majorité des références. Dans l'optique d'améliorer la technique de l'étalonnage interne et de la corrélation de surface, de nouvelles références devraient être testées, comme dans l'expérience préparatoire, afin d'observer si les composés présentent effectivement une réponse similaire, ou prédictible par une loi.

Ce mémoire donne une place importante à l'optimisation d'une nouvelle technique d'étude du système *R. grandis-D. micans*. Bien que des améliorations restent à apporter, les filtres adsorbants montrent leur efficacité pour capturer les terpénoïdes, au moins jusqu'aux sesquiterpènes. L'étalonnage interne rend possible la quantification absolue des composés, ce qui permet la comparaison des masses entre réplicats, traitements et jours sans hypothèse sur la constance des émissions. Il s'agit de l'apport majeur de ce travail par rapport aux expériences de Meurisse (2008) et Godefroid (2008), qui avaient déjà introduit une technique non destructive.

La comparaison de cette expérience avec celles de Meurisse (2008) et Godefroid (2008) révèle que tous les composés détectés ne sont pas identiques. J'ai notamment réussi à quantifier les monoterpènes myrcène et camphène, là où Meurisse (2008) n'avait pu les séparer des pics d' α - et β -pinène. Ceci résulte probablement de la programmation du four du GC-MS, plus lente dans notre étude. D'un autre côté, Meurisse (2008) et Godefroid (2008) avaient par exemple détecté du terpinolène (monoterpène) et de la verbénone (monoterpène oxygéné), ne figurant pas dans nos résultats. Ces différences peuvent provenir de la méthode expérimentale. Il est probablement que le « headspace dynamique » soit par exemple plus sensible aux composés les plus volatils par rapport au « headspace statique ». Johnson *et al.*

(2009) ont par exemple obtenu des différences quantitatives et qualitatives dans les analyses des odeurs florales de la plante *Drypetes natalensis* en utilisant des filtres désorbés par solvant ou thermiquement.

Cependant, la méthodologie n'est pas seule en cause. On sait qu'il existe des variations quantitatives et qualitatives dans les composés volatils de l'écorce entre individus d'une espèce de conifère, mais aussi sur un même individu (Heemann et Francke, 1977). De telles variations sont *a priori* réduites au sein d'une même expérience, car l'écorce est généralement prélevée sur un même pied. Mais les comparaisons entre expériences n'en restent pas moins difficiles. Néanmoins, *R. grandis* parvient à repérer et entrer dans les galeries de sa proie spécifique, pour finalement pondre au *prorata* des proies disponibles (Merlin *et al.*, 1984 ; Baisier, 1990 ; Grégoire *et al.*, 1992). Des stimuli et inhibiteurs de ponte sont donc bien en jeu. En toute logique, l'orientation et l'ajustement de la ponte du prédateur reposent sur des composés émis systématiquement au sein des galeries, ou sur des bouquets de molécules de façon à ce que l'information subsiste même lorsque la composition varie, auquel cas l'identification des stimuli et inhibiteurs serait plus ardue.

La comparaison de la méthode SPME et des filtres adsorbants ne doit pas s'arrêter aux analyses chimiques, car les aspects logistiques sont également importants afin d'expérimenter dans les meilleures conditions. On peut confronter chaque méthode pour son temps de manipulation (préparation des extractions, extraction, désorption), la solidité du matériel (fibre et filtres, dispositif d'extraction), son coût et sa facilité d'utilisation. Très brièvement, voici mon appréciation. Le coût est semble-t-il supérieur à l'achat pour les filtres bien qu'ils soient artisanaux, en raison du matériel supplémentaire qu'ils requièrent (en particulier les pompes). Ils sont néanmoins plus solides que les fibres SPME, ce qui diminue leur prix de revient. Le temps de manipulation est comparable, mais peut être largement inférieur si la désorption préparatoire des fibres SPME est longue (Godefroid, 2008). Quant à la facilité d'utilisation, mon opinion penche nettement en faveur des filtres car ils supportent l'étalonnage interne (sans interférence), les analyses répétées, l'élution par différents solvants, la possibilité de postposer une analyse, et d'automatiser les analyses au GC-MS. Ces avantages m'ont permis de procéder à deux fois plus d'extractions que Meurisse (2008) et Godefroid (2008) – deux par semaine au lieu d'une – avec un meilleur suivi de l'évolution chimique, et de réduire le temps d'analyse entre réplicats – toutes les boîtes d'un même groupe extraites simultanément.

L'ensemble des tests chimiques et physiques illustrés en première partie de mémoire ont grandement amélioré la méthodologie associée aux filtres Porapak. Les résultats s'en trouvent moins variables par l'homogénéisation des analyses chimiques et du flux de pompage. Mais des progrès restent clairement à faire pour une utilisation optimale de la technique, et la mise en évidence des signaux chimiques intervenant dans le système *D. micans*-*R. grandis*.

Je propose de concentrer les prochains efforts sur plusieurs aspects de la méthodologie des filtres Porapak. Des tests de reproductibilité permettraient de garantir une meilleure précision des résultats quantitatifs. L'étude de la dynamique d'adsorption serait également profitable afin d'une part d'éviter toute saturation, et d'autre part d'éventuellement améliorer la correction due à la longueur de la poudre adsorbante dans les filtres. Comme le propose (Kaiser, 2011), on pourrait envisager des éluions mixtes (cyclo)hexane-acétone afin d'extraire des composés plus polaires. Baisier (1990) avait d'ailleurs observé la stimulation de la ponte avec des extraits de frass à l'acétone, éthanol, éther et au dichlorométhane contenant éventuellement des composés différents d'une fraction hexanique.

Afin de produire des résultats plus clairs, les futures expériences comparatives de l'oviposition de *R. grandis* sur *D. micans* et *D. valens* devront tenir compte des commentaires présents dans ce mémoire et les travaux de Meurisse (2008) et Godefroid (2008). Retenons qu'il faut utiliser des proies de stades comparables et de même « naturalité » (temps écoulé depuis la récolte en nature, idéalement sauvages), de l'écorce provenant d'un seul arbre, avec une biomasse identique de proies et d'écorce entre séries, un même nombre de réplicats entre séries et approfondir les analyses multivariées par PLS-DA et PLS-R. Je conseille également le forage d'un trou central aux rondelles d'écorce afin de favoriser la circulation de l'air jusqu'au centre de la chambre de ponte. La mise sur pied d'une expérience avec différentes densités de proies est une alternative intéressante car elle permettrait de corrélérer le nombre de proies aux stimuli. Suivant le même principe, les inhibiteurs pourraient être corrélés au nombre de larves *R. grandis* par l'extraction de boîtes contenant différentes densités de larves prédatrices. Enfin, une expérience sur un arbre vivant présenterait un défi d'un niveau encore supérieur, mais permettrait de prendre en considération la composition spécifique de la résine induite, en plus de la résine préformée (réservée à *D. micans* si en milieu naturel ; Lieutier, 2002).

L'étude des stimuli et inhibiteurs de ponte impliqués dans le système *R. grandis*-*D. micans* pourra illustrer le concept de coévolution dans un couple de relation prédateur-proie

spécifique. Outre l'aspect évolutif, l'identification de tels composés revêt d'une grande utilité dans la lutte biologique contre ce scolyte eurasien.

Les élevages de *R. grandis* pourraient être améliorés par l'addition de stimuli de synthèse en condition de ponte. Ce principe est régulièrement pratiqué en élevage suite aux résultats de Grégoire *et al.* (1991). Une meilleure connaissance des médiateurs chimiques intervenant dans la ponte pourrait à terme mener à un élevage du prédateur sans sa proie, en présence de nourriture de substitution.

Un tel progrès permettrait d'allouer l'entièreté de la production d'élevage aux expériences scientifiques ainsi qu'au programme de « pest in first ». Cette technique, encore en étude, s'inscrit dans l'optique de la lutte biologique contre *D. micans* (Godefroid, 2008). Elle veut que le ravageur soit introduit dans une zone avant son prédateur, qui nécessite sa proie pour se maintenir (Hussey et Parr, 1965). De telle sorte qu'un contrôle intervienne rapidement, évitant les épisodes épidémiques (Nihoul, 1993) liés à l'apparition du ravageur sans son ennemi naturel.

Une autre application potentielle est le monitoring des *R. grandis*. Grégoire *et al.* (1992) ont en effet montré que certains composés suspectés de promouvoir la ponte intervenaient également dans la détection à distance des proies. Depuis lors, Meurisse *et al.* (2008) ont montré que des pièges à stimuli permettent d'avoir connaissance de la propagation du prédateur, du succès de son introduction dans une nouvelle région, ou encore de savoir indirectement si *D. micans* y est présent.

Un succès reproducteur de *R. grandis* supérieur sur une proie exotique illustrerait la théorie des nouveaux associés (Hokkanen et Pimentel, 1984). Dans le domaine des scolytes, cela ouvrirait la porte à l'utilisation de ce prédateur spécifique pour contrôler d'autres ravageurs, comme ce fut le cas en Chine en 2001 (Meurisse, 2008). Les proies ciblées devraient présenter des traits écologiques suffisamment proches (vie subcorticale, larves grégaires, cycle bouclé sur un hôte vivant, long temps de génération), notamment *D. murrayanae*, *D. punctatus*, *D. rhizophagus*, *D. terebrans* et évidemment *D. valens* (Wood, 1982), pour garantir l'efficacité du prédateur (Meurisse, 2008). Bien sûr, un succès inférieur ou égal n'exclurait pas cet usage de *R. grandis*, pour autant que la prédation ait un certain impact.

En conclusion, ce travail de fin d'études fournit une base à l'utilisation de la technique des filtres adsorbants sur des scolytes et en particulier la relation spécifique qui lie *D. micans* au prédateur *R. grandis*. L'amélioration de la méthode permettra de mieux connaître les médiateurs chimiques qui régulent la ponte du prédateur. Les futures expériences sauront profiter des connaissances acquises jusqu'ici pour mettre en lumière la coévolution entre ces insectes subcorticaux. L'identification des stimuli et inhibiteurs de ponte de *R. grandis* trouverait de nombreuses applications en lutte biologique, au départ d'une méthode inspirée par l'industrie du parfum (Kaiser, 2011).

Chapitre VI – RÉFÉRENCES

- Abrams P. A. (2000) The evolution of predator-prey interactions: theory and evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**: 79-105.
- Baisier M. (1990) Biologie des stades immatures du prédateur *Rhizophagus grandis* Gyll. (Coleoptera: Rhizophagidae). Thèse de doctorat en Sciences Zoologiques, *Université Libre de Bruxelles*, Bruxelles, 195pp.
- Baisier M. et Grégoire J.-C. (1988) Factors influencing oviposition in *Rhizophagus grandis* (Coleoptera: Rhizophagidae), specific predator of the bark beetle *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae). *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent*, **53**: 1159-1167.
- Baisier M., Grégoire J.-C., Delinte K. et Bonnard O. (1988) The role of spruce monoterpene derivatives as oviposition stimuli for *Rhizophagus grandis*, a predator of the bark beetle *Dendroctonus micans*. 359-368 in Mattson W. J., Léveux J. et Bernard-Dagan C. (eds.) *Mechanisms of woody plant defenses against insects*. Springer-Verlag, New-York, 416 pp.
- Bartlett M. S. (1937) Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society of London, Series A*, **160**(901): 268-282.
- Becker S. (2010) The endosymbiont Wolbachia in *Dendroctonus micans* (Coleoptera, Curculionidae). Thèse de doctorat en Ingénierie de la phytomédecine, *Universität für Bodenkultur*, Wien, 90pp.
- Bergmiller F. (1903) *Dendroctonus micans* und *Rhizophagus grandis*. *Zentralblatt für das Gesamte Forstwesen*, **29**: 252-256.
- Bidault Y. (2007) Intérêt d'une plateforme multi-techniques pour l'analyse de données spectrales. *Spectra Analyse*, **258**: 42-45.
- Blomquist G. J. et Vogt R. G. (2003) Biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles. Introduction and overview. 3-18 in Blomquist G. J. et Vogt R. G. (eds.) *Insect pheromones biochemistry and molecular biology*. Elsevier, London, 745pp.
- Blomquist G. J., Figueroa-Teran R., Aw M., Song M., Gorzalski A., Abbott N. L., Chang E. et Tittiger C. (2010) Pheromone production in bark beetles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **40**: 699-712.
- Bouvier-Brown N. C., Holzinger R., Palitzsch K. et Goldstein A. H. (2007) Quantifying sesquiterpene and oxygenated terpene emissions from live vegetation using solid-phase microextraction fibers. *Journal of Chromatography A*, **1161**: 113-120.
- Bouvier-Brown N. C., Goldstein A. H., Gilman J. B., Kuster W. C. et de Gouw J. A. (2009a) In-situ ambient quantification of monoterpenes, sesquiterpenes, and related oxygenated compounds during BEARPEX 2007 – implications for gas- and particle-phase chemistry. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, **9**: 10235-10269.
- Bouvier-Brown N. C., Holzinger R., Palitzsch K. et Goldstein A. H. (2009b) Large emissions of sesquiterpenes and methyl chavicol quantified from branch enclosure measurements. *Atmospheric Environment*, **43**: 389-401.
- Brand J. M., Bracke J. W., Markovetz A. J., Wood D. L. et Browne L. E. (1975) Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. *Nature*, **254**(5496): 136-137.
- Brand J. M., Bracke J. W., Britton L. N., Markovetz A. J. et Barras S. J. (1976) Bark beetle pheromones: production of verbenone by a mycangial fungus of *Dendroctonus frontalis*. *Journal of Chemical Ecology*, **2**(2): 195-199.
- Bright D. E. (1976) The insects and arachnids of Canada, part 2. The bark beetles of Canada and Alaska : Coleoptera Scolytidae. *Canada Department of Agriculture*, Publication No 1576, 241pp.
- Byers J. A. et Wood D. L. (1981) Antibiotic-induced inhibition of pheromone synthesis in a bark beetle. *Science*, **213**: 763-764.
- Dagnelie P. (2006) *Statistique théorique et appliquée. (2) Interférence statistique à une et à deux dimensions*. De Boeck, Bruxelles, 2^{ème} édition, 736pp.

