



Modulation de la manipulation du peuplier par le puceron lanigère, *Phloeomyzus passerinii* (Sign.), via la résistance de l'hôte et l'environnement

France Dardeau

► To cite this version:

France Dardeau. Modulation de la manipulation du peuplier par le puceron lanigère, *Phloeomyzus passerinii* (Sign.), via la résistance de l'hôte et l'environnement. Sylviculture, foresterie. Université d'Orléans, 2014. Français. <NNT : 2014ORLE2054>. <tel-01240284>

HAL Id: tel-01240284

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01240284>

Submitted on 9 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES LIGNEUX ET DES GRANDES CULTURES

THÈSE présentée par :

France DARDEAU

soutenue le : **8 décembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Physiologie et Biologie des organismes, populations et interactions /
Biologie Forestière

**Modulation de la manipulation du peuplier par le
puceron lanigère, *Phloeomyzus passerinii* (Sign.),
via la résistance de l'hôte et l'environnement**

THÈSE dirigée par :

François LIEUTIER

Professeur, Université d'Orléans

Co-encadrée par :

Aurélien SALLE

Maître de Conférences, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Paul-André CALATAYUD

Chargé de Recherche, IRD / CNRS

Anne-Marie CORTESERO

Professeure, Université de Rennes 1 / INRA

JURY :

Yvan RAHBE

Président du jury, Directeur de Recherche, INRA de Lyon

Paul-André CALATAYUD

Chargé de Recherche, IRD / CNRS

Anne-Marie CORTESERO

Professeure, Université de Rennes 1 / INRA

David GIRON

Chargé de Recherche, Université François Rabelais / CNRS

Marie-Odile JORDAN

Chargée de Recherche, INRA d'Avignon

François LIEUTIER

Professeur, Université d'Orléans

Aurélien SALLE

Maître de Conférences, Université d'Orléans

Steeve THANY

Professeur, Université d'Orléans

- REMERCIEMENTS -

Je remercie tout d'abord **Paul-André CALATAYUD**, **Anne-Marie CORTESERO**, **Marie-Odile JORDAN**, **David GIRON**, **Yvan RAHBE** et **Steeve THANY** d'avoir accepté de faire partie du jury qui a évalué mon travail de thèse. Merci d'avoir fait aboutir ces quelques années de travail en une journée de soutenance aussi enrichissante qu'agréable. Grâce à vos remarques et questions, j'ai pu non seulement améliorer ce pavé que vous vous êtes donné la peine d'éplucher, mais aussi de réaliser concrètement en quoi ces travaux ont apporté leur pierre à un édifice très prometteur. Ce serait un plaisir et un honneur de collaborer un jour avec vous pour vous rendre la pareille.

Je remercie le Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche pour le financement de mes expériences et déplacements pendant cette thèse. Je remercie le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche pour la bourse ayant permis de financer 3 années de mon salaire.

Merci à **Franck BRIGNOLAS** de m'avoir accueillie dans son laboratoire (nom de code LBLGC) pendant ces quelques années. Merci pour tes conseils et tes encouragements en amont de cette aventure, lorsqu'il s'agissait d'obtenir l'indispensable bourse ministérielle. Merci aussi pour les conseils en écophysio et pour avoir lancé la rénovation de l'open space où il fait désormais bon vivre.

Merci à **François LIEUTIER** de m'avoir accueillie dans son équipe et d'avoir contribué à l'obtention des fonds nécessaires à nos travaux de recherche et à leur diffusion de par le monde. Merci pour ton enthousiasme permanent, ton imagination prolifique et tes encouragements. Merci également pour tes précieux enseignements en écologie de façon générale, mais plus particulièrement sur les relations plantes-insectes. Tes cours étaient comme des récits d'aventure partout sur notre planète, donnant envie de sortir le nez dehors et de mieux comprendre les grands et minuscules phénomènes qui nous entourent. Un jour un vieux (si peu) sage m'a dit à propos du boulot : « il y a 24h dans une journée et 7 jours dans une semaine ». J'ajouterai juste que c'est plus facile à retenir qu'à appliquer, mais que tu es un bel exemple du credo qui dit que quand on aime on ne compte pas et de ce qu'on est capable de soulever comme montagne quand on a la passion pour la recherche !

Mille milliards de Mercis (au moins) à toi, **Aurélien SALLE**, pour ta contribution à ces travaux de recherche, ta motivation infinie, ta patience à toutes épreuves, ta vivacité

d'esprit, tes connaissances, tes idées par milliers, tes pointes d'humour inattendues... Sans toi nous n'aurions peut-être pas vu aussi grand et cette thèse n'aurait pas été si riche en expériences. Merci de m'avoir pressée pour aller en Corée, ce pays génial du matin calme, pour un chef calme et génial du soir au matin, enfin presque... Tu as toujours été présent pour ma thèse quand j'en ai eu besoin, que ce soit pour trancher sur la mise au point des expériences, pour mettre la main à la pâte dans les gros rushs, pour la formation en stats, pour la paperasse et surtout dans les relectures certainement pénibles d'une novice qui n'ose pas se lancer dans la rédaction... Tu m'as dit un jour que « le thésard finit toujours par détester son chef », et bien c'est raté ! Bon ok je t'ai peut-être parfois un peu maudit quand la fatigue et/ou le stress se faisait sentir mais je ne pense pas t'avoir un jour haï, car tu as trop fait pour moi pour mériter ça et je ne l'oublierai pas ! Bref, Merci de n'avoir jamais rien lâché pour que ces années soient les plus productives possibles, et Merci pour la liberté et la confiance que tu m'as accordées à bien des niveaux. Merci d'avoir quand même toujours gardé un œil sur mes avancées, éloignant ainsi certainement ce que certains considèrent comme la tristement célèbre « poisse du thésard ». Cette première thèse en tant que chef s'est à mon goût plutôt bien déroulée si on fait la moyenne des hauts et des bas, et j'espère que c'est comme ça qu'en faisant le bilan dans quelques années tu t'en souviendras.

Un Merci tout particulier à **Elodie DEPROST**, ma golden binôme chérie, sans qui je n'écrirais sûrement pas ces mots pour bien des raisons. Tout d'abord notre rencontre en première année de Licence a changé ma vie et rendu ces années d'étude si agréables que je n'ai pas pu m'arrêter... Merci pour tous les bons moments, toutes les fois où on se complétait à merveille, et tout simplement pour ton amitié. Je n'oublie pas non plus le plan B avec les algues et les abeilles en Bretagne, one day maybe, qui sait !? Tu es une femme géniale que je respecte beaucoup et qui mérite d'être connue. En tout cas tu as tout à fait ta place dans ce mémoire car je te remercie d'avoir courageusement défriché la partie histo avant mon arrivée. Tu m'as fait gagner du temps dans la mise au point et j'ai pu le consacrer à d'autres choses et donc aller plus loin. Mercyyy Lodyyy !

Merci à tous ceux qui se sont directement impliqués dans ce travail de thèse, que ce soit pour un jour ou quelques mois. Rien ne vaut le travail d'équipe quand ça se passe en toute confiance, et là-dessus j'ai eu très souvent de la chance. Je vais tenter de n'oublier personne mais j'espère que sinon ça passera inaperçu...

Commençons par tous ceux qui sont passés dans notre équipe d'Entomologie Forestière et qui ont apporté leur pierre à l'édifice. Tout d'abord, Merci à **Sophie POINTEAU** pour avoir écrit ce qui aura été ma Bible avec toutes tes découvertes qui sont un peu les fondations de mes travaux. Merci de m'avoir fourni un tas d'outils pour mieux comprendre cette petite puceronne méconnue. Merci pour les bons moments aux journées du BAPOA et à Amiens, ton aide en EPQ, ton côté simple et vrai souvent insoupçonné quand tu es la tête

dans le guidon au boulot mais qui m'aura bien fait rire. Merci à **Jean-Claude VALA** pour avoir fait entrer *Phloeomyzus passerinii* dans nos thématiques de recherche, pour tes cours sur le rhum qui mettent l'eau à la bouche et pour ton accent chaleureux qui donne envie de visiter la Guadeloupe. Merci à **Stéphanie BANKHEAD** pour ton entrain et toutes les informations que tu m'as transmises. Merci à **Alexane BERTHIER** avec qui j'ai passé beaucoup de temps dans la chaleur humide des serres et leur doux bruit permanent de ventilation. Ce n'était pas la manip la plus facile de ma thèse, autant au niveau organisation que physiquement. Tu as pourtant toujours été d'humeur égale et agréable, consciencieuse, très vite autonome et je ne t'en remercierai jamais assez. J'ai cru bien des fois que je n'arriverais pas à gérer cette jungle de peupliers aux multiples besoins et toutes les mesures constantes, mais grâce à ton aide précieuse on s'en est sorti. Tu étais LA femme de la situation. Je te souhaite de trouver vite un boulot à la hauteur de ton mérite. Merci à **Thomas AUFFRAY**, mon petit padawan devenu grand. Tu as sauvé mes nerfs pendant la manip hyper speed et stressante des coupes fraîches en proposant ton aide. Quelle bonne idée tu as eu de faire un stage sans y être obligé ! Merci pour la réparation expresse du microtome à glissière, pour les délires quasi constants tout en travaillant durement et pour ton dévouement. Merci à **Alain QUICHARD** pour avoir bichonné mes plants de peuplier à merveille, pour avoir eu souvent pitié de mes sécateurs et leur avoir rendu plusieurs vies, pour tes conseils en horticulture qui me serviront à jamais et m'ont donné la passion du bouturage, et Merci tout simplement pour tes petits airs malicieux et tes petites attentions avec les habitants de l'openspace.

Merci aux autres petites fourmis passées dans l'équipe qui ont apporté leur petite touche à ces travaux : **Pénélope ANSELLE**, **Adeline MANCEAU**, **David De FERAUDY**, et **Florie MIARD** et **Thibault FIDEL**, car les petits ruisseaux font les grandes rivières. Comme la recherche et l'enseignement c'est aussi un soutien technique de tous les jours, Merci à **Carine MARTIN** pour tout ce temps passé ensemble en TP où tu me facilitais la vie, toutes les fois où j'ai squatté ton ordi pour X raisons, tous les fous rires avec les perles de nos chers étudiants, tes missions à la cafétéria quand c'était la course. Merci aussi à **Xavier PINEAU**, ce grand fou passionné inarrêtable quand il s'agit d'en prendre plein les yeux en observant des insectes. Merci pour tout ce que tu m'as appris en taxo, les bons moments en tp avec les étudiants qui découvrent de « nouvelles » espèces, les tp Loiret où tu n'oubliais pas d'emmener le soleil. Merci pour nos échanges de dosettes bien pratiques et pour m'avoir fait découvrir les Maxi-galettes aux amandes.

Continuons par les collègues de l'UR Amélioration Génétique et Physiologie Forestières de l'INRA d'Orléans, car il ne faut pas oublier que j'y ai passé beaucoup de temps. Merci donc à **Françoise LAURANS** pour tout ce que tu m'as appris en histologie, pour tes conseils techniques quand un colorant refusait subitement de fonctionner pour des raisons inconnues, pour tes encouragements et ton aide administrative imprévue.

Merci pour ta bienveillance et ton organisation digne du mécanisme d'une horloge. Merci à **Alain MOREAU** pour mon initiation à l'ultramicrotome et pour tes petits trucs de bricolage qui facilitent la vie dans les phases méticuleuses d'histo. Merci à **Véronique LAINE** pour sa contribution dans les dernières coupes et colorations, pour ton envie d'avancer qui te pousse à toujours vouloir découvrir et en faire plus et pour sa capacité inégalée de « fée du logis » (oui un labo et un logis ne sont pas si éloignés en thèse). Merci pour ta gentillesse et ton sourire permanents.

Merci à **Patrick POURSAT** et toute sa « bande » de l'UE de l'INRA pour nous avoir permis d'utiliser la grande serre 22 et avoir rempli un sacré paquet de pots avec du sable. Merci pour ta réactivité lors de l'installation du système d'irrigation et surtout pendant les récurrentes pannes électriques qui se sont accumulées pendant une petite période maudite. Merci aussi à ma chère **Patricia MONTES** car tu m'as facilité la vie à de nombreuses reprises par ta réactivité et ta bienveillance.

J'ai eu la chance de pouvoir découvrir d'autres laboratoires et des techniques complémentaires grâce à des personnes passionnées qui ont bien voulu me donner un peu de leur temps. Merci donc à **Arnaud AMELINE** et **Anas CHERQUI** de l'unité EDYSAN d'Amiens. Merci à **Mélanie BODY**, **David GIRON** et **Jean-Philippe CHRISTIDES** de l'IRBI de Tours. Merci à **Stéphane MORTEAU** et **Céline MONTECOT** de l'INEM d'Orléans. Merci aussi à **Marie-Hélène SAUGE** et **Benoît MARÇAIS** pour leur participation à mon comité de thèse de mi-parcours.

Enfin, bien d'autres personnes m'ont accompagnée dans cette aventure professionnelle, mais aussi humaine. Un Merki spécial à **Mister Mic Givère** (Richard Bouceffa), mon confident, mon ex-pote de clope dont je suis fière, le sublimateur de blagues volées, ma tata de la piscine, le meilleur juke-box de tous les temps, le mec avec qui un seul regard suffit pour se comprendre, malgré les accidents oculaires... Je ne me suis pas permis de ne pas te dire Merci pour ton humour, ton exemple d'intégrité, tes Marabouceffaseries clairvoyantes, ton autodérision, toutes les personnes que tu m'as permis de rencontrer, tes encouragements, ton organe vocal impressionnant... Bref, Merci mon ami ! Merci à **Daniel AUQUIN**, pour ton école de la vie dans le vortex temporel. J'ai hâte de voir le one man show du futur, même si j'en connais déjà sûrement toutes les anecdotes, mais elles sont si bien racontées qu'on ne s'en lasse pas. Merci aussi pour tes réponses en biochimie, toujours très claires et immédiates. Merci de m'avoir fait connaître un tas de valeurs numériques et de modes de fonctionnement de molécules de la vie de tous les jours, même si je n'ai pas tout retenu. Merci enfin pour tes séances de psy gratuites.

Merci à mes ex-compères doctorants du LBLGC, dans l'ordre de disparition (pour ne pas dire de vieillesse). Merci à **Clément LAFON-PLACETTE**, mon compère d'organisation

d'événements en tous genres (enfin quand même pas, vous méprenez pas !) et de journées à deux au labo pendant les vacances, voir la nuit... Merci pour tous les bons moments, le monde refait dans l'escalier, ton ouverture d'esprit, tes cours 'histoire de KKG, tes tartines apéros hautes en couleurs, ze concert, les coups de main pour les potentiels hydriques, etc... Merci à **Claire HEBRAD** pour tes succulents gâteaux, les tea times et ta petite touche de naïveté rigolote, mais aussi pour avoir initié le rituel de la piscine qui nous fait tellement de bien. Merci à **Lucie BERTHEAU**, un véritable exemple pour tout thésard qui en veut. Merci pour ton sens de l'humour insoupçonné, tes conseils, tes coups de motiv à nettoyer ce labo de fond en comble représentatifs de ta capacité à tout donner sans jamais rien demander. Je ne regrette qu'une chose, qu'on ne soit pas connues avant...

Merci aussi aux doctorants qui restent après moi et que j'ai eu la chance de croiser, cette fois dans l'ordre d'apparition. Merci à **Justine QUET** pour les cafés de 16h entre deux minuteurs qui permettaient de faire une pause courte mais intense pour mieux finir la journée entre le microtome et le microscope. Merci ensuite pour toute la fin de thèse où tu as été un sacré soutien moral car la plus à même de comprendre et aussi juste parce que tu me fais tellement rire ma vieille fouine. Merci et bon courage à **Inès DJEGHDIR** et **Anne-Laure LE GAC**. Pour vous l'aventure commence, je ne peux que vous conseiller de profiter de la « chance » d'être doctorantes pour vous ouvrir à la connaissance, aux gens et tout simplement à vous-même. Merci ma Barbreïzh pour tes petites attentions quand j'ai sombré dans la zombitude des derniers jours de rédaction, et pour toutes les autres avant aussi...

Merci à tous les membres du LBLGC qui avant d'être des collègues ont été mes profs et ont donc permis indirectement mon arrivée au labo. Merci donc à **Domenico MORABITO** pour ton horoscope du tonnerre, ton humour décalé, et tous les étudiants que tu nous as ramenés. Merci à toi pour ces quelques moments privilégiés que nous as offerts. Merci à **Sabine CARPIN** pour ton sourire au beau fixe, tes petites attentions qui m'ont grandement touchée, et pour ce fameux punch si bon mais si traître... Merci à **Christiane DEPIERREUX** pour les meilleurs Pithiviers du coin et tes autres attentions culinaires régulières, à **François HERICOURT** pour tes leçons de mots fléchés et tes supers Comté, à **Cécile VINCENT-BARBAROUX** pour ta gentillesse et ton calme apaisant, à **Stéphane MAURY** pour tes métaphores toujours si inspirées, et pour avoir un jour ouvert tes portes à quelqu'un qui compte pour moi, à **Sylvain BOURGERIE** pour ta bienveillance, à **Daniel HAGEGE** pour tes petits mots gentils à chaque fois qu'on se croisait, et je finirai par **Claude JOSEPH** avec qui tout a commencé, Merci de m'avoir permis de découvrir le LBLGC et donné goût à l'investigation scientifique tout en humour.

Merci à tous les autres titulaires du LBLGC qui ont contribué à l'aventure humaine d'au moins une partie de ces 4 dernières années. Merci donc à **Françoise CHEFDOR** pour

veiller à notre sécurité entre autre grâce à ton odorat surdéveloppé et ta conscience professionnelle, à **Mathilde BAUDE** pour tes supers confs sur les pollinisateurs et ton investissement qui je l'espère soulèvera des montagnes, à **Régis FICHOT** pour ne jamais m'avoir envoyé bouler quand j'avais des questions d'écophy, d'anat ou d'anglais et donc m'avoir été bien utile à la fin de la rédaction, à **Alain DELAUNAY** pour m'avoir appris le soin et l'organisation dans un laboratoire et pour ton aide régulière en TP pendant mon cursus, à **Isabelle LE JEAN** pour tous tes conseils permettant d'éviter de tuer de pauvres plantes innocentes et pour tes éclats de rire si communicatifs, et Merci à **Laurent JEAN-ALPHONSE** pour ta contribution indirecte pendant ma thèse lorsqu'il s'agissait de mettre le nez dans la paperasse.

Enfin en vrac parce que je n'ai plus le temps et que ça commence à faire long, Merci à tous les djeuns qui ont été parfois un peu mes gamins, mes potes, mes moteurs et que sais-je encore. Merci donc à mon compère **Ti'mouton**, au p'tit **Bart**, à **Bojana** l'unique, aux trois **Guillaume**, à mon vieux **Nellio**, aux « girls » **Selín**, **Tugçe**, **Marsía** et **Flavía**, au rayon de soleil **Beatriz**, à **Arti-Clémot** le rigolo, mais encore à **Stefanía**, **Romain**, **Leopold**, **Julien**, **Sylvain**, **Céline**, **Cécile**, **Fanny**, **Marianne**, **Raphaël** et **Yohann**. Bonne continuation à tous et au plaisir de vous recroiser sur nos routes respectives. Merci aussi aux djeuns de l'INRA avec qui j'ai passé plein de bons moments. Merci donc entre autre à **Maxime**, **Alex**, **Céline**, **Claire**, **Ben**, etc...

Merci à tous les autres collègues du campus comme **Noémie**, **Zenny**, **Simonne**, **Estelle**, **Valérie**, les **Securitasmen** et **Associés**, **La Blonde** et sa bande, **Margot**, **André** et **Sonia**, et bien d'autres...

Un immense Merci à **Ma Famille**, que je ne vais pas énumérer car même la liste restreinte est longue juste comme il faut, mais longue quand même. Merci de m'avoir donné l'envie de m'intéresser à tout et tout le monde. Merci d'avoir cru en moi quand j'en étais incapable. Merci d'avoir tenté de comprendre ce que je faisais et de m'avoir soutenue. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis, pour le meilleur et pour le pire.

Je finirai par la personne la plus importante, mon compagnon de tous les jours malgré la distance géographique, dur sacrifice aujourd'hui pour le scientifique. Merci mon petit Dr. **Mika** d'avoir si souvent fait la route jusqu'ici les fois où j'étais bloquée par des pucerons ou des peupliers, ou simplement par la fatigue. Merci pour un tas d'autres choses que j'espère pouvoir t'énumérer ailleurs que sur le papier dans nos futures années.

- SOMMAIRE -

INTRODUCTION : Origine et organisation de cette thèse.....	15
I. Des Arbres et des Pucerons.....	15
A. Généralités	15
B. Dégâts associés aux pucerons des arbres	16
II. Le cas particulier du puceron lanigère du peuplier	18
A. Historique de l'émergence d'un ravageur	18
1. Biologie et répartition de <i>Phloeomyzus passerinii</i>	18
2. Origine et expansion des dégâts en peupleraies françaises.....	20
3. Moyens de lutte contre ce ravageur.....	22
B. Découvertes récentes sur ce modèle.....	22
1. Mode d'alimentation de <i>Phloeomyzus passerinii</i>	23
2. Méthodes d'analyses des performances de <i>P. passerinii</i>	24
3. Premiers éléments sur la nature et la localisation des mécanismes de résistance du peuplier	24
C. Objectifs et organisation de la thèse	25
1. Caractérisation des interactions entre <i>P. passerinii</i> et son hôte.....	26
2. Modulation des interactions par la résistance de l'hôte	26
3. Modulation des interactions par l'environnement	27
4. Organisation du mémoire de cette thèse.....	28
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE : Les Insectes phytophages face à leurs hôtes : adaptation par la manipulation.....	31
I. La plante, un substrat inadapté	33
A. Déséquilibre alimentaire des tissus végétaux.....	33
1. Composition des plantes et besoins nutritionnels des insectes.....	33
2. Mécanismes de défense des plantes nuisant à la nutrition	35

B.	Mécanismes adaptatifs des phytophages.....	38
1.	Adaptations anatomiques et métaboliques	41
2.	Adaptations comportementales	41
3.	Symbioses mutualistes.....	42
4.	Manipulation de la plante-hôte	45
II.	Modifications des tissus de la plante-hôte.....	47
A.	Les différents modes de manipulation.....	47
B.	Les différentes échelles de manipulation et leur nature	51
1.	Modifications biochimiques.....	51
2.	Modifications cellulaires	53
3.	Modifications anatomiques	54
C.	Les mécanismes à l'origine de l'induction.....	55
1.	Rôle des sécrétions	55
2.	Rôle des mouvements.....	56
3.	Rôle des symbiotes	57
III.	Conséquences pour les organismes en interaction.....	58
A.	Bénéfices pour le manipulateur	58
1.	Hypothèses liées à l'origine évolutive des manipulations.....	58
2.	Méthodes de validation expérimentale.....	59
B.	Conséquences pour la plante manipulée.....	60
1.	Pertes de fonctionnalité d'organes.....	61
2.	Modifications des allocations carbonées et azotées et déformations.....	61
3.	Relations mutualistes.....	62
IV.	Facteurs modulant la manipulation.....	64
A.	Facteurs endogènes	64
1.	Mécanismes de résistance de la plante hôte	64
2.	Vigueur de la plante et des organes	65
3.	Compétition au sein de la plante-hôte	67

B. Facteurs exogènes.....	68
1. Effets des facteurs climatiques	68
2. Effets des pratiques culturales.....	70
3. Effets de la phytophagie	70

CHAPITRE 1 : Réactions corticales du peuplier induites par *Phloeomyzus passerinii*.....71

Présentation de l'article 1.....	72
I. Contexte	76
II. Protocole général	77
III. Principaux résultats	78
IV. Conclusions.....	79
Article 1 : Resistant poplar genotypes inhibit pseudogall formation by the wooly poplar aphid, <i>Phloeomyzus passerinii</i>	77

CHAPITRE 2 : Impacts des modifications corticales sur les performances de *Phloeomyzus passerinii*.....93

Présentation de l'article 2.....	94
I. Contexte	98
II. Protocole général	98
III. Principaux résultats	101
IV. Conclusions.....	102
Article 2 : Host manipulation by a herbivore optimizes its feeding behaviour.....	100

CHAPITRE 3 : Impacts de la fertilité du sol sur les interactions arbre-puceron.....111

Présentation de l'article 3.....	112
I. Contexte	116
II. Protocole général	117

III. Principaux résultats	118
IV. Conclusions.....	119
Article 3 : Effects of fertilization on amino acid mobilization by a plant manipulating insect.....	117
CHAPITRE 4 : Impacts de l'irrigation du sol sur les interactions arbre-puceron.....	139
Présentation de l'article 4.....	140
I. Contexte	144
II. Protocole général	144
III. Principaux résultats	145
IV. Conclusions.....	146
Article 4 : Host genotype modulates the effects of water deficit on a plant manipulating aphid.....	142
CONCLUSION GENERALE.....	165
I. Synthèse des travaux de la thèse.....	169
A. Caractérisation des interactions entre Phloeomyzus passerinii et son arbre hôte	169
B. Modulations des interactions par la résistance de l'hôte.....	170
C. Modulation des interactions par l'environnement.....	171
D. Apports des travaux réalisés à la thématique générale des interactions plantes-insectes phytophages.....	172
II. Perspectives amenées par cette thèse	173
A. Mécanismes de manipulation par le puceron	173
B. Mécanismes de résistance des peupliers.....	175
C. Implications des interactions dans les mortalités de peupliers.....	176
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	177

- INTRODUCTION -

Origine et organisation de cette thèse

1. Des Arbres et des Pucerons

A. Généralités

Parmi les Aphidoidea, 40% des espèces passent au moins une partie de leur cycle biologique sur un arbre (Blackman & Eastop 1994; 2008). La majorité des espèces de pucerons effectuent leur cycle biologique sur le même hôte (cycle biologique monoécique) contre environ 10% des espèces qui alternent obligatoirement entre deux hôtes différents, souvent taxonomiquement éloignés. L'alternance se fait souvent entre un hôte ligneux et un hôte herbacé. L'hôte ligneux est généralement qualifié de primaire, car il accueille la reproduction sexuée et l'hivernation. L'hôte secondaire est souvent une herbacée sur laquelle la reproduction est uniquement parthénogénétique (sans fécondation) et donc très prolifique (Kindlmann & Dixon 1989; Moran 1992; Williams & Dixon 2007). Il existe des liens forts entre plantes ligneuses et pucerons. Néanmoins, les interactions ont été bien plus étudiées entre pucerons et herbacées.

Peccoud et al. (2010) suggèrent que la spéciation chez les pucerons pourrait être une conséquence de leur adaptation à des hôtes nouveaux. Les études dans ce domaine montrent que les traits principalement soumis à la sélection sont la performance alimentaire et la synchronisation avec la phénologie des plantes. En effet, le mode d'alimentation des pucerons varie en fonction des plantes hôtes, des organes qu'ils attaquent et des tissus qu'ils consomment. Afin de pouvoir exploiter les différentes niches écologiques que constitue une plante, chaque espèce a dû acquérir des adaptations anatomiques et un cortège enzymatique salivaire très spécifique (Pollard 1973). De part leur complexité et leur diversité architecturale, histologique et biochimique, les arbres offrent des sources potentielles de nourriture et d'habitat variés ayant certainement favorisé la diversification majeure des pucerons au tertiaire (Peccoud et al. 2010).

La très grande majorité des pucerons s'alimente de sève élaborée prélevée dans le phloème de leur hôte, grâce à leurs pièces buccales modifiées en stylets très effilés (Douglas 2003). L'absorption de sève dans le canal alimentaire des stylets se fait de façon passive grâce à la pression de turgescence des tubes criblés (cellules interconnectées perforées) du phloème (Tjallingii 1994). Lorsque les pucerons se développent sur feuilles, pétioles ou bourgeons, le phloème est facilement accessible et ils n'ont donc pas besoin d'adaptations particulières. Au niveau des parties lignifiées, le phloème est situé en profondeur dans

l'écorce. Les pucerons inféodés à ces substrats ont donc des adaptations morphologiques spécifiques telles que de très long stylets fournissant une portée plus importante (Dixon 1997; Dixon et al. 1995). La longueur des stylets est fréquemment corrélée à la taille du corps des pucerons. Par exemple sur chêne, les petites espèces sont associées aux parties tendres comme les limbes et pétioles des feuilles et les plus grandes espèces sont associées aux rameaux et au tronc. Cet allongement des stylets peut même être totalement disproportionné par rapport au corps comme chez l'espèce *Stomaphis quercus* (L.) capable de s'alimenter sur les troncs de chênes matures (Dixon 1998).

Une stratégie alternative consiste à se nourrir au niveau de tissus plus superficiels du cortex des tiges (tissus entre l'épiderme et les vaisseaux). Pour cela, les pucerons induisent souvent des modifications anatomiques constituant des galles, au niveau des tiges ou des racines (Müllick 1977; Rohfritsch 1990; Shorthouse & Rohfritsch 1992; Stern & Foster 1996; Forneck et al. 2002; Kellow et al. 2004). On observe généralement une division active (hyperplasie) et un élargissement (hypertrophie) des cellules dans l'écorce conduisant souvent à un gonflement localisé visible extérieurement. Les tissus modifiés acquièrent un rôle nourricier et améliorent le développement des pucerons (Miles 1989b a). C'est par exemple le cas d'*Eriosoma lanigerum* (Hausmann) sur pommier ou de *Viteus vitifoliae* (Fitch) sur la vigne (Staniland 1924; Jeanneau 1968; Brown et al. 1991; Granett et al. 2001; Forneck et al. 2002; Kellow et al. 2004). Les galles d'*Aldelges piceae* (Ratzburg) sur sapin de Fraser font figure d'exception en restant invisibles extérieurement (Balch 1952; Balch et al. 1964; Müllick 1977; Rohfritsch 1990). Le plus souvent, ce sont les pucerons s'alimentant dans le parenchyme cortical qui génèrent les déformations les plus importantes (Pollard 1973; Miles 1989a b; Quisenberry & Ni 2007).

B. Dégâts associés aux pucerons des arbres

Contrairement aux pucerons ravageurs de grandes cultures herbacées, les dégâts induits par les pucerons des arbres sont liés principalement à leur mode de nutrition car ils sont rarement vecteurs de virus phytopathogènes (Biddle & Tinsley 1967; Blackman & Eastop 1994). Les quelques pucerons des arbres tout de même vecteurs de virus induisent indirectement des pertes plus d'ordre économique qu'écologique. C'est par exemple le cas de *Myzus persicae* qui transmet le virus de la Sharka sur certains arbres du genre *Prunus* comme le pêcher, affectant la qualité esthétique des fruits (Hullé 1998). Les symptômes engendrés par les pucerons sont extrêmement variables en fonction du comportement d'alimentation, des composés salivaires et du type de plante hôte. Les pucerons suceurs de sève induisent le plus souvent des dommages dits asymptomatiques, mais aussi dans certains cas des arrêts de croissance, des chloroses ou des nécroses (rassemblés sous le nom de « désistance »). Les pucerons s'alimentant dans le parenchyme sont responsables de déformations associées à la génération de galles (Blackman & Eastop 1994; Quisenberry & Ni

2007). Les modifications induites par la présence de pucerons peuvent affecter les arbres en modifiant par exemple leur architecture, en déformant directement des organes d'intérêt, ou en affectant les allocations des ressources dans la plante.

Les symptômes liés à la présence d'un puceron ne sont pas forcément visibles car ils ne nuisent pas souvent à la survie des arbres, ils peuvent tout de même avoir un impact économique ou esthétique en affectant la physiologie de la plante par un détournement des ressources circulant dans la sève. Une méta-analyse de Zvereva et al. (2010) estime que les insectes suceurs de sève ont un impact négatif global sur les arbres plus fort que les insectes défoliateurs. Ils diminueraient en moyenne la croissance de 29%, la reproduction de 17% et la photosynthèse de 27% en conditions expérimentales. Les semis seraient les plus fortement affectés, suivis par les jeunes et arbres puis les arbres matures moins sensibles. La capacité de ces plantes à compenser les pertes liées à l'herbivorie par un accroissement de la croissance et de la photosynthèse permet de diminuer les symptômes visibles mais cela a tout de même un coût énergétique non négligeable pour l'arbre.

Les effets sur la croissance peuvent être variables en fonction des espèces de puceron. Par exemple sur le saule, les ponctions de sève de *Tuberolachnus salignus* (Gmelin) réduisent fortement la production de biomasse de façon durable et peuvent même diminuer celle des tissus formés avant son arrivée. Se nourrissant de manière similaire, *Pterocomma salicis* (L.) a un impact négatif bien moindre et ne touche pas les tissus plus anciens (Collins et al. 2001). L'architecture de l'arbre hôte peut aussi être touchée de différentes façons. Le puceron *Baizongia pistaciae* (L.) peut ainsi donner une architecture buissonnante à son hôte *Pistacia palaestina* (Boiss) lorsqu'il développe des galles de façon répétée sur les bourgeons terminaux, inhibant leur dominance apicale (Kurzfeld-Zexer et al. 2010). Sans même s'attaquer aux bourgeons terminaux, le puceron *Slavum wertheimae* (HRL) peut fortement diminuer la croissance terminale des rameaux de *Pistacia atlantica* (Desf), certainement en interceptant les ressources circulant dans le rameau pour la fabrication de ses galles (Martinez 2008).

L'alimentation des pucerons peut aussi induire des défoliations plus ou moins intenses à la suite du développement de chloroses ou de nécroses qui accélèrent la sénescence des feuilles (Carter 1977; Straw et al. 1998; 2000). La perte de ces organes photosynthétiques essentiels peut induire des pertes de croissance, allant par exemple de 11 à 22% chez l'épicéa de Sitka attaqué par *Elatobium abietinum* (Miles 1989b; Straw et al. 1998; 2000). Dans quelques rares cas, une forte colonisation de pucerons peut conduire à la mort des arbres. C'est par exemple le cas de *Tuberolachnus salignus* sur saule, en conditions expérimentales au moins (Collins et al. 2001). De façon plus catastrophique et remarquable, *A. piceae* est ainsi responsable de la disparition du sapin de Fraser dans le sud du massif des Appalaches (Amman & Speers 1965; Alsop & Laughlin 1991; Orondo & Day 1994). Ce puceron provoquerait la mort de l'écorce en profondeur et une forte perturbation de la conduction de sève à cause des modifications tissulaires induites avec une grande ampleur

(Balch 1952; Balch et al. 1964; Miles 1989a). Un point commun est à noter dans ces deux cas : ces pucerons s'alimentent au niveau de la tige de leur arbre hôte.