- Dagnelie P. (2008) De la régression simple et l'analyse de la variance aux modèles linéaires généralisés : synthèse et chronologie. *Revue Modulad*, **39**: 107-136.
- Dieckmann U., Marrow P. et Law R. (1995) Evolutionary cycling in predator-prey interactions: population dynamics and the Red Queen. *Journal of Theoretical Biology*, **176**: 91-102.
- Ellstrand N. C. et Elam D. R. (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**: 217-242.
- Everaerts C., Grégoire J.-C. et Merlin J. (1988) The toxicity of Norway spruce monoterpenes to two bark beetle species and their associates. 335-344 in Mattson W. J., Levieux J. et Bernard-Dagan C. (eds.) *Mechanism of woody plant defenses against insects. Search for pattern*. Springer-Verlag, New York, 416pp.
- Fielding N. et Evans H. (1997) Biological control of *Dendroctonus micans* (Scolytidae) in Great Britain. *Biocontrol News and Information (United Kingdom)*, **18**(2): 51-60.
- Fisher R. A. (1935) *The Design of Experiments*. in Oliver et Boyd (eds.). Edinburgh, 252pp.
- Godefroid M. (2008) Etude d'une interaction tritrophique : le système *Picea abies*, *Dendroctonus micans* et *Rhizophagus grandis*. Travail de fin d'études en Ingénierie agronomique, *Université Libre de Bruxelles*, Bruxelles, 53pp.
- Grégoire J.-C. (1988) The greater European spruce beetle. 455-478 in Berryman A. A. (eds.) *Dynamics of forest insect populations*. Plenum Publishing Corporation, New York.
- Grégoire J.-C., Braekman J.-C. et Tondeur A. (1981) Chemical communication between the larvae of *Dendroctonus micans* Kug. (Coleoptera, Scolytidae). *Les Colloques de l'INRA*, **7** (Les médiateurs chimiques): 253-257.
- Grégoire J.-C., Baisier M., Drumont A., Dahlsten D. L., Meyer H. et Francke W. (1991) Volatile compounds in the larval frass of *Dendroctonus valens* and *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae) in relation to oviposition by the predator, *Rhizophagus grandis* (Coleoptera: Rhizophagidae). *Journal of Chemical Ecology*, **17**(10): 2003-2019.
- Grégoire J.-C., Couillien D., Krebber R., König W. A., Meyer H. et Francke W. (1992) Orientation of *Rhizophagus grandis* (Coleoptera: Rhizophagidae) to oxygenated monoterpenes in a species-specific predator-prey relationship. *Chemoecology*, **3**: 14-18.
- Heemann V. et Francke W. (1977) Gaschromatographisch-massenspektrometrische untersuchungen der flüchtigen rindeninhaltsstoffe von *Picea abies* (L.) Karst. *Planta Medica*, **32**(4): 342-346.
- Hokkanen H. et Pimentel D. (1984) New approach for selecting biological control agents. *The Canadian Entomologist*, **116**: 1109-1121.
- Hotelling H. (1933a) Analysis of a complex of statistical variables with principal components. *Journal of Educational Psychology*, **24**: 417-441.
- Hotelling H. (1933b) Analysis of a complex of statistical variables with principal components (continued). *Journal of Educational Psychology*, **24**: 498-520.
- Hussey N. W. et Parr W. J. (1965) Observations on the control of *Tetranychus urticae* Koch on cucumbers by the predatory mite *Phytoseiulus riegeli* Dosse. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **8**: 271-281.
- Johnson S. D., Ellis A. et Dötterl S. (2007) Specialization for pollination by beetles and wasps: the role of lollipop hairs and fragrance in *Satyrium microrrhynchum* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, **94**(1): 47-55.
- Johnson S. D., Griffiths M. E., Peter C. I. et Lawes M. J. (2009) Pollinators, "mustard oil" volatiles, and fruit production in flowers of the dioecious tree *Drypetes natalensis* (Putranjivaceae). *American Journal of Botany*, **96**(11): 2080-2086.
- Jürgens A. (2004) Flower scent composition in diurnal *Silene* species (Caryophyllaceae): phylogenetic constraints or adaptation to flower visitors? *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**: 841-859.
- Jürgens A., Dötterl S., Liede-Schumann S. et Meve U. (2008) Chemical diversity of floral volatiles in Asclepiadoideae-Asclepiadeae (Apocynaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**: 842-852.

- Kaiser R. (2011) *Scent of the vanishing flora*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, 483pp.
- Kawecki T. J. (1998) Red Queen meets Santa Rosalia: arms races and the evolution of host specialization in organisms with parasitic lifestyles. *The American Naturalist*, **152**(4): 635-651.
- Kelley S. T. et Farrell B. D. (1998) Is specialization a dead end ? The phylogeny of host use in *Dendroctonus* bark beetles (Scolytidae). *Evolution*, **52**(6): 1731-1743.
- Kruskal W. H. et Wallis W. A. (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, **47**(260): 583-621.
- Lieutier F. (2002) Mechanisms of resistance in conifers and bark beetle attack strategies. 31-77 in Wagner M. R., Clancy K. M., Lieutier F. et Paine T. D. (eds.) *Mechanisms and deployment of resistance in trees to insects*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays-Bas, 320pp.
- Merlin J., Grégoire J.-C., Baisier M. et Pasteels J. M. (1984) Some new data on the biology of *Rhizophagus grandis* (Col: Rhizophagidae). in Grégoire J.-C. et Pasteels J. M. (eds.) *Biological Control of Bark Beetles*. Proceedings of the EEC Seminar, Bruxelles, 3-4 octobre 1984.
- Meurisse N. (2008) Chemical ecology of *Rhizophagus grandis* (Coleoptera: Monotomidae). Thèse de doctorat en Sciences agronomiques et Ingénierie biologique, *Université Libre de Bruxelles*, Bruxelles, 142pp.
- Meurisse N., Couillien D. et Grégoire J.-C. (2008) Kairomone traps: a tool for monitoring the invasive spruce bark beetle *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytinae) and its specific predator, *Rhizophagus grandis* (Coleoptera: Monotomidae). *Journal of Applied Ecology*, **45**: 537-548.
- Mevik B.-H. et Wehrens R. (2007) The pls package: principal component and partial least squares regression in R. *Journal of Statistical Software*, **18**(2).
- Nihoul P. (1993) Influences of the method of introduction of prey (*Tetranychus urticae*) and predators (*Phytoseiulus persimilis*) on the development of plant injury in tomato crops under glass. *Experimental & Applied Acarology*, **17**: 765-774.
- Olson D. et Pimentel D. (1974) Evolution of resistance in a host population to attacking parasite. *Environmental Entomology*, **3**(4): 621-624.
- Pauly H. et Meurisse N. (2007) Le Dendroctone de l'épicéa en France: situation et mesures de lutte en cours. *Revue Forestière Française*, **59**(6): 595-608.
- Pawliszyn J. (1997) SPME method development. 97-139 in Pawliszyn J. (eds.) *Solid phase microextraction: theory and practice*. Wiley-VCH, New York.
- Pearson K. (1896) Mathematical contributions to the theory of evolution. III. Regression, heredity and panmixia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series A*, **187**: 253-318.
- Pearson K. (1901) On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*, **2**(6): 559-572.
- Pimentel D. (1961) Animal population regulation By the genetic feed-back mechanism. *The American Naturalist*, **XCIV**(881): 65-79.
- Pimentel D. et Al-Hafidh R. (1965) Ecological control of a parasite population by genetic evolution in the parasite-host system. *Annals of the Entomological Society of America*, **58**(1): 1-6.
- Pimentel D., Levin S. A. et Olson D. (1978) Coevolution and the stability of exploiter-victim systems. *The American Naturalist*, **112**(983): 119-125.
- Richard E. (1998) Première approche des mécanismes du choix de l'hôte (*Picea abies* Karst) chez le scolyte *Dendroctonus micans* Kug. DEA d'écologie, *Université de Paris VI*, Paris, 28pp.
- Risticvic S., Lord H., Górecki T., Arthur C. L. et Pawliszyn J. (2010) Protocol for solid-phase microextraction method development. *Nature Protocols*, **5**(1): 122-139.
- Seybold S. J. et Vanderwel D. (2003) Biosynthesis and endocrine regulation of pheromone production in the Coleoptera. 137-200 in Blomquist G. J. et Vogt R. G. (eds.) *Insect pheromones biochemistry and molecular biology*. Elsevier, London, 745pp.

- Shapiro S. S. et Wilk M. B. (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, **52**(3-4): 591-611.
- Sheuringer B. T. (2010) The endosymbiont *Wolbachia* in *Rhizophagus grandis* (Coleoptera, Monotomidae). Thèse de doctorat en Ingénierie de la phytomédecine, *Universität für Bodenkultur*, Wien, 104pp.
- Siegel S. et Castellan N. J. (1988) Non parametric statistics for the behavioural sciences. *MacGraw Hill Int.*, New York.
- Smith R. H. (1971) Red turpentine beetle. *Forest Pest Leaflet*, **55**: 1-8.
- Spearman C. (1904) The proof and measurement of association between two things. *The American Journal of Psychology*, **15**: 72-101.
- Student (1908) The probable error of a mean. *Biometrika*, **6**(1): 1-25.
- Sydor W. J. et Pimentel D. (1975) Genetic feedback and simulated environmental catastrophes. *The Canadian Entomologist*, **107**: 1343-1348.
- Tømmerås B. Å., Mustaparta H. and Grégoire J.-C. (1984) Receptor cells in *Ips typographus* and *Dendroctonus micans* specific to pheromones of the reciprocal genus. *Journal of Chemical Ecology*, **10**: 759-769.
- Tukey J. (1953) *The problem of multiple comparisons*. Manuscrit non publié, Princeton University.
- Van Valen L. (1973) A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, **1**: 1-30.
- Vereecken N. J. et McNeil J. N. (2010) Cheaters and liars: chemical mimicry at its finest. *Canadian Journal of Zoology*, **88**: 725-752.
- Wold H. (1966) Estimation of principal components and related models by iterative least squares. 391-420 in Krishnaiah P. R. (eds.) *Multivariate analysis*. Academic Press, New York.
- Wold S. (1994) PLS for multivariate linear modeling. in van de Waterbeemd (eds.) *QSAR: chemometric methods in molecular design. Methods and principles in medicinal chemistry*. Verlag-chemie, Weinheim, Germany.
- Wood S. L. (1982) The bark and *Ambrosia* beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. *Great Basin Naturalist Memoirs*, **6**: 1-1359.
- Yan Z., Sun J., Don O. et Zhang Z. (2005) The red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Scolytidae): an exotic invasive pest of pine in China. *Biodiversity and Conservation*, **14**: 1735-1760.
- Zhang Q.-H., Erbilgin N. et Seybold S. J. (2008) GC-EAD responses to semiochemicals by eight beetles in subcortical community associated with Monterey pine trees in coastal California: similarities and disparities across three trophic levels. *Chemoecology*, **18**: 243-254.

ANNEXES

▪ Script R : test de permutations sur la survie des adultes *R. grandis* (Rg)

```
# TEST DE PERMUTATIONS

### Survie des adultes Rg: effet du pompage

# Données
exp_princ_rs_pompage=read.xls("exp_princ_rs.xls",sheet="pompage")
#fichier de données: observations en lignes, variables en colonnes
serie=exp_princ_rs_pompage$serie#séries (traitements)
surv_Rg=exp_princ_rs_pompage$surv_Rg#taux de survie des adultes Rg

# Bootstrapping
nBoot=10000#nombre d'itérations
myDifVec=rep(0,nBoot)#vecteur qui stocke le résultat de chaque itération
for(i in 1:nBoot){#début boucle d'itération
myPermOrder=sample(nrow(exp_princ_rs_pompage))#ordre aléatoire
#d'échantillonnage
myPermSerie=exp_princ_rs_pompage$serie[myPermOrder]#traitements suivant
#l'échantillonnage aléatoire
myDifVec[i]=diff(tapply(exp_princ_rs_pompage$surv_Rg,myPermSerie,mean))
#différence entre les moyennes des traitements d'après
#l'échantillonnage aléatoire
}#fin boucle d'itération

# Test bilatéral: seuil de 2,5% à gauche et à droite
myHist=hist(myDifVec,breaks=100,main="Bootstrapping: survie des Rg",
xlab="Différence entre moyennes",ylab="Nombre d'itérations")#histogramme
#des itérations
diff(tapply(exp_princ_rs_pompage$surv_Rg,exp_princ_rs_pompage$serie,mean))
#différence entre les moyennes observées: positionner sur l'histogramme
myHist$counts#effectifs dans l'histogramme
abline(v=-0.3,col=2)#limite de rejet à gauche (2,5%)
abline(v=0.3,col=2)#limite de rejet à droite (2,5%)

# FIN
```


▪ **Tableau 11 : État des adultes *R. grandis* (Rg) retirés lors de l'interruption de la ponte (lot sur la cinétique de ponte)**

Série	Boîte	Jour	Rg ♀ retirée	Rg ♀ état	Rg ♂ retiré	Rg ♂ état	Survie Rg moyenne	Survie Rg écart-type
1	1	7	1	1	1	1	0.50	0.50
	2		1	0	1	0		
	3		1	1	1	0		
	4		1	0	1	1		
	5		1	1	1	0		
	6		1	1	1	1		
	7		1	0	1	0		
	8		1	1	1	1		
	9		1	0	1	0		
	10		1	1	1	0		
2	1	11	1	0	1	1	0.30	0.46
	2		1	0	1	1		
	3		1	0	1	1		
	4		1	0	1	0		
	5		1	0	1	0		
	6		1	0	1	1		
	7		1	0	1	0		
	8		1	0	1	0		
	9		1	1	1	1		
	10		1	0	1	0		
3	1	14	0	0	1	0	0.10	0.30
	2		1	0	1	0		
	3		1	0	1	0		
	4		1	0	1	0		
	5		1	0	1	0		
	6		1	0	1	0		
	7		1	0	1	1		
	8		1	0	1	0		
	9		0	0	1	0		
	10		1	0	1	1		
4	1	18	1	0	1	1	0.25	0.43
	2		0	0	0	0		
	3		1	0	1	1		
	4		1	0	1	0		
	5		1	0	1	0		
	6		1	0	1	0		
	7		1	0	1	1		
	8		1	0	1	1		
	9		1	0	1	0		
	10		1	0	1	1		

Tableau 11. État des adultes *R. grandis* (vivant=1, mort=0) au jour de leur retrait (succès=1, échec=0) des boîtes du lot assigné à l'étude de la cinétique de ponte sur *D. valens*. Taux de survie moyen et écart-type par série.

■ **Tableau 12 : masse des composés extraits dans chaque série au jour 1**

n°	Composés	Dm	DmRg	Dv	DvRg	Contrôle
1	[91+93+77+92+79]	0.16 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.02 ^a	0.37 ± 0.15 ^a	0.14 ± 0.04 ^a	0.12 ± 0.07 ^a
2	α-pinène	11.09 ± 2.84 ^a	8.79 ± 1.83 ^a	24.39 ± 7.87 ^a	11.99 ± 4.78 ^a	5.69 ± 2.97 ^a
3	camphène	0.41 ± 0.07 ^a	0.36 ± 0.07 ^a	0.89 ± 0.34 ^a	0.38 ± 0.14 ^a	0.35 ± 0.19 ^a
4	β-pinène	15.27 ± 3.97 ^a	12.16 ± 2.55 ^a	27.98 ± 8.7 ^a	16.24 ± 7.84 ^a	7.27 ± 3.97 ^a
5	myrcène	0.63 ± 0.24 ^{ab}	0.37 ± 0.11 ^{ab}	2.04 ± 0.84 ^a	0.99 ± 0.71 ^{ab}	0.05 ± 0.07 ^b
6	[91+39+77+41+93]	0.03 ± 0.04 ^a	0.01 ± 0.03 ^a	0.07 ± 0.03 ^a	0.05 ± 0.03 ^a	0.06 ± 0.08 ^a
7	3-carène	0.16 ± 0.03 ^a	0.14 ± 0.03 ^a	0.25 ± 0.09 ^a	0.11 ± 0.05 ^a	0.16 ± 0.09 ^a
8	p-cymène	0.44 ± 0.22 ^a	0.38 ± 0.2 ^a	1.32 ± 0.56 ^a	0.59 ± 0.3 ^a	0.2 ± 0.17 ^a
9	limonène	4.22 ± 1.04 ^a	3.34 ± 0.69 ^a	8.86 ± 2.83 ^a	5.31 ± 2.67 ^a	1.93 ± 1.13 ^a
10	[43+39+79+67+114]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
11	γ-terpinène	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.08 ± 0.06 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0 ± 0 ^a
	monoterpènes	32.39 ± 8.18^a	25.7 ± 5.32^a	66.25 ± 20.4^a	35.79 ± 16.19^a	15.84 ± 8.64^a
12	[85+41+39+43+55]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0.01 ^a
13	fenchone	0.07 ± 0.03 ^a	0.03 ± 0.02 ^a	0.25 ± 0.14 ^a	0.07 ± 0.05 ^a	0.03 ± 0.03 ^a
14	fenchol	0.03 ± 0.03 ^a	0 ± 0 ^a	0.15 ± 0.11 ^a	0.02 ± 0.03 ^a	0 ± 0 ^a
15	[93+91+77+108+67]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
16	[77+39+83+55+79]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
17	cis-verbénol	0.32 ± 0.12 ^a	0.18 ± 0.06 ^a	0.6 ± 0.32 ^a	0.23 ± 0.13 ^a	0.18 ± 0.11 ^a
18	camphre	0.21 ± 0.06 ^a	0.14 ± 0.02 ^a	0.29 ± 0.11 ^a	0.15 ± 0.07 ^a	0.22 ± 0.13 ^a
20	[55+39+41+83+95]	0.11 ± 0.04 ^a	0.04 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.09 ^a	0.09 ± 0.09 ^a	0.08 ± 0.04 ^a
21	[53+79+77+107+135]	0.22 ± 0.08 ^a	0.13 ± 0.03 ^a	0.38 ± 0.2 ^a	0.14 ± 0.08 ^a	0.11 ± 0.07 ^a
22	bornéol	0.03 ± 0.02 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.06 ^a	0.01 ± 0.03 ^a	0.03 ± 0.03 ^a
23	(isopinocampone (-14,7°))	0.1 ± 0.04 ^a	0.04 ± 0.01 ^a	0.16 ± 0.09 ^a	0.06 ± 0.06 ^a	0.09 ± 0.06 ^a
24	terpinène-4-ol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.07 ± 0.08 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
25	myrténal	0.02 ± 0.02 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.14 ^a	0.02 ± 0.04 ^a	0 ± 0 ^a
26	[93+95+91+67+121]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.03 ± 0.03 ^a	0 ± 0.01 ^a	0 ± 0 ^a
	monoterpènes oxygénés	1.11 ± 0.41^a	0.58 ± 0.14^a	2.37 ± 1.35^a	0.79 ± 0.56^a	0.73 ± 0.43^a
27	[119+105+91+79+77]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.03 ± 0.03 ^a	0 ± 0.01 ^a	0 ± 0 ^a
28	[105+91+79+119+77]	0.01 ± 0.02 ^a	0 ± 0 ^a	0.09 ± 0.06 ^a	0.02 ± 0.03 ^a	0 ± 0 ^a
29	[91+105+79+161+119]	0.26 ± 0.1 ^a	0.12 ± 0.06 ^a	0.6 ± 0.35 ^a	0.19 ± 0.2 ^a	0.16 ± 0.09 ^a
	sesquiterpènes	0.27 ± 0.11^a	0.12 ± 0.06^a	0.72 ± 0.44^a	0.22 ± 0.25^a	0.16 ± 0.09^a
	total terpénoïdes	33.77 ± 8.13^a	26.4 ± 5.4^a	69.35 ± 21.79^a	36.8 ± 16.93^a	16.74 ± 9.14^a

Tableau 12. Masse (µg) des composés, moyenne ± écart-type, dans chaque série au jour 1 de l'expérience principale. Les composés sont ordonnés par classe (monoterpènes, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes), avec la somme attribuée à chaque classe et le total des terpénoïdes. Le composé 19 est l'étalon interne, retiré des analyses statistiques. Les masses d'une même ligne ne différant pas significativement entre elles sont suivies par une même lettre : test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples *post-hoc* après Kruskal-Wallis.

■ **Tableau 13 : masse des composés extraits dans chaque série au jour 4**

n°	Composés	Dm	DmRg	Dv	DvRg	Contrôle
1	[91+93+77+92+79]	0.1 ± 0.04 ^{ab}	0.12 ± 0.03 ^{ab}	0.23 ± 0.15 ^a	0.11 ± 0.03 ^{ab}	0.01 ± 0.01 ^b
2	α-pinène	11.87 ± 1.14 ^{ab}	12.64 ± 3.34 ^{ab}	21.13 ± 11.7 ^a	12.96 ± 3.34 ^a	0.73 ± 0.17 ^b
3	camphène	0.3 ± 0.04 ^{ab}	0.34 ± 0.08 ^{ab}	0.57 ± 0.34 ^a	0.37 ± 0.1 ^{ab}	0.04 ± 0.03 ^b
4	β-pinène	14.77 ± 2.03 ^{ab}	16.44 ± 5.56 ^{ab}	21.6 ± 11.13 ^a	20.3 ± 6.71 ^a	0.82 ± 0.16 ^b
5	myrcène	0.38 ± 0.1 ^a	0.41 ± 0.25 ^a	0.67 ± 0.4 ^a	0.58 ± 0.35 ^a	0.01 ± 0.01 ^a
6	[91+39+77+41+93]	0.08 ± 0.14 ^a	0.05 ± 0.04 ^a	0.03 ± 0.04 ^a	0.04 ± 0.05 ^a	0 ± 0 ^a
7	3-carène	0.26 ± 0.09 ^a	0.23 ± 0.09 ^a	0.27 ± 0.11 ^a	0.16 ± 0.04 ^a	0.01 ± 0.01 ^a
8	p-cymène	0.4 ± 0.13 ^a	0.37 ± 0.2 ^a	0.65 ± 0.51 ^a	0.65 ± 0.43 ^a	0.06 ± 0.03 ^a
9	limonène	5.72 ± 1.66 ^{ab}	5.17 ± 1.88 ^{ab}	7.09 ± 3.28 ^a	6.36 ± 2.51 ^{ab}	0.37 ± 0.1 ^b
10	[43+39+79+67+114]	0.18 ± 0.11 ^a	0.17 ± 0.12 ^a	0.14 ± 0.12 ^a	0.25 ± 0.15 ^a	0.12 ± 0.1 ^a
11	γ-terpinène	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	monoterpènes	34.05 ± 4.49^{ab}	35.93 ± 11.26^{ab}	52.38 ± 27.26^a	41.78 ± 13.14^a	2.17 ± 0.57^b
12	[85+41+39+43+55]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.02 ± 0.02 ^a
13	fenchone	0.03 ± 0.03 ^a	0.03 ± 0.02 ^a	0.07 ± 0.08 ^a	0.04 ± 0.04 ^a	0.05 ± 0.04 ^a
14	fenchol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.01 ± 0.03 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
15	[93+91+77+108+67]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
16	[77+39+83+55+79]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.01 ± 0 ^a
17	cis-verbénol	0.4 ± 0.12 ^a	0.33 ± 0.14 ^a	0.41 ± 0.4 ^a	0.31 ± 0.19 ^a	0.04 ± 0.03 ^a
18	camphre	0.51 ± 0.18 ^a	0.33 ± 0.06 ^a	1.06 ± 0.9 ^a	1 ± 0.39 ^a	0.08 ± 0.06 ^a
20	[55+39+41+83+95]	0.24 ± 0.06 ^a	0.15 ± 0.03 ^a	0.31 ± 0.26 ^a	0.3 ± 0.11 ^a	0.03 ± 0.02 ^a
21	[53+79+77+107+135]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
22	bornéol	0.29 ± 0.07 ^a	0.2 ± 0.09 ^a	0.12 ± 0.16 ^a	0.16 ± 0.09 ^a	0 ± 0 ^a
23	(isopinocampone (-14,7°))	0.56 ± 0.17 ^a	0.37 ± 0.09 ^a	0.6 ± 0.53 ^a	0.44 ± 0.14 ^a	0.14 ± 0.05 ^a
24	terpinène-4-ol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
25	myrténal	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
26	[93+95+91+67+121]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	monoterpènes oxygénés	2.03 ± 0.56^a	1.4 ± 0.36^a	2.59 ± 2.33^a	2.24 ± 0.87^a	0.38 ± 0.19^a
27	[119+105+91+79+77]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.03 ± 0.05 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0 ± 0 ^a
28	[105+91+79+119+77]	0.05 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.1 ± 0.12 ^a	0.05 ± 0.05 ^a	0.01 ± 0.01 ^a
29	[91+105+79+161+119]	0.45 ± 0.09 ^a	0.33 ± 0.08 ^a	0.79 ± 0.79 ^a	0.49 ± 0.26 ^a	0.14 ± 0.04 ^a
	sesquiterpènes	0.5 ± 0.1^a	0.36 ± 0.09^a	0.93 ± 0.96^a	0.56 ± 0.33^a	0.14 ± 0.05^a
	total terpénoïdes	36.58 ± 4.97^{ab}	37.69 ± 11.62^{ab}	55.89 ± 29.81^a	44.58 ± 13.71^a	2.69 ± 0.8^b

Tableau 13. Masse (µg) des composés, moyenne ± écart-type, dans chaque série au jour 4 de l'expérience principale. Les composés sont ordonnés par classe (monoterpènes, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes), avec la somme attribuée à chaque classe et le total des terpénoïdes. Le composé 19 est l'étalon interne, retiré des analyses statistiques. Les masses d'une même ligne ne différant pas significativement entre elles sont suivies par une même lettre : test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples *post-hoc* après Kruskal-Wallis.