II. Le cas particulier du puceron lanigère du peuplier

A. Historique de l'émergence d'un ravageur

1. Biologie et répartition de *Phloeomyzus passerinii*

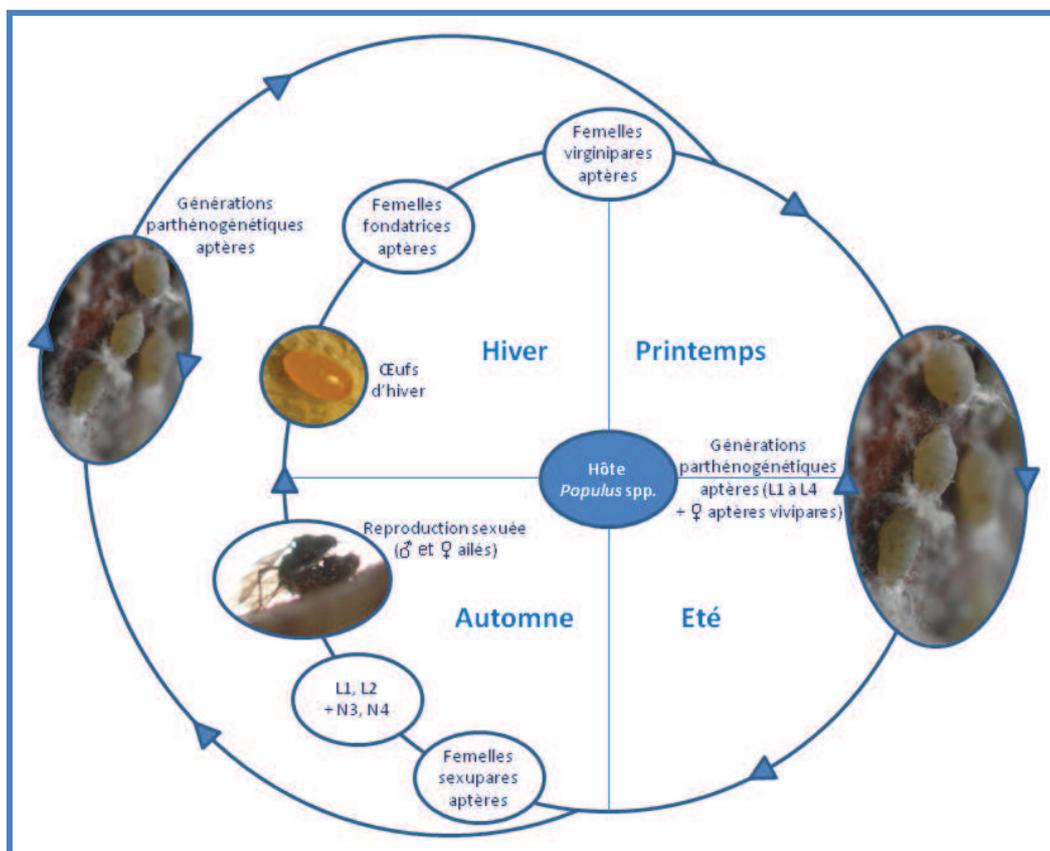


Figure 1 : Cycle biologique de *Phloeomyzus passerinii*. L1 à L4 = stades larvaires, N3 et N4 = stades nymphaux. (d'après Arzone et Vidano 1984, Blackman et Eastop 1994, Pointeau 2011). Photographies Clara Millet (femelles parthénogénétiques aptères) et Jean-Claude Vala (accouplement et œuf).

Phloeomyzus passerinii (Signoret) a été décrit pour la première fois sur peuplier noir, près de Paris, par Signoret (1875). Il se développe sur le tronc ou des grosses branches de peupliers, au niveau des anfractuosités d'écorce. Il semble préférer les arbres matures, de grande taille, et la portion de la tige située à la base du houppier. Son cycle biologique (Fig. 1) comprend principalement une phase asexuée et une phase sexuée lui permettant de produire des œufs résistants aux conditions hivernales et certainement un certain brassage

génétique (Vala et al. 2011). La phase asexuée démarre avec des femelles aptères vivipares produisant directement des larves au départ assez mobiles. Dans des conditions favorables, les femelles parthénogénétiques peuvent produire plus de 1000 femelles à travers 10 à 12 générations annuelles (Della Beffa 1936). En conditions de laboratoire optimales constantes, Arzone et Vidano (1984) ont observé jusqu'à 33 générations annuelles. Les femelles aptères vivipares sont visibles principalement d'avril à novembre, mais cette phase peut perdurer pendant l'hiver. Les pucerons se réfugient alors dans les anfractuosités de l'écorce, à la base des rameaux ou au niveau des racines de leur hôte (Vala et al. 2011). La phase sexuée semble se dérouler principalement à l'automne.

Tableau I : Signalements de *Phloeomyzus passerinii* dans le Monde depuis sa description. (d'après Pointeau 2011)

	Pays	Statut	Référence bibliographique		Pays	Statut	Référence bibliographique
Europe	Allemagne	Indigène	Della Beffa (1936)	Asie/Moyen-Orient	Chine	Indigène	Zhang et Zhong (1982)
	Belgique	Indigène	Nef et Menu (1994)		Iran	Indigène	Chodjai (1977)
	Espagne	Indigène	Aparisi (1971)		Israël	Indigène	Halperin (1981)
	France	Indigène	Signoret (1875)		Pakistan	Indigène	Habib et Ghani (1970)
	Grèce	Indigène	Garuphalos et Tsitsones (1965)		Russie	Indigène	Cholodkovsky (1921)
	Hongrie	Indigène	Nef et Menu (1994)		Syrie	Indigène	Nef et Menu (1994)
	Italie	Indigène	Della Beffa (1936)		Turquie	Indigène	Remaudière et al. (2006)
	Pays-Bas	Indigène	Doom et Hille Ris Lambers (1962)		Amérique	Argentine	Introduit
	Royaume-Uni	Indigène	Theobald (1929)	Canada		Introduit	Smith (1974)
Afrique	Egypte	Indigène	Hall (1928)	Chili		Introduit	Ramirez (com. pers.)
	Maroc	Indigène	Roberti (1939)	Etats-Unis		Introduit	Smith (1974)
				Pérou		Introduit	Delfino (2005)

Phloeomyzus passerinii est une espèce monoécique s'alimentant exclusivement de peuplier (Signoret 1875; Vala et al. 2011). Il a été observé dans de nombreux pays de la zone paléarctique de la planète, où il est considéré comme indigène. Il a également été introduit dans quelques pays du continent Américain (Tab. I). On le retrouve en conditions naturelles dans les ripisylves composées principalement de son hôte privilégié le peuplier noir, *Populus nigra* L. (Lapietra & Allegro 1990; Blackman & Eastop 1994). Il a également été signalé sur *P. ciliata*, *P. deltoides*, *P. maximowiczii* et *P. suaveolens* (Habib & Ghani 1970; Blackman & Eastop 1994). Bien qu'un signalement ait été fait sur *P. alba* également (Theobald 1929), celui-ci est désormais attribué à une erreur d'identification de l'espèce de puceron (Doom & Lambers 1962). Ses capacités à se développer varient cependant selon les espèces et hybrides de peuplier, au niveau du développement des colonies, ou dès l'installation des individus colonisateurs (Lapietra & Allegro 1990; Allegro et al. 1996; Allegro 1997; Sadeghi et al. 2007; Pointeau et al. 2011).

2. Origine et expansion des dégâts en peupleraies françaises

Les premiers à s'être intéressé de plus près à *Phloeomyzus passerinii* sont des italiens, suite à gros dégâts constatés dans la région Piémontaise dans les années 30 (Della Beffa 1936). L'Espagne a ensuite été touchée en 1940 (Aparisi 1971), puis le Moyen-Orient fut touché, d'abord en Iran en 1980 (Rajabi-Mazhar et al. 2003). Des dégâts sont survenus alors à répétition avec une rythmicité d'environ deux ans quelques peu variable (Lapietra & Allegro 1990). Ce puceron est reconnu comme un des principaux insectes ravageurs du peuplier dans tous ces pays (Arru 1974). En France, il est signalé en peupleraie depuis 1939, mais il n'a acquis le statut de ravageur que depuis les premiers dégâts observés en 1995 dans le Sud-Ouest. Les signalements de ce puceron se sont depuis multipliés et on observe une expansion de ses pullulations vers le nord et l'est de la France (Fig. II). On le considère désormais comme l'insecte générant le plus de dommages sur peuplier. Ses dommages sont d'autant plus importants qu'il s'attaque préférentiellement à des arbres assez âgés (à partir de 8-10 ans ou 80 cm de circonférence) et impose donc parfois des récoltes précoces et donc des pertes économiques (Baubet & Goudet 2010).

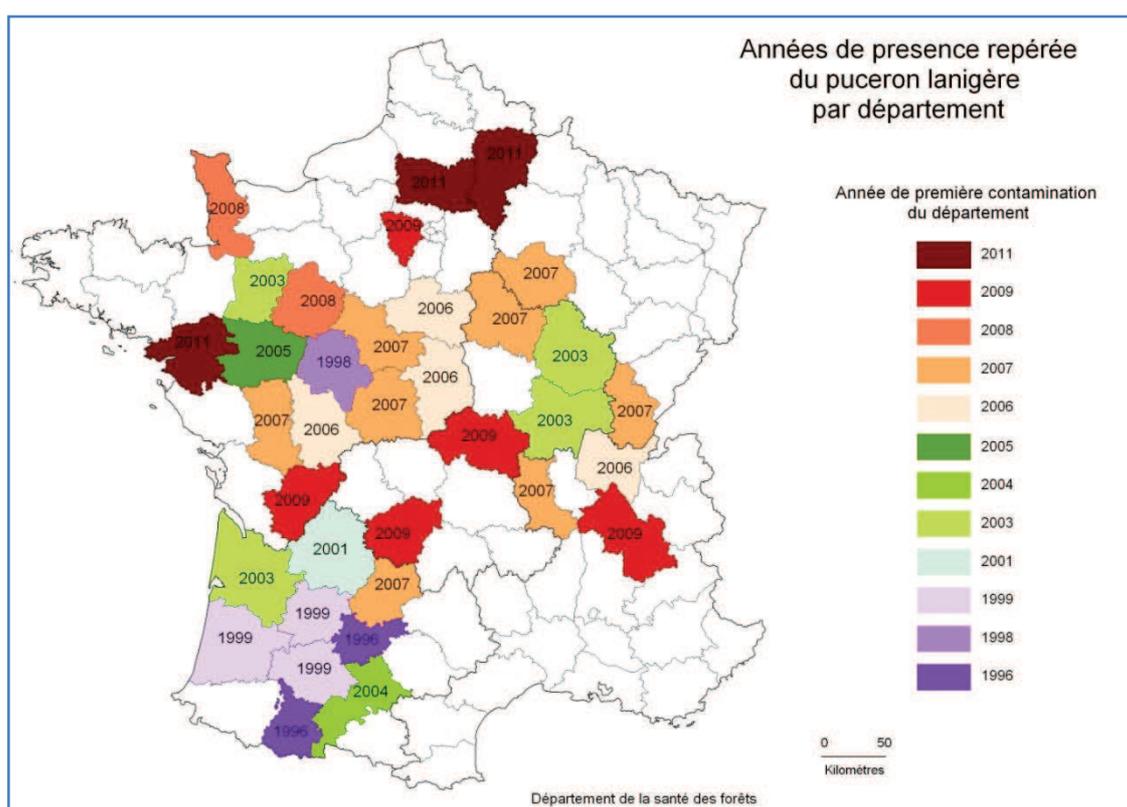


Figure II : Dates des premiers signalements de dégâts en peupleraie dus au puceron lanigère dans les départements français. (© Département de la Santé des Forêts)

Les dommages apparaissent suite à des pullulations de grande envergure. Lors de ces pullulations, les colonies du puceron peuvent complètement recouvrir les troncs de peuplier leur donnant un aspect blanchâtre à cause de laine produite par les insectes. Des

champignons opportunistes se développent également sur le miellat produit par les pucerons (fumagine), ce qui peut donner un aspect noirâtre aux troncs (Della Beffa 1936; Arzone & Vidano 1984; DSF 2006). La plupart des symptômes (Fig. III) apparaissent l'année suivant une pullulation. Ils sont visibles dès le printemps et consistent en des suintements noirâtres, des nécroses et des craquelures de l'écorce (effet « peau de lézard »). On constate également un ralentissement de croissance et une absence de débourrement des bourgeons des rameaux inférieurs voire de l'ensemble de l'arbre. Cependant, sa présence n'est pas toujours synonyme de dégâts car on estime que des symptômes apparaissent à partir d'un recouvrement de 30 à 50% des troncs de peuplier. Au-delà de 50% de recouvrement, les risques de mortalités des peupliers sont grands. On rapporte jusqu'à 70% de mortalité sur des parcelles ayant subi de fortes pullulations.



Figure III : Symptômes et dégâts observables l'année suivant une pullulation de *Phloeomyzus passerinii* en peupleraies. (a) = suintement noirâtre de l'écorce, (b) = nécrose corticale, (c) = craquellement de l'écorce (peau de lézard), (d) = apparition de fumagine (champignon noir) sur une colonie de pucerons recouvrant le tronc, (e), (f) et (g) = absence de débournement léger des rameaux inférieurs à l'intégralité de l'arbre, (h) = forte mortalité dans une parcelle. Photographies Aurélien Sallé (a à g) et Jean-Claude Vala (h).

Les infestations auraient tendance à se localiser à l'intérieur des peuplements, laissant parfois les arbres de lisière indemnes malgré l'intensité de la colonisation (DSF 2006). Les observations de terrain suggèrent qu'une température et une hygrométrie élevées, ainsi qu'une faible luminosité favorisent le développement de ce ravageur (Vidotti 1960; Arzone & Vidano 1984; Maugard 1996). De plus, ce puceron a une forte préférence

pour les zones riches et occasionne donc les dégâts les plus forts dans les meilleures stations (DSF 2012).

3. Moyens de lutte contre ce ravageur

La production végétale réalisée de façon intensive et non raisonnée amène régulièrement à des dysfonctionnements de ces systèmes de culture. Par exemple, un usage abusif de pesticides peut générer l'apparition de populations résistantes de ravageurs, les pesticides à large spectre nuisent aux ennemis naturels du ravageur et à leur habitat et la monoculture de plantes sélectionnées pour leur productivité peut poser problème quand ils s'avèrent être uniformément sensibles aux ravageurs. C'est pourquoi on tend vers le développement de techniques de gestion intégrée des ravageurs. Cela consiste notamment à utiliser préférentiellement des insecticides sélectifs, favoriser le développement des ennemis naturels en aménageant leur habitat et à utiliser des variétés végétales partiellement résistantes (Van Emden 2007). L'insecticide recommandé contre le puceron lanigère en peupleraie est le Karaté® Forêt (5% lambda-cyhalothrine), un composé peu sélectif car utilisé contre divers ravageurs et dangereux pour les abeilles. Il est classé comme nocif et dangereux pour l'environnement, en particulier pour les organismes aquatiques. Son utilisation en peupleraies souvent en zones alluviales est donc dangereuse. Ainsi, son utilisation est très réglementée et limitée à trois pulvérisations par an, mais les recolonisations sont fréquentes après un traitement. De plus, la hauteur des peupliers rend l'application du produit assez contraignante pour les personnes non formées. Il semble que les ennemis naturels de *P. passerinii* ne soient pas capables de juguler les pullulations (Arzone 1986). Il est donc souvent compliqué de gérer une population de puceron lorsque les conditions environnementales lui permettent de se multiplier précocement et/ou tardivement dans l'année. Une troisième alternative pour gérer les populations de *P. passerinii* est le développement et l'utilisation de génotypes de peupliers résistants et/ou tolérants aux attaques de l'insecte. C'est pourquoi le Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC) s'intéresse aux mécanismes de résistance des divers espèces et hybrides de peupliers cultivés.

B. Découvertes récentes sur ce modèle

Lorsque le LBLGC a commencé à travailler sur *P. passerinii*, alors assez méconnu, il s'est rapidement avéré que des éléments de base manquaient pour mieux comprendre les interactions entre ce puceron et son arbre hôte. En effet, même si l'on savait qu'il se nourrissait sur le tronc de peupliers, aucune donnée n'existait sur les tissus qu'il consommait et sur sa façon d'y accéder. De plus, si quelques études montraient une variabilité de ses performances en fonction des espèces et hybrides de peuplier, les méthodes utilisées

n'étaient pas toujours les mêmes et ne paraissaient pas suffisamment fiables pour être reproductibles sur une grande gamme d'hôtes et à différentes échelles d'étude. C'est donc d'abord sur ces deux points que les premiers travaux du LBLGC ont porté : le mode de nutrition et les méthodes d'analyse des performances de *P. passerinii*. Etant donné que la localisation du site de nutrition donnait une première piste sur les tissus probables où devraient se rencontrer les mécanismes de résistance du peuplier, la suite des travaux a porté sur la caractérisation du comportement de piqûre sur des génotypes de niveau de résistance contrastés. Les principaux résultats de ces études (Pointeau 2011) sont présentés ici.

1. Mode d'alimentation de *Phloeomyzus passerinii*

Afin d'identifier le site de nutrition et le comportement d'exploration des tissus et d'alimentation de *P. passerinii*, deux approches ont été utilisées lors des travaux de Pointeau et al. (2012) : une observation de la position des stylets des pucerons dans les tissus de peuplier en microscopie optique et une observation de leur comportement de piqûre en temps réel par électropénétrographie (EPG) (cf. présentation article 2 pour une description de la technique). Ces travaux ont été réalisés sur un génotype sensible de peuplier (I-214) afin de servir de base de compréhension des interactions entre *P. passerinii* et son hôte, et ainsi servir de référence pour les études à venir.

L'approche histologique a mis en évidence une première particularité de *P. passerinii* en montrant que ses stylets ne progressent jamais jusqu'aux tubes criblés du phloème et donc qu'il s'alimente comme ces derniers dans les cellules plus superficielles du parenchyme cortical de peuplier (cf. présentation de l'article 1 pour localisation histologique). Ces études ont été faites sur des individus fraîchement installés sur des boutures de peuplier. Aucune modification corticale n'était alors visible sur ce laps de temps.

Pointeau et al. (2012) ont aussi montré que le trajet des stylets jusqu'au site de nutrition est aussi assez peu commun pour un puceron. En effet, les pucerons ont plutôt tendance à s'alimenter de façon furtive en cumulant plusieurs techniques (Tjallingii & Hogen Esch 1993; Giordanengo et al. 2010). Notamment, ils font le plus souvent cheminer leurs stylets entre les cellules *via* l'apoplasme (entre les parois primaire et secondaire des cellules) pour diminuer leur action mécaniquement vulnérante et donc limiter la perception de la plante d'une agression associée à des mécanismes de défense. Or, *P. passerinii* ne semble aucunement utiliser cette stratégie de limiter la perception de sa piqûre par le peuplier. Il insère en effet ses stylets de façon très rectiligne avec une alternance entre des passages inter- et intra-cellulaires, perforant de part en part les cellules du parenchyme jusqu'à son site de nutrition.

Ces travaux ont également permis de définir les différentes ondes enregistrées en EPG et de les relier à la séquence d'alimentation de *P. passerinii*, de la traversée du suber à

l'ingestion en passant par les phases d'exploration inter- et intra-cellulaires (Pointeau et al. 2012). Si les phases d'exploration sont similaires à celles des autres insectes piqueurs étudiés en EPG, la phase d'ingestion soutenue mise en évidence dans cette étude a été décrite pour la première fois. Elle correspondrait à la phase d'alimentation de *P. passerinii* dans les cellules du parenchyme cortical. Cette caractérisation des signaux spécifiques à *P. passerinii* offre un outil d'étude comportementale de ce puceron sur d'autres génotypes de peuplier ou dans d'autres conditions environnementales.

2. Méthodes d'analyses des performances de *P. passerinii*

Afin de pouvoir réaliser des tests de performance de *P. passerinii* à grande échelle, il était nécessaire de mettre au point une méthode facilement réalisable et reproductible. De plus, une méthode dont les résultats seraient transposables du laboratoire au terrain permettrait de contrôler les conditions environnementales et simplifierait grandement la logistique des expériences. C'est pourquoi Pointeau et al. (2011) ont réalisé des tests de performance de *P. passerinii* sur plusieurs génotypes de peuplier en peupleraie, sur des plants en pot en serre et sur des boutures en laboratoire avec des mesures précises de paramètres démographiques. Ces paramètres ont évalué d'abord la capacité d'installation de *P. passerinii* (taux d'installation) et, lorsqu'il y avait lieu, sa capacité de multiplication (vitesse de développement larvaire, fécondité et indices d'accroissement associés). Cette étude a montré une variabilité de ces paramètres en fonction des génotypes de peuplier. Ils ont alors été classés en trois groupes : les génotypes résistants qui empêchent l'installation du puceron, les génotypes moyennement résistants qui affectent uniquement sa capacité de multiplication et les génotypes sensibles où les performances du puceron sont les meilleures. Comme ces résultats étaient transposables entre les trois types de substrats utilisés, cette étude a permis de valider l'intérêt des approches sur bouture ou sur plants en pots pour comprendre les interactions entre le peuplier et ce puceron. Ce travail a donc permis de sélectionner des génotypes de peuplier aux niveaux de résistance à *P. passerinii* bien contrastés et transposables à différentes échelles d'étude, pouvant servir de références pour réaliser d'autres études.

3. Premiers éléments sur la nature et la localisation des mécanismes de résistance du peuplier

Les principaux travaux réalisés sur la résistance du peuplier au puceron lanigère ont été menés avec trois génotypes de peuplier hybrides euraméricains (*Populus deltoides* Marshall x *P. nigra* L.), aux niveaux de résistance bien différents.

- le génotype **sensible I-214**, hybride naturel femelle sélectionné en 1929 en Italie, représente 10.5% (4^{ème} rang) des parts de vente de peuplier destiné à la plantation en 2012-2013 en France.

- le génotype **moyennement résistant I-45/51**, hybride naturel mâle sélectionné en 1948 en Italie, représente 12.2% (2^{ème} rang) des parts de vente de peuplier destiné à la plantation en 2012-2013 en France.

- le génotype **très résistant Brenta**, hybride naturel femelle sélectionné en Italie, représente 1.0% (15^{ème} rang) des parts de vente de peuplier destiné à la plantation en 2012-2013 en France.

Afin d'identifier les phases de la séquence d'alimentation de *P. passerinii* qui pourraient être affectées par les mécanismes de résistance des différents hybrides de peuplier, une étude comparative a été réalisée en EPG (Poiteau et al. 2013). En faisant un parallèle avec les performances démographiques du puceron, cette étude a permis de suggérer différents mécanismes de résistance. Il semble que le génotype très résistant Brenta développe des mécanismes d'antixénose (affectant le comportement du puceron et donc l'acceptation de l'hôte) et d'antibiose (affectant la démographie) alors que le génotype intermédiaire I-45/51 n'affecte que les paramètres démographiques et utilise donc uniquement des mécanismes d'antibiose. Dans les deux cas, les mécanismes de résistance seraient situés au niveau du parenchyme cortical, car aucun effet de surface n'a été mis en évidence et les tissus du suber semblent avoir peu d'impact.

C. Objectifs et organisation de la thèse

Ce travail de thèse visait à répondre à trois problématiques :

- 1** **Quelle est la nature des interactions entre *P. passerinii* et son hôte ?** Comment l'insecte se nourrit-il ? Induit-il la formation d'une galle dans les tissus corticaux ? Le mode de nutrition a-t-il des répercussions sur l'arbre, par exemple en altérant certaines fonctions comme la conduction de sève, ou en détournant des réserves de l'arbre ?
- 2** **Quels mécanismes permettent à certains génotypes de peuplier d'être résistants ?** Quels types de réponses sont mises en place suite aux piqûres chez les génotypes de peuplier résistants ? Sont-elles de nature anatomique ? Y-a-t-il accumulation de composés de défense ? Comment ces mécanismes affectent-ils les interactions entre le puceron et son hôte ?
- 3** **L'environnement abiotique peut-il moduler ces interactions ?** Les performances de l'insecte peuvent-elles être affectées par des contraintes environnementales agissant

sur la plante-hôte ? Y-a-t-il des interactions génotypes de peuplier x environnement dans l'effet de ces contraintes ?

1. Caractérisation des interactions entre *P. passerinii* et son hôte

Concernant ce premier point, notre hypothèse était que ce puceron étant de petite taille et s'alimentant non pas dans les vaisseaux du phloème mais dans le parenchyme cortical, il devait faire partie des insectes phytophages cécidogènes. Même si aucune déformation apparente ne semble se former au niveau de son site de piqûre sur arbre, il arrive que des gonflements apparaissent sur boutures après quelques semaines de piqûre au même endroit. De plus, des travaux préliminaires à ma thèse (stage M2 Elodie Deprost) montraient que les modifications du parenchyme cortical ne présentaient pas de nécrose malgré l'insertion rectiligne vulnérante des stylets. Les modifications observées pouvaient donc être la formation d'un tissu nutritif permettant au puceron de détourner les nutriments vers son site d'alimentation. Enfin, la capacité de ce puceron à rester plusieurs semaines sur le même site de nutrition en dépit des mécanismes de défense que devrait mettre en place son hôte, suggérait un contournement ou une inhibition de ces mécanismes par l'insecte.

Notre premier objectif était d'étudier l'interaction entre *P. passerinii* et le peuplier au niveau des zones de piqûre, pour comprendre la réaction du peuplier et les potentielles manipulations par le puceron. Pour cela, nous avons observé les modifications corticales induites par *P. passerinii* chez le peuplier sensible I-214. Ces données nous ont fourni des éléments de compréhension d'une interaction de type compatible. Cette étude a aussi servi de référence pour toute la suite de cette thèse où des observations histologiques ont été réalisées dans la plupart des expériences pour aider à interpréter nos résultats.

Notre second objectif était d'évaluer l'impact des modifications corticales induites par les piqûres sur les paramètres démographiques et comportementaux du puceron. La plupart des insectes manipulateurs vivent dans des habitats fermés (enroulements de feuille, mines, galles) et ne permettent pas ce type d'étude. Nous avons pu, avec le modèle étudié analyser les modifications physiologiques et comportementales du puceron liées à la potentielle manipulation des tissus du peuplier.

2. Modulation des interactions par la résistance de l'hôte

Les travaux de Pointeau et al. (2011; 2013) sur les génotypes I-214, Brenta et I-45/51 suggèrent l'implication de mécanismes d'antibiose et d'antixénose, nous permettant de formuler des hypothèses quant aux mécanismes impliqués dans la résistance située au niveau du parenchyme cortical. Avec des niveaux de résistance contrastés, il était possible que des mécanismes différents soient impliqués ou que ce soit la vitesse de mise en place ou l'intensité de mêmes mécanismes qui jouent un rôle. Cependant, ces travaux ont été réalisés

avec des boutures de peuplier n'ayant jamais été attaquées par *P. passerinii*, ne prenant donc en compte que la résistance constitutive des peupliers. Ils ne permettaient donc pas de savoir si des mécanismes de résistance induite étaient mis en place. Il était donc important de compléter les travaux de Pointeau et al. (2011; 2013) en prenant en compte l'influence du puceron sur les réactions se déroulant dans le parenchyme cortical du peuplier.

Notre premier objectif ici était de compléter l'étude histologique et histochimique menée sur génotype sensible de peuplier en comparant ces observations aux modifications corticales induites sur deux autres génotypes de peuplier aux niveaux de résistance contrastés (résistant et moyennement résistant). Un suivi temporel des réactions corticales nous a permis de comparer entre génotypes les étapes successives des modifications observées. Les réactions corticales à la piqûre ont été comparées à celles induites par une blessure mécanique pour pouvoir mettre en évidence les mécanismes spécifiques à l'interaction entre *P. passerinii* et chacun des génotypes.

Notre deuxième objectif par rapport à la résistance était d'estimer l'impact en termes de performances démographiques et de comportement de *P. passerinii* des modifications corticales qu'il induit sur un génotype de résistance intermédiaire. Une comparaison avec le génotype sensible et entre des boutures saines ou préinfestées en amont nous a permis de distinguer l'impact de la résistance induite et constitutive. L'objectif associé était d'établir un lien entre les modifications anatomiques et biochimiques des tissus corticaux et la favorisation du puceron sur génotype sensible ou au contraire ses moins bonnes performances sur génotype de résistance intermédiaire. Il est à noter que le génotype de résistance forte n'a pas été utilisé dans ces études car il ne permet pas l'établissement durable et dense de colonies de pucerons. L'étendue trop restreinte des réactions de l'écorce de ce génotype rendait donc difficile son utilisation d'un point de vue technique.

3. Modulation des interactions par l'environnement

L'environnement peut moduler les interactions plantes-insectes au sens large. Les études réalisées en ce sens sur des manipulateurs sont assez rares car la plupart de ces insectes, en particulier les cécidogènes, sont difficiles à élever. Or, étudier des paramètres abiotiques en conditions naturelles est assez complexe car le climat est imprévisible et les paramètres ne peuvent pas être étudiés indépendamment, complexifiant fortement les interprétations. A nouveau, nous savions que notre modèle était intéressant pour ce type d'étude car le peuplier est un arbre à croissance rapide, connu de plus pour sa sensibilité à certains paramètres physico-chimiques comme la teneur en eau du sol. Cela permettait d'observer l'impact de facteurs environnementaux sur une période courte d'expérimentation. De plus, le puceron lanigère du peuplier est considéré comme un parasite de vigueur (Nageleisen et al. 2010). Ce puceron pouvait donc être affecté

indirectement par la qualité du site de culture si la valeur nutritive du peuplier est reliée à sa vigueur.

Nos objectifs étaient ici d'évaluer l'effet de deux paramètres environnementaux, la fertilisation et la contrainte hydrique, sur les performances des insectes se développant sur les deux génotypes utilisés dans les études précédentes (sensible et moyennement résistant). La vitesse de développement de colonies de pucerons a donc été comparée entre génotype et entre conditions environnementales afin d'évaluer comment l'environnement module l'interaction entre le puceron et son hôte. A nouveau, le génotype de résistance forte n'a pas été utilisé car il ne permet pas l'étude des performances démographiques du puceron à l'échelle de colonies en l'empêchant de s'installer au-delà d'une semaine.

Deux objectifs additionnels étaient associés ici.

- Lors de l'expérimentation sur la fertilisation, nous avons quantifié la valeur nutritive des tissus attaqués par le puceron *via* des dosages d'acides aminés libres et protéiques en fonction du génotype et du niveau de fertilisation.

- Lors de l'étude sur la contrainte hydrique, nous avons comparé les modifications de l'anatomie et de la lignification des tissus corticaux du peuplier entre les génotypes et le niveau de déficit hydrique pour savoir si les mécanismes de défense du peuplier ou de manipulation par le puceron pouvaient être affectés.

4. Organisation du mémoire de cette thèse

Plusieurs éléments suggérant l'hypothèse d'une manipulation du peuplier par *P. passerinii*, ce mémoire commence par une **Synthèse bibliographique** sur les stratégies d'exploitation des plantes par les insectes phytophages et plus particulièrement par les manipulateurs. Cette synthèse s'intéresse aux différentes techniques de manipulation et à leur impact sur les insectes et leurs hôtes, ainsi qu'aux facteurs internes (ex : résistance) et externes (ex : environnement) modulant ces interactions particulières.

Les quatre chapitres suivants rapportent les travaux réalisés lors de cette thèse. Il se présentent sous la forme d'articles scientifiques en anglais et sont précédés de résumés en français étayés par quelques éléments de compréhension scientifiques et/ou techniques.

Le **Chapitre 1** (Article 1 publié) fournit une description des modifications histologiques et histochimiques des tissus corticaux de peuplier, induites par la piqûre d'individus isolés de *P. passerinii* ou une blessure mécanique, sur trois génotypes de peuplier aux niveaux de résistance au puceron distincts (sensible, moyennement résistant, très résistant).

Le **Chapitre 2** (Article 2 publié) expose l'impact des modifications corticales induites par le développement d'une colonie de pucerons sur génotype sensible ou moyennement résistant, sur les performances démographiques et comportementales d'individus isolés de *P. passerinii* installés sur tissus modifiés ou non.

Le **Chapitre 3** (Article 3 non publié) rapporte comment le niveau de fertilisation du sol affecte le développement des peupliers et des colonies de pucerons sur un génotype sensible ou moyennement résistant, et s'intéresse aux concentrations en acides aminés des tissus corticaux en fonction de la fertilisation du sol et de la présence ou non de pucerons.

Le **Chapitre 4** (Article 4 non publié) évalue l'impact du niveau d'irrigation du sol sur le développement des colonies de pucerons sur un génotype sensible et moyennement résistant, en lien avec les variations du métabolisme primaire et de la croissance des peupliers, et celles des réactions corticales générées par les colonies de pucerons.

La **Conclusion générale** fait une synthèse des apports de chacune de ces études par rapport aux problématiques énoncées plus haut. Elle fait aussi le bilan des apports de ces travaux dans la recherche sur les insectes manipulateurs. Les études en cours et les perspectives à ces travaux au sein du laboratoire y sont également évoqués.

- SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE -

Les insectes phytophages face à leurs hôtes : adaptation par la manipulation

1. La plante, un substrat inadapté

A. Déséquilibre alimentaire des tissus végétaux

La remarquable petite fraction d'Ordres d'insectes qui contiennent des phytophages, malgré l'abondante biomasse végétale disponible en milieu terrestre, a toujours été source de discussions en termes évolutifs (Strong et al. 1984; Behmer 2006). Southwood (1973) suggère que les problèmes liés à l'accrochage et à la déshydratation à la surface du végétal et à la qualité nutritionnelle du substrat végétal limiteraient l'adaptation des insectes à ce type de régime alimentaire. Ce sont les problèmes liés à la qualité nutritionnelle, largement étudiés en tant que facteur modulant les interactions plantes/insectes, qui seront développés ici.

1. Composition des plantes et besoins nutritionnels des insectes

Les animaux ont tous globalement les mêmes besoins nutritionnels. Ils peuvent synthétiser certains nutriments mais doivent obligatoirement en obtenir d'autres, qualifiés de nutriments essentiels, à partir de leur alimentation (Behmer 2008). Or, plantes et animaux diffèrent énormément dans leur composition chimique (Fig. 1). En effet, parmi les sept macroéléments nécessaires (S, Na, P, Mg, Ca, K, N), quatre sont en quantités plus faibles chez les végétaux (S, Na, P et N). Les microéléments ne sont pas en adéquation non plus, mais les différences sont bien moindres (Schoonhoven et al. 2005).