■ **Tableau 14 : masse des composés extraits dans chaque série au jour 7**

n°	Composés	Dm	DmRg	Dv	DvRg	Contrôle
1	[91+93+77+92+79]	0.09 ± 0.03 ^{ab}	0.06 ± 0.03 ^{ab}	0.22 ± 0.14 ^a	0.08 ± 0.06 ^{ab}	0 ± 0 ^b
2	α-pinène	12.24 ± 2.47 ^{ab}	6.9 ± 3.41 ^{ab}	24.91 ± 14.36 ^a	12.11 ± 3.92 ^a	0.53 ± 0.2 ^b
3	camphène	0.27 ± 0.08 ^{ab}	0.18 ± 0.08 ^{ab}	0.69 ± 0.46 ^a	0.33 ± 0.1 ^{ab}	0.02 ± 0.01 ^b
4	β-pinène	12.95 ± 3.91 ^{ab}	6.29 ± 3.14 ^{ab}	23.48 ± 16.86 ^a	17.95 ± 5.01 ^a	0.51 ± 0.17 ^b
5	myrcène	0.19 ± 0.16 ^a	0.03 ± 0.06 ^a	0.62 ± 0.54 ^a	0.4 ± 0.19 ^a	0 ± 0 ^a
6	[91+39+77+41+93]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.04 ± 0.08 ^a	0.11 ± 0.07 ^a	0 ± 0 ^a
7	3-carène	0.27 ± 0.05 ^{ab}	0.16 ± 0.08 ^{ab}	0.4 ± 0.14 ^a	0.19 ± 0.03 ^{ab}	0 ± 0 ^b
8	p-cymène	0.15 ± 0.18 ^a	0.01 ± 0.03 ^a	0.81 ± 0.83 ^a	0.55 ± 0.28 ^a	0 ± 0 ^a
9	limonène	4.2 ± 1.28 ^{ab}	1.95 ± 0.84 ^{ab}	8.22 ± 5.18 ^a	5.83 ± 1.79 ^a	0.06 ± 0.03 ^b
10	[43+39+79+67+114]	0.03 ± 0.04 ^a	0.06 ± 0.06 ^a	0.03 ± 0.04 ^a	0.08 ± 0.08 ^a	0.07 ± 0.07 ^a
11	γ-terpinène	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	monoterpènes	30.4 ± 7.06^{ab}	15.65 ± 7.49^{ab}	59.43 ± 37.42^a	37.63 ± 9.96^a	1.2 ± 0.4^b
12	[85+41+39+43+55]	0 ± 0 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
13	fenchone	0.02 ± 0.02 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.07 ^a	0.05 ± 0.03 ^a	0 ± 0 ^a
14	fenchol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
15	[93+91+77+108+67]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
16	[77+39+83+55+79]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
17	cis-verbénol	0.17 ± 0.16 ^a	0.09 ± 0.09 ^a	0.16 ± 0.17 ^a	0.07 ± 0.07 ^a	0 ± 0 ^a
18	camphre	1.02 ± 0.32 ^{ab}	0.52 ± 0.24 ^{ab}	2.8 ± 1.61 ^a	2.04 ± 0.54 ^a	0.09 ± 0.06 ^b
20	[55+39+41+83+95]	0.29 ± 0.09 ^{ab}	0.13 ± 0.07 ^{ab}	0.51 ± 0.31 ^a	0.41 ± 0.14 ^a	0.02 ± 0.01 ^b
21	[53+79+77+107+135]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
22	bornéol	0.28 ± 0.05 ^a	0.12 ± 0.07 ^a	0.22 ± 0.19 ^a	0.17 ± 0.06 ^a	0 ± 0 ^a
23	(isopinocampone (-14,7°))	0.87 ± 0.29 ^a	0.4 ± 0.17 ^a	1.16 ± 0.68 ^a	0.76 ± 0.16 ^a	0.09 ± 0.05 ^a
24	terpinène-4-ol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
25	myrténal	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
26	[93+95+91+67+121]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	monoterpènes oxygénés	2.65 ± 0.82^{ab}	1.28 ± 0.57^{ab}	4.92 ± 2.99^a	3.5 ± 0.93^a	0.19 ± 0.11^b
27	[119+105+91+79+77]	0.01 ± 0.01 ^a	0 ± 0 ^a	0.01 ± 0.03 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0 ± 0 ^a
28	[105+91+79+119+77]	0.05 ± 0.03 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0.09 ± 0.08 ^a	0.04 ± 0.04 ^a	0 ± 0 ^a
29	[91+105+79+161+119]	0.55 ± 0.18 ^{ab}	0.23 ± 0.12 ^{ab}	0.85 ± 0.58 ^a	0.44 ± 0.26 ^{ab}	0.03 ± 0.02 ^b
	sesquiterpènes	0.61 ± 0.21^{ab}	0.24 ± 0.14^{ab}	0.95 ± 0.68^a	0.48 ± 0.3^{ab}	0.03 ± 0.02^b
	total terpénoïdes	33.66 ± 7.8^{ab}	17.17 ± 8^{ab}	65.3 ± 40.22^a	41.61 ± 10.81^a	1.42 ± 0.45^b

Tableau 14. Masse (µg) des composés, moyenne ± écart-type, dans chaque série au jour 7 de l'expérience principale. Les composés sont ordonnés par classe (monoterpènes, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes), avec la somme attribuée à chaque classe et le total des terpénoïdes. Le composé 19 est l'étalon interne, retiré des analyses statistiques. Les masses d'une même ligne ne différant pas significativement entre elles sont suivies par une même lettre : test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples *post-hoc* après Kruskal-Wallis.

▪ **Tableau 15 : masse des composés extraits dans chaque série au jour 11**

n°	Composés	Dm	DmRg	Dv	DvRg	Contrôle
1	[91+93+77+92+79]	0.05 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.04 ^a	0.09 ± 0.05 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.03 ^a
2	α-pinène	7.91 ± 3.43 ^a	4.91 ± 4.02 ^a	11.53 ± 5.1 ^a	4.47 ± 1.23 ^a	3.15 ± 3.16 ^a
3	camphène	0.2 ± 0.06 ^a	0.17 ± 0.14 ^a	0.36 ± 0.14 ^a	0.24 ± 0.14 ^a	0.12 ± 0.11 ^a
4	β-pinène	7.84 ± 4.88 ^a	4.59 ± 3.89 ^a	9.9 ± 4.28 ^a	5.6 ± 2.31 ^a	3.01 ± 3.04 ^a
5	myrcène	0.27 ± 0.21 ^a	0.13 ± 0.15 ^a	0.32 ± 0.28 ^a	0.13 ± 0.13 ^a	0.08 ± 0.16 ^a
6	[91+39+77+41+93]	0.01 ± 0.02 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
7	3-carène	0.16 ± 0.11 ^a	0.07 ± 0.04 ^a	0.2 ± 0.1 ^a	0.11 ± 0.04 ^a	0.03 ± 0.05 ^a
8	p-cymène	0.28 ± 0.17 ^a	0.11 ± 0.17 ^a	0.46 ± 0.29 ^a	0.07 ± 0.12 ^a	0 ± 0 ^a
9	limonène	3.25 ± 1.84 ^a	1.66 ± 1.21 ^a	3.85 ± 1.81 ^a	1.91 ± 1.09 ^a	0.38 ± 0.65 ^a
10	[43+39+79+67+114]	0 ± 0 ^a	0.02 ± 0.03 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.18 ± 0.22 ^a
11	γ-terpinène	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	monoterpènes	19.98 ± 10.61^a	11.72 ± 9.65^a	26.73 ± 11.4^a	12.56 ± 4.33^a	6.96 ± 7.14^a
12	[85+41+39+43+55]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
13	fenchone	0.09 ± 0.04 ^{ab}	0.05 ± 0.03 ^{ab}	0.15 ± 0.08 ^a	0.08 ± 0.04 ^{ab}	0 ± 0 ^b
14	fenchol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
15	[93+91+77+108+67]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
16	[77+39+83+55+79]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
17	cis-verbénol	0.21 ± 0.35 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0.01 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
18	camphre	0.78 ± 0.36 ^a	0.51 ± 0.16 ^a	2.29 ± 0.94 ^a	1.38 ± 0.4 ^a	0.56 ± 0.13 ^a
20	[55+39+41+83+95]	0.29 ± 0.17 ^a	0.13 ± 0.05 ^a	0.45 ± 0.17 ^a	0.28 ± 0.1 ^a	0.08 ± 0.04 ^a
21	[53+79+77+107+135]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0.01 ^a	0 ± 0 ^a
22	bornéol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.01 ± 0.03 ^a
23	(isopinocampone (-14,7°))	1.03 ± 0.59 ^a	0.47 ± 0.16 ^a	1.12 ± 0.41 ^a	0.52 ± 0.12 ^a	0.4 ± 0.17 ^a
24	terpinène-4-ol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
25	myrténal	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
26	[93+95+91+67+121]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	monoterpènes oxygénés	2.4 ± 1.5^a	1.16 ± 0.4^a	4.01 ± 1.58^a	2.26 ± 0.63^a	1.06 ± 0.3^a
27	[119+105+91+79+77]	0.04 ± 0.05 ^a	0 ± 0 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
28	[105+91+79+119+77]	0.08 ± 0.1 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.04 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0 ± 0 ^a
29	[91+105+79+161+119]	0.62 ± 0.49 ^a	0.19 ± 0.1 ^a	0.54 ± 0.23 ^a	0.18 ± 0.16 ^a	0.12 ± 0.07 ^a
	sesquiterpènes	0.74 ± 0.64^a	0.2 ± 0.11^a	0.6 ± 0.28^a	0.19 ± 0.18^a	0.12 ± 0.07^a
	total terpénoïdes	23.12 ± 12.31^a	13.08 ± 10.1^a	31.34 ± 12.61^a	15 ± 4.89^a	8.13 ± 7.26^a

Tableau 15. Masse (µg) des composés, moyenne ± écart-type, dans chaque série au jour 11 de l'expérience principale. Les composés sont ordonnés par classe (monoterpènes, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes), avec la somme attribuée à chaque classe et le total des terpénoïdes. Le composé 19 est l'étalon interne, retiré des analyses statistiques. Les masses d'une même ligne ne différant pas significativement entre elles sont suivies par une même lettre : test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples *post-hoc* après Kruskal-Wallis.

■ **Tableau 16 : masse des composés extraits dans chaque série au jour 14**

n°	Composés	Dm	DmRg	Dv	DvRg	Contrôle
1	[91+93+77+92+79]	0.07 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.06 ^a	0.08 ± 0.11 ^a	0.05 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.01 ^a
2	α-pinène	9.65 ± 2.49 ^a	12.48 ± 6.96 ^a	10.41 ± 8.96 ^a	5.42 ± 1.57 ^a	2.44 ± 1.31 ^a
3	camphène	0.29 ± 0.11 ^{ab}	0.53 ± 0.24 ^{ab}	0.38 ± 0.34 ^{ab}	0.58 ± 0.3 ^a	0.08 ± 0.04 ^b
4	β-pinène	11.76 ± 3.07 ^a	14.02 ± 8.77 ^a	8.65 ± 7.68 ^a	3.98 ± 1.31 ^a	2.21 ± 0.97 ^a
5	myrcène	0.2 ± 0.22 ^a	0.38 ± 0.63 ^a	0.05 ± 0.14 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
6	[91+39+77+41+93]	0.05 ± 0.1 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
7	3-carène	0.37 ± 0.05 ^a	0.23 ± 0.12 ^{ab}	0.21 ± 0.25 ^{ab}	0.01 ± 0.02 ^b	0 ± 0 ^b
8	p-cymène	0 ± 0 ^a	0.1 ± 0.21 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
9	limonène	4.39 ± 1.13 ^a	3.93 ± 2.04 ^a	2.22 ± 2.38 ^a	0.73 ± 0.39 ^a	0.15 ± 0.13 ^a
10	[43+39+79+67+114]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.02 ± 0.05 ^a	0 ± 0 ^a	0.06 ± 0.12 ^a
11	γ-terpinène	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.01 ± 0.04 ^a	0 ± 0 ^a
	monoterpènes	26.79 ± 6.19^a	31.78 ± 18.34^a	22.02 ± 19.06^a	10.79 ± 3.29^a	4.95 ± 2.44^a
12	[85+41+39+43+55]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
13	fenchone	0 ± 0 ^a	0.02 ± 0.04 ^a	0.12 ± 0.29 ^a	0.06 ± 0.05 ^a	0 ± 0.01 ^a
14	fenchol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
15	[93+91+77+108+67]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
16	[77+39+83+55+79]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
17	cis-verbénol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
18	camphre	1.51 ± 0.36 ^a	1.56 ± 0.53 ^a	4.17 ± 5.08 ^a	2.9 ± 0.44 ^a	0.46 ± 0.05 ^a
20	[55+39+41+83+95]	0.49 ± 0.16 ^a	0.33 ± 0.12 ^a	0.66 ± 0.72 ^a	0.51 ± 0.22 ^a	0.06 ± 0.02 ^a
21	[53+79+77+107+135]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
22	bornéol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.01 ± 0.02 ^a
23	(isopinocampone (-14,7°))	1.49 ± 0.43 ^a	1.24 ± 0.5 ^a	1.74 ± 1.91 ^a	1.06 ± 0.2 ^a	0.29 ± 0.13 ^a
24	terpinène-4-ol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
25	myrténal	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
26	[93+95+91+67+121]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	monoterpènes oxygénés	3.49 ± 0.95^{ab}	3.14 ± 1.16^{ab}	6.69 ± 7.98^{ab}	4.53 ± 0.83^a	0.82 ± 0.17^b
27	[119+105+91+79+77]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
28	[105+91+79+119+77]	0.01 ± 0.03 ^a	0 ± 0 ^a	0.03 ± 0.09 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
29	[91+105+79+161+119]	0.55 ± 0.2 ^a	0.35 ± 0.22 ^a	0.6 ± 0.9 ^a	0.28 ± 0.13 ^a	0.02 ± 0.02 ^a
	sesquiterpènes	0.57 ± 0.23^a	0.35 ± 0.22^a	0.63 ± 0.98^a	0.28 ± 0.13^a	0.02 ± 0.02^a
	total terpénoïdes	30.85 ± 6.03^a	35.28 ± 19.22^a	29.33 ± 27.28^a	15.6 ± 3.94^a	5.8 ± 2.5^a

Tableau 16. Masse (µg) des composés, moyenne ± écart-type, dans chaque série au jour 14 de l'expérience principale. Les composés sont ordonnés par classe (monoterpènes, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes), avec la somme attribuée à chaque classe et le total des terpénoïdes. Le composé 19 est l'étalon interne, retiré des analyses statistiques. Les masses d'une même ligne ne différant pas significativement entre elles sont suivies par une même lettre : test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples *post-hoc* après Kruskal-Wallis.

■ **Tableau 17 : masse des composés extraits dans chaque série au jour 18**

n°	Composés	Dm	DmRg	Dv	DvRg	Contrôle
1	[91+93+77+92+79]	0.07 ± 0.04 ^a	0.1 ± 0.06 ^a	0.04 ± 0.04 ^a	0.03 ± 0.04 ^a	0.07 ± 0.05 ^a
2	α-pinène	6.77 ± 2.14 ^a	6.49 ± 3.91 ^a	5.1 ± 3.08 ^a	1.76 ± 1.67 ^a	7.24 ± 5.26 ^a
3	camphène	0.33 ± 0.11 ^a	0.56 ± 0.35 ^a	0.31 ± 0.17 ^a	0.31 ± 0.2 ^a	0.24 ± 0.17 ^a
4	β-pinène	7.5 ± 2.19 ^a	5.9 ± 3.37 ^a	3.71 ± 2.69 ^a	1.32 ± 1.45 ^a	7.48 ± 6.46 ^a
5	myrcène	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
6	[91+39+77+41+93]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
7	3-carène	0.17 ± 0.1 ^a	0.09 ± 0.08 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0 ± 0 ^a	0.08 ± 0.17 ^a
8	p-cymène	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
9	limonène	2.43 ± 0.78 ^a	1.7 ± 1.2 ^a	0.44 ± 0.43 ^a	0.07 ± 0.22 ^a	1.29 ± 1.75 ^a
10	[43+39+79+67+114]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0.03 ± 0.09 ^a	0.1 ± 0.09 ^a
11	γ-terpinène	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	monoterpènes	17.28 ± 5.06^a	14.84 ± 8.89^a	9.61 ± 6.25^a	3.51 ± 3.48^a	16.51 ± 13.78^a
12	[85+41+39+43+55]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
13	fenchone	0.09 ± 0.11 ^a	0.06 ± 0.07 ^a	0.12 ± 0.14 ^a	0.14 ± 0.14 ^a	0.02 ± 0.04 ^a
14	fenchol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
15	[93+91+77+108+67]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
16	[77+39+83+55+79]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
17	cis-verbénol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
18	camphre	2.56 ± 1.14 ^a	1.86 ± 0.66 ^a	4.16 ± 2.34 ^a	2.31 ± 1.14 ^a	0.98 ± 0.18 ^a
20	[55+39+41+83+95]	0.64 ± 0.25 ^a	0.34 ± 0.12 ^a	0.72 ± 0.37 ^a	0.54 ± 0.29 ^a	0.18 ± 0.09 ^a
21	[53+79+77+107+135]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
22	bornéol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
23	(isopinocampone (-14,7°))	2.14 ± 0.66 ^a	1.37 ± 0.48 ^a	1.73 ± 0.84 ^a	1.07 ± 0.45 ^a	0.59 ± 0.23 ^a
24	terpinène-4-ol	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
25	myrténal	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
26	[93+95+91+67+121]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	monoterpènes oxygénés	5.44 ± 2.13^a	3.63 ± 1.32^a	6.74 ± 3.64^a	4.05 ± 1.96^a	1.77 ± 0.47^a
27	[119+105+91+79+77]	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
28	[105+91+79+119+77]	0.04 ± 0.09 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.06 ^a	0 ± 0 ^a
29	[91+105+79+161+119]	0.81 ± 0.6 ^a	0.32 ± 0.22 ^a	0.65 ± 0.4 ^a	0.56 ± 0.53 ^a	0.09 ± 0.06 ^a
	sesquiterpènes	0.86 ± 0.69^a	0.33 ± 0.23^a	0.65 ± 0.41^a	0.58 ± 0.58^a	0.09 ± 0.06^a
	total terpénoïdes	23.58 ± 7.15^a	18.8 ± 10.13^a	17 ± 8.8^a	8.14 ± 5.68^a	18.37 ± 14.16^a

Tableau 17. Masse (µg) des composés, moyenne ± écart-type, dans chaque série au jour 18 de l'expérience principale. Les composés sont ordonnés par classe (monoterpènes, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes), avec la somme attribuée à chaque classe et le total des terpénoïdes. Le composé 19 est l'étalon interne, retiré des analyses statistiques. Les masses d'une même ligne ne différant pas significativement entre elles sont suivies par une même lettre : test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples *post-hoc* après Kruskal-Wallis.

Figure 11 : Évolution de la masse des monoterpènes dans les séries

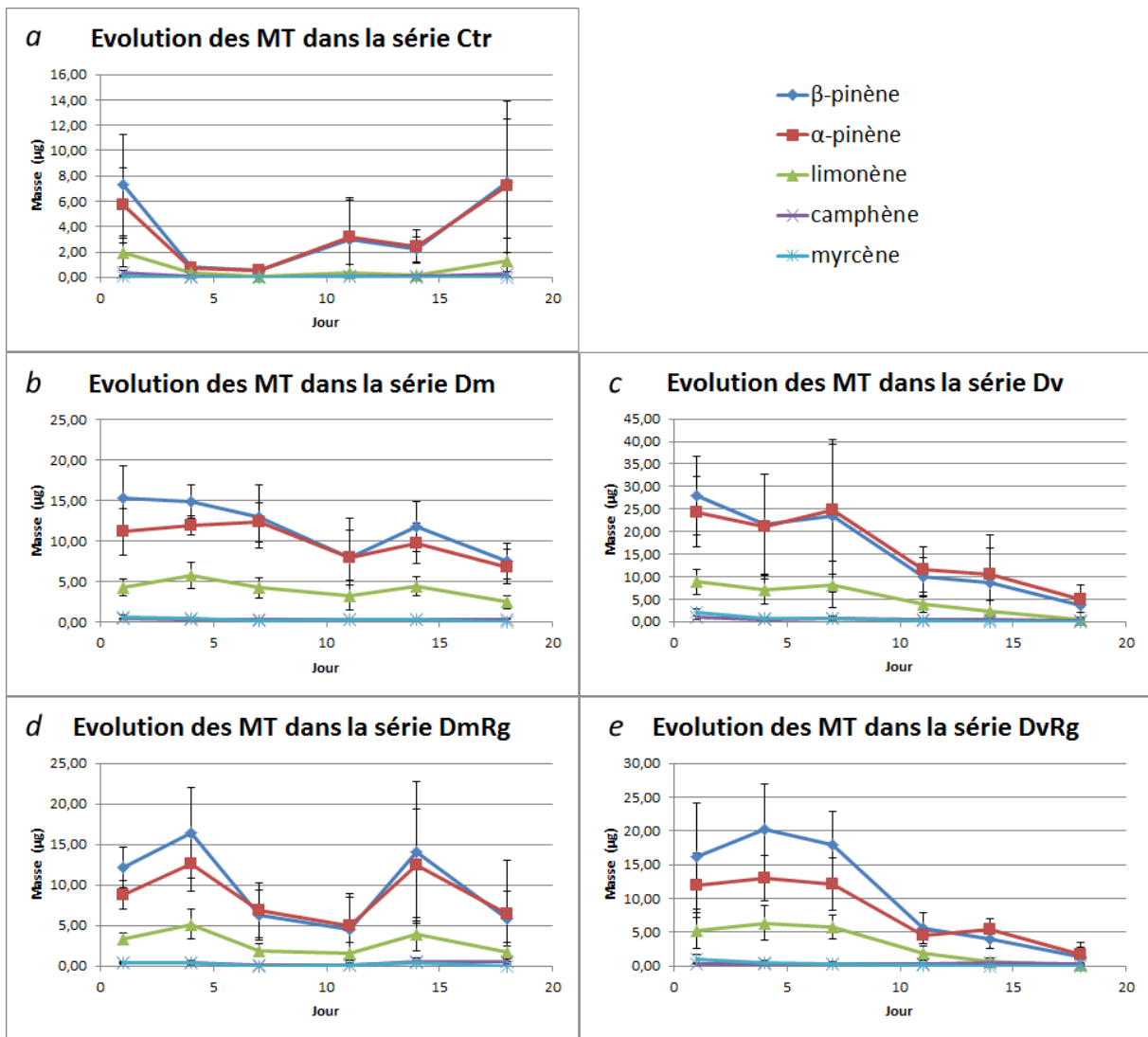


Figure 11. Masse (µg) des monoterpènes (MT) principaux, au cours des jours 1 à 18 d'extraction de l'expérience principale, dans les séries (a, Ctr) contrôle, (b, Dm) *D. micans* seul, (c, Dv) *D. valens* seul, (d, DmRg) *D. micans* avec *R. grandis*, et (e, DvRg) *D. valens* avec *R. grandis* : moyenne ± écart-type.