Les besoins en composés azotés, en particulier en acides aminés, constituent le facteur limitant crucial pour les phytophages (Southwood 1973; Strong et al. 1984; Schoonhoven et al. 2005; Behmer 2006). Ces composés sont d'autant plus limitants que les sources d'azote trouvées dans les plantes ne sont pas toutes exploitables par les phytophages (Schoonhoven et al. 2005). Les fortes variations de teneurs en azote entre espèces végétales, organes, saisons et autres facteurs environnementaux expliquent la compatibilité ou non entre espèces de phytophages et types de ressources végétales (Schoonhoven et al. 2005). Parmi les 20 acides aminés souvent trouvés chez les plantes, 10

sont considérés comme essentiels pour les insectes (arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, valine). Les acides aminés des plantes se trouvent essentiellement sous forme protéique avec environ seulement 5% d'acides aminés libres. La valeur nutritive du contenu protéique des plantes va donc dépendre non seulement de sa quantité mais aussi de sa digestibilité et de sa composition en acides aminés (Schoonhoven et al. 2005; Behmer 2006; 2008; 2009). A cause de leur petite taille, de leur croissance rapide et de leur incapacité à utiliser un catabolisme actif pour réguler leur température, les insectes ont besoin d'un encore plus grand ratio de protéines que la plupart des autres herbivores (Bernays 1998). Un grand nombre d'études montre une corrélation entre les teneurs en azote des hôtes et les performances des consommateurs en termes de croissance et de fécondité, à l'échelle individuelle et des populations (Myers & Post 1981; Dixon et al. 1993; Cole 1997; Awmack & Leather 2002; Karley et al. 2002).

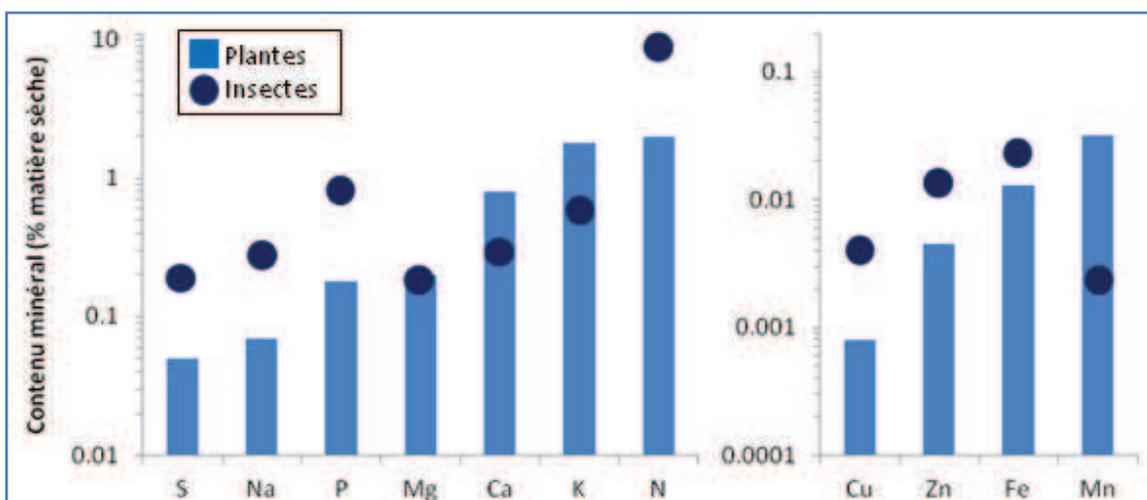


Figure 1 : Concentrations moyennes des éléments dans les plantes comparées à celles des insectes. Ces valeurs peuvent varier entre espèces, entre individus, entre organes, avec l'âge et en fonction des conditions environnementales. L'échelle verticale est logarithmique. (d'après Schoonhoven 2005, données d'après Allen et al. 1974)

Au sein du règne animal, les insectes ont la particularité de ne pas pouvoir synthétiser de stérols (Schoonhoven et al. 2005). Ils sont donc obligés de les trouver dans leur alimentation. Le cholestérol est la forme majoritaire chez les insectes alors qu'il est en faible quantité chez les plantes. Les insectes phytophages doivent donc soit se contenter des stérols existants chez leur hôte, soit les convertir en cholestérol par métabolisation, soit les convertir sous d'autres formes aussi utilisables. Le sitostérol, forme la plus présente chez les végétaux, peut être utilisé par la majorité des insectes phytophages, mais ce n'est pas le cas de tous les stérols trouvés chez les plantes (Behmer & Nes 2004; Schoonhoven et al. 2005; Behmer 2008). Les acides gras polyinsaturés (ex : acides linoléique et linolénique), certaines vitamines (ex : vitamines B, provitamine A, vitamine E...) et les caroténoïdes sont également

des éléments essentiels pour les insectes. Leur absence dans le substrat ingéré a souvent des effets négatifs (Behmer 2006; 2008).

Enfin l'eau, même si elle n'est pas un nutriment à proprement parler, peut être limitante pour les herbivores. Des relations fortes existent entre la croissance de certaines larves de Lépidoptères et les teneurs en eau des feuilles ingérées ou des milieux artificiels proposés (Scriber & Feeny 1979; Schoonhoven et al. 2005). Même lorsqu'une plante hôte riche en eau est disponible, il est possible d'observer des insectes ingérant directement de l'eau sous forme libre trouvée dans leur environnement. La plante hôte n'est donc pas forcément la ressource exclusive en eau de son consommateur, rendant les relations entre teneurs en eau des plantes et performances des insectes moins linéaires lorsqu'ils sont libres de leurs mouvements (Schoonhoven et al. 2005).

La composition des végétaux est évidemment très variable entre espèces, mais aussi entre génotypes et entre organes. Elle évolue à la fois au fil des saisons, avec l'âge des individus et des organes et en fonction des conditions environnementales comme la fertilité et le statut hydrique du sol, l'éclairage et la température (Douglas 1993; Schoonhoven et al. 2005; Behmer 2008). La fertilisation du sol a tendance à augmenter les teneurs globales en azote et en phosphore des tissus végétaux (Chen et al. 2011). La quantité totale d'azote diminue lorsque la saison de végétation commence et les proportions respectives entre acides aminés protéiques varient différemment selon les espèces au cours de l'année (Näsholm & Ericsson 1990; Zein et al. 2011; Dohleman et al. 2012). Il en est de même pour la quantité totale de glucides, avec cette fois une variation saisonnière sur la proportion entre glucides simples et complexes, et ce de façon différente selon les espèces (Barbaroux & Bréda 2002; Barbaroux et al. 2003). Enfin une contrainte hydrique peut augmenter les teneurs en sucres solubles et en azote de certains organes, tout en limitant les possibilités d'alimentation de certains herbivores à cause des problèmes de turgescence ou de déshydratation. Les conséquences peuvent donc être très variables (Koricheva et al. 1998).

2. Mécanismes de défense des plantes nuisant à la nutrition

Certains composés allélochimiques synthétisés par les végétaux peuvent affecter la qualité nutritionnelle des tissus ingérés et ainsi amplifier l'inadéquation nutritionnelle. Trois mécanismes, souvent combinés, peuvent être observés : une inhibition du comportement de nutrition, une diminution de l'efficacité d'assimilation de la nourriture et un empoisonnement qui interfère avec les processus métaboliques de l'herbivore (Fig. 2). Les phytophages doivent donc trouver un équilibre entre nutrition et absorption de composés potentiellement dangereux (Schoonhoven et al. 2005; Behmer 2008; 2009).

La réduction de la prise alimentaire par le phytophage s'exerce *via* plusieurs mécanismes qui peuvent être complémentaires (Chen 2008) (Fig. 2). Le renforcement des

parois cellulaires augmente les barrières mécaniques contre les insectes possédant des pièces buccales de type suceur. En plus d'un épaissement des parois par dépôt de callose, des composés phénoliques (ex : lignine et subérine, Fig. 3) peuvent contribuer au

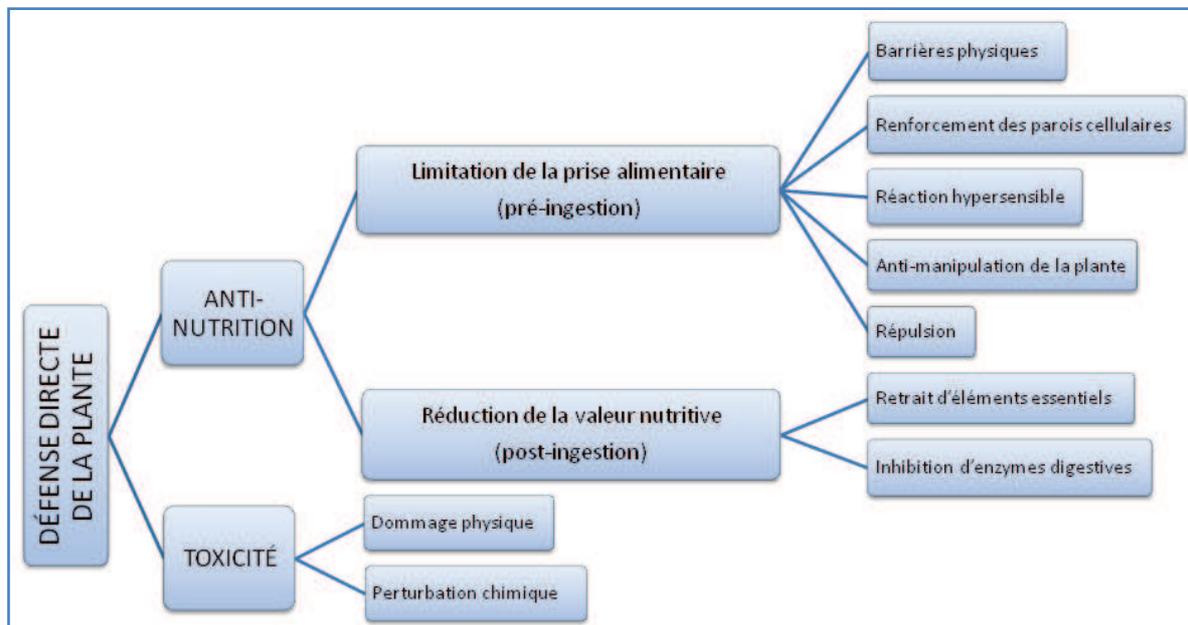


Figure 2 : Catégories de défense directe des plantes contre les herbivores. Les mécanismes impliqués vont moduler la valeur nutritive du substrat ou sa toxicité. L'effet anti-nutrition peut avoir lieu avant ou après l'ingestion (d'après Chen 2008).

durcissement et à l'imperméabilisation des tissus (Eyles et al. 2009). Les réponses hypersensibles impliquent des morts cellulaires rapides pour affamer l'agresseur. Elles sont efficaces surtout pour les phytophages avec un site de nutrition fixe comme les insectes cécidogènes et certains pucerons (Sauge et al. 1998; Fernandes & Negreiros 2001; Höglund et al. 2005). Enfin la répulsion des phytophages se fait *via* des composés organiques volatiles émis par la plante ou des composés anti-appétants contenus dans les tissus des plantes. Ces composés de défense rassemblent certains composés azotés (ex : glycosides cyanogéniques) ou phénoliques (ex : certains tanins, Fig. 3d) et terpènes (ex : monoterpènes et sesquiterpènes, Fig. 3b) (Bernays & Chapman 1994; Awmack & Leather 2002; Gatehouse 2002; Chen 2008; Barbehenn & Constabel 2011). La production par les plantes attaquées de ces composés volatiles peut avoir une action répulsive directe mais elle est connue principalement pour son effet protecteur indirect. Ils peuvent en effet attirer et stimuler tous types d'ennemis naturels des phytophages, allant des parasitoïdes les plus spécifiques aux oiseaux insectivores généralistes, en passant par divers insectes prédateurs. (De Moraes et al. 1998, Thaler 1999, Kessler & Baldwin 2001, James & Grasswitz 2005, Allison & Hare 2009, Unsicker et al. 2009).

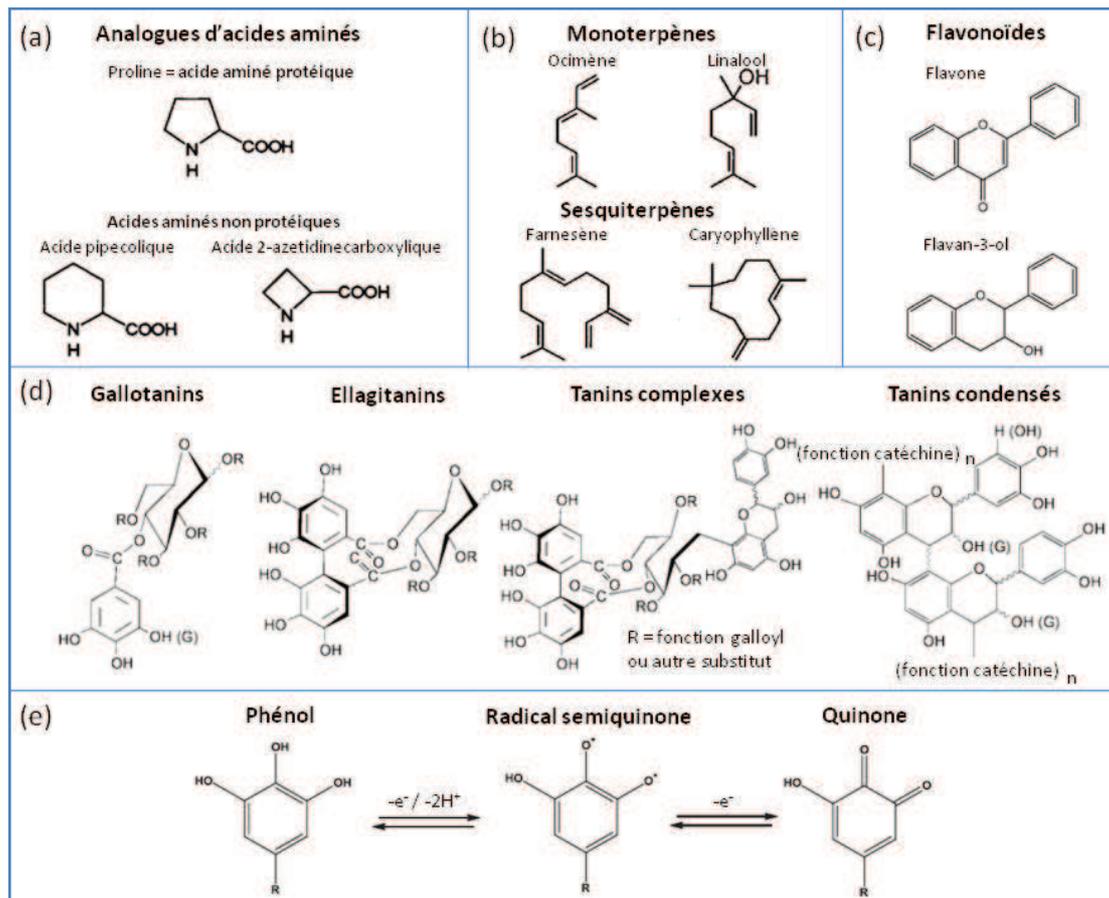


Figure 3 : Quelques composés de défense chez les plantes. (a) Analogues d'acides aminés toxiques, exemple de la proline (d'après Bernays et Chapman 1994) (b) Terpénoïdes volatils répulsifs, exemples des mono- et sesquiterpènes (d'après Paré et Tumlinson 1999) (c) Flavonoïdes, exemples des sous-classes flavone et flavan-3-ol (d'après Aron et Kennedy 2008) (d) Classification des tanins, répulsifs et anti-digestifs (d'après Khanbabaee et van Ree 2001). (e) Réaction d'auto-oxydation d'un groupement phénol, produisant des formes plus agressives et un stress oxydant (d'après Barbehenn et Constabel 2011).

Après ingestion, les mécanismes de défense contribuent à diminuer la qualité nutritive des tissus soit par retrait d'éléments essentiels, soit par inhibition de leur digestion (Fig. 2). Le renforcement des parois des cellules végétales évoqué plus haut peut ainsi diminuer la digestibilité des tissus ingérés par les insectes broyeurs comme les criquets (Clissold et al. 2004). Certaines enzymes des plantes peuvent aussi être ingérées et continuer à dégrader des nutriments dans l'intestin de l'insecte (ex : protéases, désaminases d'acides aminés, polyphénols oxydases). Si cela touche par exemple les acides aminés essentiels (ex : arginine et thréonine), le développement de l'insecte sera affecté. Les plantes produisent aussi des inhibiteurs de protéines variés. S'ils s'attaquent à des enzymes digestives du phytophage (ex : inhibiteurs de protéases et d'amylases), la valeur nutritive des tissus ingérés diminue et le développement peut être affecté (Wink 1988; Chen 2008; Eyles et al. 2009). Les tanins (Fig. 3d), métabolites secondaires les plus abondants chez les plantes, ont longtemps eu la réputation d'affecter la digestion en se fixant aux protéines ingérées et aux enzymes digestives des herbivores. Cependant l'avancée des travaux sur ces composés a permis de montrer que cela ne serait observé que pour les vertébrés. Pour les insectes,

l'effet négatif sur la nutrition n'est pas forcément avéré et leurs performances peuvent même être améliorées (Fox & Macauley 1977; Martin et al. 1987; Taper & Case 1987; Barbehenn et al. 2009; McArt et al. 2009). Néanmoins, la forme oxydée de certains composés phénoliques comme les tanins et flavonoïdes (ex : quinones et radicaux semiquinones, Fig. 3e) serait plus active et pourrait par exemple modifier des acides aminés essentiels et ainsi diminuer la qualité nutritionnelle du substrat. Le stress oxydant pourrait aussi créer des dégâts au niveau des cellules de l'épithélium intestinal, de même que les protéases des plantes pourraient aussi s'attaquer à la paroi du tube digestif (Pechan et al. 2002; Barbehenn & Constabel 2011). La plupart des métabolites secondaires sont toxiques pour les herbivores, sauf s'ils ont développé des techniques de détoxification. Néanmoins, les ressources investies dans cette détoxification sont pour ainsi dire perdues pour la croissance et cela induit donc indirectement un effet sur l'efficacité de la nutrition (Chen 2008). Les teneurs en composés de défense vont alors imposer des compromis différents dans l'allocation énergétique chez l'insecte qui dans la plupart des cas verra sa croissance affectée si la détoxification nécessaire devient trop importante et donc coûteuse en énergie (Smallegange et al. 2007, Manson & Thompson 2009, Maskato et al. 2014). Cependant, certains insectes capables de directement métaboliser des composés de défense peuvent alors consommer les tissus de leur hôte en toute impunité (Wittstock et al. 2004).

Les effets des composés de défense peuvent être cumulés, voire synergiques, avec une forte spécificité pour chaque système hôte/herbivore. Les stratégies sont très différentes entre espèces, entre tissus d'une même plante et parfois même en fonction du stade de développement d'un même tissu (Awmack & Leather 2002; Chen 2008; Calatayud et al. 2013). Cependant, l'effet d'un même composé peut aussi varier en fonction de la composition nutritionnelle du substrat. Il a été montré chez certains criquets que si les glucides sont en plus grandes quantités que les protéines, l'acide urique a un effet anti-appétant. Si la composition du substrat est inversée, ce même composé bouleverse cette fois l'utilisation des protéines par le criquet (Behmer 2008).

Ces déséquilibres alimentaires fluctuants et la présence de composés allélochimiques variés dans les tissus végétaux imposent donc des contraintes fortes sur les phytophages. Malgré tout, environ un quart des espèces eucaryotes connues sont des insectes herbivores, avec des besoins nutritionnels assez homogènes entre espèces. Cela implique que des mécanismes adaptatifs variés soient apparus pour permettre l'exploitation de végétaux extrêmement divers (Bernays 1998; Behmer 2008).

B. Mécanismes adaptatifs des phytophages

La forte dilution des éléments essentiels aux phytophages dans les tissus qu'ils ingèrent les obligent soit à consommer des quantités suffisantes de tissus pour satisfaire

leurs besoins en glucides, mais avec une carence en protéines, soit à consommer suffisamment pour répondre à leurs besoins en protéines, impliquant une ingestion excessive de glucides, soit à trouver un niveau intermédiaire entre les deux (Behmer 2009). Lors de la consommation d'un substrat, l'ingestion des nutriments est modulée en trois phases : une régulation pré-ingestive impliquant les chémorécepteurs, une régulation post-ingestive jouant sur l'absorption et l'utilisation des nutriments et enfin l'apprentissage (Behmer 2009). Ici nous les subdiviserons en fonction des mécanismes impliqués, indépendamment de la phase concernée.

1. Adaptations anatomiques et métaboliques

Une des adaptations classiques va évidemment concerner le tube digestif qui doit pouvoir recevoir des quantités suffisantes d'aliments pour en tirer les nutriments nécessaires. L'intestin des sauterelles représente environ un tiers du volume du corps et celui des chenilles peut contenir une quantité d'aliments pouvant dépasser la masse du corps. Grâce à un débit rapide de la nourriture ingérée, les sauterelles peuvent consommer l'équivalent de leur masse corporelle en une journée, voire le double si le substrat est pauvre en protéines. Les chenilles consomment 2 à 3 fois leur poids par jour (Bernays 1998). Les adultes du puceron de l'érable sycomore (*Drepanosiphum platanooides*) ingèrent au moins l'équivalent de leur propre poids et les larves plusieurs fois leur poids chaque jour (Dixon & Logan 1973).

Cependant, ingérer de grandes quantités de végétaux signifie également ingérer en excès certains composés nutritifs, et d'autres composés parfois non digestes, voire toxiques. Des mécanismes existent pour évacuer ou stocker ce surplus en nutriments, comme la conversion de l'azote en acide urique et celle des glucides en lipides respectivement (Behmer 2008). La toxicité des composés allélochimiques peut être atténuée par une excrétion rapide des déchets de l'alimentation, empêchant ces composés de traverser les membranes du tube digestif et d'atteindre leurs cibles (Schoonhoven et al. 2005). Certains spécialistes vont même jusqu'à stocker les composés toxiques pour leur propre défense (Wink & Schneider 1990). D'autres les utilisent comme précurseurs de leurs composés de défense (Kazana et al. 2007). Les insectes possèdent aussi des enzymes détoxifiantes (ex : cytochrome P450 mono-oxygénases) plus ou moins variées en fonction du spectre de plantes hôtes consommées (Gatehouse 2002; Schoonhoven et al. 2005; Feyereisen 2006).

L'évacuation rapide des nombreux déchets de l'alimentation est nécessaire mais elle impose au préalable une assimilation rapide des nutriments. La partie complémentaire de cette stratégie est donc de maximiser l'efficacité d'assimilation des nutriments contenus dans les tissus ingérés. L'optimisation de l'assimilation peut passer par des adaptations anatomiques au niveau du tube digestif. Le mésentéron du puceron *Acyrtosiphon pisum* (Harris) présente notamment des membranes particulières au niveau de la paroi du

mésentéron qui permettent de retenir les acides aminés et d'améliorer leur absorption, ainsi que de retenir les enzymes digestives contre la paroi pour éviter leur excrétion (Cristofolletti et al. 2003). La chambre filtrante des pucerons (Fig. 4a et b) leur permet d'augmenter la concentration et donc l'absorption en azote dans l'intestin. Le principe est que l'estomac et l'intestin antérieur (stomodeum) sont en partie ou complètement englobés dans l'intestin postérieur (proctodeum) pour permettre l'évacuation des déchets et surplus, tandis que les nutriments limitants peuvent circuler plus longtemps, ce qui augmente leur taux d'assimilation. La chambre filtrante est présente chez de nombreux Hémiptères qui se nourrissent exclusivement de sève comme les cochenilles ou les cicadelles. C'est là l'origine du miellat produit par ces insectes, un déchet de digestion enrichi en sucres qui sont en quantité importante dans la sève. Les pucerons ont ainsi une efficacité d'assimilation bien supérieure par exemple aux Lépidoptères. Ces structures peuvent avoir ponctuellement un rôle opposé de dilution en laissant circuler l'eau, lorsque certains glucides sont en trop grandes quantités dans la sève et que le puceron risque la déshydratation à cause des différences osmotiques par rapport à son hémolymphe (Dixon 1998; Calatayud & Rahbé 2013). Finalement, la concentration en nutriments d'un substrat ne conditionne pas toujours directement la croissance du phytophage car l'efficacité d'assimilation peut moduler les effets liés à de faibles ou fortes teneurs en éléments. Par exemple, plus les quantités d'azote sont élevées, moins l'insecte est efficace car il n'a pas besoin d'optimiser sa consommation s'il n'est pas limité (Schoonhoven et al. 2005). Cela peut être valable aussi pour l'assimilation des sucres (Lee et al. 2004).

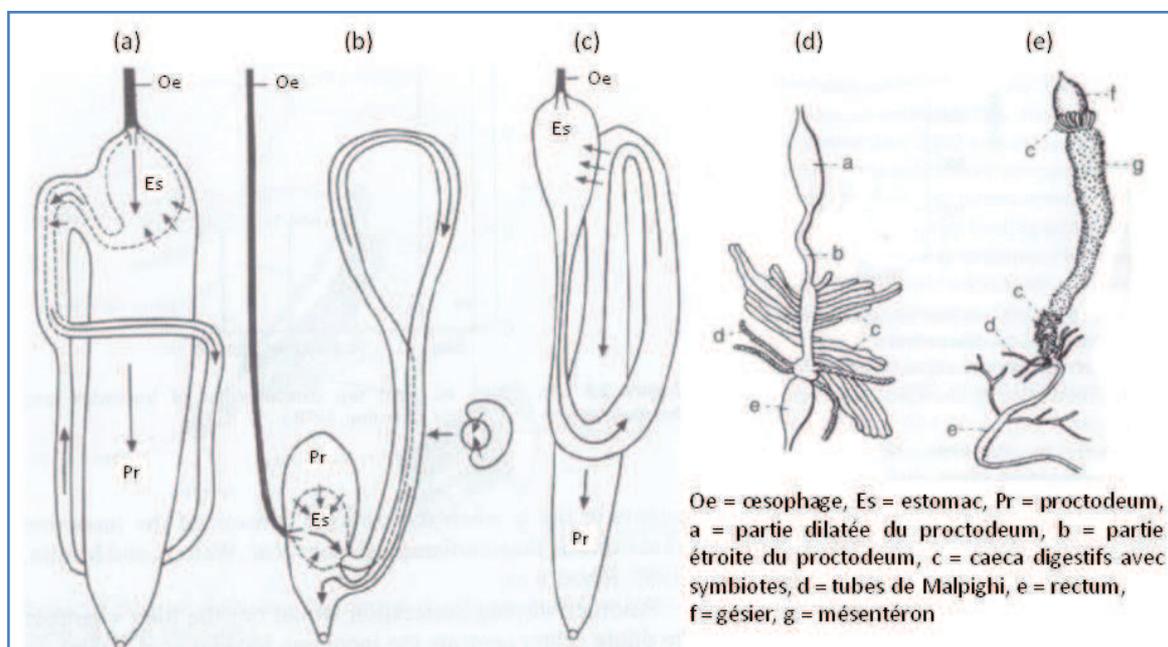


Figure 4 : Vue dorsale du canal alimentaire de (a) *Lachnus roboris*, (b) *Subsaltusaphis ornata*, (c) *Acyrthosiphon pisum*, (d) *Aphanus sp.* et (e) *Adoxus obscurus*. Chez (a) et (b) l'estomac et une partie du stomodeum sont complètement ou partiellement encaissés dans le proctodeum pour former la « chambre filtrante ». Chez (c), une partie du proctodeum est fermement accrochée à un côté de l'estomac. Flèches = flux dans le système. La comparaison du canal alimentaire d'un insecte (d) suceur de sève et (e) broyeur souligne l'importance variable accordée aux symbiotes. ((a), (b) et (c) d'après Dixon 1998 ; (d) et (e) d'après Schoonhoven 2005)

Enfin, d'autres adaptations anatomiques du tube digestif sont liées à la présence de micro-organismes symbiotiques contribuant à l'efficacité de la nutrition *via* différentes stratégies exposées ci-dessous (*cf.* partie I.B.3.). Plusieurs structures permettent d'optimiser cette symbiose. L'iléum (partie médiane du proctodeum) peut présenter une panse constituée de diverticules abritant des symbiotes microbiens, comme chez les termites, des larves de Scarabeidae, des blattes et des criquets. Différentes portions d'intestin peuvent être dilatées de sorte à constituer des chambres de fermentation où les conditions anaérobies permettent à certains micro-organismes de dégrader la cellulose (ex : *Oryctes nasicornis*, Scarabeidae). Beaucoup d'insectes possèdent des *caeca* gastriques (Fig. 4d et e) hébergeant des bactéries symbiotiques. Certaines cellules spécialisées peuvent aussi accueillir des symbiotes, et sont appelées mycétocytes ou bactériocytes, selon qu'elles hébergent respectivement des levures ou des bactéries. Ces cellules sont rassemblées en organes (mycétome ou bactériome) associés au tube digestif, aux tissus adipeux et aux tubes de Malpighi (appareil excréteur) (Bayon & Mathelin 1980; Dixon 1998; Schoonhoven et al. 2005; Calatayud & Rahbé 2013).

2. Adaptations comportementales

Outre les mécanismes internes de régulation de la nutrition, les herbivores ont développé des comportements spécifiques permettant également de compenser les déséquilibres nutritionnels de leurs plantes-hôtes. L'un d'eux consiste à varier les sources de nourriture, soit en consommant différentes espèces d'hôtes, soit en consommant différents organes (Fig. 5). En effet, la consommation d'aliments variés augmente particulièrement la valeur sélective des phytophages car l'hétérogénéité de la qualité nutritionnelle des plantes est très grande comparée à celle de proies animales (Lefcheck et al. 2013). Cette stratégie peut être pratiquée par un phytophage généraliste, souvent mobile et habitué à alterner les hôtes (ex : sauterelles). A l'inverse, un herbivore spécialiste, en particulier s'il est peu mobile, aura peu de chances de rencontrer des substrats qui se complètent et développera une forte efficacité d'utilisation des aliments pour sa croissance (Simpson et al. 2002). Certains insectes phytophages vont parfois jusqu'à consommer des tissus inhabituels voire non végétaux comme leurs exuvies, le pollen ou d'autres animaux, y compris de la même espèce. Cette capacité d'alternance permet à la fois d'améliorer l'équilibre alimentaire et de diminuer le temps passé à s'alimenter (Bernays 1998).

Cependant, la plupart des insectes ne sont pas généralistes et ne peuvent donc pas alterner les sources de nourriture, et même les généralistes peuvent se retrouver cantonnés à un seul type d'hôte. Ils doivent alors adopter d'autres stratégies comme s'attaquer à des parties différentes d'une même plante selon leurs besoins. Certaines larves de Lépidoptères

vont par exemple consommer d’abord de jeunes feuilles plus riches en protéines et ensuite migrer vers les tiges plus riches en glucides (Bernays 1998). Le puceron *Chaitophorus populicola* (Thomas) migre régulièrement sur les jeunes feuilles de peuplier contenant plus d’acides aminés (Gould et al. 2007). Les stratégies d’alimentation peuvent aussi porter sur une alternance quotidienne dans le choix des parties consommées sur l’hôte. C’est par exemple le cas des pucerons subissant un stress osmotique qui sont capables pour s’hydrater de s’alimenter temporairement dans les vaisseaux du xylème plutôt que du phloème (Tjallingii 1989). Une autre stratégie consiste à réguler la consommation en fonction de la qualité nutritionnelle de l’unique substrat disponible. On parle d’une réponse de compensation, c’est-à-dire que la consommation est d’autant plus forte que le substrat est pauvre. C’est par exemple le cas du puceron *Tuberolachnus salignus* (Gmelin) qui ingère quatre fois plus de sève sur les saules matures que sur les arbres sénescents présentant une plus grande concentration en azote (Mittler 1958). La chenille *Spodoptora littoralis* (Boisduval) mange d’autant plus que le substrat à disposition est dilué (Lee et al. 2004). Une faille de cette stratégie repose sur le fait qu’un faible métabolisme primaire chez la plante, fournissant un substrat dilué, peut être associé à une concentration en métabolites secondaires de défense, neutralisant les bénéfices du comportement de compensation.

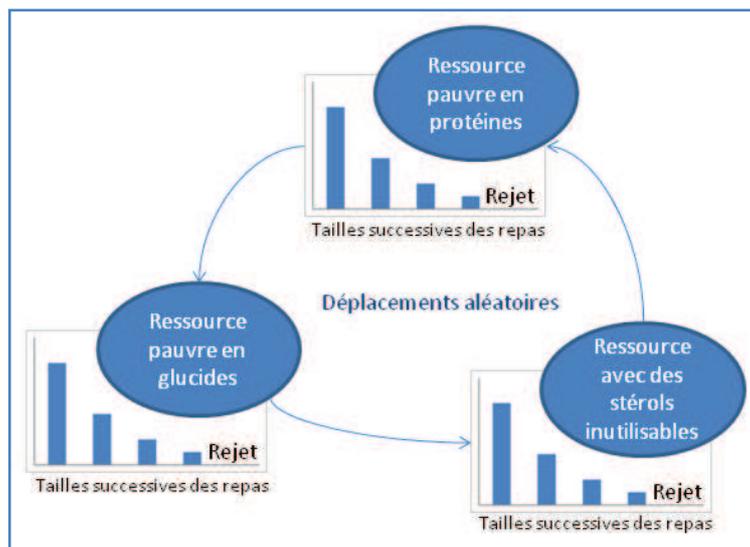


Figure 5 : Stratégie d’optimisation du mélange des ressources alimentaires. L’apprentissage du rejet des substrats pauvres se rencontre chez les herbivores généralistes et mobiles comme les sauterelles. Elle permet de couvrir les besoins nutritifs de l’insecte en utilisant différentes plantes complémentaires dans leur composition (d’après Bernays 1998).

3. Symbioses mutualistes

Dans cette quête d’optimisation nutritionnelle, les herbivores abritent ou cohabitent avec de nombreux micro-organismes qui peuvent contribuer à équilibrer le substrat végétal grâce à des relations mutualistes (Tab. 1). Les insectes se développant sur des tissus

végétaux particulièrement déséquilibrés comme la sève, le bois et les débris végétaux ont développé des interactions avec des symbiotes variés (Behmer 2006; Nardon & Heddi 2013). On peut subdiviser ces micro-organismes en trois groupes : les ectosymbiotes se développant dans l'environnement du phytophage, les endosymbiotes vivant dans le corps de l'herbivore de façon extracellulaire et les endocytobiotiques se trouvant à l'intérieur de cellules isolées ou dans structures spécialisées comme les bactériomes et mycétomes évoqués ci-dessus (cf. partie I.B.1.) (Nardon & Heddi 2013).

Concernant les ectosymbioses, plusieurs espèces d'insectes sont capables de cultiver des champignons en leur apportant un substrat prédigéré (Corio-Costet & Lieutier 2013). Les fourmis champignonnières (Attines) pratiquent une fongiculture : elles récoltent des fragments végétaux variés et y ajoutent des sécrétions fécales pour optimiser la culture de leurs symbiotes avant de les consommer. Cette technique leur procure un substrat équilibré et détoxifié à partir de plantes diverses. Les termites champignonnières (Macrotermitinae) ont domestiqué plusieurs espèces de *Termitomyces*, symbiotes qui constituent un aliment et contribuent à la dégradation de la cellulose avant ingestion. Les tissus fongiques riches en eau, glucides, protéines, vitamines B et stérols fournissent un substrat plus équilibré en éléments essentiels. De plus, l'ingestion d'enzymes fongiques restant actives dans l'intestin de l'insecte peut faciliter la digestion et la détoxification des tissus végétaux (McCulloch Martin 1992; Corio-Costet & Lieutier 2013; De Fine Licht et al. 2013). Toujours dans un but d'optimisation nutritive, d'autres insectes inoculent des champignons phytopathogènes dans leur plante hôte pour la modifier. Par exemple, les Coléoptères de la sous-famille des Platypodinae creusent dans les troncs d'arbres des galeries où ils inoculent et cultivent des champignons appelés *Ambrosia* qui sont leur source exclusive de nourriture (régime xylomycétophage) (De Sousa & Inacio 2005; Six 2012). De même, les guêpes xylophages de la famille des Siricidae entretiennent une relation obligatoire avec des symbiotes inoculés lors de l'oviposition. Les larves ingèrent avec le bois des fragments mycéliens qui digèrent quasiment à eux seuls la cellulose et l'hémicellulose dans le canal alimentaire. Les bénéfiques en termes de nutrition peuvent donc être multiples car ces champignons peuvent modifier la composition de la plante en eau, en glucides et en protéines, en plus de faciliter la digestion des tissus végétaux (McCulloch Martin 1992).

Les endosymbioses sont fréquentes au niveau du tube digestif des insectes se nourrissant dans le phloème et le xylème ou utilisant la cellulose (libres dans le lumen ou au niveau de caeca, Fig. 4d et e). Ces derniers sont fortement voire totalement dépendants des micro-organismes pour leur survie. Les micro-organismes peuvent être bactériens ou fongiques. Ils participent à la nutrition de l'insecte par des mécanismes variés. Leur rôle peut être de faciliter la digestion des tissus végétaux. Un des exemples classiques est celui des termites du genre *Reticulitermes* dont la digestion de la cellulose est grandement améliorée grâce aux bactéries et protistes présents dans leur tube digestif. Contrairement à la plupart des phytophages qui évacuent la cellulose comme un déchet, l'association mutualiste avec des micro-organismes a ainsi permis à certains termites, thysanoures ou encore cafards

d'exploiter au mieux les substrats riches en cellulose comme le bois (Douglas 2009). La capacité de certains symbiotes à dégrader la lignine (ex : Actinomycètes de termites et Protéobactéries de scolytes) améliore encore la digestion des parois cellulaires du substrat végétal (Watanabe et al. 2003; Bugg et al. 2011). Des bactéries symbiotiques variées associées à certains termites sont en plus capables de fixer l'azote atmosphérique et de produire des acides aminés qui seront ensuite utilisable par leur hôte (Ohkuma et al. 1999). Les endosymbiotes peuvent aussi directement apporter des éléments essentiels à leurs hôtes. De nombreuses drosophiles sont associées à des levures leur apportant des nutriments essentiels, des vitamines et des stérols (Starmer & Fogleman 1986). Certaines cicadelles se nourrissant de sève sur riz dépendent aussi de symbiotes de type levure notamment pour le métabolisme des stérols et le recyclage de l'azote (Noda et al. 1979; Sasaki et al. 1996).

Les symbiotes peuvent aussi contribuer indirectement à l'amélioration de la qualité nutritive de la plante hôte en diminuant sa toxicité. L'arsenal enzymatique des champignons leur permet de métaboliser ou détoxifier tout un panel de composés allélochimiques des plantes. Les composés toxiques ainsi hydrolysés, oxydés ou encore conjugués sont ensuite excrétés par les insectes. C'est par exemple le cas des levures associées aux Drosophiles (Starmer & Fogleman 1986; Dowd 1992).

Tableau 1 : Exemples de symbioses entre insectes phytophages et micro-organismes liées à la nutrition.

C = champignon, B = bactérie, ecto = ectosymbiose, endo = endosymbiose, cyto = endocytobiose (d'après Douglas 2013)

Intérêts	Insectes	Symbiotes	Références
Synthèse d'acides aminés essentiels (complément)	Hémiptères Pucerons (ex : <i>Acyrtosiphon pisum</i>)	<i>Buchnera aphidicola</i> (B, cyto) <i>Serratia symbiotica</i> (B, cyto)	Buchner (1965) Koga et al. (2003)
Synthèse de vitamines (complément)	Hémiptères Cicadelles (ex : <i>Homalodisca coagulata</i>)	<i>Sulcia muelleri</i> (B, cyto) <i>Baumannia cicadellincola</i> (B, cyto)	McCutcheon et Moran (2007)
Synthèse de stérols (complément)	Coléoptères Anobides (ex : <i>Lasioderma serricorne</i>)	<i>Symbiotaphrina kochii</i> (C, cyto) <i>Symbiotaphrina buchneri</i> (C, cyto)	Noda et Koizumi (2003)
Fixation et recyclage des composés azotés	Isoptères Termites (espèces variées)	Bactéries variées (B, endo)	Ohkuma (1999)
Dégradation de polymères complexes (ex : lignine)	Isoptères Termites (ex : <i>Coptotermes formosanus</i>)	<i>Streptomyces</i> sp. (B, endo)	Watanabe et al. (2003)
Détoxification de composés allélochimiques	Hyménoptères Fourmis (ex : <i>Acromyrmex echinator</i>)	<i>Leucocoprinus gongylophorus</i> (C, ecto)	De Fine Licht et al. (2013)

Les endocytobiotés sont généralement localisés dans des cellules particulières isolées ou rassemblées en mycétome ou bactériome, des cellules géantes et polyploïdes témoignant d'une forte activité métabolique (Nardon et al. 2002). Les endocytobiotés fournissent à leurs hôtes des substances utiles ou indispensables, tels que des vitamines, des stérols et des acides aminés essentiels (Noda & Koizumi 2003; Zientz et al. 2006; McCutcheon & Moran 2007; Akman Gündüz & Douglas 2009; Douglas 2009; McCutcheon et al. 2009; Nardon &

Heddi 2013). Les pucerons suceurs de sève sont bien connus pour leur coévolution avec la bactérie *Buchnera aphidicola* qui leur apporte des acides aminés essentiels et des vitamines (Bernays 1998; Nakabachi & Ishikawa 1999; Akman Gündüz & Douglas 2009). On considère que les capacités du génome de cette bactérie dans les voies de biosynthèse des acides aminés conditionnent les besoins nutritionnels des différentes espèces de pucerons (Moran et al. 2008). Les apports respectifs entre acides aminés par *Buchnera* peuvent être modulés en fonction de la composition du substrat ingéré par son hôte, permettant une adaptation aux fluctuations de composition des plantes (Douglas et al. 2001). Les endocytobiotés peuvent aussi convertir des nutriments en excès de façon réversible et sans coût énergétique, permettant ainsi un stockage transitoire (Gasnier-Fauchet et al. 1986). Les symbiotes de type levure de certaines cicadelles participent au recyclage des déchets azotés en composés nutritifs (Sasaki et al. 1996). Tous ces mécanismes contribuent à l'optimisation de la nutrition.

4. Manipulation de la plante-hôte

Plutôt que de s'adapter aux déséquilibres des tissus ingérés, certains phytophages transforment la composition de ces tissus pour les adapter à leurs besoins. Il s'agit alors d'une manipulation de la plante-hôte, c'est-à-dire d'une amélioration nutritionnelle et/ou une diminution de toxicité des tissus végétaux avant leur ingestion par le phytophage. Plusieurs Ordres d'insectes et d'autres Invertébrés sont concernés et les stratégies sont variées. Ils peuvent manipuler leur plante-hôte soit pour leur propre bénéfice, soit pour celui de leur descendance.

Une première stratégie consiste à inhiber ou épuiser les mécanismes de défense de la plante hôte qui pourraient entraver l'installation ou le développement des insectes. Des stratégies comportementales collectives peuvent ainsi se rencontrer chez les insectes phytophages, notamment certains Scolytes qui sont capables de contrer les défenses des conifères, pourtant très efficaces. Pour se faire, les insectes attaquent leur hôte en masse grâce à leurs phéromones d'agrégation. A ces attaques collectives s'ajoute le fait que les Scolytes orientent leur galerie longitudinalement dans le tronc de l'hôte et inoculent à l'arbre des champignons phytopathogènes, pour stimuler davantage les défenses de l'arbre. Cela permet d'épuiser rapidement les mécanismes de défense des arbres, ce qui favorise l'installation des insectes (Lieutier 2004; Lieutier et al. 2009).

Un autre type de manipulation consiste à modifier le contenu des tissus végétaux en nutriments et/ou en composés de défense pour ingérer un substrat de meilleure qualité nutritive. Les pucerons peuvent ainsi moduler le métabolisme de leur plante-hôte pour améliorer la composition du phloème en nutriments ou diminuer sa toxicité (Thompson & Goggin 2006; Giordanengo et al. 2010). Le puceron *A. pisum* remobilise l'azote de la zone de croissance apicale de son hôte vers son site de nutrition (Girousse et al. 2005). Le puceron

Rhopalosiphum padi (L.) est capable d'augmenter les teneurs en acides aminés du maïs et de l'orge alors que *Sitobion avenae* (F.) peut diminuer les concentrations en composés phénoliques sur ces mêmes hôtes (Eleftherianos et al. 2005). L'augmentation des teneurs en acides aminés du phloème permet de diminuer les taux d'ingestion et donc le temps consacré à l'alimentation chez certains pucerons (Sandström & Moran 2001). Ce dernier type de manipulation peut être plus ou moins poussé, et conduit parfois à des transformations profondes des tissus et du métabolisme de l'hôte. On peut séparer ces stratégies selon deux modes de vie : ectophyte (à l'extérieur de la plante) pour les insectes générant des chloroses ou des pseudogalles et endophyte (à l'intérieur de la plante) pour les insectes mineurs ou cécidogènes qui développent une relation plus intime avec les tissus de leur hôte. Leur formation, les conséquences sur le manipulateur et son hôte et leur modulation sont développés ci-après. Elles impliquent des modifications souvent très spécifiques au couple herbivore-plante hôte avec un degré de complexité variable. On rencontre ces structures chez différents insectes mais aussi chez d'autres Invertébrés comme les nématodes et acariens.

11. Modifications des tissus de la plante-hôte

A. Les différents modes de manipulation

Les chloroses sont des dépigmentations ou changements de pigmentation de feuilles ou autres tissus végétaux résultant de pertes en chlorophylle (Fig. 6a). Ces colorations anormales peuvent être localisées au niveau de la zone de piqûre, le long des vaisseaux ou bien sur l'ensemble du limbe des feuilles. Elles sont générées par des Hémiptères comme certains Aphididae (ex : *Diuraphis noxia* (Mordvilko), *Therioaphis trifolii maculata* (Monell), *Pemphigus betae* (Doane)) sur Herbacées (ex : blé, orge et luzerne) ou encore sur arbres (ex : épicéa et peuplier) (Quisenberry & Ni 2007).

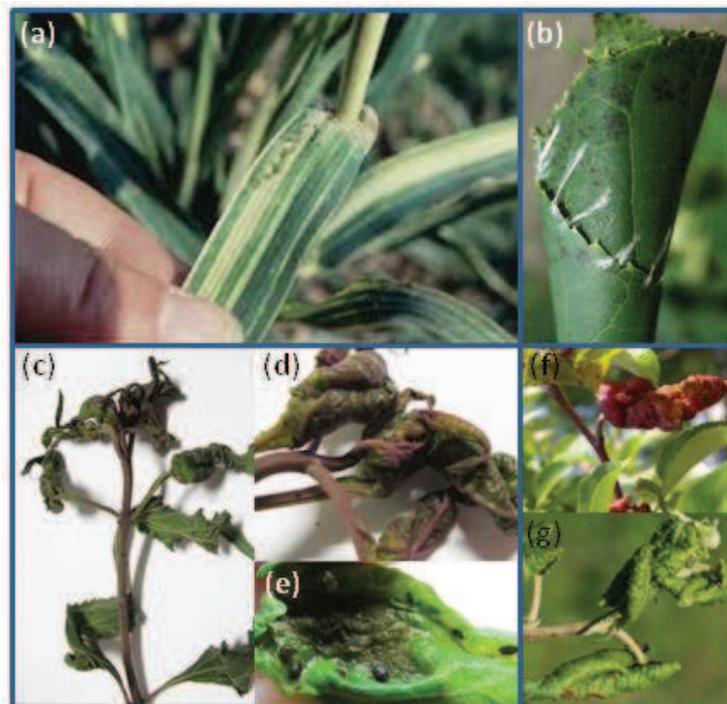


Figure 6 : Exemples de chlorose et de pseudogalles de type enroulement de feuilles. (a) Chlorose sur feuille de blé générée par *Diuraphis noxia* (Aphididae) se présentant en longues bandes jaunes (© CIMMYT). (b) Exemple d'enroulement actif réalisé par un Lépidoptère grâce à la production de soie adhésive. (c) et (d) Enroulement indirect de feuille généré par *Nigritergaphis crassisetosa* (Aphididae) dont les colonies (e) se développent à l'intérieur (d'après Zhang et al. 2013). (f) et (g) Enroulements indirects différents générés par *Dysaphis devectora* et *D. noxia* (Aphididae) respectivement, tous deux sur feuille de pommier (© J. L. Let et INRA, Bernard Chaubet respectivement).

Les pseudogalles et les galles sont rarement distinguées dans la littérature car la limite entre les deux n'est pas clairement définie. Nous considérerons ici les pseudogalles comme de simples déformations d'organes végétaux déjà existants, rassemblant des plissements de tiges et des enroulements ou repliements de feuilles (Fig. 6 b à g). Les plus communes et étudiées sont ces dernières qui consistent en un enroulement complété

souvent d'un gonflement ou gaufrage de feuilles autour de colonies d'insectes ou d'individus isolés. L'enroulement peut être activement réalisé par l'insecte ou indirectement apparaître à cause du comportement d'alimentation des phytophages. On les rencontre chez certains Hémiptères (ex : Aphididae), Hyménoptères (Megalodontidae, Pamphilidae), Thysanoptères (ex : Phlaeothripidae), mais surtout chez les Lépidoptères (nombreuses familles dont Gracillariidae, Hesperiiidae, Pyralidae, Tortricidae). Les plantes touchées peuvent être aussi bien des Herbacées (ex : blé et millepertuis) que des arbres (ex : pommiers et peupliers) (Mound 1971; Delplanque et al. 1998; Daly et al. 1998; Barjadze et al. 2011; Quisenberry & Ni 2007; Zhang et al. 2013). Un exemple d'enroulement indirect est celui généré par *D. noxia* (Aphididae) qui colonise préférentiellement la face supérieure des feuilles de son hôte. Lorsque les densités sont importantes, une perte de turgescence peut conduire à un recourbement des limbes autour de la veine centrale sur plant âgé ou à une inhibition du déploiement complet des feuilles sur de jeunes plants (Burd et al. 1993; Quisenberry & Ni 2007). La même technique se retrouve chez les pucerons du genre *Macrosiphini* (Aphididae) qui colonisent uniquement la phase inférieure des feuilles jusqu'à ce qu'elles s'enroulent autour de la colonie (Zhang et al. 2013). Chez *Pachypappa tremulae* L. (Aphididae), ce sont des piqûres au niveau du pétiole qui provoquent le rabattement du limbe pour former un nid autour des larves (Delplanque et al. 1998). Les Lépidoptères réalisent des enroulements actifs en s'aidant de leur production de soie, avec des techniques variées au niveau du découpage des feuilles (Fitzgerald et al. 1991; Greeney & Jones 2003).

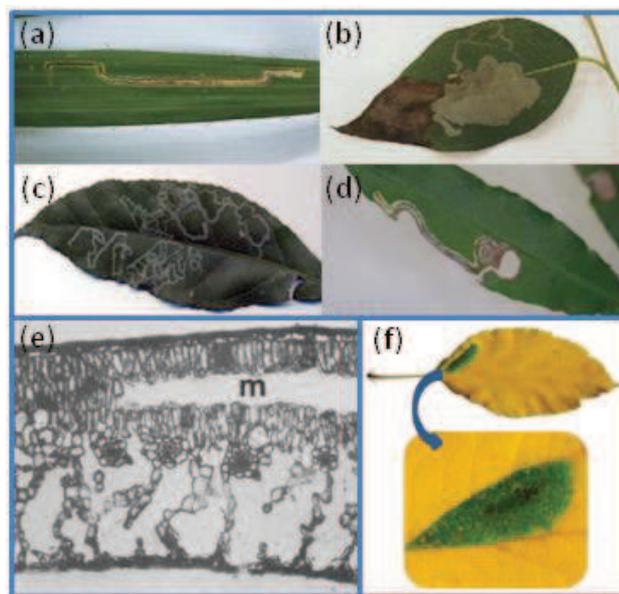


Figure 7 : Exemples de mines foliaires générées par des insectes. Différentes formes de mines : **(a)** mine linéaire sur feuille de *Calamus muellerii*, **(b)** mine linéaire étendue en tâche sur *Eucalyptus* sp., **(c)** mine serpentiforme sur *Elaeocarpus*, **(d)** mine en spirale sur *Morinda jasminoides* (d'après Sinclair et Hughes 2009). **(e)** Coupe transversale de feuille de lumière d'*Ilex opaca* présentant une mine (= m) de *Phytomyza ilicicola* (Diptera) dans le mésophylle palissadique (d'après Kimmerer et Potter 1987). **(f)** Ile verte générée par *Phyllonorycter blancardella* (Lepidoptera) sur feuille d'automne de pommier (d'après Kaiser et al. 2010).

Les mineurs de feuilles (Fig. 7) peuvent être des larves de quelques Coléoptères (ex : Attelabidae, Buprestidae, Chrysomelidae, Nititulidae) et Hyménoptères (Argidae, Pergidae, Tenthredinidae), un certain nombre de familles de Diptères (ex : *Anthomyiidae*, Drosophilidae, Phoridae, Tephritidae) et surtout de nombreuses familles de Lépidoptères (ex : Cosmopterygidae, Gracilariidae, Pyralidae, Tortricidae) (Connor & Taverner 1997). On les retrouve sur un grand nombre de mono- et dicotylédones et même sur quelques fougères (Sinclair & Hughes 2010). L'objectif des mineurs serait de consommer les tissus internes les plus nutritifs tout en évitant les tissus présentant des systèmes de défense. C'est l'hypothèse d'alimentation sélective proposée par plusieurs auteurs (Kimmerer & Potter 1987; Connor & Taverner 1997; Scheirs et al. 2001). La stratégie consiste à consommer les tissus du mésophylle qui sont les plus riches en nutriment et à éviter au maximum les tissus de l'épiderme et les vaisseaux qui contiennent les structures et composés de défense (Scheirs et al. 2001) (Fig. 7e). Cette stratégie n'est pas une manipulation de la plante à proprement parler, mais s'en approche légèrement dans le sens où l'insecte leurre son hôte en diminuant la perception de sa présence et en contournant ses défenses. Au-delà de cette adaptation comportementale, certains insectes mineurs sont considérés comme de véritables manipulateurs lorsqu'ils vont jusqu'à modifier la physiologie de la plante pour améliorer le contenu nutritif des tissus attaqués. L'exemple le plus marquant de manipulation est celui des « îles vertes » générées par des larves de Lépidoptères que l'on voit très nettement apparaître lorsque vient l'automne et la sénescence naturelle des feuilles (Giron et al. 2013) (Fig. 7f). On les considère parfois comme un intermédiaire entre une simple mine et une galle car même si les modifications sont moins profondes, les insectes en tirent un avantage en apportant une certaine longévité aux organes qu'ils consomment (Walters et al. 2008).

Les galles sont des formations par les plantes d'organes anormaux parfois spectaculaires. Par opposition aux pseudogalles, seront reconnues ici comme galles les transformations allant au-delà de la simple déformation d'un organe, avec au minimum réorganisation partielle des tissus originels, voire apparition de structures nouvelles (normalement inexistantes) ou en position ectopique (localisation anormale) sur la plante hôte concernée. En d'autres termes, les galles impliquent différenciation et croissance actives des tissus végétaux. Stone et Schönrogge (2003) considèrent les galles comme une extension du phénotype des insectes induisant leur formation, car même si elles sont composées de tissus végétaux, leur développement est largement contrôlé par les gènes des insectes. On peut les séparer en deux groupes avec d'une part les galles ouvertes générées par certains Hémiptères (Aphididae, Psyllidae) et Thysanoptères (Phlaeothripidae) et d'autre part les galles fermées générées par certains Coléoptères (ex : Buprestidae, Cerambycidae, Curculionidae), Lépidoptères (ex : Cosmopterygidae, Gelechiidae, Tortricidae), Hémiptères (Adelgidae, Aphididae, Pemphigidae, Phylloxeridae), mais surtout des Diptères (ex : Agromyzidae, Cecidomyiidae) et des Hyménoptères (ex : Cynipidae, Eurytomidae,

Tenthredinidae) (Daly et al. 1998). Tous les organes des plantes peuvent être touchés : racine, tige, pétiole, limbe, bourgeon (Fig. 8).

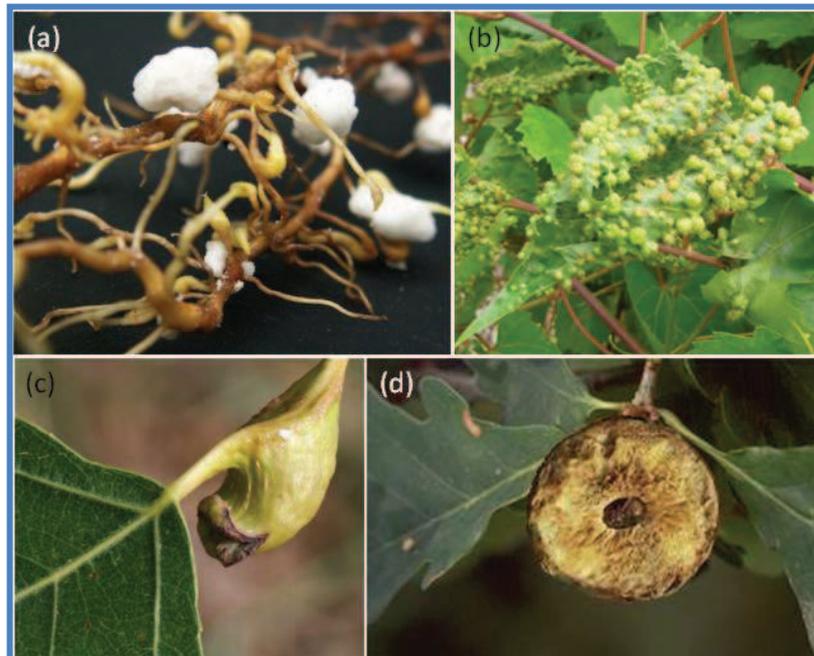


Figure 8 : Exemples de galles générées par des insectes sur différents organes végétaux. (a) et (b) galles générées par *Viteus vitifoliae* sur racines (© J. Schmid) et feuilles (© V'innopôle Sud-Ouest) de vigne respectivement. (c) galle ouverte générée par *Pemphigus bursarius* sur pétiole de peuplier (© P. Falatico). (d) galle générée par une espèce de Cynipidae sur bourgeon de chêne vue en coupe (© B. Langelliers).

Shorthouse et al. (2005) considèrent les insectes cécidogènes comme les herbivores les plus sophistiqués de la nature. La plupart de ces insectes sont spécialisées sur une seule espèce de plante hôte. Quelques espèces d'insectes peuvent s'attaquer à différents hôtes, mais ils restent marginaux parmi les milliers d'espèces d'insectes cécidogènes décrites (Abrahamson et al. 1989; Frenzel et al. 2000; Wool 2005). Les galles peuvent être anatomiquement et physiologiquement différentes même entre espèces d'insectes très proches. La manipulation est au cœur du fonctionnement des galles car le principe général est que l'insecte prend le contrôle de son hôte pour utiliser la croissance et la physiologie des organes attaqués à son avantage. Les mécanismes de manipulation de la plante sont loin d'être totalement élucidés encore aujourd'hui, même s'ils sont de plus en plus étudiés (Shorthouse et al. 2005). Evolutivement parlant, le développement de galles se retrouve au sein d'une si grande diversité d'organismes qu'on peut imaginer que la sélection a favorisé plusieurs fois cette stratégie d'exploitation très efficace des ressources des plantes. Les mécanismes impliqués sont donc de toute évidence assez variés (Stone et al. 2010), et les forces évolutives ayant conduit à cette diversité sont certainement également variés. Chez les insectes cécidogènes coloniaux comme les pucerons et les thrips, la structure de la galle a certainement été sélectionnée dans le sens d'une augmentation de la surface interne disponible pour l'alimentation. A l'inverse, chez les guêpes et moucheron, il semblerait que

les structures externes non nutritives et potentiellement protectrices vis-à-vis des ennemis naturels participent davantage à la diversité observée (Stone & Schönrogge 2003).

B. Les différentes échelles de manipulation et leur nature

Les mécanismes permettant de conférer aux tissus végétaux des propriétés bénéfiques pour le phytophage rassemblent des modifications biochimiques (nutriments et composés allélochimiques en quantités et proportions plus adaptées), des modifications cellulaires (dédifférenciation puis différenciation des cellules végétales vers un rôle différent) et des modifications anatomiques (réorganisation plus ou moins poussée des tissus). La littérature scientifique est assez restreinte pour les insectes manipulateurs ectophytes, à l'exception des piqueurs-suceurs car ils sont responsables de nombreux dégâts en agriculture. Les insectes endophytes et surtout cécidogènes ont été au contraire plus largement étudiés et leurs stratégies de manipulation seront donc ici davantage détaillées.

1. Modifications biochimiques

Le déclenchement de chloroses consiste à convertir en acides aminés libres et assimilables les protéines chlorophylliennes des cellules adjacentes au site de nutrition. Ce mécanisme est similaire à la sénescence naturelle des feuilles qui s'accompagne d'un recyclage de la chlorophylle (Cockfield 1988). Les aiguilles d'épicéa chlorosées par le puceron *Elatobium abietinum* (Walker) présentent ainsi des différences de proportions entre acides aminés (Fisher 1987). La cicadelle *Nilaparvata lugens* (Stal.) peut augmenter jusqu'à 30 fois les concentrations de certains acides aminés essentiels des feuilles de riz (Cagampang et al. 1974). Certains pucerons comme *Schizaphis graminum* (Rondani) et *D. noxia* augmentent les concentrations en acides aminés du phloème et augmentent la proportion en acides aminés essentiels de façon systémique sur blé et orge (Telang et al. 1999; Sandström et al. 2000). Cela leur permet de presque totalement s'affranchir de ses endosymbiotes pour la nutrition. *Diuraphis noxia* forme en plus un puits métabolique au niveau de son site de nutrition en diminuant les flux de sèves vers le reste de sa plante hôte (Botha & Matsiliza 2004).

Les enroulements de feuilles ne constituent pas seulement un abri mais peuvent aussi présenter des modifications en termes de composition biochimique. En effet, les feuilles de lumière présentent souvent des caractéristiques défavorables pour les phytophages comme de plus fortes concentrations en composés de défense et en fibres. Les enroulements créent un microenvironnement reproduisant des conditions d'ombrage pour les feuilles concernées, améliorant ainsi leur composition (Fukui 2001). Certaines larves de Tortricidae peuvent ainsi consommer des feuilles normalement toxiques en empêchant la photo-activation de composés de défense comme l'hypericine (Sandberg & Berenbaum

1989). Certaines larves de Pyralidae diminuent la dureté et les concentrations en tanins sans affecter les teneurs en azote et en eau des feuilles (Sagers 1992). Le Lépidoptère *Rhopobota naevana* (Hübner) (Tortricidae) est capable d'induire en plus une augmentation de la teneur en azote des feuilles (Fukui et al. 2002).

Dans le cas des « îles vertes », les larves d'insectes maintiennent une activité métabolique normale dans les zones infestées alors même que l'ensemble du feuillage entre en sénescence. Comme la sénescence s'accompagne d'une dégradation des protéines, des glucides et des lipides par la plante hôte qui les récupère avant l'hiver, la manipulation empêche ce recyclage et maintient la qualité nutritive des tissus au même niveau que celui des feuilles encore vertes. L'insecte manipulateur s'affranchit ainsi en partie des fluctuations saisonnières et finit son cycle biologique dans un cadre constant (Giron et al. 2013).

C'est dans le cas des galles que l'on va trouver les modifications les plus diversifiées et complexes. Les concentrations de nombreux composés peuvent être modifiées car les galles fonctionnent comme des puits métaboliques apportant tous les éléments nécessaires à la croissance des insectes. On peut ainsi observer des modifications des flux de carbone et d'azote (Larson & Whitham 1991; Raman et al. 2006). La formation de galles mobilise des nutriments comme des sucres solubles, de l'amidon, des acides aminés libres, des protéines et/ou des lipides en provenance des tissus adjacents (Shannon & Brewer 1980; Koyama et al. 2004; Motta et al. 2005; Saltzmann et al. 2008; Suzuki et al. 2009; Matsukura et al. 2012; Dsouza & Ravishankar 2014). Le métabolisme élevé de ces tissus en croissance nécessite des photosynthétats en grandes quantités. Cela implique la mise en place d'un flux des composés nécessaires vers le puits que constituent les tissus de la galle, en provenance des tissus adjacents (Castro et al. 2012). Des mesures calorimétriques des tissus de la galle d'*Epiblema strenuana* Walker (Lepidoptera : Tortricidae) montrent par exemple qu'ils ont un plus haut niveau énergétique que les tissus situés juste au-dessus sur les tiges, indiquant une absorption des composés énergétiques au niveau de la galle (Florentine et al. 2005). A l'inverse, des composés comme l'amidon peuvent parfois diminuer dans la galle, certainement suite à l'activation d'enzymes type amylase et hydrolase permettant une conversion en sucres soluble (Dsouza & Ravishankar 2014). Les nutriments ciblés par la manipulation peuvent varier en fonction des stades de développement de l'insecte (Saltzmann et al. 2008). Les nutriments majoritairement accumulés dépendraient donc de la ressource énergétique principale et du stade de développement de l'insecte.

Une augmentation des concentrations en composés de défense de la plante (composés phénoliques par exemple) apparaît aussi fréquemment dans les galles. L'accumulation des composés de défense peut se présenter sous la forme d'un gradient décroissant en s'éloignant de la galle (Motta et al. 2005; Samsone et al. 2011; Dsouza & Ravishankar 2014). Des colorations très voyantes des galles semblent parfois être associées à cette toxicité, faisant alors office de colorations aposématiques vis-à-vis des autres herbivores (Inbar et al. 2010). Connor et al. (2012) tempèrent cependant cette hypothèse et

suggèrent que ces colorations seraient plutôt des artefacts liés à l'accumulation de composés lors de la formation des galles. Ils mentionnent cependant que les galles sont souvent attaquées en hiver, lorsqu'elles ont perdu leur couleur rouge. A l'inverse, les mécanismes de défense de la plante peuvent être atténués par le cécidogène. C'est par exemple le cas du phylloxera qui inhibe partiellement ou stimule certaines voies de biosynthèse de composés secondaires, ayant pour effet global une altération des capacités de défense de la vigne (Nabity et al. 2013). Plusieurs espèces de Tenthredes contrôlent aussi les voies de biosynthèse de la plupart des composés phénoliques de défense des Saules pour diminuer leurs concentrations dans les tissus internes de leurs galles comparées aux feuilles (Nyman & Julkunen-Tiitto 2000). Certains mécanismes de défense indirects de la plante peuvent être aussi inhibés, comme par exemple l'émission de composés volatiles, ce qui permettrait aux insectes cécidogènes de ne pas être repérés à distance par leurs parasitoïdes (Tooker & Hanks 2006; Tooker et al. 2008).

Enfin certaines modifications biochimiques peuvent être assez inattendues. Certaines galles du Chêne générées par des guêpes Cynipidae excrètent une sorte de miellat durant tout le développement de l'insecte, bien que les chênes ne soient pas connus pour posséder de nectaires. Ces sécrétions, longtemps considérées comme inutiles pour le cécidogène (Bequaert 1924), serviraient de récompense pour les fourmis, donnant lieu à une interaction mutualiste dont les bénéfices pour le cécidogène sont évoqués plus loin (cf. partie III.A.1.) (Washburn 1984).

2. Modifications cellulaires

Des modifications cellulaires ne sont mentionnées que chez les galles mais l'absence de signalement chez les autres manipulateurs peut être due à une absence d'étude en ce sens. L'existence de cellules dites nutritives dans les galles peut être considérée comme un pilier de leur fonction (Rohfritsch 1992). Ces cellules présentent notamment un cytoplasme abondant et une vacuole réduite et fragmentée, une hypertrophie du noyau et du nucléole et des organites abondants (plastides, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, ribosomes et mitochondries). Ces modifications sont retrouvées dans des cellules végétales normales physiologiquement et métaboliquement actives comme les cellules sécrétrices des nectaires, les cellules de stockage des cotylédons dans les graines, les cellules compagnes du phloème et les cellules mères des grains de pollen (Raman & Ananthakrishnan 1983; Bronner 1992). Vecchi et al. (2013) considèrent aussi que le Lépidoptère qui s'attaque à *Tibouchina pulchra* (Cham.) transforme les cellules des tissus attaqués en cellules du même type que celles d'un cambium vasculaire, stimulant ainsi la production de protéines et le stockage de lipides.

Concernant les membranes cellulaires, il a été montré que le nématode cécidogène *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) est capable d'induire la formation de cellules de

transfert en activant certains gènes de transport de sa plante hôte. La composition de la paroi de ces cellules est modifiée suite à une diminution ou une augmentation de l'expression des gènes codant pour des transporteurs membranaires. On observe alors une diminution du transport des protéines mais une augmentation de celui de l'eau et des acides aminés. Ces transporteurs contribueraient à la formation de cellules géantes dont s'alimente le nématode et qui seraient ainsi facilement approvisionnées en eau et en éléments nutritifs (Hammes et al. 2005; Caillaud et al. 2008). Assez peu d'études ont été menées en ce sens chez les insectes, mais il a été récemment montré que les galles du phylloxera présentaient une augmentation de l'expression de gènes liés au transport de l'eau, de nutriments et de minéraux (Nabity et al. 2013). En outre, les parois cellulaires des tissus internes de la galle ont tendance à présenter des parois très minces au fur-et-à-mesure de sa maturation, ce qui facilite le passage des nutriments (Rohfritsch 1992). Certains cécidogènes seraient aussi capables de modifier la composition des parois cellulaires des tissus de leurs galles (Konno et al. 2003).