Figure 12 : Évolution de la masse des monoterpènes oxygénés dans les séries

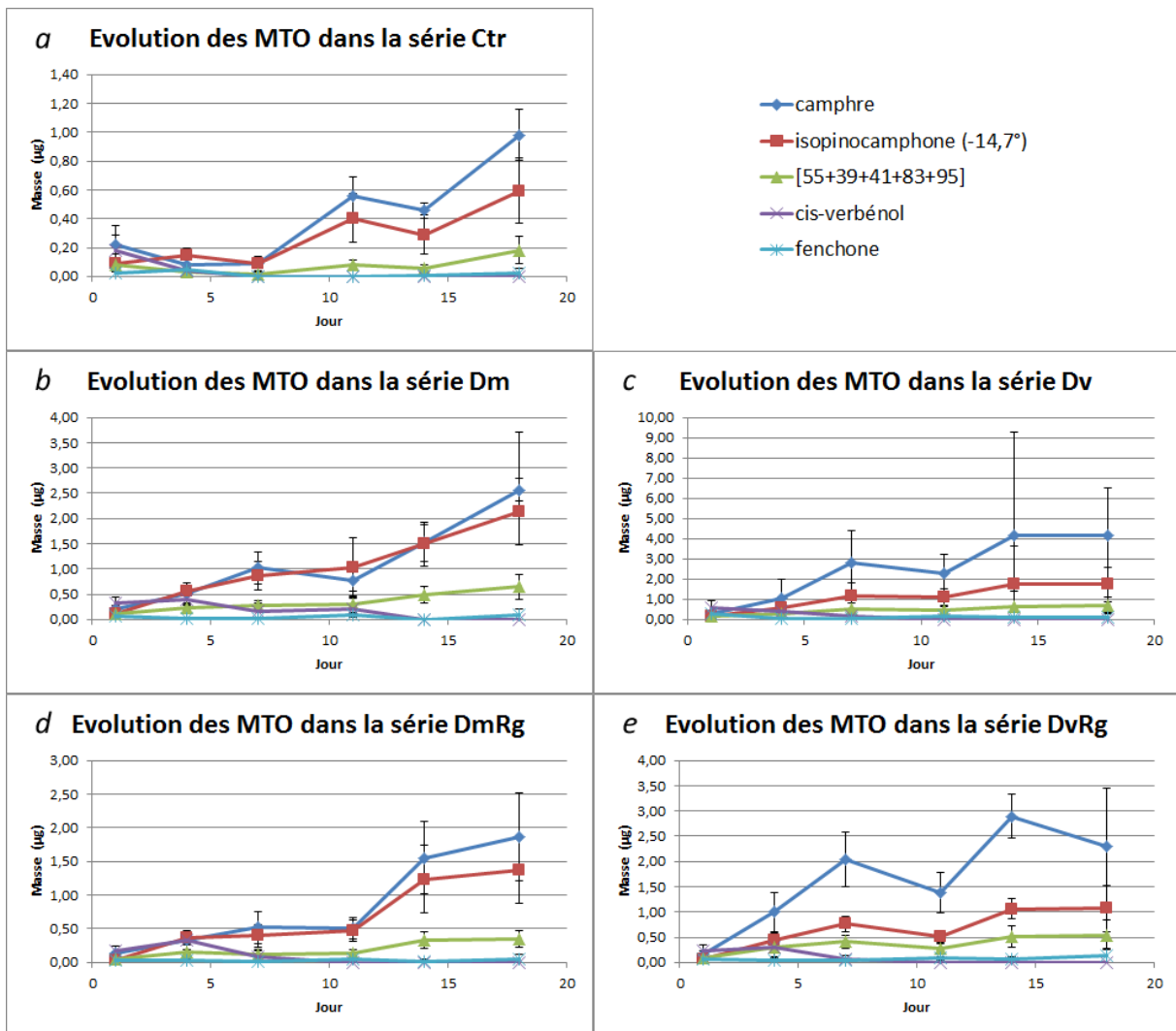


Figure 12. Masse (µg) des monoterpènes oxygénés (MTO) principaux, au cours des jours 1 à 18 d'extraction de l'expérience principale, dans les séries (a, Ctr) contrôle, (b, Dm) *D. micans* seul, (c, Dv) *D. valens* seul, (d, DmRg) *D. micans* avec *R. grandis*, et (e, DvRg) *D. valens* avec *R. grandis* : moyenne ± écart-type.

Figure 13 : Évolution de la masse des sesquiterpènes dans les séries

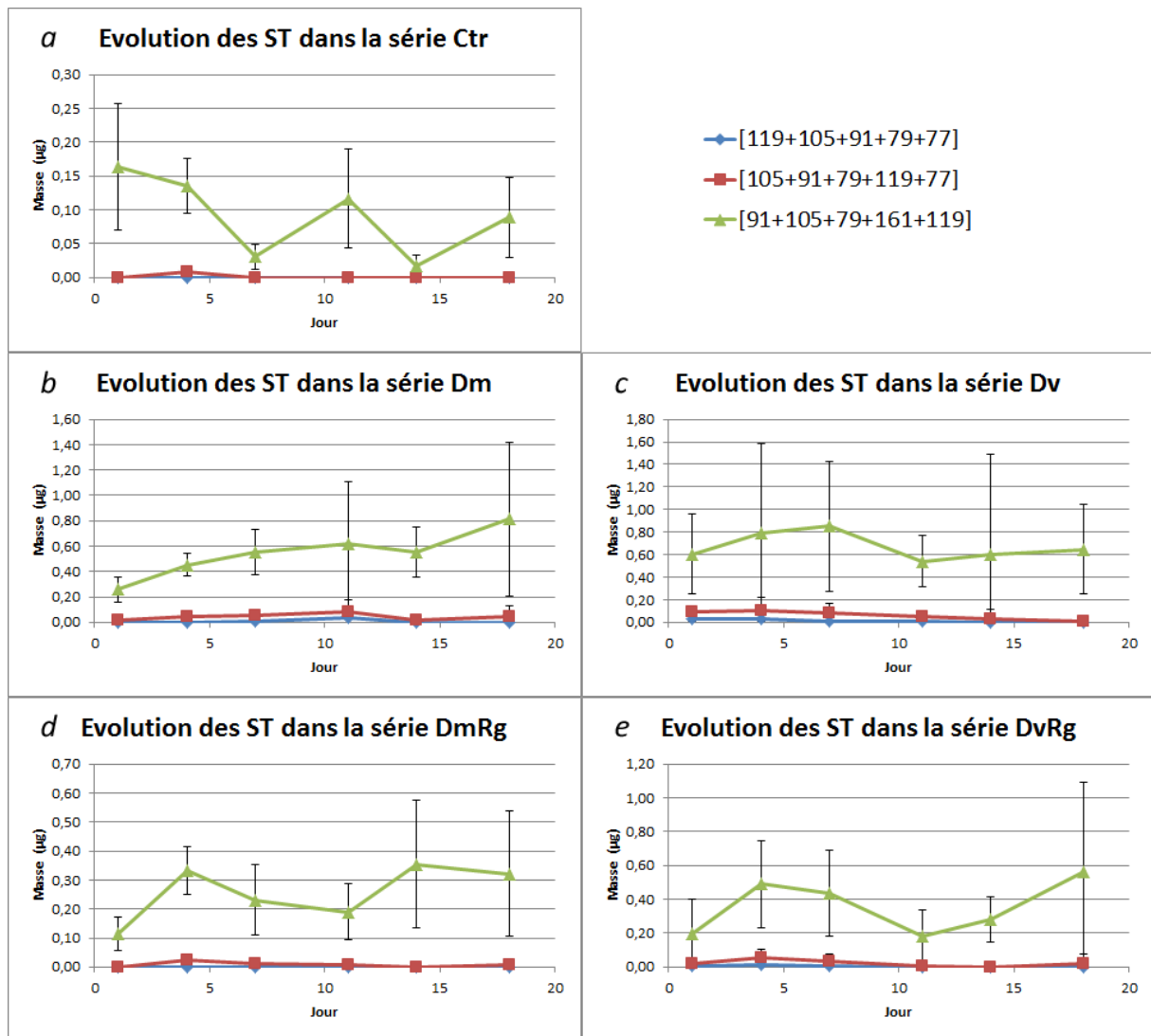


Figure 13. Masse (μg) des sesquiterpènes (ST), au cours des jours 1 à 18 d'extraction de l'expérience principale, dans les séries (a, Ctr) contrôle, (b, Dm) *D. micans* seul, (c, Dv) *D. valens* seul, (d, DmRg) *D. micans* avec *R. grandis*, et (e, DvRg) *D. valens* avec *R. grandis* : moyenne \pm écart-type.

Figure 14 : Évolution de la masse totale des terpénoïdes dans les séries

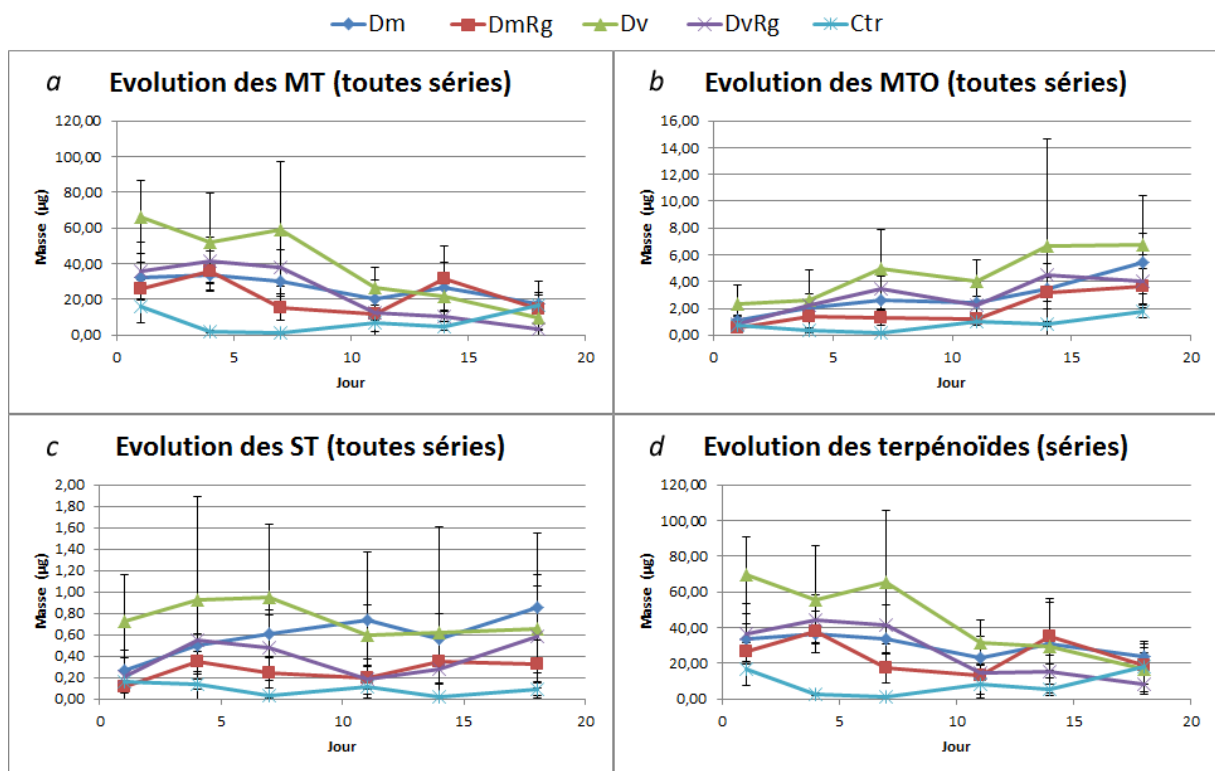


Figure 14. Masse (μg) des (a, MT) monoterpènes, (b, MTO) monoterpènes oxygénés, (c, ST) sesquiterpènes, et (d) masse totale des terpénoïdes, au cours des jours 1 à 18 d'extraction de l'expérience principale, par série : moyenne \pm écart-type. (Ctr) contrôle, (Dm) *D. micans*, (Dv) *D. valens*, (Rg) *R. grandis*.