3. Modifications anatomiques

De même que pour les modifications cellulaires, les modifications anatomiques des tissus de la plante hôte ne sont connues que pour les cécidogènes. Chaque galle a une organisation et une morphologie caractéristiques de l'espèce d'insecte qui l'induit. Leur diversité est immense mais on peut les rassembler en différentes catégories selon leur structure et leur complexité. Küster (1911) les sépare en deux groupes : le type organoïde où les croissances anormales des tissus végétaux diffèrent très légèrement des tissus normaux dans leur structure et le type histioïde avec une grande variété de croissances anormales qui altèrent fortement l'organe originel. Ces dernières peuvent être subdivisées en galles kataplasmiques moins organisées et différenciées que le tissu manipulé et en galles prosoplasmiques au contraire très organisées et avec différenciation de nouveaux tissus spécifiques à l'insecte inducteur.

Globalement, la formation d'une galle va suivre plusieurs étapes et le modèle basique le plus commun est celui des Cecidomyiidae, largement détaillé par Rohfritsch (1992). Le processus commence par une phase d'initiation où un groupe de cellules est isolé et forcé à ne plus suivre son développement normal. Ensuite vient une phase de croissance et de différenciation où la galle gagne en biomasse par un phénomène d'hyperplasie (divisions cellulaires) et d'hypertrophie (élargissement cellulaire). Un tissu nutritif va alors rapidement apparaître sur la face interne de la galle, délimitant la chambre larvaire. Une partie de ces cellules va former un tissu vasculaire qui se branchera sur l'appareil vasculaire normal de la plante pour être alimenté par la sève. On trouve aussi parfois une couche concentrée en amidon, autour du tissu nutritif, servant de réserve. Enfin vient la phase de maturation où une gaine de sclérenchyme se développe souvent à l'extérieur du tissu nutritif, séparant la galle en deux parties : la région interne et le cortex. La couche de cellules internes, autour

des tissus conducteurs, est composée de cellules parenchymateuses classiques qui sont parfois lignifiées et peuvent contenir des composés phénoliques. A l'extérieur du cortex, des formations épidermiques variées apparaissent, comme de simples trichomes, des poils, des ornements complexes lignifiés. La phase de maturation se termine par la déhiscence ou l'ouverture de la galle, souvent suite à l'arrêt du flux de sève. On trouve parfois une couche d'abscission qui sépare les deux parties de la galle et permet la libération de la région interne et l'émergence des insectes. De nombreuses variantes de ce modèle existent, certaines galles se limitant même à des réactions rappelant un cal de cicatrisation sans différenciation de tissu nutritif. Dans ce cas le comportement des insectes est plus proche de celui d'un mineur (ex : certains Tenthredes).

C. Les mécanismes à l'origine de l'induction

C'est encore sur les insectes endophytes que la littérature scientifique est la plus documentée dans ce domaine. Les effecteurs de la manipulation sont encore très largement inconnus à ce jour mais l'intérêt croissant porté aux interactions complexes comme les mineuses générant des îles vertes et certains insectes cécidogènes permet aujourd'hui de comprendre une partie des mécanismes clés et leur diversité. Il est depuis longtemps admis que les sécrétions par des adultes et/ou des larves ont indéniablement un rôle, et les technologies récentes notamment en protéomique et génomique permettent aujourd'hui d'identifier les composés chimiques ou les gènes impliqués. Dans certains cas, les mouvements des individus peuvent aussi avoir un rôle. Enfin, rappelons que les insectes sont porteurs de nombreux symbiotes et/ou vecteurs de virus qui peuvent avoir leur importance. Ce sont ces trois composantes de l'induction de manipulation des plantes hôtes qui sont discutées ici.

1. Rôle des sécrétions

Plusieurs types de sécrétions pourraient être impliqués dans la manipulation des plantes hôtes. Les substances contenues dans les sécrétions salivaires des pucerons pourraient générer les pseudogalles de type enroulement de feuille. C'est sans doute le cas sur pommier pour *Dysaphis devecta* et *D. plantaginea* (Aphididae) qui induisent des enroulements de feuilles à plusieurs centimètres de leur site de nutrition, suggérant ainsi l'implication de composés salivaires mobiles dans la plante-hôte (Forrest & Dixon 1975). De même, Madhusudhan et Miles (1998) suggèrent que les chloroses seraient générées par des phytotoxines injectées par les pucerons lors de leur alimentation. Comme la composition salivaire d'un puceron générant une chlorose semble similaire en termes de capacités enzymatiques à celle d'autres espèces asymptomatiques, les modifications pourraient être

dues à une plus grande mobilité des composés sécrétés par le premier, plutôt qu'à la nature chimique des composés en eux-mêmes.

Chez les insectes cécidogènes, le fluide déposé par les adultes lors de l'oviposition peut aussi jouer un rôle. Des multiplications cellulaires, la différenciation de vaisseaux et des modifications d'organites peuvent ainsi apparaître dans les tiges de la Linaire commune suite à l'oviposition du charançon *Rhinusa pilosa* (Barnewall & Clerck-Floate 2012). La ponte des adultes peut donc être dans ce cas une première étape dans la modification des tissus, même si ce sont les descendants uniquement qui en bénéficient.

Les larves mineuses générant des îles vertes produiraient des phytohormones de type cytokinine, qui empêchent localement le processus de sénescence de la feuille et y maintient un environnement nutritif, même après la chute de la feuille. On retrouve les cytokinines dans les excréments et dans l'appareil gastro-intestinal, mais surtout dans les glandes salivaires des insectes où elles sont vraisemblablement synthétisées. On les retrouve ensuite en grandes quantités dans les tissus de la mine et en périphérie alors que le reste de la feuille et même les autres feuilles encore vertes en contiennent très peu. Cela permet le maintien de la chlorophylle et donc du métabolisme primaire des feuilles (Engelbrecht et al. 1969; Giron et al. 2007; Walters et al. 2008).

Les phytohormones de type cytokinine ou auxine se retrouvent aussi dans certaines galles. C'est par exemple le cas de la galle générée par *Eurosta solidaginis* sur les tiges de *Solidago altissima* qui montre des taux élevés de ces deux types d'hormones (Engelbrecht et al. 1969; Mapes & Davies 2001a; 2001b). Les phytohormones semblent bien être synthétisées et injectées par les insectes manipulateurs puisque l'on a montré leur présence dans le corps, et souvent plus précisément dans certaines glandes excrétrices de larves ou d'adultes de ces insectes (Engelbrecht et al. 1969; Elzen 1983; Mapes & Davies 2001a; 2001b; Straka et al. 2010; Yamaguchi et al. 2012; Body et al. 2013; Bartlett & Connor 2014). D'autres phytohormones, comme l'acide abscissique, pourraient être impliquées dans la formation de galles, mais des travaux supplémentaires sont nécessaires pour bien comprendre leur rôle (Tokuda et al. 2013; Tooker & Helms 2014). Ce serait certainement par l'injection de composés chimiques comme des phytohormones que l'induction des galles se ferait à distance du site d'attaque dans certains cas (ex : certains Hémiptères). Le stimulus chimique circulerait alors dans les vaisseaux de la plante et l'intensité de l'induction serait dose-dépendante (Sopow et al. 2003; Matsukura et al. 2009).

2. Rôle des mouvements

Chez les insectes cécidogènes, la phase d'initiation peut être déclenchée soit par l'oviposition de l'adulte (ex : guêpes symphytes et à galles, quelques Coléoptères), soit par le premier stade larvaire (ex : cécidomyies, pucerons, cochenilles). C'est aussi parfois

l'alimentation de l'imago durant l'oviposition qui contribue à l'initiation (ex : acariens, certains psylles, thrips). Le trajet lors de l'oviposition peut contrôler la formation de certaines galles de Tenthredes qui réalisent des blessures très précises et propres à chaque espèce pour initier la formation de la galle. Globalement, c'est principalement la larve qui façonne ensuite la galle. En effet, si on retire la larve après la phase d'initiation, la galle aura un développement affecté avec absence de certains tissus et une organisation et une forme anormales. En s'alimentant, les larves sécrètent une salive qui modifie les parois cellulaires ou qui liquéfie les contenus cellulaires, déclenchant une réponse de dédifférenciation puis de prolifération de cellules attaquées et adjacentes. Un parallèle se crée alors entre la consommation du tissu nutritif et l'induction de sa formation. La larve va alors modeler la galle de l'intérieur par ses déplacements continus pour s'alimenter sur toute la paroi interne. La vitesse de la phase de croissance de la galle va donc dépendre de l'activité d'alimentation de la larve et du type de pièces buccales. Le maintien d'une réaction de la plante à la blessure mécanique infligée par la consommation des tissus génère un puits attirant les ressources nutritives (Rohfritsch 1992). Le principe est en fait que l'activité d'alimentation génère un stress chez l'organe hôte et les tissus adjacents à l'attaque y répondent par des activités physiologiques nouvelles apportées par des tissus nouvellement différenciés en périphérie (Raman 2012).

3. Rôle des symbiotes

Les manipulations induites par les herbivores ne sont pas toujours directement attribuables à leur action directe. Les symbiotes mutualistes qui leur sont associés peuvent aussi être à l'origine des modifications observées. Faire la part des choses entre le rôle de l'herbivore et celui de ses symbiotes dans les performances d'un insecte sur son hôte requiert une comparaison entre des individus normaux et aposymbiotiques. Ces derniers peuvent être obtenus grâce à des antibiotiques ou par des traitements à la chaleur. Les tests peuvent ensuite être pratiqués sur la plante-hôte ou sur milieu artificiel, si le modèle d'herbivore étudié le permet (Dixon 1998).

Certains endosymbiotes seraient impliqués dans la production de phytohormones de type cytokinine (CK) (cf. partie II.C.1). Les bactéries pourraient être impliquées selon trois hypothèses : en synthétisant directement des CKs, en permettant aux insectes de synthétiser/sécréter des CKs, ou encore en induisant la production ou l'activation des CKs par la plante (Giron & Glevarec 2014). La capacité des insectes manipulateurs à injecter des CKs dans les tissus de leur plante hôte (cf. partie II.C.1) renforce plutôt les deux premières hypothèses. Il n'est pas clair toutefois si les insectes capables de synthétiser des CKs le font grâce à leurs symbiotes ou grâce à l'acquisition de gènes bactériens par transfert horizontal (Bartlett & Connor 2014). Quoi qu'il en soit, la part de responsabilité respective des insectes, de leurs symbiotes, ou d'un cumul des deux dans ces mécanismes de manipulation basés sur les CKs reste à élucider.

III. Conséquences pour les organismes en interaction

A. Bénéfices pour le manipulateur

1. Hypothèses liées à l'origine évolutive des manipulations

Les chloroses sont souvent bénéfiques pour l'insecte qui les induit. Le puceron *Melanocallis caryaefoliae* (Davis) se développe moins vite, reste de petite taille et présente plus de mortalité si on l'empêche d'induire une chlorose sur les feuilles dont il s'alimente (Cottrell et al. 2010). De la même façon, les pseudogalles en enroulement de feuille générés par la larve du Lépidoptère *R. naevana* leurs permettent de se développer plus vite (Fukui et al. 2002). Les avantages sélectifs des insectes manipulateurs ectophytes sont ainsi avérés pour quelques modèles mais ils ont été globalement peu étudiés. Beaucoup plus d'études ont été réalisées concernant les manipulateurs endophytes et ils ont donné lieu à de nombreuses réflexions quant à leur origine évolutive.

Price et al. (1987) furent les premiers à rassembler les différentes hypothèses sur l'origine évolutive des galles. Du point de vue de l'insecte, trois principales hypothèses sont retenues et servent aujourd'hui de base de travail :

- « l'hypothèse de nutrition » liée à l'évitement des défenses de la plante et/ou à l'amélioration de la composition nutritionnelle du substrat consommé.
- « l'hypothèse du microenvironnement » qui permet une régulation de certains paramètres atmosphériques dans cette enceinte réduite.
- « l'hypothèse de protection de la prédation », la galle permettant d'échapper à la prédation et aux pathogènes.

Ces trois hypothèses étant reliées à un mode de vie endophyte particulier car élaboré, on peut considérer que ce sont probablement les mêmes forces évolutives qui ont permis l'apparition des insectes mineurs responsables des îles vertes, même si cela reste plus succinctement étudié en comparaison des galles. C'est pourquoi les études ayant testé ces hypothèses sur galles et mines seront exposées ici ensemble.

L'hypothèse de nutrition chez les manipulateurs a fait l'objet de nombreuses études et est ainsi reconnue comme centrale. Elle stipule qu'un cécidogène peut modifier la valeur nutritive des tissus végétaux qu'il manipule afin d'améliorer son propre développement (Price et al. 1987; Hartley & Lawton 1992). Dans le cas des îles vertes, il a pu être montré que le maintien local du métabolisme des feuilles par les larves est essentiel au développement des larves, car si on empêche cette manipulation et qu'on impose aux larves des feuilles sénescents jaunes, les mortalités sont élevées et le comportement d'alimentation est modifié (Kaiser et al. 2010). Dans le cas des galles, les accumulations fréquentes en acides aminés et sucres solubles ou encore en lipides ont un intérêt nutritif direct pour l'insecte en développement (Koyama et al. 2004; Motta et al. 2005; Suzuki et al. 2009; Dsouza &

Ravishankar 2014). Concernant les protéines, leur augmentation au niveau des galles est plus complexe à interpréter car cela peut résulter autant d'une induction par l'insecte que d'une réaction de défense de la plante (Birch 1974).

L'hypothèse du microenvironnement suggère que le développement d'une galle permet au cécidogène, s'il est endophyte, de se protéger des conditions climatiques extérieures. Les insectes vivant dans des galles sont notamment bien protégés de la déshydratation et meurent souvent rapidement si on les retire de cet abri (Willmer 1980). C'est sans doute pourquoi on trouve une plus grande diversité d'espèces cécidogènes aux latitudes basses ou dans les sites xériques des latitudes tempérées que dans les autres habitats plus humides (Price et al. 1998).

Si les structures internes des galles ont probablement pour rôle de procurer un substrat plus nutritif et atténué au niveau des défenses chimiques, on peut penser que les structures externes ont davantage un rôle de protection contre les ennemis naturels. La formation d'épines, poils, trichome, la dureté et l'épaisseur de la partie externe, ou encore la production de résine ont certainement un rôle de protection directe, mais cela n'a pas été prouvé expérimentalement (Stone et al. 2002; 2010). La protection peut aussi se mettre en place *via* l'intervention d'autres partenaires. Quelques espèces de guêpes Cynipidae induisent des galles qui sécrètent du nectar à leur surface extérieure. Ces substances attirent des fourmis qui protègent significativement ces insectes des attaques de parasitoïdes (Abe 1992; Fernandes et al. 1999; Inouye & Agrawal 2004). Dans ce cas la défense se fait de façon indirecte en impliquant tout un réseau trophique.

Les insectes cécidogènes doivent aussi faire face à des herbivores qui consomment les tissus de leur plante hôte et potentiellement ceux de leur galle. Pour y faire face, certains pucerons du pistachier (*Baizongia pistaciae*) induisent la sécrétion de composés à la surface de leur galle qui exerce une action toxique sur les larves et une action répulsive sur les adultes d'un Coléoptère herbivore (Martinez 2010). La présence d'un gradient en composés toxiques dans les tissus végétaux autour de la galle pourrait aussi être un système de défense contre les herbivores et pathogènes (Samsone et al. 2011). La forte concentration en tanins et en terpènes de la galle du puceron *Slavum wertheimae* (*Pemphigidae*) est par exemple suffisamment répulsive pour les chèvres qui peuvent consommer toutes les feuilles d'un rameau en évitant celles portant des galles (Rostás et al. 2013). On retrouve cette aversion pour les galles chez d'autres mammifères comme l'élan, même si les composés de défense impliqués ne sont pas encore identifiés (Rea 2013).

2. Méthodes de validation expérimentale

Le cas des insectes cécidogènes peut poser problème dans le sens où ils sont souvent difficiles à maintenir en élevage et donc à étudier en laboratoire. Il est donc souvent

obligatoire de les étudier directement sur le terrain avec les contraintes que cela implique en termes de mise en place des dispositifs expérimentaux, de régulation des conditions environnementales et éventuellement de repérage visuel (Stone et al. 2010).

L'hypothèse de nutrition a été fréquemment testée en comparant les performances des insectes manipulateurs ou d'autres herbivores sur les tissus modifiés et sur des tissus témoins normaux. Les paramètres démographiques pris en compte sont la vitesse de développement (Forrest 1971; Koyama et al. 2004; Diamond et al. 2008; Matsukura et al. 2012) et/ou la fécondité des individus (Llewellyn & Hargreaves 1986; Koyama et al. 2004). Une stratégie alternative consiste à comparer la composition en différents métabolites de tissus normaux et de tissus modifiés de la plante-hôte et observer s'il y a accumulation de composés nutritifs et/ou diminution de composés de défense (Shannon & Brewer 1980; Koyama et al. 2004; Motta et al. 2005; Saltzmann et al. 2008; Suzuki et al. 2009; Matsukura et al. 2012; Dsouza & Ravishankar 2014).

Des études de l'impact d'une préinfestation sur le comportement d'insectes herbivores ont déjà été réalisées (Prado & Tjallingii 1997; Gonzáles et al. 2002; Sauge et al. 2006; Dugravot et al. 2007) mais jamais sur des manipulateurs, car l'habitat fermé des galles, des enroulements de feuilles et des mines complique l'observation directe et en continu des insectes. Ce type d'étude requerrait un modèle où les tissus modifiés ne viendraient pas englober l'insecte et le laisseraient donc accessible à l'œil ou à des outils comme l'électropénétrographie (étude en temps réel du comportement d'alimentation d'insectes aux pièces buccales de type piqueur-suceur).

Pour l'hypothèse de protection, la démonstration est aussi délicate car les phénomènes d'adaptation des prédateurs et parasitoïdes font qu'il est difficile d'observer actuellement des mécanismes de protection qui n'ont pas été contournés au cours de l'évolution. On peut toutefois observer de fortes corrélations entre certains traits structuraux de galles et les communautés de parasitoïdes associés (Bailey et al. 2009).

B. Conséquences pour la plante manipulée

En se plaçant du côté de la plante-hôte quant à l'origine évolutive des galles, Price et al. (1987) estiment que la relation entre l'insecte et son hôte est presque exclusivement de type parasitaire, bien qu'il existe quelques exceptions. Les conséquences sur la plante sont toutefois souvent mineures car elles peuvent rester localisées à l'organe attaqué, lequel a plus ou moins d'importance pour la survie ou la valeur sélective de l'hôte. L'attaque peut cependant toucher la plante de façon plus globale et conduire à un impact plus conséquent. au travers de pertes de fonctionnalité d'organes ou de détournement des allocations de nutriments dans la plante.

1. Pertes de fonctionnalité d'organes

La formation de nouveaux organes ou la déformation d'organes préexistants peut modifier profondément le métabolisme et l'anatomie de tissus préexistants et aboutir à des pertes de fonctionnalité.

Le puceron *Viteus vitifoliae* (Phylloxera) est un des insectes cécidogènes dommageable les plus connus. Il présente deux formes, l'une s'attaquant aux feuilles (gallicoles), l'autre aux racines (radicicoles). Cette dernière est prédominante sur *Vitis vinifera*, la principale espèce de vigne cultivée dans le monde. Elle induit des nécroses racinaires entraînant des pertes de croissance, une perte de feuilles, des carences et parfois la mort du cep de vigne lorsqu'il devient incapable de s'alimenter en eau et en nutriments (Granett et al. 2001).

Un autre insecte cécidogène fait peser une menace économique croissante sur la production de châtaignes en Europe, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera : Cynipidae). Les galles se forment au niveau des bourgeons apicaux, ce qui stoppe la croissance et induit l'avortement des fleurs femelles, aboutissant parfois à des pertes de production de châtaignes de l'ordre de 80% (Kato & Hijii 1997; Battisti et al. 2014).

Les insectes développant des galles foliaires affecteraient la photosynthèse à plusieurs niveaux. Il est souvent difficile de conclure quant à leur effet positif ou négatif sur la photosynthèse (Yang et al. 2003; de Oliveira et al. 2011). Cependant, plusieurs études indiquent que la photosynthèse est souvent moins forte en présence de galles foliaires, et l'effet peut être d'autant plus fort que la densité de galles est élevée (Huang et al. 2014). La baisse de photosynthèse peut aussi toucher les feuilles adjacentes (Larson 1998).

2. Modifications des allocations carbonées et azotées et déformations

En détournant une partie des ressources assimilées par la plante à leur profit, les herbivores manipulateurs peuvent indirectement affecter les performances de leur hôte, la création de puits métaboliques au niveau des tissus dont s'alimente le manipulateur pouvant aller jusqu'à créer un stress métabolique général (Raman et al. 2006). Certaines cécidomyies (ex: *Diplusodon orbicularis*, *Lythraceae*) peuvent ainsi induire une mortalité des branches fines et des branches apicales. En effet, ces insectes se nourrissant sur les tiges, sont parfaitement situés pour intercepter les flux de nutriments et d'eau, aux dépens des organes végétaux à qui ces ressources sont normalement destinées (Marini-Filho & Fernandes 2012). L'Hyménoptère *Eupontania aquilonis*, qui s'attaque aux feuilles de son hôte, peut induire des mortalités de tiges assez fortes et une diminution du nombre de feuilles à cause des ressources qu'il détourne (Hakkarainen et al. 2005). De la même façon, certains pucerons s'attaquant uniquement aux bourgeons axillaires du Pistachier peuvent bloquer la croissance

au niveau des bourgeons apicaux des mêmes rameaux (Martinez 2008). Les modifications d'allocations induites par l'insecte peuvent varier en fonction des organes. La guêpe *Antistrophus silphii* (Cynipidae) diminue ainsi la production de biomasse globale, et plus particulièrement les allocations des métabolites aux tiges et inflorescences. La floraison est aussi retardée. L'allocation aux feuilles est au contraire augmentée et celle des rhizomes non affectée. En s'attaquant aux méristèmes, cet insecte modifie ainsi fortement l'architecture et le pouvoir reproducteur de son hôte mais permet sa survie future en maintenant un stockage normal dans les rhizomes (Fay & Hartnett 1991). De la même façon, on peut observer une plus grande allocation de macroéléments pour les tiges quand ce sont sur ces organes que se développent les cécidogènes, alors que les autres organes ont une allocation diminuée (Abrahamson & McCrea 1986).

Les modifications de l'architecture et de la fertilité des plantes varient selon les espèces d'insectes cécidogènes. Le diptère *Tomoplagia rudolphi* (Tephritidae) a tendance à induire une augmentation du nombre de rameaux secondaires et diminue la viabilité des graines alors que la production de fleurs n'est pas affectée (Silva et al. 1996). L'architecture de la plante hôte peut être impactée de façon assez durable comme chez certains pistachiers qui produisent davantage de rameaux secondaires pendant au moins deux ans après la formation de galles du puceron *B. pistaciae* sur les bourgeons terminaux, induisant une architecture en buisson plutôt qu'en arbre (Kurzfeld-Zexer et al. 2010).

3. Relations mutualistes

Bien que les insectes cécidogènes soient considérés globalement comme des parasites (Price et al. 1987), comme en témoignent les nombreux exemples évoqués plus haut, une exception confirme la règle avec l'exemple des guêpes du figuier (Hymenoptera : Agaonidae). Ce cas particulier de co-évolution a conduit à une inter-dépendance forte entre les partenaires. En effet, les guêpes pondent dans les inflorescences d'espèces particulières de figuiers, attirées par des composés volatiles spécifiques de l'hôte. En entrant dans les inflorescences, ces guêpes pollinisent les fleurs et pondent aussi dans quelques ovaires qui seront ensuite transformés en galles par les larves. Le figuier et la guêpe dépendent donc totalement l'un de l'autre pour leur reproduction. Les guêpes ont donc acquis un dimorphisme sexuel très fort adapté à ce mode de vie. Les femelles ailées peuvent disséminer le pollen et ont un corps profilé avec des appendices se détachant facilement pour entrer dans les inflorescences. Les mâles sont petits, aptères et presque aveugles, de part leur durée de vie courte, et sont cantonnés à l'intérieur des inflorescences le temps de la fécondation des futures femelles émergentes (Cook & Rasplus 2003). Dans certains cas, la dépendance peut être très forte car si les guêpes entrent sans pollen, la mortalité larvaire augmente et les figues ont même tendance à totalement avorter. Cela serait lié au fait que les larves de stade trois et plus s'alimentent sur l'endosperme hypertrophié après pollinisation (Jansen-González et al. 2012).

Récemment, il a été mis en évidence la possibilité d'un bénéfice indirect de la présence de galles pour la plante hôte. En effet, le développement de galles par *Leptocybe invasa* (Hymenoptera : Eulophidae) sur *Eucalyptus camalulensis* augmenterait sa résistance au gel, certainement grâce à des modifications physiologiques comme une augmentation des concentrations en protéines, en pigments photosynthétiques et en anthocyanines. Les modifications physiologiques induites par la présence des cécidogènes permettraient ainsi à l'Eucalyptus de coloniser plus facilement un environnement normalement hostile. Malgré le coup énergétique lié au développement des galles, l'hôte y trouve donc également un bénéfice dans certaines conditions environnementales, plaçant cette interaction entre le parasitisme et le mutualisme (Rocha et al. 2013).

Dans certains cas, les rameaux attaqués présentent une croissance supérieure en biomasse l'année suivante, et ce d'autant plus que les surfaces de feuilles attaquées étaient grandes. Il y a donc compensation de l'attaque par la plante hôte, additionnée d'une augmentation locale de la résistance qui diminue les densités d'attaque par la suite comme cela peut être observé pour d'autres phytophages (Kozlov et al. 2012). Sur peuplier, la présence de galles peut induire une diminution des attaques par les larves de Coléoptères, tout en provoquant une augmentation des larves de Lépidoptères (Künkler et al. 2013). L'impact de la présence d'un cécidogène peut donc avoir des répercussions à l'échelle des communautés d'insectes phytophages associée à son hôte.

IV. Facteurs modulant la manipulation

A. Facteurs endogènes

1. Mécanismes de résistance de la plante hôte

Des comparaisons entre des variétés de plantes hôtes de niveau de résistance contrastés permettent de comprendre les mécanismes impliqués dans les interactions entre manipulateur et hôte dans les cas de résistance ou de sensibilité. Une stratégie efficace de défense de la plante devrait soit tuer l'agresseur, soit empêcher l'insecte de détourner les nutriments produits par la plante en empêchant la formation de la galle, soit au minimum, limiter les possibilités d'approvisionnement en métabolites des tissus de la galle.

Ainsi, les réactions hypersensibles (HRs) semblent être un moyen de défense par rapport aux cécidogènes très répandus chez les plantes et très efficace car souvent responsable de fortes mortalités chez les insectes (Fernandes & Negreiros 2001). Les HRs, davantage connues dans les relations plantes/pathogènes, consistent en une mort rapide des cellules du site d'infection (Heath 2000), le but étant d'isoler l'envahisseur pour l'affamer (Agrios 1997). Certains génotypes de *Salix* sp. peuvent ainsi totalement empêcher le développement de galles et induire la mort de la totalité des larves du cécidogène *Dasineura marginemtorquens* dans les 48h après leur éclosion par la formation rapide de taches nécrotiques au niveau des sites d'attaque (Höglund et al. 2005). Le niveau de résistance peut être en lien avec la vitesse de propagation et l'étendue des HRs. La capacité de la plante hôte à déclencher des HRs après une attaque par un insecte cécidogène peut être le premier facteur régulant les populations de ce dernier. Par exemple, plus de 77% des tentatives de développement de galles par des Cecidomyiidae peuvent échouer sur Hêtre commun, et donc conduire à la mort des larves (Fernandes et al. 2003). Même si les nécroses cellulaires ne sont pas forcément visibles extérieurement, par exemple lorsque les insectes se logent à l'intérieur des bourgeons, il est possible de mettre indirectement en évidence des HRs par la localisation d'un stress oxydant qui est la première étape d'une mort cellulaire programmée (Dini et al. 2012).

Comme les micro-organismes phytopathogènes, les insectes cécidogènes entretiennent des relations très intimes avec leurs hôtes. On peut alors parler de souches virulentes ou avirulentes d'insectes, comme on le ferait pour des bactéries ou des champignons, lorsqu'ils sont capables ou non d'attaquer une plante hôte en contournant ses mécanismes de défense. Si des gènes de résistance à quelques galles ont été trouvés chez les plantes (Harris et al. 2003; Biradar et al. 2004; Stuart et al. 2012), les gènes d'avirulence restaient inconnus jusqu'à récemment. La mouche de Hesse, *Mayetiola destructor* Say (Diptera: Cecidomyiidae), est un des modèles les plus utilisés pour comprendre les mécanismes de résistance des plantes aux cécidogènes. C'est le premier modèle

d'interaction plante/arthropode pour lequel l'existence d'un gène d'avirulence a été mis en évidence, confirmant les théories de relation gène-pour-gène comme on peut en observer chez des phytopathogènes (Aggarwal et al. 2014). Les nombreuses études sur ce modèle ont permis de mettre en évidence différents mécanismes de résistance de la plante et de contournement de cette résistance par l'insecte. En fonction des souches de mouches virulentes ou avirulentes, on observe que ce ne sont pas les mêmes voies de biosynthèse qui sont activées chez le blé. En effet, en présence d'une souche avirulente, des composés appartenant à des voies associées à la défense chimique voient leurs concentrations augmentées (ex : acide salicylique) alors qu'elle n'est pas affectée lorsque c'est une souche virulente qui attaque (Zhu et al. 2010). C'est le principe de la virulence qui permet de ne pas déclencher des mécanismes de défense spécifiques. Dans les cas d'incompatibilité entre souche de mouche et variété de blé, il semblerait que les mécanismes principaux de défense rassemblent des stratégies d'antibiose avec notamment un renforcement des parois cellulaires, la production de composés toxiques (protéiques et lipidiques) et une impossibilité d'induction du métabolisme nutritif, rendant le substrat impropre à la consommation et à la manipulation. Les souches virulentes de mouches semblent donc capables de supprimer ces actions d'antibiose, de fragiliser les parois et de stimuler le métabolisme nutritif et la croissance des futurs tissus de la galle (Liu et al. 2007; Zhu et al. 2012; Tooker & Moraes 2011; Khajuria et al. 2013).

Sans forcément tuer les insectes cécidogènes, les plantes peuvent limiter la différenciation de leurs tissus en galles. On sait par exemple que les concentrations hormonales peuvent être manipulées chez des plants sensibles de maïs alors que ce n'est pas le cas chez des résistants, inhibant presque totalement la formation de galles par *Cicadulina bipunctata* (Hemiptera : Cicadellidae) chez ces derniers (Tokuda et al. 2013). Dans le cas du phylloxera, les racines des variétés résistantes de vigne présentent plus d'assises de cellules au niveau de périderme (couche externe), des parois plus épaisses avec davantage de lignine, cellulose et pectine et de fortes concentrations en composés phénoliques, formant une barrière plus efficace contre le développement des galles (Du et al. 2011).

La tolérance des plantes aux attaques de cécidogènes peut varier pour une même espèce d'insecte. Par exemple, l'Astéracée *Silphium integrifolium* subit des pertes de hauteur, de surface foliaire et de production d'inflorescences dans son habitat naturel alors qu'en conditions expérimentales elle se montre beaucoup plus tolérante. Malgré les pertes initiales, elle compense ensuite largement les pertes liées à la formation des galles en produisant activement de nouveaux tissus (Fay et al. 1996).

2. Vigueur de la plante et des organes

De façon générale, les insectes herbivores ont tendance à être plus nombreux sur les plantes vigoureuses, que cela affecte ou non leur survie. L'effet serait encore plus fort sur les

insectes cécidogènes (Cornelissen et al. 2008). Cette tendance pourrait s'expliquer par l'hypothèse de vigueur des plantes qui suggère un lien entre vigueur de la plante ou des organes, qualité nutritive des tissus végétaux et performances des herbivores (Price 1991). La majorité des études ayant porté sur l'hypothèse de la vigueur de la plante comme un des facteurs modulant les performances du cécidogène confirment ces postulats. En partant du principe qu'une plante se développant avec vigueur correspondrait à un substrat riche, les femelles choisiraient plutôt des organes vigoureux pour leur ponte et les larves y auraient de meilleures performances. On peut par exemple observer un lien positif entre longueur de tige, préférence de ponte et survie des larves de cécidogènes (Kimberling et al. 1990; Fritz et al. 2000; Stone et al. 2002). Les critères de vigueur corrélés aux préférences ne concernent cependant pas forcément tous les organes de la plante. En effet, il peut y avoir un lien positif avec la longueur de tige mais un lien négatif avec celle des feuilles (Fritz et al. 2000). Or, il faut parfois faire attention aux liens de cause à effet, une corrélation entre des fortes densités de galles et des petites feuilles peut être une conséquence du détournement des ressources énergétiques par le cécidogène pendant la croissance végétale plutôt qu'un choix de petites feuilles par ces derniers (White 2011). De la même façon, si l'on peut voir un lien entre une plus grande vigueur des plantes et le développement de galles, cela ne signifie pas que l'insecte est responsable de cette vigueur, mais plutôt qu'il choisit les plants vigoureux. Cette capacité pourrait jouer un rôle dans la lutte biologique contre certaines plantes nuisibles, car on peut imaginer que la pression de sélection imposée par les manipulateurs sur les plants vigoureux sélectionnerait des plants moins performants (Dhileepan 2004).

Quelques études mettent en avant une hypothèse alternative qui est celle de la taille optimale de module. Elle suggère que les performances du cécidogène seront meilleures pour une taille intermédiaire d'organe plutôt que sur l'organe le plus vigoureux comme évoqué plus haut (Björkman 1998; Mckinnon et al. 1999). Cela s'expliquerait par le fait que l'induction de galles peut être dose-dépendante (Sopow et al. 2003) et que cette dose peut augmenter avec la taille des modules (Mckinnon et al. 1999; Flaherty & Quiring 2008). Ainsi, sur de petits modules l'induction est facile car nécessite une faible dose mais les performances de l'insecte ne sont pas très bonnes à cause du peu de disponibilités en ressource nutritives. A l'inverse, sur de grands modules, l'induction serait difficile car nécessiterait une très forte dose. Un équilibre entre l'énergie nécessaire à l'induction et celle disponible pour le développement ultérieur des larves serait donc le meilleur type de substrat pour les cécidogènes et correspondrait à des tailles intermédiaires de modules végétaux.

L'âge des organes peut aussi avoir son influence. En effet, afin de développer une galle les tissus végétaux jeunes, en plein développement, sont logiquement plus favorables car ils attirent des flux de nutriments et présentent des tissus en pleine croissance plus malléables. On peut ainsi observer un lien positif entre les performances de cécidogènes et la dynamique de croissance de feuilles. La qualité de cet organe pour la fabrication d'une

galle serait plutôt liée à la durée pendant laquelle il constituera un puits de photoassimilats plutôt que sa taille finale (Höglund 2014).