■ **Figure 15 : Score- et loadingplots de l'ACP sur les masses extraites : jour 1 :**

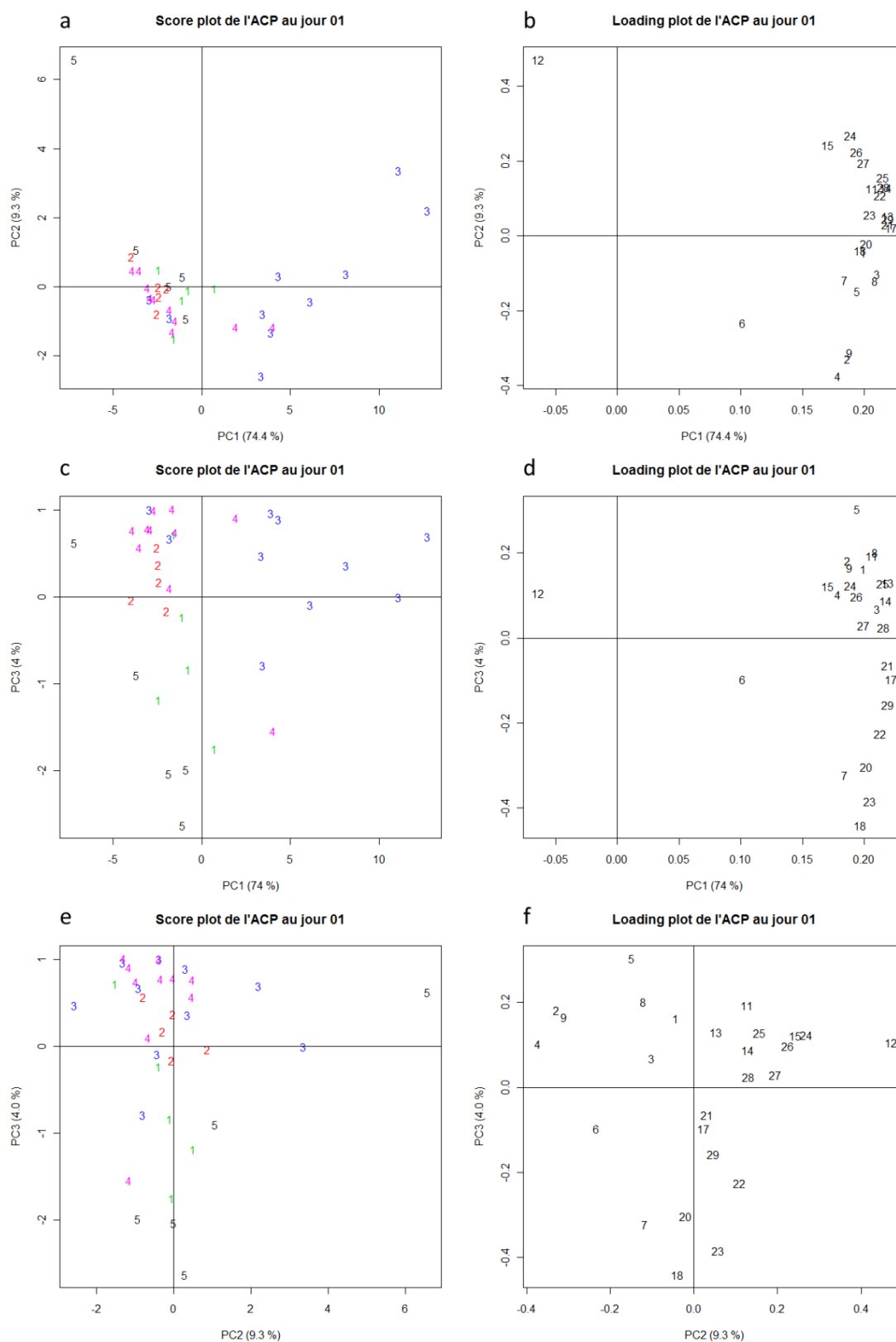


Figure 15. Score- (a, c, e) et loadingplots (b, d, f) des ACP sur la masse des composés extraits au jour 1 de l'expérience principale, suivant les composantes principales (PC) 1 et 2 (a, b), 1 et 3 (c, d), 2 et 3 (e, f) avec la proportion de la variabilité expliquée entre parenthèses. Sur les scoreplots, les numéros identifient les séries chimiques : (1, vert) *D. micans*, (2, rouge) *D. micans* avec *R. grandis*, (3, bleu) *D. valens*, (4, mauve) *D. valens* avec *R. grandis*, (5, noir) contrôle. Sur les loadingplots, les numéros renvoient aux composés du tableau 9.

■ **Figure 16 : Score- et loadingplots de l'ACP sur les masses extraites : jour 4 :**

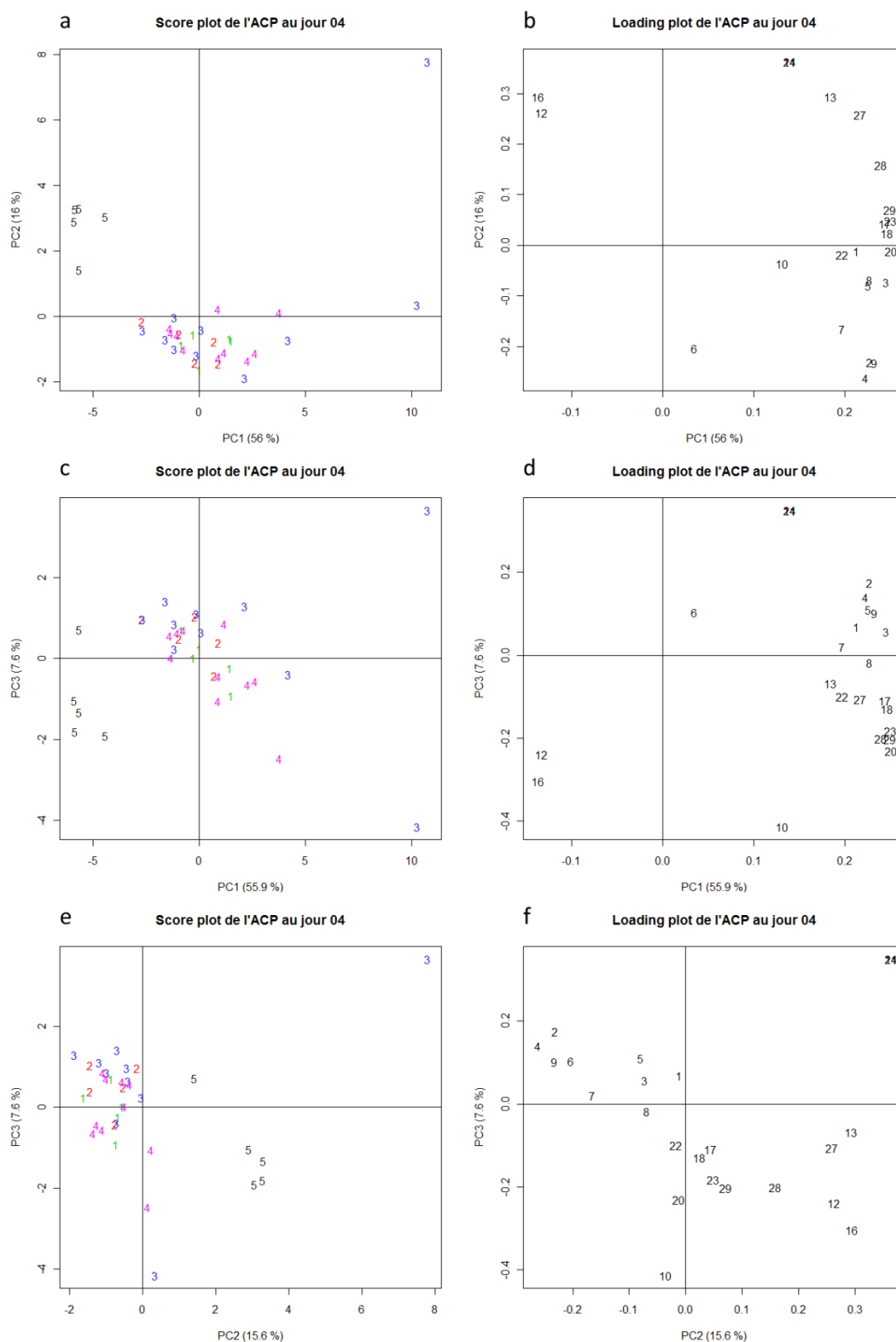


Figure 16. Score- (a, c, e) et loadingplots (b, d, f) des ACP sur la masse des composés extraits au jour 4 de l'expérience principale, suivant les composantes principales (PC) 1 et 2 (a, b), 1 et 3 (c, d), 2 et 3 (e, f) avec la proportion de la variabilité expliquée entre parenthèses. Sur les scoreplots, les numéros identifient les séries chimiques : (1, vert) *D. micans*, (2, rouge) *D. micans* avec *R. grandis*, (3, bleu) *D. valens*, (4, mauve) *D. valens* avec *R. grandis*, (5, noir) contrôle. Sur les loadingplots, les numéros renvoient aux composés du tableau 9.

■ **Figure 17 : Score- et loadingplots de l'ACP sur les masses extraites : jour 7 :**

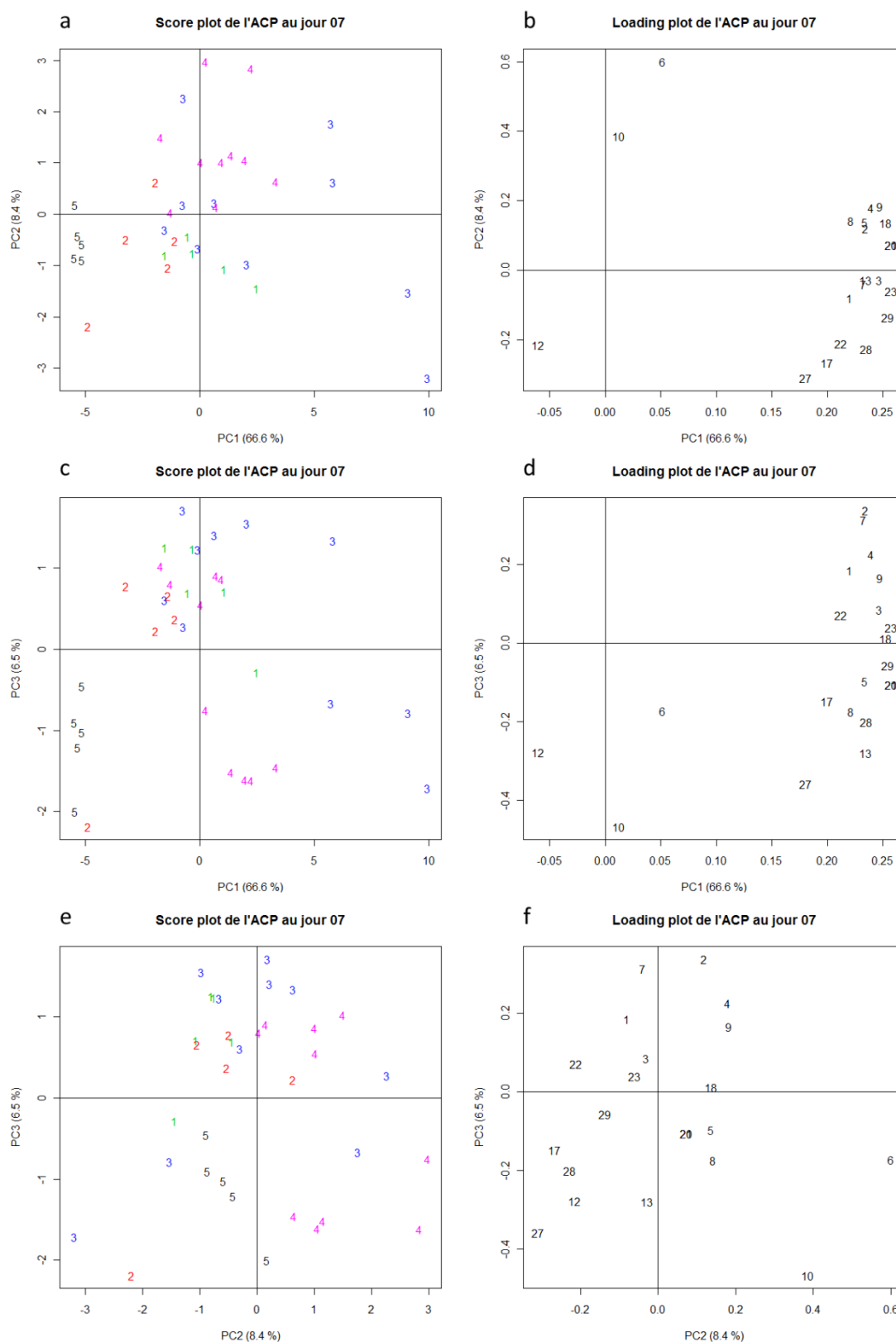


Figure 17. Score- (a, c, e) et loadingplots (b, d, f) des ACP sur la masse des composés extraits au jour 7 de l'expérience principale, suivant les composantes principales (PC) 1 et 2 (a, b), 1 et 3 (c, d), 2 et 3 (e, f) avec la proportion de la variabilité expliquée entre parenthèses. Sur les scoreplots, les numéros identifient les séries chimiques : (1, vert) *D. micans*, (2, rouge) *D. micans* avec *R. grandis*, (3, bleu) *D. valens*, (4, mauve) *D. valens* avec *R. grandis*, (5, noir) contrôle. Sur les loadingplots, les numéros renvoient aux composés du tableau 9.