L'âge des plantes hôtes peut aussi moduler leur capacité de résistance, selon l'hypothèse d'ontogénie de la plante. Par exemple, les réponses hypersensibles aux attaques de cécidogènes sont plus fréquentes sur les anacardiés âgés. Ces arbres subissent pourtant plus d'attaques, certainement à cause de leur vigueur (Santos & Fernandes 2010). Dans ce cas, les adultes semblent donc suivre l'hypothèse de vigueur de la plante alors que les larves subissent celles de l'ontogénie de la plante. Des effets opposés peuvent donc s'appliquer selon les stades de développement de l'insecte. Cela montre bien la complexité des interactions entre plante et manipulateur et l'intérêt de toujours tester différentes hypothèses sans *a priori*.

3. Compétition au sein de la plante-hôte

Si les manipulateurs se développent mieux sur des plantes vigoureuses, il n'en reste pas moins qu'ils ont toujours accès à une ressource limitée à partager avec leurs congénères. Ainsi, même si on rencontre souvent plus de galles sur des rameaux vigoureux, la survie des insectes peut à l'inverse alors être diminuée à cause de la densité trop forte de galles sur un même organe (Wool & Manheim 1988; Tabuchi et al. 2011). Les cas de compétition intraspécifique pour l'exploitation de la ressource végétale peuvent ainsi être assez communs. La présence de nombreuses galles peut engendrer des individus émergents plus petits, plus fragiles et moins féconds. Cette forte pression de sélection impose donc aux adultes de choisir des sites d'oviposition à la fois adaptés physiologiquement aux besoins pour le développement de la galle mais aussi permettant d'éviter au maximum cette compétition (Weis et al. 1988). Cela peut donner lieu à des comportements agressifs comme chez les pucerons de type *Pemphigus* dont les femelles fondatrices peuvent combattre pendant deux jours pour prendre possession d'un site en position basale des feuilles où la galle pourra intercepter davantage de nutriments arrivant vers cet organe (Whitham 1978; 1979).

La compétition pour les ressources se fait aussi entre les galles et certains organes de la plante qui constituent aussi des puits métaboliques comme les fruits. Les galles de la guêpe *Trichilogaster signiventris* (Hymenoptera : Pteromalidae) sont ainsi plus grosses sur les bourgeons végétatifs que sur des inflorescences d'acacia où se développent des fruits. En effet, les fruits constituent des puits plus puissants que les galles en termes de flux de carbone. C'est donc préférentiellement en été et en automne, en dehors des périodes de fructification, que ces insectes peuvent développer des galles (Dorchin et al. 2006). Selon l'hypothèse de compétition de puits, l'architecture des plantes peut ainsi moduler leur niveau de résistance aux insectes cécidogènes. On observe par exemple davantage de puits métaboliques naturels (ex : les bourgeons) sur les peupliers résistants au puceron *Pemphigus*

betae que sur les sensibles. De plus, si on supprime une partie des bourgeons, la mortalité des pucerons diminue sur résistant alors que cela n'a pas d'effet sur sensibles. Cette action diminuerait la compétition entre puits naturels et puits générés par les pucerons sur arbres résistants alors que sur les sensibles elle n'avait pas lieu (Larson & Whitham 1997).

B. Facteurs exogènes

Des facteurs exogènes peuvent moduler les paramètres physiologiques internes des plantes et ainsi affecter leur vigueur, leur composition nutritionnelle et leur résistance, impactant potentiellement les interactions entre manipulateur et hôte, de façon positive ou négative. A ce jour assez peu d'études ont porté sur l'effet des facteurs environnementaux sur ces interactions. La relation intime et souvent très spécifique entre les partenaires peut compliquer les observations et leur interprétation car les mécanismes de manipulation de base ne sont pas encore élucidés dans bien des cas.

1. Effets des facteurs climatiques

Les méta-analyses s'intéressant à l'effet de stress environnementaux sur les relations plantes-insectes montrent qu'ils n'affectent pas de la même façon les différentes guildes d'insectes phytophages. Concernant les insectes manipulateurs comme les cécidogènes, les stress abiotiques subis par les plantes-hôtes auraient généralement des effets négatifs sur les performances des insectes manipulateurs (Koricheva & Larsson 1998; Huberty & Denno 2004; Jactel et al. 2012).

Dans un contexte de climat changeant présageant une augmentation de la fréquence et de l'intensité des épisodes de sécheresse (IPCC 2013), quelques études ont porté sur l'impact d'une contrainte hydrique sur les performances d'insectes cécidogènes. Björkman (2000) montre qu'un stress hydrique affectant négativement la croissance de l'épicéa commun, réduit la taille des galles du puceron *A. abietis*, illustration classique de l'hypothèse de vigueur de la plante. L'étude met toutefois en évidence que l'impact du stress hydrique dépend du génotype, ou plus précisément du niveau de résistance de la plante, car lors du stress la survie des femelles fondatrices est réduite sur un génotype sensible mais améliorée sur un génotype résistant. Cela suggère que le niveau de résistance, déterminé génétiquement dans des conditions non stressantes, peut avoir moins d'influence que les changements induits par un stress hydrique. Quelques insectes cécidogènes seraient capables de compenser les effets d'un stress hydrique subi par son hôte. Par exemple, certains Cynipidae induisent une augmentation de l'assimilation nette en CO₂, de la conductance stomatique et du potentiel hydrique xylémien lors d'un stress hydrique, alors qu'ils n'ont pas d'effet en conditions non limitantes. Cela permettrait à ces insectes de ne

pas subir de variations de disponibilité en ressources malgré les conditions environnementales fluctuantes (Fay et al. 1993).

Une sécheresse peut aussi affecter indirectement les cécidogènes *via* les parasitoïdes associés. Par exemple, les diamètres des galles d'*Eurosta solidaginis* (Diptera : Tephritinae) sont diminués après un épisode de sécheresse. Or les guêpes parasitoïdes *Eurytoma gigantea* sélectionnent plutôt les galles de grande taille, augmentant donc la survie des cécidogènes en cas de sécheresse (Sumerford et al. 2000). De fortes températures peuvent aussi avoir des effets sur les interactions plantes-insectes cécidogènes. Par exemple, Des variétés de blé normalement 100% résistantes à la mouche de Hesse, *Mayetiola destructor*, peuvent devenir sensibles lorsque les graines ont été exposées seulement quelques heures à une température de 40°C (Currie et al. 2014). Ce paramètre environnemental a été très peu étudié à ce jour, mais pourrait soulever davantage d'intérêt avec les changements climatiques en cours qui devraient amener des vagues de fortes chaleurs plus fréquentes (IPCC 2013). Enfin, dans des milieux particuliers comme les mangroves, une corrélation positive entre concentration en sel et densité de galles a été observée. Les cécidogènes préféreraient dans ce milieu les hôtes affaiblis par les fortes concentrations en sel (Gonçalves-Alvim et al. 2001).

D'autres paramètres environnementaux souvent liés à l'activité humaine peuvent aussi avoir une influence sur les insectes manipulateurs. La pollution industrielle peut par exemple avoir des impacts variables sur les capacités de manipulation des cécidogènes. En comparant deux sites avec des degrés de pollution différents, Furlan et al. (2004) ont montré une augmentation du nombre de galles sur le site le plus pollué mais une densité inférieure à leur référence témoin pour le site moyennement pollué. Cet effet serait dû d'un côté à une augmentation de la qualité nutritionnelle sur le premier site et de l'autre côté une augmentation de la concentration en fibres servant de barrière mécanique sur le deuxième site.

Dans la majorité des études, les communautés d'insectes cécidogènes sont étudiées dans leur globalité et assez peu de travaux ont porté sur des espèces précises, ce qui est un manque car il est très probable que les réactions varient énormément sachant que chaque espèce attaque des organes différents, à des stades de maturité différents, sur des plantes ayant des tolérances aux variations environnementales très variables, etc... Il serait donc intéressant de développer ces thématiques de recherche sur de plus en plus de modèles avec des caractères écologiques variés pour constituer un panel d'outils de compréhension des interactions entre manipulateurs et plantes.

2. Effets des pratiques culturales

L'ajout d'eau et de nutriments dans le substrat des plantes n'a pas forcément d'effet sur les performances des insectes cécidogènes. Cependant, il peut contribuer à rendre les plantes plus tolérantes aux attaques en leur permettant de compenser les pertes induites par l'attaque (Fay et al. 1996). On pourrait penser que la fertilisation du sol devrait avoir un effet positif sur les cécidogènes car cela devrait augmenter la valeur nutritive de la plante et donc celle des tissus de la galle. Cependant, l'exemple de deux espèces de Cynipidae sur chêne montre que la teneur en azote des galles reste stable même quand celle du reste des feuilles augmente après fertilisation du sol (Hartley & Lawton 1992). Il semble que ces insectes sont bien capables de manipuler les tissus de leur hôte à leur avantage mais que cette manipulation vise à éviter un trop fort taux d'azote dans les galles qui deviendrait toxiques, ce qui a amené les auteurs à reformuler l'hypothèse de nutrition est indiquant que les manipulateurs optimisent leur substrat végétal pour leur développement, sans nécessairement induire des accumulations de métabolites primaires

Des pratiques de taille sur des plantes pérennes peuvent interférer dans les interactions hôtes-cécidogènes. Par exemple, la suppression de la dominance apicale par taille chez *Pistacia atlantica* entraîne la production de plus nombreuses galles de plusieurs espèces de pucerons (Martinez & Wool 2002). La coupe de vieilles branches lors de l'entretien de jardins peut aussi créer des sites d'installation plus favorables à certains cécidogènes car leur densité augmente sur les rameaux à proximité des cicatrices de taille. Cela serait tout simplement dû au fait que ces rameaux poussent plus tôt que les autres et sont donc les premiers colonisés (Wool & Manheim 1988). Sachant que certains cécidogènes sont sensibles à l'âge des organes qu'ils attaquent et peuvent préférer des rameaux plus âgés (ex : le puceron *Pemphigus betae* sur peuplier d'Amérique), il est évident que le choix des techniques de taille doit se faire en fonction des préférences de l'insecte contre lequel on veut lutter.

3. Effets de la phytophagie

Les herbivores peuvent interférer entre eux dans leurs stratégies d'exploitation d'une même plant-hôte. C'est par exemple le cas du puceron *Melanocallis caryaefoliae* responsable de chloroses qui ne peut plus modifier le contenu en acides aminés du phloème de son hôte, le pacanier, en présence de son compétiteur *Monellia caryella* et voit donc ses performances réduites (Petersen & Sandström 2001).

La présence de mammifères consommant des feuilles ou des tiges semble souvent favoriser les insectes cécidogènes. Par exemple, le peuplier d'Amérique présente davantage de galles d'Hyménoptères lorsqu'il a été attaqué par des castors. En effet, les attaques de castors induisent une augmentation de la longueur des tiges restantes par compensation de

l'arbre et celle-ci est fortement corrélée à la densité de galles de galles sur les feuilles (Bailey & Whitham 2006). Il en est de même sur saule après des attaques de lapins, suggérant que certains cécidogènes pourraient être dépendants des grands herbivores pour maintenir de fortes densités de population (Hjältén & Price 1996). En plus d'augmenter la quantité de substrat disponible, les mammifères herbivores peuvent aussi améliorer la qualité nutritive du substrat pour les manipulateurs. Les feuilles peuvent ainsi présenter de plus grandes quantités d'azote et devenir plus digestes après le passage d'un mammifère et ainsi présenter davantage de galles (Danell & Huss-Danell 1985; Olofsson & Strengbom 2000). Le passage des herbivores permettrait une élimination de branches âgées et la formation de nouveaux tissus plus jeunes et vigoureux (ex : longueur) et donc de meilleure qualité pour les insectes manipulateurs (Roininen et al. 1997). Cela dépend cependant des espèces de plante hôte car par exemple sur bambou nain, le moucheron *Procystiphora uedai* choisit plutôt des plants n'ayant pas été broutés par le cerf sika pour sa ponte. Sur les plants broutés, la survie des descendants est pourtant supérieure mais ils sont de plus petite taille car le broutement induit la formation de tiges plus fines sur lesquelles les galles restent plus petites (Tabuchi et al. 2010). De plus, le réseau trophique lié au manipulateur peut être influencé, comme par exemple les parasitoïdes qui peuvent avoir des taux d'attaque supérieurs sur des plantes ayant été broutées (Tabuchi et al. 2011).

CHAPITRE 1 : Réactions corticales du peuplier induites par *Phloeomyzus passerinii*

Objectifs :

- Caractérisation histologique et histochimique de la réaction corticale du peuplier à la piquûre du puceron lanigère.
- Suivi temporel et comparaison de trois génotypes de peuplier aux niveaux contrastés de résistance au puceron.

Article 1 :

Resistant poplar genotypes inhibit pseudogall formation by the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* Sign.

F. Dardeau, E. Deprost, F. Laurans, V. Lainé, F. Lieutier, A. Sallé

Trees (2014), 28 : 1007-1019

PRESENTATION DE L'ARTICLE 1

1. Contexte

Phloeomyzus passerinii se développe sur le tronc des peupliers où il se nourrit aux dépens du parenchyme cortical après une insertion rectiligne inter- et intracellulaire des stylets (Pointeau et al. 2012). Il ne provoque la formation d'aucune galle apparente sur arbres, mais induit parfois des gonflements visibles de l'écorce sur boutures (Fig. 1.1c). Compte-tenu des modes de nutrition fréquemment observés avec les pucerons se développant sur écorces ou racines, il était probable que ce puceron manipule les tissus corticaux de son hôte pour favoriser son développement.

Il existe une grande variabilité du niveau de sensibilité des peupliers à cet insecte en fonction des espèces, hybrides et génotypes (Sadeghi et al. 2007; Pointeau et al. 2011). On suppose que différents mécanismes de résistance sont impliqués car on peut observer des phénomènes d'antixénose (modification de comportement d'acceptation de l'hôte) et/ou d'antibiose (modifications des performances démographiques) selon les génotypes de peuplier (Pointeau et al. 2013). Cependant, on ne connaît pas la nature des mécanismes de défense efficaces vis-à-vis de ce puceron, qu'ils soient constitutifs ou induits. Connaître ces mécanismes et leur cinétique serait une première piste pour trouver des méthodes de lutte efficaces et durables contre ce ravageur. Les mécanismes généraux de défense induite des plantes rassemblent l'accumulation de composés chimiques de défense et des lésions nécrotiques (Lieutier & Berryman 1988; Miles 1989b; Biggs 1992) ou encore une lignification et une imperméabilisation des parois cellulaires (Müllick 1977; Biggs 1984). Ces réactions font partie des mécanismes d'hypersensibilité connus pour leur efficacité face à certains manipulateurs (Balch et al. 1964; Miles 1989a), et pourraient donc être impliqués dans la résistance du peuplier vis-à-vis de *P. passerinii*.

Les objectifs de cette étude étaient donc de (i) caractériser les modifications corticales induites par l'alimentation de *P. passerinii* sur génotype sensible ; (ii) les comparer à celles induites par une blessure mécanique pour dégager les spécificités liées à la piqûre du puceron en fonction d'une réponse aspécifique à un stress mécanique ; (iii) étudier comment les réactions corticales variaient entre génotypes de peuplier de résistance différents pour mettre en évidence des mécanismes de défense potentiels. Une étude des modifications anatomiques et biochimiques des tissus corticaux a ainsi été réalisée.

11. Protocole général

- **Matériel végétal et conditions expérimentales** : nous avons utilisé des boutures en pot d'hybrides euraméricains de peupliers (*Populus x canadensis* Moench) très utilisés en populiculture et dont les niveaux de résistance étaient contrastés. Le génotype I-214 est considéré comme sensible, le génotype Brenta est très résistant (empêche l'installation du puceron) et le génotype I-45/51 est de résistance intermédiaire (affecte la vitesse d'accroissement des colonies) (Pointeau et al. 2011).
- **Pucerons et blessures mécaniques**: Nous avons utilisé des individus issus d'une même lignée isofemelle, et réalisé un suivi temporel du développement de réactions corticales chez le peuplier au niveau du site de piqûre d'un puceron (Fig. 1.1c). Des blessures mécaniques (Fig. 1.1a et b) ont été réalisées en parallèle en enfonçant la pointe de minuties à la même profondeur que celle d'insertion des stylets du puceron.

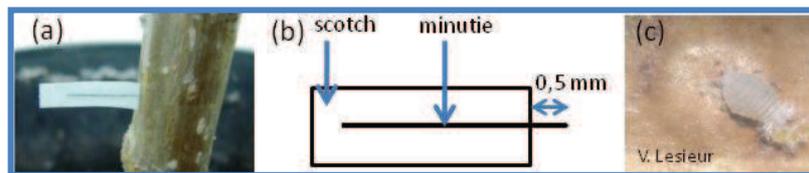


Figure 1.1 : Blessure mécanique (a) réalisée avec la pointe d'une minutie plantée dans l'écorce de peuplier, enfoncée à 0.5mm de profondeur comme schématisé en (b). (c) Gonflement de l'écorce de peuplier pouvant être observé après une piqûre de *Phloeomyzus passerinii* plusieurs semaines sur le même site.

- **Quelques notions d'anatomie** : de l'extérieur vers l'intérieur, on distingue dans les tiges de peuplier d'abord le cortex constitué d'un épiderme très fin, du suber, des cellules mortes aux parois très épaisses, et enfin du parenchyme cortical parsemé d'îlots de fibres de sclérenchyme (Fig. 1.2). Le suber est généré par le phellogène (méristème secondaire) pouvant produire aussi un phelloderme vers l'intérieur. On observe ensuite le phloème secondaire qui permet la conduction de sève élaborée. Celui-ci est séparé du xylème, où circule la sève brute, par le cambium libéro-ligneux (méristème secondaire) qui produit cet appareil circulatoire.
- **Observations histologiques et histochimiques** : des portions de tige ont été prélevées après 1, 2, 3 et 4 semaines de piqûre ou de blessure, ainsi que sur des plants témoins sains en parallèle. Une partie de ces fragments ont subi directement des coupes transversales fraîches (40 μ m). Les autres fragments ont été inclus en résine avant de subir des coupes transversales semi-fines (5 μ m) ou fines (1.5 μ m). Les coupes fraîches ont été colorées au Carmino-vert pour une étude de l'anatomie des tissus et de la lignification des parois cellulaires. Les parois cellulaires cellulosiques apparaissent en rose et les parois lignifiées en bleu-vert (Fig. 1.2). Des colorations à la Vanilline-O et au

DMACA ont permis de localiser des composés phénoliques solubles de type tanins (en rouge-organe) et flavanols (en bleu) respectivement dans les vacuoles ou au niveau de dépôts pariétaux. Les coupes en résine ont été colorées au Bleu de Toluidine O pour une observation anatomique plus fine, avec une coloration violette des parois cellulosesiques et bleue pour les parois lignifiées. La coloration au Phloroglucinol-HCl a permis de visualiser la présence de lignine en rouge sous lumière blanche. En complément, présence de lignine a été confirmée par des observations en autofluorescence. La présence de subérine a été indirectement détectée par des observations de fluorescence sous lumière bleue avant et après coloration au Phloroglucinol-HCl éteignant l'autofluorescence uniquement de la lignine et non de la subérine. Une coloration à l'IKI a permis de colorer en noir-violacé les amyloplast, stockant l'amidon. Des photographies des réactions de l'écorce ont été réalisées sur un microscope photonique et la taille des réactions a été mesurée.

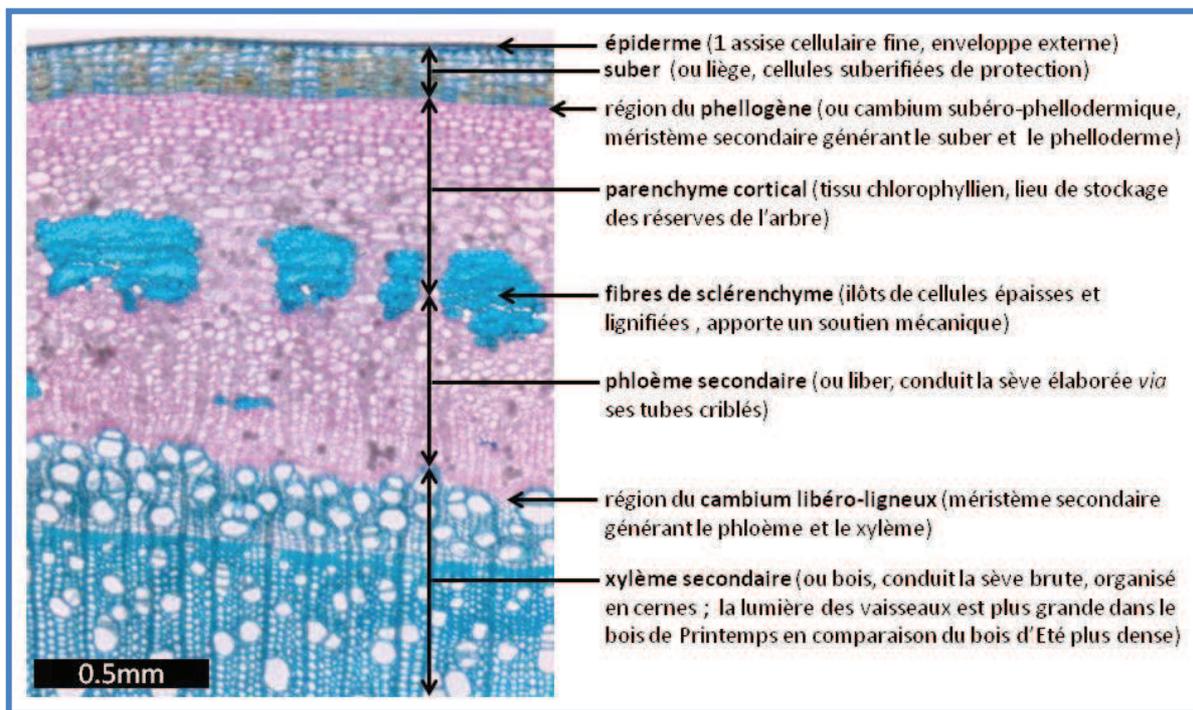


Figure 1.2 : Coupe transversale de tige de peuplier sain (40µm) colorée au Carmino-vert. Les parois cellulosesiques apparaissent en rose et les parois lignifiées ou subérifiées apparaissent en bleu-vert.

III. Principaux résultats

- **Témoins et réactions aux blessures mécaniques** : aucune différence anatomique ou biochimique n'a été mise en évidence pour les plants témoins sains, que ce soit entre les génotypes ou entre les semaines d'observation. Les tanins et flavanols étaient principalement localisés dans des vacuoles sous le suber et entre les îlots de sclérenchyme. Des grains d'amidon dispersés dans tout le parenchyme étaient visibles

jusqu'en fin d'expérience. De même, aucune différence entre génotypes n'a été observée pour la réaction aux blessures mécaniques. Elle est dans tous les cas restée très localisée autour de la pointe de l'aiguille et consistait en une lignification des cellules à proximité de la lésion et une accumulation de tanins et flavanols dans les cellules adjacentes. En périphérie une assise méristématique réactionnelle s'est différenciée, le périoderme de blessure, isolant la lésion du reste des tissus sains. Les réactions à la piqûre de *P. passerinii* étaient très différentes des blessures mécaniques et, à l'inverse, variaient fortement entre les génotypes de peuplier.

- **Réaction de génotype sensible à *P. passerinii*** : dans le génotype sensible (I-214), la piqûre de *P. passerinii* a induit la formation progressive d'un tissu étendu en forme de demi-lune, suite à des multiplications cellulaires (hyperplasie) initiées dans le parenchyme dès la première semaine de piqûre. A partir de 3 semaines de piqûre, des cellules hypertrophiées à parois fines sont apparues au sein de ces zones de croissance active. On pouvait alors distinguer une organisation précise en trois zones de la réaction corticale : une zone centrale de cellules parenchymateuses normales légèrement lignifiée, une zone périphérique de cellules en divisions avec des hypertrophies ponctuelles et des parois fines, et une zone distale très lignifiée. Les tanins et flavanols se sont légèrement accumulés au départ puis ont progressivement disparu dans tout l'intérieur de la zone de réaction, y compris ceux normalement présents de façon constitutive. Ils se sont accumulés uniquement en périphérie de la zone de réaction. Les grains d'amidon ont progressivement disparu dans toute la zone de réaction.
- **Réactions de génotypes résistants à *P. passerinii*** : dans le génotype très résistant (Brenta), les observations ont été limitées à une semaine de piqûre, les insectes n'ayant pu s'installer plus longtemps. Elles montraient une très intense accumulation de tanins, flavanols et lignine en comparaison des autres génotypes, mais aucune multiplication cellulaire. Dans le génotype de sensibilité intermédiaire (I-45/51), les tanins et flavanols se sont accumulés au début de la réaction à la piqûre de l'insecte et étaient légèrement plus concentrés que chez le sensible. Cependant ces composés ont disparu par la suite de la zone de réaction. En revanche, les multiplications cellulaires et les hypertrophies sont apparues à la même vitesse, mais le tissu modifié était totalement désorganisé et ne présentait pas les trois zones décrites sur le sensible. La lignification dans la zone de réaction est restée plus intense et étendue que pour le génotype sensible pendant toute l'expérience.

IV. Conclusions

Les modifications tissulaires induites par la piqûre de *Phloeomyzus passerinii* ont plusieurs caractéristiques communes avec les galls induites par des insectes, comme l'hyperplasie et l'hypertrophie (Brown et al. 1991; Rohfritsch & Anthony 1992; Forneck et al.

2002). Le fait que la zone de réaction observée présente peu d'organisation et consiste surtout en un gonflement des tissus attaqués nous permet de qualifier ce tissu modifié de galle histioïde kataplasmique selon la classification de Rohfritsch (1992), ou encore de pseudogalle. On peut supposer que ce tissu modifié joue un rôle nutritif dans lequel les teneurs en composés nutritifs pourraient être manipulées par l'insecte comme cela peut être observé chez d'autres galligènes (Bronner 1992; Rohfritsch & Anthony 1992). La pseudogalle serait également un tissu dans lequel les défenses du peuplier sont atténuées au cœur pour une meilleure nutrition, mais renforcées en périphérie pour protéger ce site d'alimentation, comme cela est observé pour plusieurs galls d'insectes (Rey 1992; Rohfritsch 1992; Nyman & Julkunen-Tiitto 2000).

Alors que les réponses hypersensibles sont des mécanismes classiques de résistance aux insectes cécidogènes (Fernandes & Negreiros 2001; Höglund et al. 2005), l'absence de nécroses sur ce modèle suggère que ce n'est pas le cas pour *P. passerinii*. Dans les génotypes résistants de peuplier, il semble que la formation de la pseudogalle soit plus ou moins inhibée par l'accumulation rapide de composés phénoliques solubles et de lignine, en particulier pour le génotype très résistant (Brenta). Cela pourrait être la cause du rejet de l'hôte par le puceron en quelques jours seulement chez ce dernier (Pointeau et al. 2011). Sur le génotype de résistance intermédiaire (I-45/51), il semble que la pseudogalle soit tout de même partiellement mise en place, mais son organisation plus anarchique est certainement liée à une lignification des parois cellulaires trop rapide et diffuse des tissus. Cela pourrait diminuer la capacité du tissu à mobiliser des nutriments et expliquer les moins bonnes performances démographiques du puceron sur ce génotype (Pointeau et al. 2011; 2013).

Resistant poplar genotypes inhibit pseudogall formation by the wooly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* Sign

F. Dardeau · E. Deprost · F. Laurans ·
V. Lainé · F. Lieutier · A. Sallé

Received: 31 October 2013 / Revised: 6 February 2014 / Accepted: 25 March 2014 / Published online: 10 April 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract

Key message *Phloeomyzus passerinii* can induce a pseudogall within the bark of susceptible poplar genotypes, while in resistant genotypes the induction seems to be impeded by lignification processes.

Abstract *Phloeomyzus passerinii* is a major pest of poplar stands in Europe, North Africa and the Near East. This aphid feeds in the cortical parenchyma of different poplar species and hybrids, and can affect their growth and survival through unknown mechanisms. In some genotypes, however, resistance prevents either the settlement or the development of aphid colonies. For a better understanding of tree reactions to aphid probing, we compared the anatomical and biochemical modifications undergone within the bark of stem cuttings, after different delays of either aphid colonization or mechanical wounding. To assess how resistance may modulate tree reactions, the comparison was performed using three poplar genotypes exhibiting different resistance levels. In these three genotypes, mechanical wounding induced a similar, localized, wound periderm. In contrast, aphid colonization triggered more extended reactions, which differed among genotypes. In the susceptible genotype, aphids induced a reaction tissue, characterized after a month by thin-walled hypertrophied

cells and a depletion of soluble phenolic compounds and starch. Anatomical features of this reaction tissue suggest that the aphid initiates a pseudogall in the cortical tissues of its susceptible host. In the resistant genotypes, however, the differentiation of the reaction tissue was totally or partially inhibited, probably because of extended lignification processes. The implications of a pseudogall induction on susceptible hosts' physiology, and the impact of lignification on aphid development and behavior, are discussed.

Keywords Host manipulation · Wound periderm · Cortical parenchyma · Nutritive tissue · Lignification · Soluble phenolic compounds

Introduction

The impact of Homopterans on tree stands is usually limited but, on few occasions, some species can cause extensive damage and even tree mortalities (Amman and Speers 1965; Miles 1989; Orondo and Day 1994; Straw et al. 2011). As they rarely transmit phytoviruses to trees (Blackman and Eastop 1994), aphids and adelgids affect their host mostly through resource depletion when they feed on phloem sap (Dixon 1971; Wood et al. 1987; Collins et al. 2001). Alternatively, by inducing chlorosis, galls or reaction tissues in their hosts, some species may also affect basic plant functions such as photosynthesis or sap conduction, thereby impeding the plant development and survival (Balch et al. 1964; Straw et al. 2011). For instance, species like *Adelges piceae* (Ratz.) or *Eriosomalanagerum* (Hausmann), feeding upon cortical tissues, induce galls in the inner bark of their hosts, whose development can interrupt sap flow (Balch et al. 1964; Brown et al. 1991; Hollingsworth and Hain 1991).

Communicated by U. Luetge.

F. Dardeau · E. Deprost · F. Lieutier · A. Sallé (✉)
UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des
Grandes Cultures, Université d'Orléans, Rue de Chartres,
BP 6759, 45067 Orléans Cedex, France
e-mail: aurelien.salle@univ-orleans.fr

F. Laurans · V. Lainé
Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, INRA
d'Orléans, Avenue de la Pomme de Pin, Ardon, BP 20619,
45166 Olivet Cedex, France

Bark defenses against insect aggressions are diverse. Constitutive defense mechanisms represent the first hurdle to insect colonization. They encompass anatomical features like cork thickness or sclerenchyma abundance and chemical components affecting host acceptance or suitability (Wagner et al. 2002; van Emden 2007). Aggressions also trigger a diverse array of induced responses in trees, completing constitutive resistance (Eyles et al. 2010). For example, the hypersensitive responses (HRs) in the bark are characterized by accumulation and biosynthesis of chemical defensive compounds, together with the formation of a necrotic lesion surrounding the damaged tissues (Lieutier and Berryman 1988; Miles 1989; Biggs 1992). A lignification of cell walls also occurs in the immediate vicinity of wounded tissues, completed by the subsequent formation of an internal impervious tissue (Mullick 1977; Biggs et al. 1984). Lignification and impervious tissue formation are the first steps of a compartmentalization process aiming at separating inner tissues from aggressors. Next steps are the initiation and establishment of a necro-phyllactic or wound periderm at the internal margin of impervious tissues, restoring the continuity of the normal phellogen. It may also be followed, if the injury is quite deep in the bark, by a callus formation in the cambial zone (Mullick 1977; Biggs et al. 1984). Such mechanisms can provide an efficient control of tree-dwelling Homoptera. For instance, HR is involved in the resistance of some apple tree and silver fir genotypes to *E. lanigerum* and *A. piceae*, respectively (Balch et al. 1964; Miles 1989). Compartmentalization by a wound periderm also interferes with Adelgids feeding on firs and provides a long-term resistance to the insects (Balch et al. 1964; Miles 1989). The speed of host response is frequently a key component of successful resistance to insects (Miles 1989). Unraveling the mechanisms leading to host damage in the bark and how resistance can alter these processes is therefore of major importance for management purposes of tree pests.

The wooly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Sign.), is considered as a major pest of poplar stands in Europe, the Near East and Northern Africa (Arzone and Vidano 1984; Sadeghi et al. 2007; Baubet and Carouille 2009). After outbreaks, infested trees exhibit delay in bud break, growth reduction, bark cracks and necroses and mortality of lower branches. Sometimes, the year following outbreaks, massive tree mortality occurs (Arzone and Vidano 1984; Baubet and Carouille 2009). Processes leading to these symptoms and tree death are unknown. *Phloeomyzus passerinii* develops on the trunks of poplars, where it feeds in the cortical parenchyma and reaches its feeding site with an unusual straight stylets pathway, both extracellular and intracellular, through its host tissues (Pointeau et al. 2012). External examination of poplar stems and histological investigations of short-term

infestations did not report any visible change in infested tissues (Pointeau et al. 2012). Nonetheless, prolonged infestations of cuttings induced bark swellings and a tanning of inner bark tissues, suggesting a long-term, extended host response to aphid probing (pers. obs.). Poplar susceptibility varies according to species, hybrids and genotypes (Sadeghi et al. 2007; Pointeau et al. 2011). Resistance studies indicate that, depending on genotypes, resistance may affect behavior and/or performances of aphids, and conclude that resistance factors are located in the cortical parenchyma (Pointeau et al. 2011, 2013). It is also hypothesized that HR and phenolic compounds, one of the major components of poplar resistance to biotic aggressions (Philippe and Bohlmann 2007), could be involved in resistance toward *P. passerinii* (Pointeau et al. 2013).

To develop better management strategies, interactions between *P. passerinii* and cortical tissues of its host need to be clarified. Highlighting the resistance mechanisms affecting aphid performances would help in breeding resistant poplar genotypes to this emerging pest. In particular, it would be relevant to have a better insight on the way *P. passerinii* exploits host tissues, on host response to aphid feeding and on the kind of damage generated by this interaction. Thus, using histological and histochemical approaches, we investigated the development of anatomical and biochemical features within poplar bark after different delays of infestation. As a comparison, mechanical wounds were also performed. The effect of resistance was examined by comparing the resistance of three poplar genotypes known to differ in their susceptibility to *P. passerinii*.

Materials and methods

Aphids and plant material

Aphids were taken from a monoclonal laboratory colony, established from a wild apterous parthenogenetic individual collected in October 2008 in Rebourstin (France). The colony was maintained under controlled conditions (21 °C, 70 % RH and 16L: 8D photoperiod) according to Arru's (1974) protocol on stem cuttings of the genotype I-214.