■ **Figure 18 : Score- et loadingplots de l'ACP sur les masses extraites : jour 11 :**

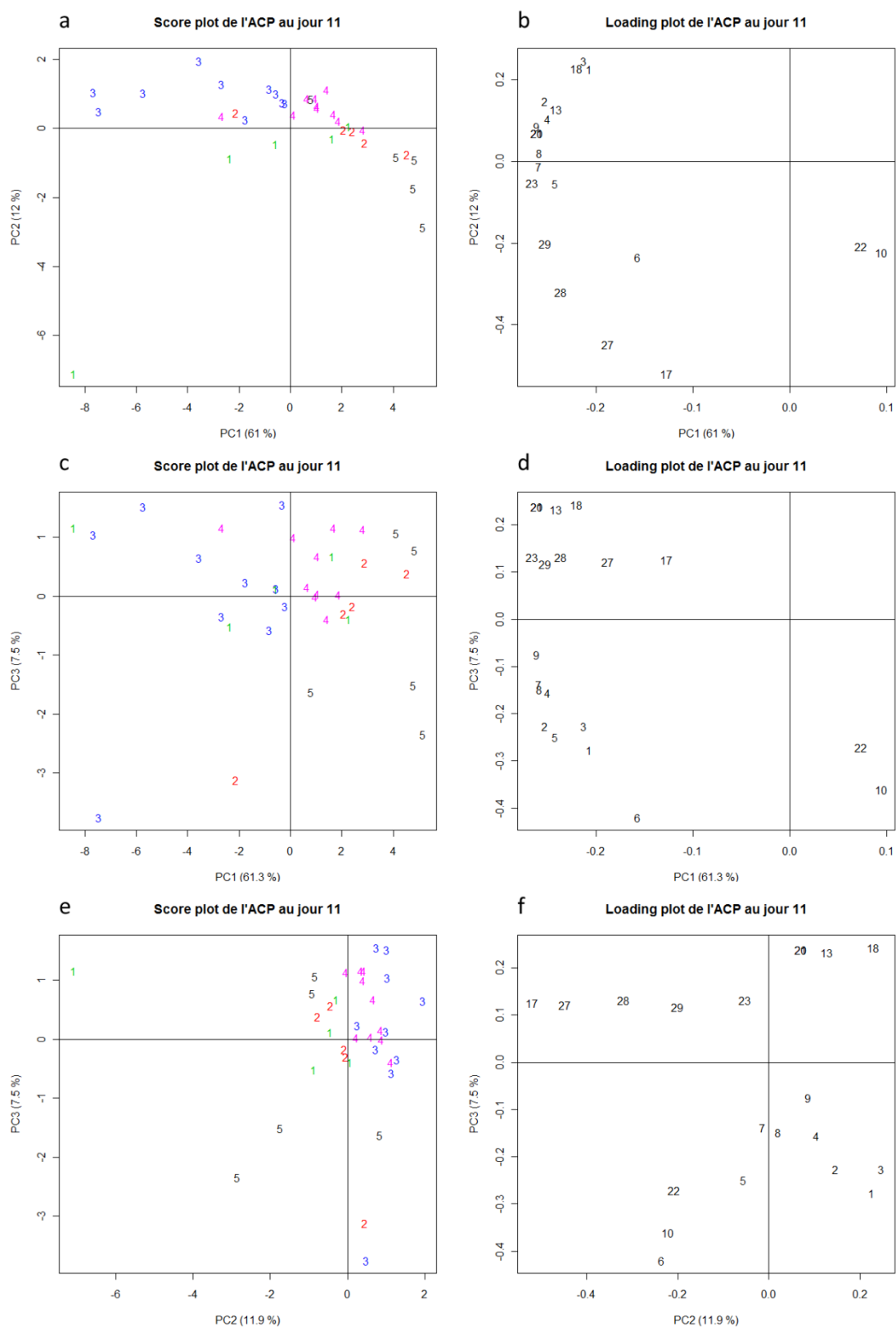


Figure 18. Score- (a, c, e) et loadingplots (b, d, f) des ACP sur la masse des composés extraits au jour 11 de l'expérience principale, suivant les composantes principales (PC) 1 et 2 (a, b), 1 et 3 (c, d), 2 et 3 (e, f) avec la proportion de la variabilité expliquée entre parenthèses. Sur les scoreplots, les numéros identifient les séries chimiques : (1, vert) *D. micans*, (2, rouge) *D. micans* avec *R. grandis*, (3, bleu) *D. valens*, (4, mauve) *D. valens* avec *R. grandis*, (5, noir) contrôle. Sur les loadingplots, les numéros renvoient aux composés du tableau 9.

■ **Figure 19 : Score- et loadingplots de l'ACP sur les masses extraites : jour 14 :**

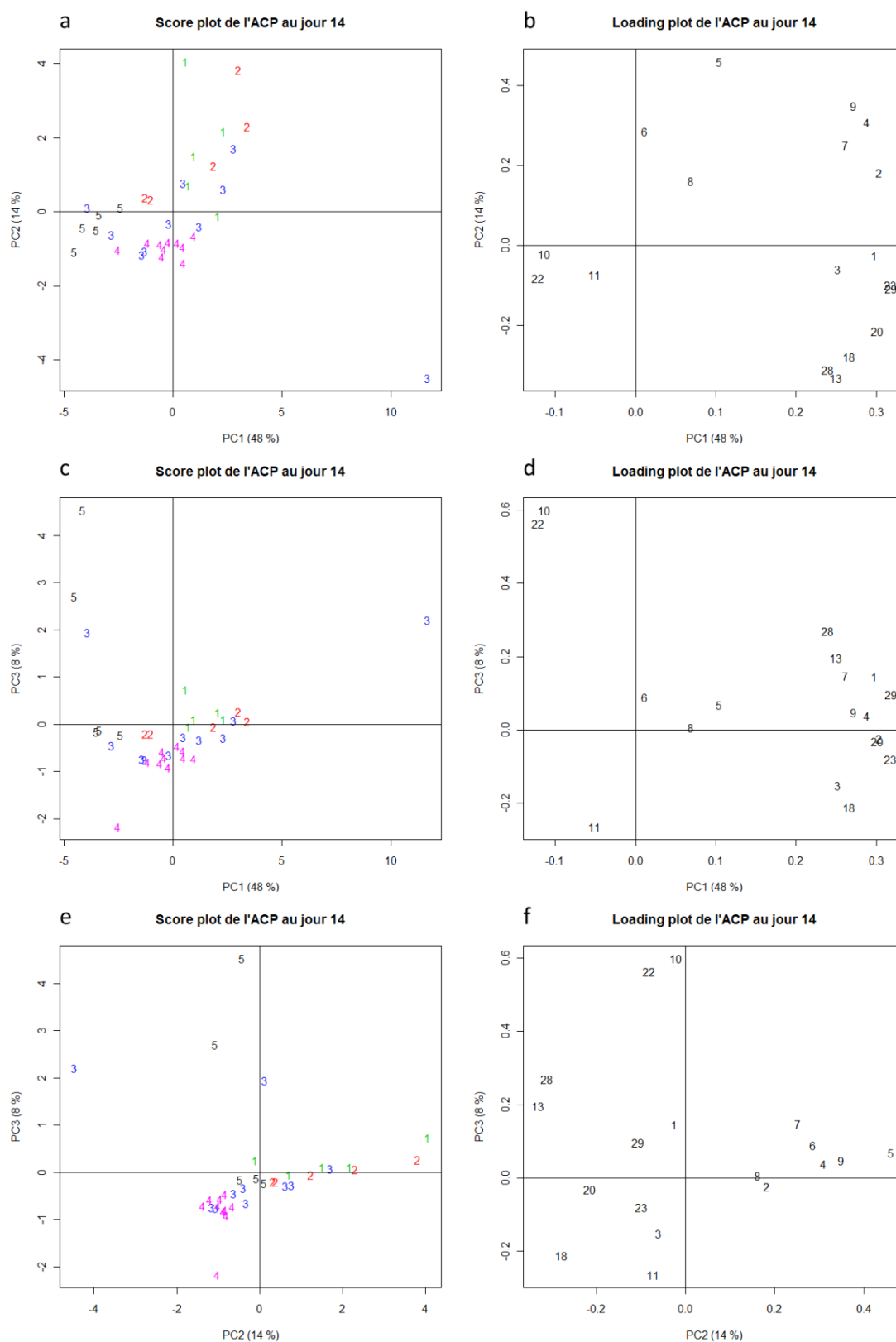


Figure 19. Score- (a, c, e) et loadingplots (b, d, f) des ACP sur la masse des composés extraits au jour 14 de l'expérience principale, suivant les composantes principales (PC) 1 et 2 (a, b), 1 et 3 (c, d), 2 et 3 (e, f) avec la proportion de la variabilité expliquée entre parenthèses. Sur les scoreplots, les numéros identifient les séries chimiques : (1, vert) *D. micans*, (2, rouge) *D. micans* avec *R. grandis*, (3, bleu) *D. valens*, (4, mauve) *D. valens* avec *R. grandis*, (5, noir) contrôle. Sur les loadingplots, les numéros renvoient aux composés du tableau 9.

■ **Figure 20 : Score- et loadingplots de l'ACP sur les masses extraites : jour 18 :**

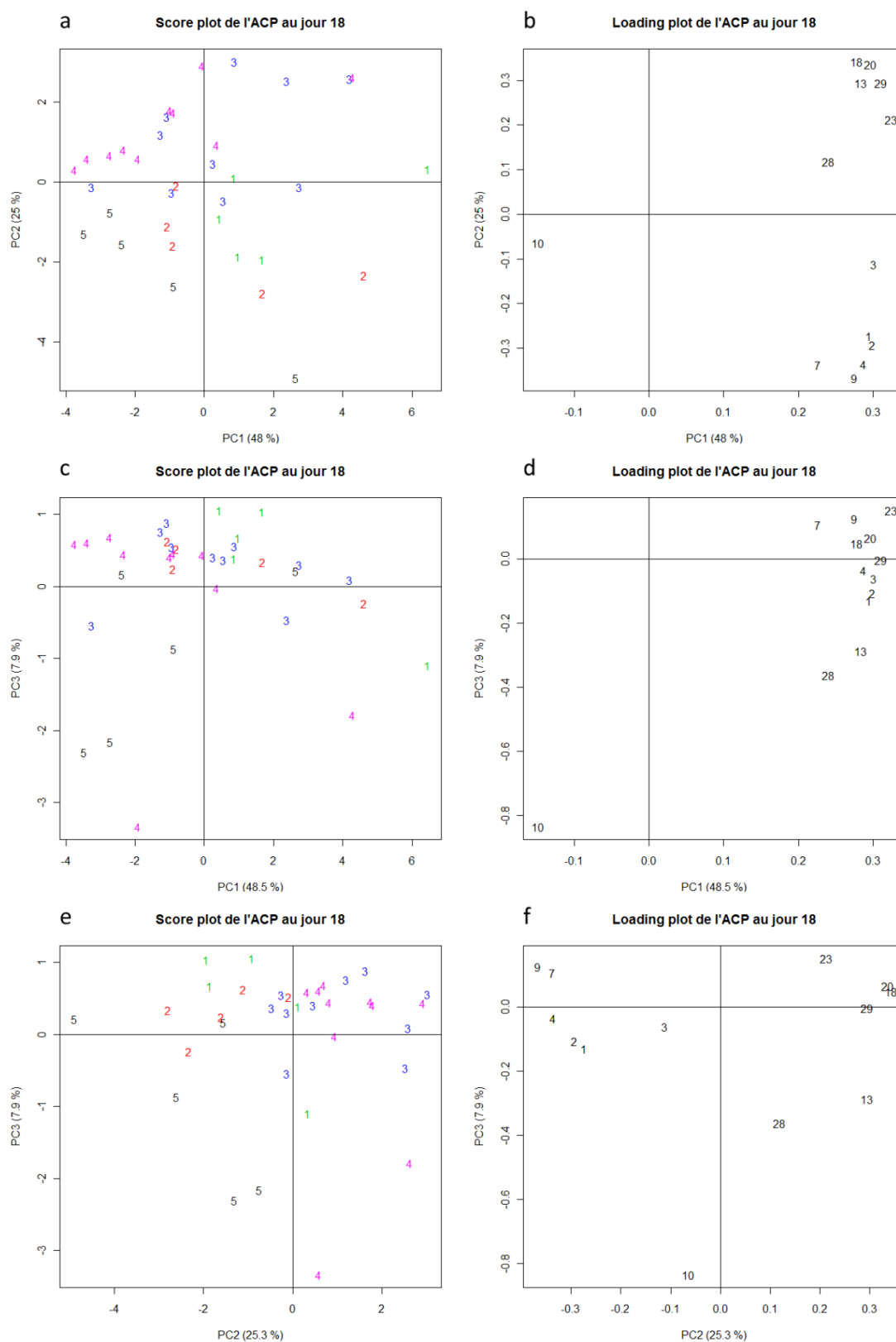


Figure 20. Score- (a, c, e) et loadingplots (b, d, f) des ACP sur la masse des composés extraits au jour 18 de l'expérience principale, suivant les composantes principales (PC) 1 et 2 (a, b), 1 et 3 (c, d), 2 et 3 (e, f) avec la proportion de la variabilité expliquée entre parenthèses. Sur les scoreplots, les numéros identifient les séries chimiques : (1, vert) *D. micans*, (2, rouge) *D. micans* avec *R. grandis*, (3, bleu) *D. valens*, (4, mauve) *D. valens* avec *R. grandis*, (5, noir) contrôle. Sur les loadingplots, les numéros renvoient aux composés du tableau 9.