Three genotypes, namely I-214, I-45/51 and Brenta, were used for the experiments. All of them were *Populus × canadensis* (Moench) genotypes (interspecific *Populus deltoides* (Bartr.) Marsh. × *Populus nigra* L. hybrids) bred in Italy. They are frequently occurring in France, especially I-214 and I-45/51 which are among the five most planted genotypes for the past 20 years (Eric Paillassa, IDF, pers. comm.). These three genotypes differ in their resistance level toward the aphid. Both laboratory experiments and field observations have indicated that the

genotype I-214 is highly susceptible to *P. passerinii*, while I-45/51 affects aphid's development and fecundity and Brenta affects aphid settlement and survival (Poiteau et al. 2011, 2013). The cortical interactions between *P. passerinii* and its host were investigated in stem cuttings. This plant material is commonly used for resistance assays which give congruent results with field observations on mature trees (Poiteau et al. 2011, 2013). Stem cuttings (20-cm long, 1.5- to 2-cm diameter) of each genotype were collected at the experimental nursery of Guéméné-Penfao (France), from 1-year poplar stump sprouts, at the end of autumn 2010 and kept at 4 °C until use. Four weeks before experiments, all buds except the terminal one were removed and cuttings were placed in 1 L pots filled with a mix of compost (75 %) and sand (25 %). They were kept in a greenhouse for 2 weeks, before being transferred to a growth chamber with controlled conditions (21 °C, 70 % RH and 16L: 8D photoperiod with a photon flux density of 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Stem cuttings were fertilized once a week with 50 mL of a modified solution of Murashige and Skoog providing N, P, K in 10/8/2 proportions, respectively. Two sets of cuttings were used. A first set of 70 stem cuttings per genotype was planted in February 2011 and used for fresh sections and a second set of 27 stem cuttings of I-214 and I-45/51 was used in mid-April 2011 for resin embedding of bark samples. Stem cuttings were kept for 2 weeks in the growth chamber for acclimation before infestation or wounding.

Mechanical wounding, aphid infestation and monitoring

For infestations, three pairs of parthenogenetic females were placed under three separated gelatine capsules (size 000, LGA, La Seyne-sur-Mer), on the bark of 43 and 12 stem cuttings for the first and second experiment, respectively. Two days later, gelatin capsules were removed and the position of aphids was marked with a permanent pen. During 1 month, aphids' position was checked every other day and nymphs laid were removed. The duration of aphid feeding at a same position was recorded, and when an aphid fell or died, the stem cutting was discarded from the experiment. Mechanical wounds were performed with needles (0.05-mm thick) inserted at 0.5-mm depth in the bark of the cutting. Three needles per cutting were stuck in 12 and 6 stem cuttings for the first and second experiment, respectively. Fifteen stem cuttings for the first experiment and nine for the second were kept without aphid or wounding, as controls.

Fresh histology and histochemistry

Samples were collected at the beginning of wounding or aphid feeding and after 1, 2, 3 and 4 weeks, by cutting

1-cm-long sections around aphids or needles. The number of stem cuttings used and samples collected per modality and sampling date is presented in Table 1. Cross sections (40 μm) were performed with a sliding microtome. Nine and six cross sections were made for each sample of wounds and controls, respectively. For aphid feeding sites, cross sections were made around stylet insertion area, with six sections above the aphid site and six below.

For each sample, one-third of all sections were soaked 10 min in 2.4 % (vol:vol) sodium hypochlorite, washed in distilled water, then immersed 3 min in 25 % acetic water, 8 min in Mirande's reagent (Deysson 1954) and finally washed in distilled water. Sections were then mounted in water to observe anatomy and lignification of bark tissues. Cellulosic cell walls appeared in pink and lignified cell walls appeared in blue–green. The second third of sections was stained for tannins. Samples were bathed 30 min in a saturated 95 % ethanol solution of Vanillin-O and then mounted in a 9N hydrochloric acid solution. Tannins appeared in red–orange. The last third of sections was stained for flavanols with Dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA). After 15 min in a 0.3 % (wt:vol) solution of ethanol/hydrochloric acid 12 N (vol:vol), sections were rinsed twice with 70 % ethanol and mounted in ethanol 70 %. Flavanols were stained in dark blue. Sections were immediately observed with a light microscope (Leica DMR, Leica Microsystems, Vienna, Austria) equipped with a Leica DFC 320 digital camera. Anatomical modifications were measured with ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Maximal width and depth of reaction tissues were measured.

Resin embedded histology and histochemistry

Samples were collected prior to infestation or wounding and then 2 and 4 weeks later. The number of stem cuttings used and samples collected per modality and sampling date is presented in Table 1. Bark tissues were prefixed by injecting in gelatin capsules a 2.5 % glutaraldehyde solution in a 0.2 M, pH 6.8 McIlvain citrate/phosphate buffer (Pepin and Boumendil 1982). After 2 h, capsules were removed and a sample of bark tissues (4-mm long \times 2 mm-wide \times 2-mm thick) was collected. Samples were then fixed with the same 2.5 % glutaraldehyde solution over 24 h and rinsed with McIlvain buffer. All samples were dehydrated in an increasing ethanol series and progressively impregnated in LRWhite™ soft grade resin (SPI, West Chester, USA) with a series of resin and ethanol mix with a progressive increasing of resin percentage. They were finally embedded in gelatin capsules filled with pure resin after 12 h at 56 °C for polymerization. These blocks were used to obtain 60 sections (5- μm thick) per sample, with a microtome (RM2155 Leica Microsystems, Vienna,

Table 1 Sampling frequency and number of samples collected for the fresh and resin embedded histological investigations

Experiment	Poplar genotypes	Treatment	Sampling date (weeks)	Stem cuttings used per sampling date	Samples collected per sampling date
1: Fresh histology	I-214, I-45/51, Brenta	Control	0, 1, 2, 3, 4	3	5–6
		Needles	1, 2, 3, 4	3	5–6
		Aphids ^a	1, 2, 3, 4	3–6	5–8
2: Resin embedded histology	I-214, I-45/51	Control	0, 2, 4	3	3
		Needles	2, 4	3	3
		Aphids	2, 4	6	3–5

^a For Brenta samples from aphids treatment were collected only a week after infestation (see results)

Austria). Series of thin cross sections (1.5- μ m thick) were also performed, with an ultramicrotome (Leica Ultracut R, Leica Microsystems, Vienna, Austria), on two additional samples collected after a month from either mechanical wounding or aphid infestation.

To investigate bark anatomy, we performed a Toluidine Blue O (TBO) staining with a 0.1 % (wt:vol) solution in a phosphate buffer 0.1 M, pH 6.8 for 5 min before rinsing twice 5 min in distilled water. Cellulosic cell walls appeared violet and lignified cell walls appeared blue. For starch staining, Iodine–iodide solution (IKI) was used 30 min before rinsing with distilled water and showed starch accumulations in black grains. Lignin was specifically localized with phloroglucinol–HCl (PHCl). Sections were then soaked 2 min in 2 % (wt:vol) phloroglucinol dissolved in 2:1 mixture of ethanol and concentrated HCl before being rinsed with distilled water. All slides were mounted with Canada balsam and examined immediately with the same light microscope and camera as for fresh sections. To detect both lignin and suberin, sections were observed under blue light excitation (EL6000 Leica, Fluorescence Illumination System) with a BP 360/40 excitation filter, a 400 dichromatic mirror and a BP 470/40 suppression filter, with a light microscope (Leica DM6000 B, Leica Microsystems, Vienna, Austria). Sections were then stained with PHCl. As this reagent quenched autofluorescence due to lignin and other phloroglucinol-reactive phenolic compounds, it allowed the observation of suberin only under blue light.

Results

Fresh histology and histochemistry

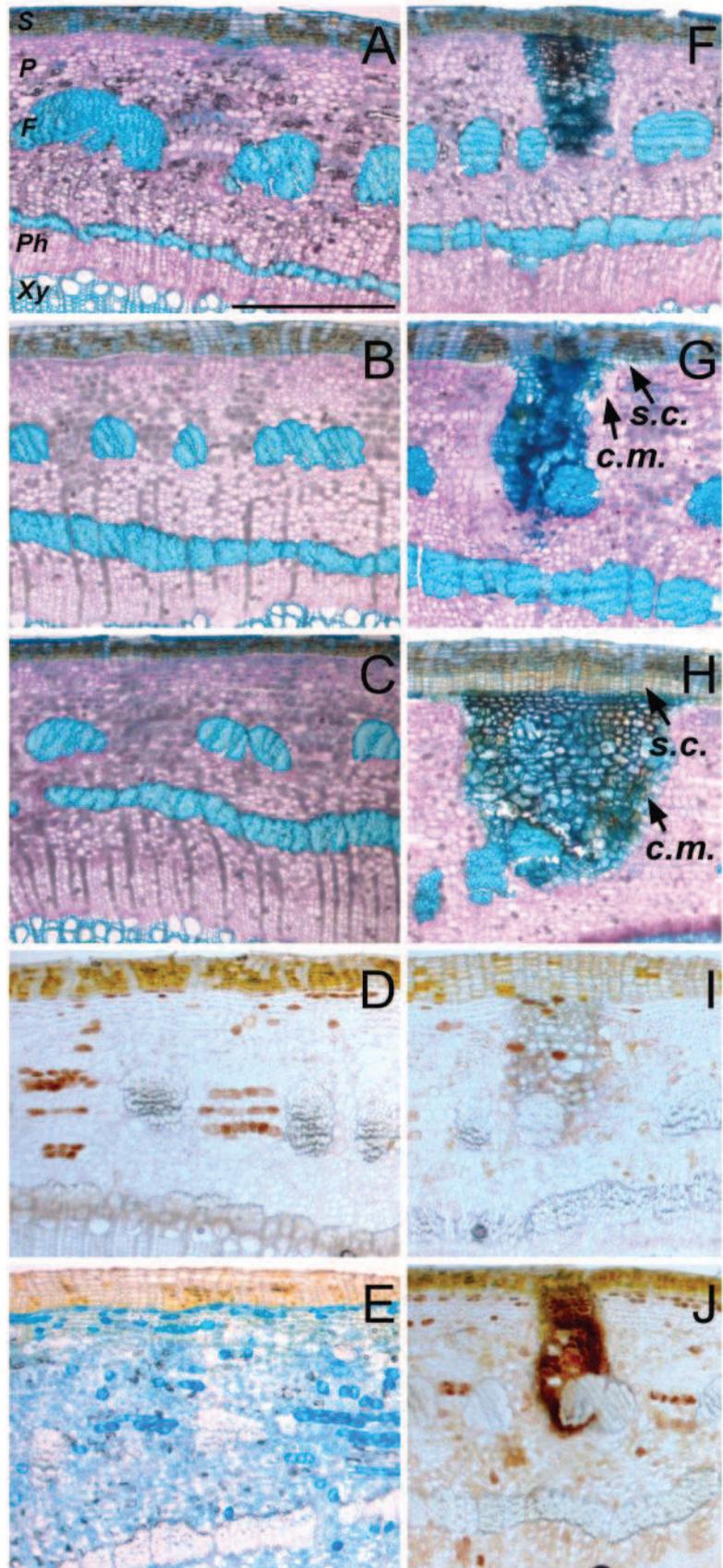
Anatomical features of control bark samples were similar for all genotypes, and did not vary during the experiment (Fig. 1a–c). The thickness of the different tissues composing bark, and the abundance of sclerenchyma fibers, were equivalent among genotypes. Tannins and flavanols exhibited the same distribution pattern, in all genotypes, for

all the duration of experiment (Fig. 1d, e). These compounds were located in the vacuole of cells right beneath the suber layer or between sclerenchyma fibers. Similar cells were also dispersed in the parenchyma, and few of them occurred in the phloem.

Anatomical and histochemical responses to mechanical injuries were similar in all poplar genotypes. Mechanical wounding resulted in a deposition of lignin in the cell walls in the immediate vicinity of the wounded area (Fig. 1f). Lignification was conspicuous, and intense, 1 week after the injury and slightly extended during the following weeks (Fig. 1g, h). This area was 0.44 ± 0.03 mm deep and 0.31 ± 0.02 mm wide after 1 week and slightly increased to 0.51 ± 0.03 mm deep and 0.32 ± 0.03 mm wide at the end of the experiment. After 2 weeks, cell multiplication (*c.m.*) became visible around the lignified area (Fig. 1g) in all I-45/51 samples, 80 % of Brenta samples and only 33 % of samples from I-214. Stacked cells (*s.c.*) also appeared below the suber in a few samples of all genotypes, indicating an enhanced activity of the phellogen (Fig. 1g). At the end of the experiment all samples exhibited cell multiplication. An extended wound periderm connecting to phellogen totally isolated the lesion. Stacked cells below the suber were visible in 83, 67 and 50 % of Brenta, I-45/51 and I-214 samples, respectively (Fig. 1h). Tannins and flavanols were observed in the lesion throughout the duration of the experiment and accumulated in almost all cells of the reactive area after 1 month (Fig. 1i, j).

Feeding by *P. passerinii* induced responses in bark tissues differing from what occurred after a mechanical injury. The induced responses also differed according to poplar genotype, even after 1 week of infestation (Fig. 2a–f). In I-214, a lignification of cell walls was visible beneath the suber in the probed tissues, and layers of three to four stacked cells, parallel to the suber, were visible in the cortical parenchyma of 20 % of the samples (Fig. 2a). Cells in this newly formed reaction tissue were rectangular, and were undergoing periclinal divisions (*c.m.*). The reaction tissue was 0.37 ± 0.02 mm deep and 1.20 ± 0.09 mm wide. In I-45/51, similar events occurred but lignification of cell walls was more intense and

Fig. 1 Cross sections (40 μm) of fresh bark tissues from stem cuttings of three different poplar genotypes (I-214, I-45/51 and Brenta), in controls and following a mechanical wounding. **a–c** Controls bark tissues of I-214 (susceptible), I-45/51 (intermediate) and Brenta (resistant) genotypes, respectively (Mirande’s reagent staining). **d, e** Tannins and flavanols location in control bark tissues of I-214 (Vanillin-O and DMACA staining) representing the general pattern for all genotypes. **f–h** Reactions to mechanical wounding in I-214 after 1, 2 and 4 weeks, respectively, showing lignification, periclinal cell divisions around the wound (*c.m.*) and below suber (*s.c.*). **i, j** Soluble phenolic compounds location in I-214 (Vanillin-O staining), 2 and 4 weeks after mechanical wounding, respectively, showing the progressive accumulation of tannins. Mirande’s reagent staining is showing cellulosic cell walls in *pink* and lignified cell walls in *blue*. Vanillin-O/HCl is staining condensed tannins in *brown–orange* and newly formed ones in *red*. DMACA is staining flavanols in *dark blue*. *Black scale* represents 0.5 mm. *S* suber, *P* cortical parenchyma, *F* sclerenchyma fibers, *Ph* phloem, *Xy* xylem. *Arrows* indicate stacked cells (*s.c.*) or cell multiplication in the parenchyma (*c.m.*)



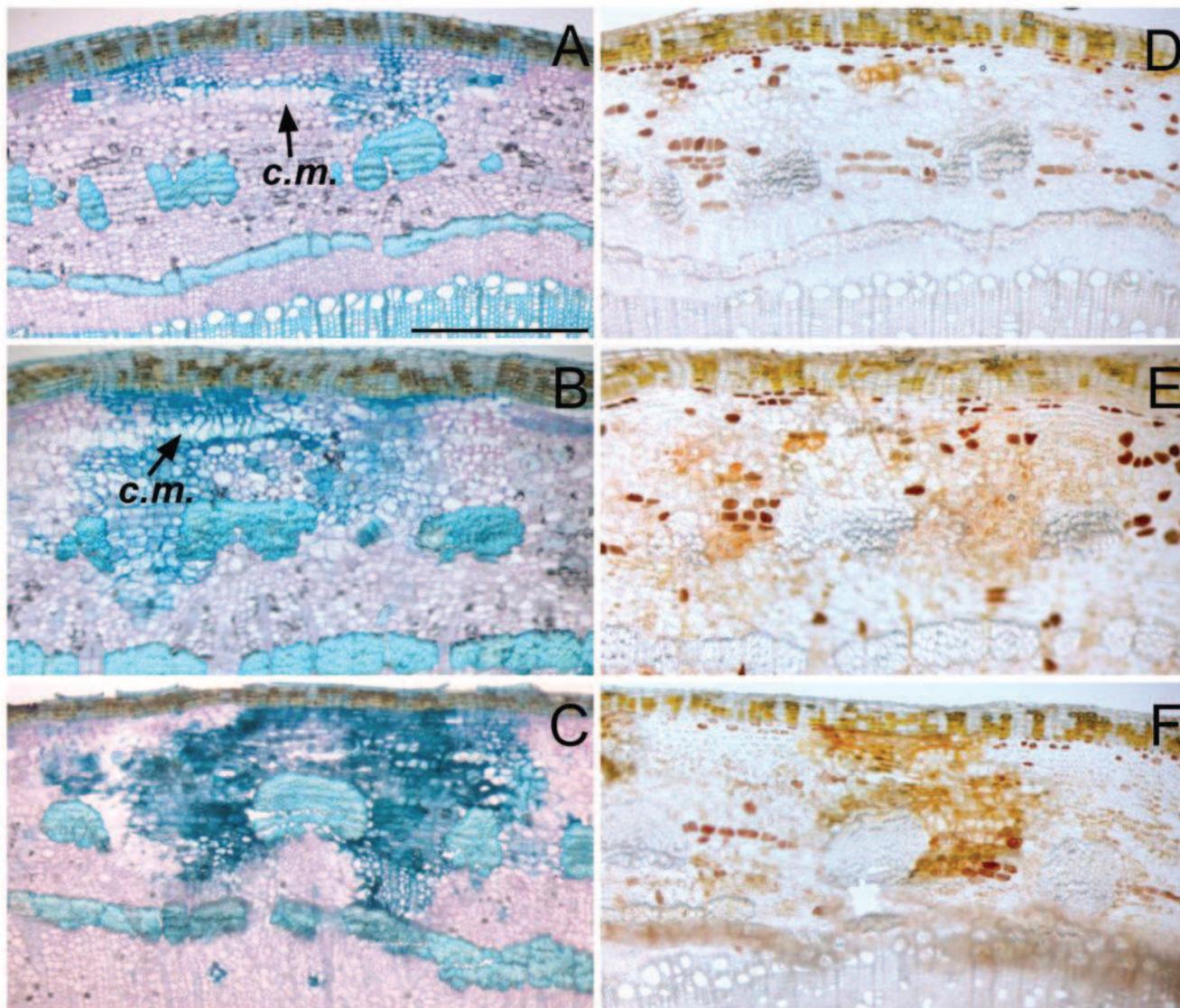


Fig. 2 Cross sections (40 μm) of fresh bark tissues from stem cuttings of three different poplar genotypes (I-214, I-45/51 and Brenta), 1 week after *P. passerinii* colonization. **a–c** Cortical reactions to *P. passerinii* feeding in I-214 (susceptible), I-45/51 (intermediate) and Brenta (resistant), respectively, showing lignification and periclinal cell divisions (*c.m.*) after Mirande's reagent staining. **d–f** Tannins location in I-214, I-45/51 and Brenta, respectively

(Vanillin-O/HCl staining). Mirande's reagent staining is showing cellulosic cell walls in pink and lignified cell walls in blue. Vanillin-O/HCl is staining condensed tannins in brown–orange and newly formed ones in red. Black scale represents 0.5 mm. The different kinds of tissues are presented in Fig. 1. Arrows indicate cell multiplication (*c.m.*)

extended and the reaction tissue was 0.54 ± 0.05 mm deep and 0.98 ± 0.09 mm wide (Fig. 2b). Due to its high level of resistance, only three samples could be observed in Brenta 1 week after infestation and no longer after. Lignification was more intense and extended than in the other genotypes as it was already 0.47 ± 0.04 mm deep and 1.67 ± 0.06 mm wide, and no cell multiplication was visible (Fig. 2c).

Regarding soluble phenolic compounds, the distribution of both tannins and flavanols within cortical tissues followed the same evolution, hence only the results for

tannins are presented in the figures. Accumulations in vacuoles and cell walls occurred already 1 week after infestation in the three genotypes (Fig. 2d–f). However, as for lignification, accumulations were more intense in Brenta (Fig. 2f) and, to a lesser extent though, in I-45/51 (Fig. 2e) than in I-214 (Fig. 2d).

The following weeks, the anatomical and biochemical modifications induced by infestation became more conspicuous and extended, and evolved differently in I-214 and I-45/51 (Fig. 3a–h). In I-214, after 2 weeks, an activation of the phellogen activity occurred and resulted in an

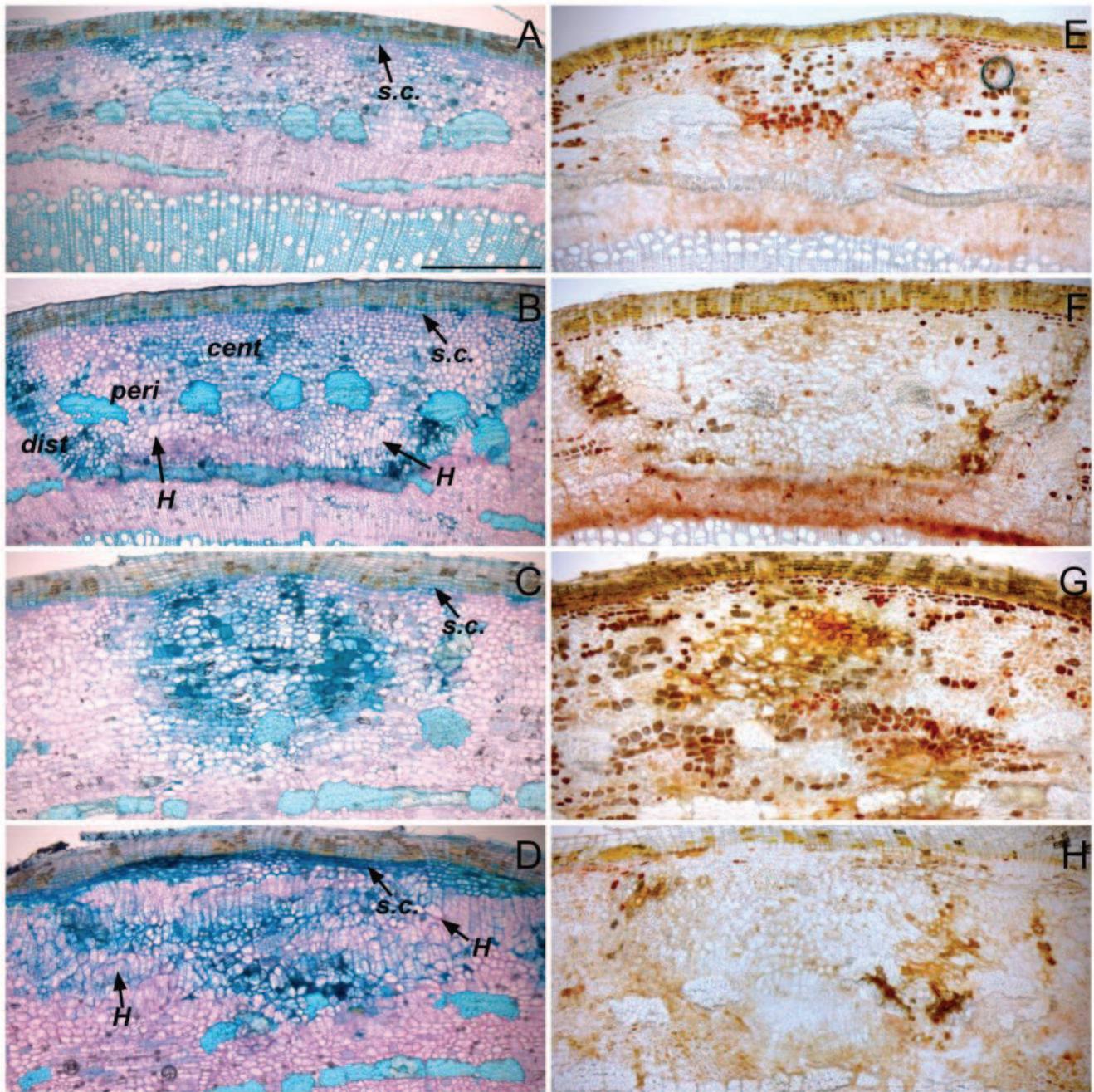


Fig. 3 Cross sections (40 μm) of fresh bark tissues from stem cuttings of two different poplar genotypes (I-214 and I-45/51), 2 and 4 weeks after *P. passerinii* colonization. **a, b** Cortical reactions to *P. passerinii* feeding in I-214 after 2 and 4 weeks (Mirande's reagent staining), showing cell divisions, cell enlargements (*H*) and lignification in the parenchyma delineating three distinct areas (*cent*, *peri* and *dist*). An activation of phellogen activity (*s.c.*) is also visible. **c, d** Cortical reactions to *P. passerinii* feeding in I-45/51 after 2 and 4 weeks (Mirande's reagent staining) showing cell divisions, cell enlargements (*H*) and a diffuse pattern of lignification in the parenchyma. An activation of phellogen activity (*s.c.*) is also visible. **e, f** cortical reactions to *P. passerinii* feeding in I-214 after 2 and

4 weeks (Vanillin-O staining), indicating an initial accumulation and biosynthesis (red vacuoles) (**e**) and a depletion (**f**) of tannins within the reaction zone. **g, h** Cortical reactions to *P. passerinii* feeding in I-45/51 after 2 and 4 weeks (Vanillin-O/HCl staining), indicating an accumulation and biosynthesis (red vacuoles) (**g**) and a depletion (**h**) of tannins within the reaction zone. Mirande's reagent staining is showing cellulosic cell walls in pink and lignified cell walls in blue. Vanillin-O/HCl is staining condensed tannins in brown–orange and newly formed ones in red. Black scale represents 0.5 mm. The different kinds of tissues are presented in Fig. 1. Arrows represent stacked cells under suber (*s.c.*), hypertrophied cells (*H*). *cent* central area, *peri* peripheral area, *dist* distal area

accumulation of stacked cells (*s.c.*) below the suber, visible in 71 % of samples at the end of the experiment (Fig. 3a, b). After 2 weeks, the lignification of cell walls was more extended, but still located in the cortical parenchyma only (Fig. 3a). In the periphery of the lignified area, enlarged cells occurred in 40 % of samples after 3 weeks, and after a month all samples contained hypertrophied cells (*H*, Fig. 3b). At this date, three areas could be distinguished in all samples (Fig. 3b): a central area (*cent*) with slightly lignified parenchyma cells, a peripheral area (*peri*) where cell hypertrophy and hyperplasia occurred, and a distal area (*dist*), bordering the peripheral area with densely lignified cells. Lignification of dispersed cells was also observed in the phloem in 86 % of samples and 43 % exhibited some crushed and lignified cell clusters between the reaction tissue and the phloem. During the monitoring, the reaction tissue extended as it grew to 0.83 ± 0.05 mm in depth and 2.41 ± 0.15 mm in width after a month of infestation (Fig. 3b).

In I-45/51, similar events occurred but with a different pattern. Lignification of cell walls was much more intense and extended than in I-214 from the second to the third week (Fig. 3c), but tended to have the same size at the end of the experiment (Fig. 3d). Stacked cells were also visible below the suber in 20 % of the samples after a 2-week infestation, indicating an enhanced activity of the phellogen (Fig. 3c). All samples exhibited these stacked cells at the end of the monitoring (Fig. 3d). Cell hyperplasia (*c.m.*) and hypertrophy (*H*) occurred with the same timing as in I-214, but with a distinct pattern. While they were mostly in the peripheral, not lignified, area in I-214, they occurred in a disorganized pattern in I-45/51 and only in 50 and 25 % of samples after 3 weeks and 1 month, respectively. The three areas clearly delineated in I-214, could not be distinguished in I-45/51. Lignification of cell walls also happened in the multiplying and hypertrophied cells (Fig. 3d). The global extension of the reaction zone increased throughout the monitoring period up to 0.86 ± 0.06 mm in depth and 2.42 ± 0.26 mm in width after a month.

Regarding tannins and flavanols, both types of compounds accumulated in cell vacuoles of I-214 during the second week (Fig. 3e). At this time, coloration patterns with vanillin-O staining also suggested that biosyntheses occurred in cells of the reaction area (Fig. 3e). During the last 2 weeks of the monitoring, these compounds progressively disappeared from the central and peripheral areas, except in the layer of cells beneath suber, and accumulated in the vacuoles and cell walls of the distal area, and in the cell walls of the phloem below (Fig. 3f). In I-45/51, these compounds accumulated in the infested area after 2 weeks (Fig. 3g) but, as in I-214, they progressively disappeared from the reaction tissue and accumulated at the periphery (Fig. 3h).

Resin embedded histology and histochemistry

Resin embedded samples confirmed that the general bark anatomy was identical in the controls of I-214 and I-45/51 genotypes, throughout the duration of the experiment (Fig. 4a, c). They also indicated that starch reserves were abundant in the cortical parenchyma all along the experiment (Fig. 4b).

Mechanical wounding induced periclinal cell divisions (*c.m.*) around injured tissues, with a similar timing and pattern in both genotypes. These divisions were limited 2 weeks after the injury, but more developed 2 weeks later when up to five layers of small, rectangular cells were produced, forming a wound periderm that fully enclosed the wounded area, and joined the phellogen (Fig. 4d, g). BTO and PHCl staining confirmed that the cell walls of newly formed cells, in contact with the wounded area, were rapidly lignified (Fig. 4d, f, g). Autofluorescence and PHCl did not allow the detection of suberin deposits in the wound periderm (Fig. 4f, h, i). In both genotypes, starch reserves tended to slightly disappear from the cortical parenchyma, in the vicinity of the wound periderm (Fig. 4e).

In both genotypes, periclinal divisions (*c.m.*) were visible 2 weeks after the onset of feeding by *P. passerinii* (Fig. 5a, b). Superficial lignification could also be distinguished with both PHCl and BTO staining (data not shown). Two weeks later extended reaction tissues were observed (Fig. 5d, e). In I-214, it consisted in a homogeneous tissue located in the cortical parenchyma, with alignments of dozen of stacked cells originating from the periclinal divisions, corresponding to the peripheral area described previously (Fig. 5d, f). This tissue was located below the central area constituted with normal parenchyma cells, with lignified cell walls (Fig. 5k). Dead cells were also visible on the stylets pathway (Fig. 5f). Cells in the peripheral area were thin walled, and some of them exhibited a very pronounced hypertrophy (*H*), locally disorganizing the reaction tissue (Fig. 5f). In the tissues located underneath, extended lignification occurred (Fig. 5h) and crushed cells (*c.c.*) could be observed (Fig. 5d, g). In I-45/51, instead of a homogeneous reaction tissue, there were several zones of cell hyperplasia (*c.m.*) distributed throughout the cortical parenchyma (Fig. 5e). Cells also presented thin walls and hypertrophy (*H*), but to a lesser extent than in I-214.

After 28 days, no starch granules were visible in the reaction tissues induced by the aphid in the two genotypes, and in the surrounding parenchyma (Fig. 5c). Only a few granules remained at the periphery of the feeding site in I-45/51. Autofluorescence and counter coloration with PHCl did not indicate suberin deposits in cell walls of the reaction tissues (Fig. 5i, j, l, m).

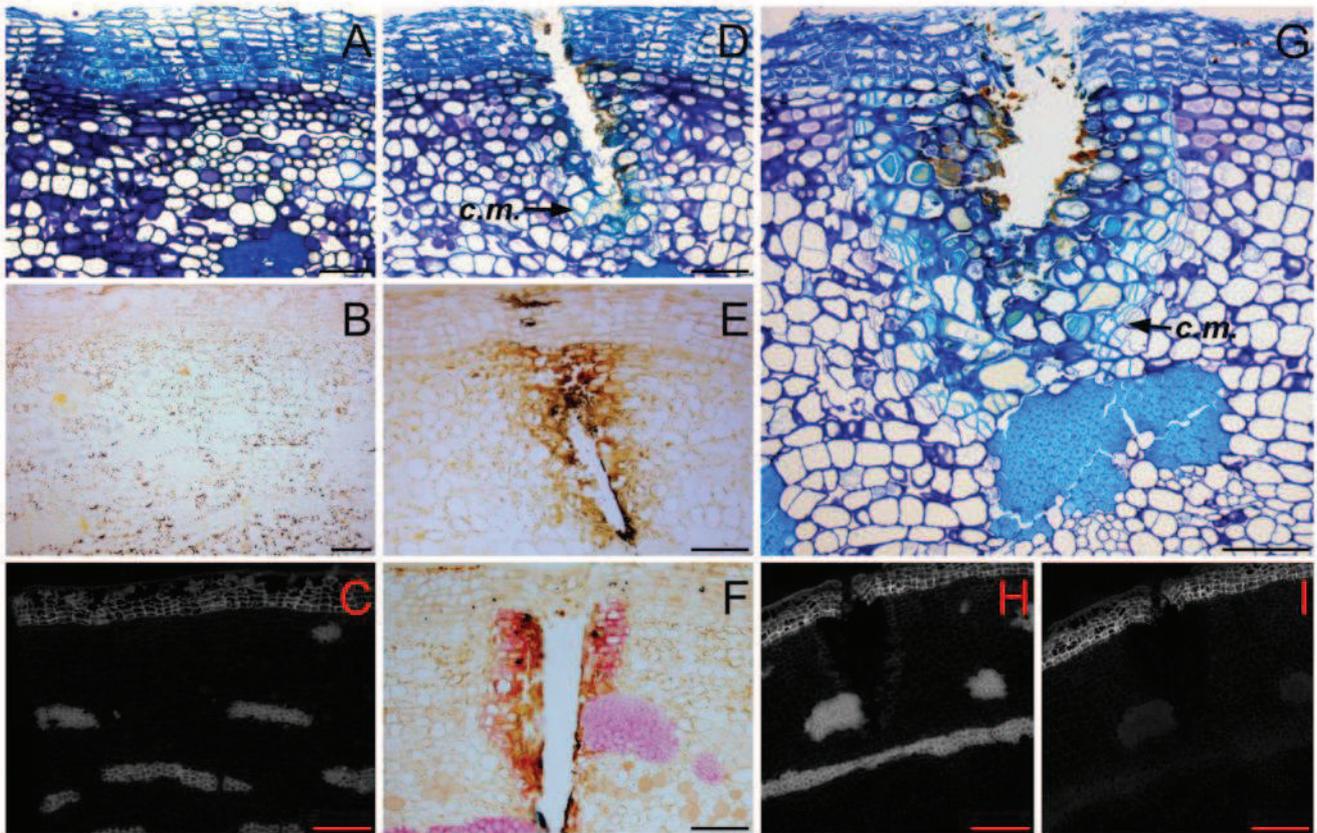


Fig. 4 Resin embedded cross sections of the bark tissues from the poplar genotype I-214 (susceptible), from controls and after a mechanical wounding. **a–c** Controls after 4 weeks, showing the general anatomy (**a**: BTO staining), abundant starch granules throughout the parenchyma (**b**: IKI staining), and fluorescence restricted to the suber and sclerenchyma fibers (**c**). **d** Reaction to a mechanical wounding after 2 weeks, showing cell division (*c.m.*) and lignification around the wound (BTO staining). **e–i** Reactions to a mechanical wounding after 1 month showing starch granules (**e**) and cell division (*c.m.*) and lignification around the wound (**g**) (IKI and BTO staining). **f–i** are showing lignin and suberin localization in

I-214 after 1 month (phloroglucinol/HCl staining and autofluorescence before and after phloroglucinol/HCl staining). BTO is showing cell walls in *purple* if cellulosic and in *blue* if lignified or suberized. IKI is showing starch grains in *black*. Phloroglucinol/HCl is staining lignin in *red*. DAPI-filtered pictures are showing lignin and suberin fluorescence before and after phloroglucinol/HCl staining. All samples were 5- μ m thin except **g** which is 1.5- μ m thin. *Black and red scales* represent 0.1 mm. The different kinds of tissues are presented in Fig. 1. *Arrows* indicate cell multiplication in parenchyma (*c.m.*)

Discussion

Infestations by *P. passerinii* induced anatomical and biochemical modifications in host tissues that sharply differed from the reaction to mechanical injuries. In all three genotypes, mechanical wounding induced the formation of a classical wound periderm (Bostock and Stermer 1989), characterized by parietal and vacuolar accumulations of lignin, tannins and flavanols in the reaction zone surrounding the injured area. Metaplasia also occurred, followed by periclinal divisions in the outer margin of this reaction area. Deposition of suberin or suberin-like compounds generally occurs in an impervious tissue that differentiates in the cells immediately abutting the lignified area (Biggs et al. 1984; Bostock and Stermer 1989; Biggs 1992). This has been described in particular in the bark of a poplar hybrid undergoing a fungal infection (Biggs et al.

1984; Weiland and Stanosz 2007). However, in our study, no deposition of suberin-like compounds could be detected. This might be an artifact as suberin linings can be thin and difficult to detect (Biggs 1984), or suberin deposition may occur in a delay longer than the time range considered in our study. Following the mechanical injury, both anatomical and biochemical modifications remained localized around the wound.

In contrast, the response of cortical tissues to aphid infestation was much more extended, and presented a very distinct organization, although similar lignification and hyperplasia processes also occurred. Thin-walled, hypertrophied cells differentiated only within the tissues infested by the aphid. Furthermore, the biosynthesis and distribution of soluble phenolic compounds within cortical tissues also sharply differed between wound- and aphid-induced reactions. Following aphid infestation, these compounds, after

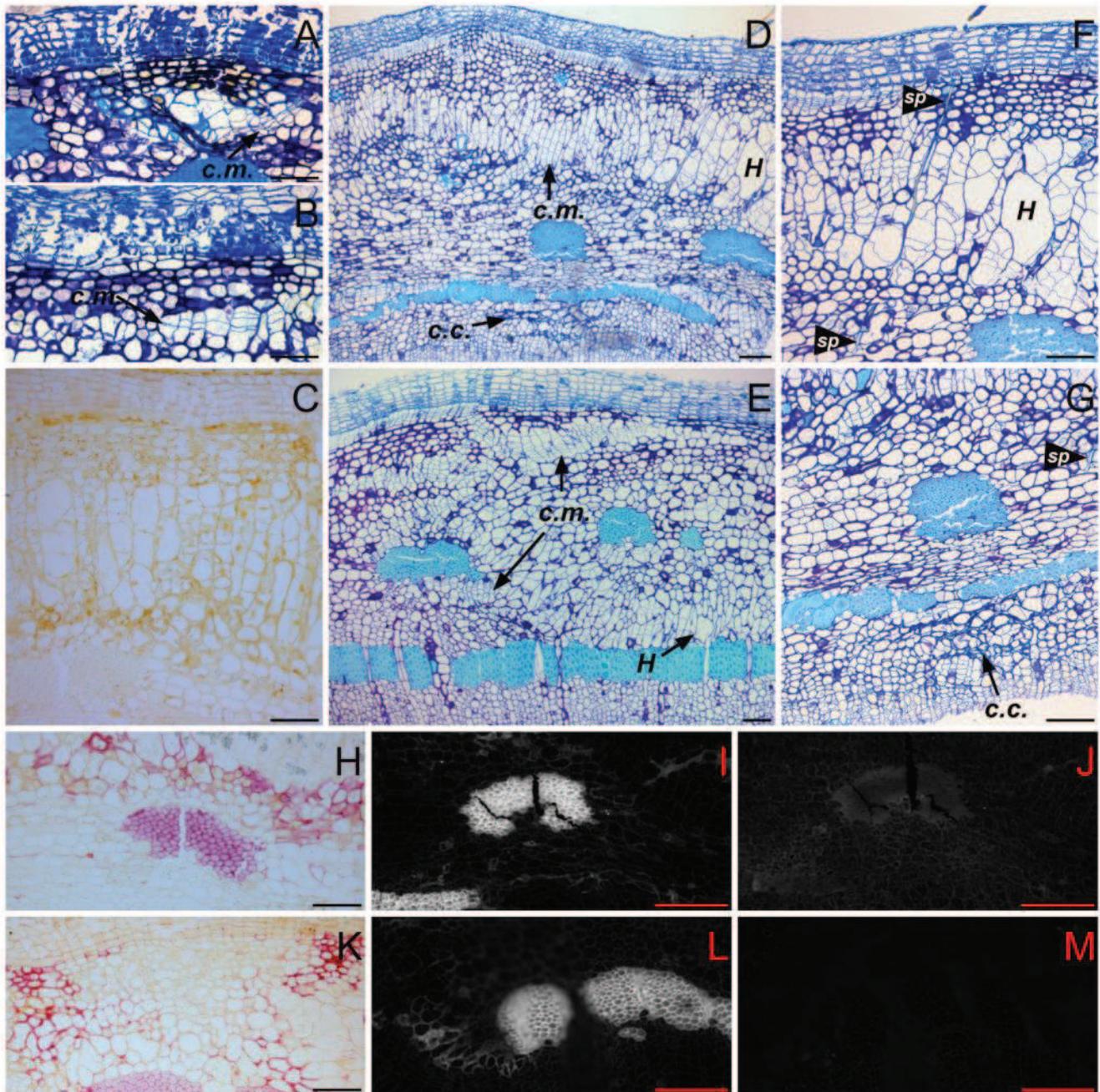


Fig. 5 Resin embedded cross sections of bark of two poplar genotypes (I-214 and I-45/51) infested by *P. passerinii*. **a, b** Reaction to a 2-week infestation in I-214 and I-45/51 genotypes, respectively, showing periclinal division (*c.m.*) in the parenchyma (BTO staining). **c** IKI staining of I-214 bark after a month of infestation indicating a depletion of starch granules from the reaction area. **d, e** Reactions to a month infestation by *P. passerinii* in I-214 and I-45/51 genotypes, respectively showing hyperplasia (*c.m.*) and cell hypertrophy (*H*) (BTO staining). **f** Detail of **d** showing aphid stylets pathway (*sp*) and thin-walled, hypertrophied cells (*H*) of the peripheral area of the reaction tissue. **g** Detail of **d** showing crushed cells (*c.c.*) in the distal area of the reaction tissue. **h** Phloroglucinol/HCl staining of the distal area of a reaction zone in I-214 showing lignification of the cell

walls. **i, j** Autofluorescence of the distal area prior (**i**) and after (**j**) phloroglucinol/HCl staining, indicating an absence of suberization. **k** Phloroglucinol/HCl staining of the central area of a reaction zone in I-45/51 showing lignification of the cell walls. **l, m** Autofluorescence of the central area prior (**l**) and after (**m**) phloroglucinol/HCl staining, indicating an absence of suberization. BTO is showing cell walls in purple if cellulosic and in blue if lignified or suberized. IKI is showing starch grains in black. All samples were cut at 5 μm except **d, e, f** and **g** which were 1.5- μm thin. Black and red scales represent 0.1 mm. The different kinds of tissues are presented in Fig. 1. Arrows indicate cell multiplication in the parenchyma (*c.m.*), hypertrophied cells (*H*) and aphid's stylets pathway (*sp*). *c.c.* clusters of crushed cells

a transient accumulation, progressively disappeared from central and peripheral areas but continued to accumulate in the distal area.

The organization of the reaction tissue induced in I-214, along with its biochemical and anatomical features, shared many similarities with gall tissues induced by insects. Hyperplasia and cell hypertrophy observed in the peripheral area are also encountered in galls induced on perennial plants by different Homopterans like *E. lanigerum* on apple tree (Brown et al. 1991), *A. laricis* Vallot and *A. abietis* L. on spruce (Rohfritsch and Anthony 1992), and *Viteus vitifoliae* (Fitch) on grapevine (Forneck et al. 2002). Cell hypertrophy is often associated with nutritive tissues in these galls. The hypertrophied cells generally exhibit enlarged nucleus and nucleolus, abundant organelles, and an abundant cytoplasm (Rohfritsch and Anthony 1992). Because of their high metabolic activity, and because they create a mobilizing sink within the plant, these cells can be filled with nutrients (Bronner 1992). Since *P. passerinii* performs sustained intracellular ingestions for feeding, the hypertrophied cells might then also favor its nutrition (Pointeau et al. 2012, 2013). The development of a nutritive tissue is frequently concomitant with starch accumulations in the vicinity of hypertrophied cells, which degradation provides soluble sugars to the insect (Bronner 1992; Rohfritsch and Anthony 1992; Forneck et al. 2002). In our study, however, we observed a progressive depletion in starch content of cells within the reaction zone and in its periphery, similar, but to a larger extent, to what occurred around the wound periderm. This could contradict the nutritive function of the hypertrophied cells, yet a similar depletion of starch reserves has also been reported within the gall tissues of *A. abietis* (Rohfritsch and Anthony 1992). Depletion in secondary metabolites close to the feeding site and accumulation at the periphery are also features frequently observed in insect-induced galls. For instance, some gall-inducing Hymenoptera can affect the biosynthesis of phenolic compounds in their hosts, thereby lowering the concentrations of most of these compounds in gall interiors, while accumulating some of them in the outer tissues (Rey 1992; Rohfritsch 1992; Nyman and Julkunen-Tiitto 2000). Likewise, lignin and phenolic compounds can accumulate in the outer tissues of Homopterans and cecidomyiids galls (Rohfritsch 1992; Rohfritsch and Anthony 1992).

Altogether, the anatomical features observed in the susceptible poplar genotype suggest that *P. passerinii*, to favor its nutrition and development, induces a gall in the bark of its host tree. This mode of nutrition is commonly encountered in small Homopterans species that colonize bark or roots like *E. lanigerum* and *V. vitifoliae* (Brown et al. 1991; Forneck et al. 2002). Considering that the induced tissues consist mostly in several layers of modified

parenchymatous cells, without a high degree of organization, the gall could be classified as a histioid, kataplasmic gall (Rohfritsch 1992). Being mostly a swelling of pre-existing bark tissue, it could also be referred as a pseudogall. Although conspicuous in our study, these induced tissues had never been described for this insect. The previous histological study, investigating the feeding mode of the insect, failed to detect them since it considered bark tissues only after few hours of stylets probing while the first conspicuous anatomical modifications require several days (Pointeau et al. 2012). Interestingly, *P. passerinii* uses during probing a quite destructive stylets pathway, both inter- and intracellular, contrary to most phloem-feeding aphids whose pathway is intercellular (Tjallingii and Hogen Esch 1993; Pointeau et al. 2012). Several aphids inducing galls within cortical tissues of perennial plants also cross cells when probing (Pollard 1973; Miles 1989). Together with salivation, this mechanical wounding could assist aphids in the initiation of a host response, further manipulated to differentiate a pseudogall. For instance, gall midges also perform mechanical wounds in their host cells to initiate galls (Rohfritsch 1992), and the initiation of galls by several Hymenopterans apparently requires both a wounding of tissues and the deposition of insect secretions during oviposition (Rey 1992).

All three poplar genotypes considered in our study exhibited comparable anatomy and distribution pattern of both soluble phenolic compounds and starch. Their response to mechanical wounding was also similar, although the onset of wound periderm formation was slightly delayed in I-214. In contrast, the response to the probing by *P. passerinii* differed among genotypes. Both lignification and accumulation of soluble phenolic compounds were more intense and extended in the resistant genotypes, especially a week after infestation in the few samples collected from the resistant genotype Brenta. Similarly, early responses to *V. vitifoliae* probing within leaves of resistant grape genotypes were characterized by vacuolar accumulations of soluble phenolic compounds (Raman et al. 2009). Fast deposition of lignin and biosynthesis of secondary metabolites is also typical of HR in plants, which is implicated in resistance versus gall midges in different plant species (Fernandes and Negreiros 2001; Höglund et al. 2005) and aphids on leaves of peach trees and grapevines (Saugé et al. 1998; Raman et al. 2009). However, HR also implies extended cell death at the site of infestation and no conspicuous necroses have been observed in association with the aphid-induced reactions, as only cells crossed by stylets died. Hence, HR does not seem to be involved in poplar resistance to *P. passerinii*.

Cell wall modifications can affect plant–insect interactions, especially plant penetration by insects with piercing mouthparts (Divol et al. 2007; Rangasamy et al. 2009). In

our study, the rapid and intense deposition of lignin, by strengthening cell walls, may have affected aphid probing within host tissues in both I-45/51 and Brenta. Together with the accumulation of soluble phenolic compounds, this intense lignin deposition could be involved in the low settlement rate and the feeding avoidance exhibited by aphids on Brenta (Pointeau et al. 2011, 2013). Likewise, the extended lignification in I-45/51 that persisted all along the experiment could have impeded the differentiation of hypertrophied cells and, more generally, of the reaction zone by blocking cell growth and permeability. This would have resulted in a disorganization of the induced reaction zone in this genotype compared to I-214. Aphids developing on I-45/51 have a longer nymphal development and a lower fecundity compared to those developing on I-214, presumably because of a nutritional deficiency (Pointeau et al. 2011, 2012). This would be congruent with an impaired development of nutritive tissues within host cortical parenchyma, as suggested in our experiment.

The anatomical and biochemical modifications resulting from aphid infestation were restricted to the cortical parenchyma for the three genotypes, but occasionally extended to phloem. Lignin and soluble phenolic compounds deposits in cell walls were visible in the phloem of I-214 and I-45/51. The differentiation of the reaction tissue within parenchyma, with cell hypertrophy, seems to exert a significant pressure within host tissue. After the removal of long-time settled aphids, droplets of liquid ooze from the infested area (pers. obs.). This pressure is therefore probably responsible for the bark swelling that can be observed on cuttings and for the crushing of cells in the underneath tissues. Bark cracks that are often observed on tree bark the year following aphid outbreak (Arzone and Vidano 1984) could also result from the differentiation of the reaction tissue that interrupts the continuity of the periderm.

Although modifications were observed within phloem, it is unsure that these modifications could significantly affect sap conduction. For practical issues, our observations have been conducted on rooted stem cuttings, in which cortical parenchyma and phloem tissues are thinner than in the trees colonized by *P. passerinii* in field conditions. Presumably, the reaction zones and their consequences on the underneath tissues in a mature tree would have a limited direct impact on sap conduction. However, galls often act as mobilizing sinks within their host plant accumulating nutrients like amino acids, soluble sugars or starch drawn from the surrounding tissues (Shannon and Brewer 1980; Saltzmann et al. 2008; Suzuki et al. 2009). This is supported by the depletion of starch reserves around the infested areas in our experiment. Considering that during outbreaks poplar stems are covered with aphid colonies, the sinks that would be induced could significantly affect nitrogen and carbon allocations within trees. This could explain the delay in bud breaking and the

growth reduction observed on surviving infested trees the year following outbreaks. If the induced sinks are strong enough, they might also challenge tree survival. According to the Nutrition Hypothesis (Price et al. 1987), by mobilizing nutrient, galled plant tissues have a better nutritional value for insects than unaffected ones. The hypothesis of a pseudogall induction by *P. passerinii* could then be supported by transplant experiments of aphids, as long as they would exhibit better physiological performances on pre-infested tissues compared to normal ones. Likewise, analyses of soluble sugars or amino acid contents would also support this hypothesis if the modified tissues showed accumulations of nutrients, thus confirming that aphid colonies can affect plant allocations of carbon and nitrogen.

Acknowledgments This work was supported by a grant from the French Ministry of Agriculture, Food Processing and Forest. The PhD thesis of F. Dardeau is granted by the French Ministry of Higher Education and Research. We thank Cécile Montécot-Dubourg and Stéphane Mortau for their technical assistance with autofluorescence, and Sophie Pointeau for her earlier comments on the manuscript.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Amman GD, Speers CF (1965) Balsam woolly aphid in the Southern Appalachians. *J For* 63:18–20
- Arru GM (1974) Metodo per valutare la resistenza dei pioppi all' Afide lanigero (*Phloeomyzus passerinii* Sign). *Cellulosa e Carta* 25:45–49
- Arzone A, Vidano C (1984) Indagini su *Phloeomyzus passerinii* (Sign.) in Piemonte. *Ann Fac Sci Agrari Univ Stud Torino* 13:337–356
- Balch RE, Clark J, Bonga JM (1964) Hormonal action in production of tumours and compression wood by an aphid. *Nature* 22:721–722
- Baubet O, Carouille F (2009) Bilan de la Santé des Forêts en 2008. Peupleraie française: entre rouille et puceron lanigère, l'inquiétude demeure. Min. Agr. Pêche, Paris
- Biggs AR (1984) Intracellular suberin occurrence and detection in tree bark. *IAWA Bull* 5:243–248
- Biggs AR (1992) Anatomical and physiological responses of bark tissues to mechanical injuries. In: Blanchette RA, Biggs AR (eds) *Defense mechanisms of woody plants against fungi*. Springer-Verlag, Berlin, pp 13–40
- Biggs AR, Merrill W, Davis DD (1984) Discussion: response of bark tissues to injury and infection. *Can J For Res* 14:351–356
- Blackman RL, Eastop VF (1994) *The Aphids*. In: Blackman RL, Eastop VF (eds) *Aphids on the world's trees: an identification and information guide*. CAB International in association with the Natural History Museum, London, pp 95–108
- Bostock RM, Stermer BA (1989) Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. *Ann Rev Phytopathol* 27:343–371
- Bronner R (1992) The role of nutritive cells in the nutrition of Cynipids and Cecidomyiids. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (eds) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, pp 102–117

- Brown MW, Glenn DM, Wisniewski ME (1991) Functional and anatomical disruption of apple roots by the woolly apple aphid (Homoptera: Aphididae). *J Econ Entomol* 84:1823–1826
- Collins CM, Rosado RG, Leather SR (2001) The impact of aphids *Tuberolachnus salignus* and *Pterocomma salicis* on willow trees. *Ann Appl Biol* 138:133–140
- Deysson G (1954) *Eléments d'anatomie des plantes vasculaires*. Sedes, Paris, p 266
- Divol F, Vilaine F, Thibivilliers S, Kusiak C, Sauge MH, Dinant S (2007) Involvement of the xyloglucan endotransglycosylase/hydrolases encoded by celery XTH1 and *Arabidopsis* XTH33 in the phloem response to aphids. *Plant Cell Environ* 30:187–201
- Dixon AFG (1971) The role of aphids in wood formation. I. The effect of the Sycamore aphid, *Drepanosiphum platanoides* (Schr.) (Aphididae), *Acer pseudoplatanus* (L.). *J Appl Ecol* 8:165–179
- Eyles A, Bonello P, Ganley R, Mohammed C (2010) Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytol* 185:893–908
- Fernandes GW, Negreiros D (2001) The occurrence and effectiveness of hypersusceptible reaction against galling herbivores across host taxa. *Ecol Entomol* 26:46–55
- Forneck A, Kleinmann S, Blaich R, Anvari SF (2002) Histochemistry and anatomy of phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) nodosities on young roots of grapevine (*Vitis* spp.). *Vitis* 41:93–97
- Höglund S, Larsson S, Wingsle G (2005) Both hypersusceptible and non-hypersusceptible responses are associated with resistance in *Salix viminalis* against the gall midge *Dasineura marginemtorquens*. *J Exp Bot* 56:3215–3222
- Hollingsworth RG, Hain FP (1991) Balsam woolly adelgid (Homoptera: Adelgidae) and spruce-fir decline in the southern Appalachians: assessing pest relevance in a damaged ecosystem. *Fla Entomol* 74:179–187
- Lieutier F, Berryman AA (1988) Preliminary histological investigations on the defense reactions of three pines to *Ceratocystis clavigera* and two chemical elicitors. *Can J For Res* 18:1243–1247
- Miles PW (1989) Specific responses and damage caused by Aphidoidea. In: Minks AK, Harrewijn P (eds) *Aphids: their Biology, Natural Enemies and Control*, vol 2C. Elsevier, Amsterdam, pp 23–47
- Mullick DB (1977) The non-specific nature of defense in bark and wood during wounding, insect and pathogen attack. *Rec Adv Phytochem* 11:395–441
- Nyman T, Julkunen-Tiitto R (2000) Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13184–13187
- Orondo SBO, Day RK (1994) Cypress aphid (*Cinara cupressi*) damage to a cypress (*Cupressus lusitanica*) stand in Kenya. *Int J Pest Manag* 40:140–144
- Pepin R, Boumendil J (1982) Préservation de l'ultrastructure du sclérote de *Sclerotinia tuberosa* (Champignon Discomycète); un modèle pour la préparation des échantillons imperméables et hétérogènes. *Cytology* 47:359–377
- Philippe RN, Bohlmann J (2007) Poplar defence against insects herbivores. *Can J Bot* 85:1111–1126
- Pointeau S, Sallé A, Lesieur V, Bankhead-Dronnet S, Bonnaffoux M, Lieutier F (2011) Estimating the effect of poplar resistance on the performance of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii*, in various experimental conditions. *Can J For Res* 41:1233–1241
- Pointeau S, Ameline A, Laurans F, Sallé A, Rahbé Y, Bankhead-Dronnet S, Lieutier F (2012) Exceptional plant penetration and feeding upon cortical parenchyma cells by the woolly poplar aphid. *J Insect Physiol* 58:857–866
- Pointeau S, Ameline A, Sallé A, Bankhead-Dronnet S, Lieutier F (2013) Characterization of antibiosis and antixenosis to the woolly poplar aphid (Homoptera: Aphididae) in the bark of different poplar genotypes. *J Econ Entomol* 106:473–481
- Pollard DC (1973) Plant penetration by feeding aphids (Homoptera, Aphidoidea): a review. *Bull Entomol Res* 62:631–714
- Price PW, Fernandes GW, Waring GL (1987) The adaptive nature of insect galls. *Environ Entomol* 16:15–24
- Raman A, Beiderbeck R, Herth W (2009) Early subcellular responses of susceptible and resistant *Vitis* taxa to feeding by grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae*. *Bot Helv* 119:31–39
- Rangasamy M, Rathinasabapathi B, McAuslane HJ, Cherry RH, Nagata RT (2009) Role of leaf sheath lignification and anatomy in resistance against southern chinch bug (Homoptera: Blissidae) in St. Augustinegrass. *J Econ Entomol* 102:432–439
- Rey LA (1992) Developmental morphology of two types of Hymenopterous galls. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (eds) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, pp 87–101
- Rohfritsch O (1992) Patterns in gall development. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (eds) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, pp 60–86
- Rohfritsch O, Anthony M (1992) Strategies in gall induction by two groups of Homoptera. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (eds) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, pp 102–117
- Sadeghi SE, Rajabi-Mazhar NA, Moharramipour S (2007) A study on the incidence of woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Hom.: Aphididae) on poplar species and clones in Hamedan province. *Iran J Entomol Soc* 26:47–59
- Saltzman KD, Giovanini MP, Zheng C, Williams CE (2008) Virulent Hessian fly larvae manipulate the free amino acid content of host wheat plants. *J Chem Ecol* 34:1401–1410
- Sauge MH, Kervella J, Pascal T (1998) Settling behaviour and reproductive potential of the green peach aphid *Myzus persicae* on peach varieties and a related wild *Prunus*. *Entomol Exp Appl* 89:233–242
- Shannon RE, Brewer JW (1980) Starch and sugar levels in three coniferous insect galls. *Z Angew Entomol* 89:526–533
- Straw NA, Fielding N, Green G, Price J, Williams D (2011) Defoliation and growth relationships for mid-rotation Sitka spruce attacked by the green spruce aphid, *Elatobium abietinum* (Walker) (Homoptera: Aphididae). *For Ecol Manag* 262:1223–1235
- Suzuki D, Fukushi Y, Ashimoto SI (2009) Do aphid galls provide good nutrients for the aphids? Comparisons of amino acid concentrations in galls among *Tetraneura* species (Aphididae: Eriosomatinae). *Arthropod Plant Interact* 3:241–247
- Tjallingii WF, HogenEsch TH (1993) Fine structure of aphid stylet routes in plant tissue in correlation with EPG signals. *Physiol Entomol* 18:317–328
- van Emden HF (2007) Host-plant resistance. In: van Emden HF, Harrington R (eds) *Aphids as crop pests*. CAB International, Wallingford, pp 447–462
- Wagner MR, Clancy KM, Lieutier F (2002) *Mechanisms and deployment of resistance in trees to insects*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Weiland JE, Stanosz GR (2007) The histology of hybrid poplar clones inoculated with *Septoria musiva*. *Plant Dis* 91:1524–1530
- Wood BW, Tedders WL, Dutcher JD (1987) Energy drain of three pecan aphid species (Homoptera: Aphididae) and their influence on in-shell pecan production. *Environ Entomol* 16:1045–1056

CHAPITRE 2 : Impacts des réactions corticales sur les performances de *Phloeomyzus passerinii*

Objectifs :

- Effets de la formation d'une pseudogalle sur le développement de *Phloeomyzus passerinii*
- Conséquences de la formation d'une pseudogalle sur le comportement de nutrition de l'insecte
- Comparaison des performances et du comportement de l'insecte sur deux génotypes de peuplier de sensibilités différentes, modifiés ou non par les pucerons.

Article 2 :

Host manipulation by a herbivore optimizes its feeding behaviour

F. Dardeau, S. Pointeau, A. Améline, F. Laurans, A. Cherqui,
F. Lieutier, A. Sallé

Animal Behaviour (2014), 95 : 49-56

PRESENTATION DE L'ARTICLE 2

I. Contexte

D'après l'hypothèse de nutrition, la différenciation de galles par les galligènes permettrait l'ajustement de la valeur nutritive de l'hôte aux besoins de l'herbivore, améliorant ainsi sa valeur sélective (Price et al. 1987; Hartley & Lawton 1992). Le transfert d'individus sur des tissus modifiés permet de tester si leurs performances démographiques sont en effet améliorées par la manipulation de l'hôte (Llewellyn & Hargreaves 1986; Koyama et al. 2004; Diamond et al. 2008; Matsukura et al. 2012). Si quelques travaux ont montré des modifications du comportement liées à des infestations successives par des insectes herbivores (Prado & Tjallingii 1997; Gonzáles et al. 2002; Sauge et al. 2006; Dugravot et al. 2007), cela n'a jamais pu être mis en évidence pour des insectes manipulateurs, à cause de leur habitat souvent fermé. Or, on pourrait s'attendre à ce que les modifications physico-chimiques qu'ils induisent favorisent par exemple leur prise alimentaire ou leur vitesse d'acceptation de l'hôte.

Le puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii*, est capable de générer une pseudogalle dans les tissus corticaux de son hôte (Dardeau et al. 2014a, cf. Chap. 1). Cette dernière présente des caractéristiques anatomiques et biochimiques suggérant une amélioration nutritionnelle des tissus pour l'insecte. On sait également que des génotypes de peuplier résistants affectent au moins partiellement le développement de cette galle, notamment par des processus de lignification rapide des tissus attaqués.

Cet insecte restant à l'extérieur des tissus végétaux qu'il modifie, il offre la possibilité de réaliser des expériences de transfert d'individus sur des pseudogalles afin d'étudier l'impact de ces modifications tissulaires sur ses performances démographiques et comportementales. Notre étude a donc consisté à pré-infester des peupliers avec *P. passerinii* pour ensuite comparer les performances de nouveaux individus sur des pseudogalles normales (génotype sensible I-214), en comparaison de tissus sains non attaqués au préalable. La modulation des performances et du comportement du puceron sur des pseudogalles perturbées (génotype moyennement résistant I-45/51) a aussi été testée.

II. Protocole général

- **Peupliers et conditions expérimentales** : Les expériences ont été réalisées sur des boutures en pot d'hybrides de peupliers euraméricains (*Populus x canadensis* Moench), présentant de niveaux de sensibilité à *P. passerinii*. Le génotype I-214 est considéré comme très sensible et le génotype I-45/51 est de résistance intermédiaire car il permet

l'installation du puceron mais affecte ensuite le développement des colonies (Pointeau et al. 2011; 2013).

- **Pucerons et préinfestations :** Les pucerons utilisés étaient issus d'une même lignée isofemelle. La moitié des boutures de peuplier utilisées, pour chaque génotype, a été infestée avec des femelles parthénogénétiques afin d'obtenir une grande surface d'écorce modifiée en pseudogalle (Fig. 2.1). L'autre moitié des boutures a été conservée sans puceron en tant que témoins sains. Cette opération a été renouvelée deux fois afin de réaliser les mesures de performances démographiques des pucerons sur un premier lot de boutures (expérience 1) et les observations comportementales sur le second lot de boutures (expérience 2).

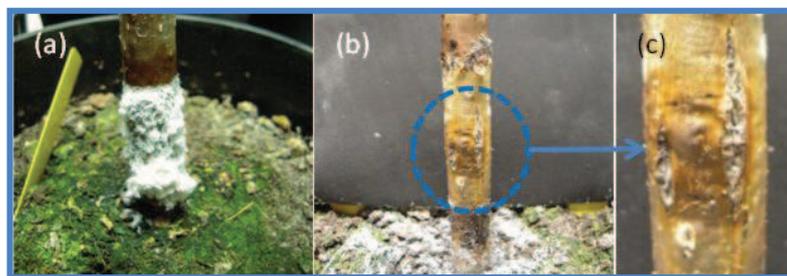


Figure 2.9 : Préinfestations de boutures de peuplier par *Phloeomyzus passerinii*. (a) Colonie de puceron après 5 semaines de développement. (b) Aspect gonflé de l'écorce après retrait des pucerons et de leur cire. (c) Agrandissement de l'aspect gonflé de l'écorce après formation de pseudogalles.

- **Modifications corticales induites chez le peuplier :** lors de la première expérience, les modifications anatomiques et la lignification des parois cellulaires ont été étudiées sur les boutures préinfestées et témoins. Des portions de tige ont été prélevées afin de réaliser des coupes transversales fraîches (40 μ m) au niveau des tissus modifiés par le puceron ou à mi hauteur des boutures pour les témoins. Ces coupes ont été colorées au Carmino-vert afin de visualiser les parois cellulaires cellulosiques en rose et les parois lignifiées en bleu-vert.
- **Performances démographiques du puceron :** lors de l'expérience 1, le développement de larves issues de femelles parthénogénétique a été suivi. La période pré-reproductive, le nombre de larves produites par femelle ont été estimés et le taux d'accroissement naturel intrinsèque (r_m) et la durée de doublement et la survie larvaire ont été calculés
- **Comportement du puceron :** pour l'expérience 2, le comportement d'alimentation de *P. passerinii* a été enregistré par la technique d'électropénétrographie (EPG) (Fig. 2.2). Cette technique permet d'étudier le comportement d'exploration et alimentation d'un insecte piqueur-suceur dans les tissus de sa plante hôte. En intégrant les deux partenaires dans un circuit électrique, les variations de tension enregistrées peuvent être

associées à la localisation de la pointe des stylets de l'insecte et à son activité en temps réel (Giordanengo 2014; Tjallingii 1978). La séquence d'alimentation de *P. passerinii* a déjà été décrite sur des tissus non modifiés de génotype de peuplier sensible, très résistant et intermédiaire (Pointeau et al. 2012; 2013). Sur génotype sensible, la phase d'exploration consiste en une traversée rapide du suber (phase A), puis une alternance de passages inter- (phase C) et intracellulaire (phase b-lcp) lors de la progression des stylets dans le parenchyme cortical jusqu'au site de nutrition. La phase d'alimentation correspond à une ingestion soutenue du contenu des cellules parenchymateuses (phase s-lcp) et marque l'acceptation de l'hôte.

Nous avons réalisé des enregistrements de 12 h, en plaçant les pucerons (femelles parthénogénétiques aptères) sur des tissus modifiés ou témoins. Les enregistrements ont ensuite été analysés afin de distinguer chaque phase et calculer différents paramètres d'intérêt (Tableau 2.1). La distinction sur les électropénéetrogrammes entre les différentes phases était basée sur la description de la séquence d'alimentation de *P. passerinii* faite par Pointeau et al. (2012).

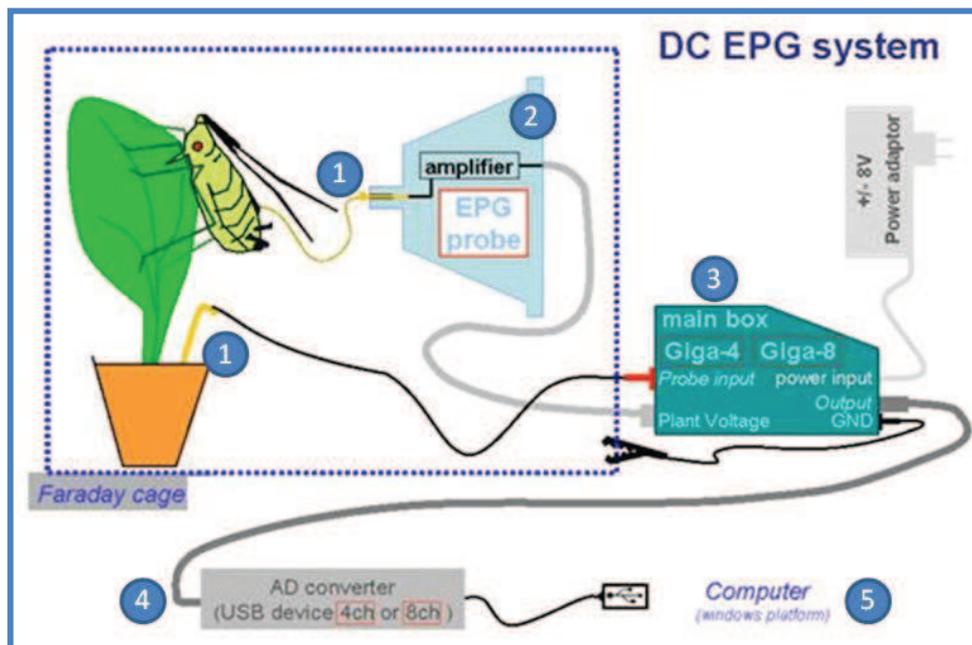


Figure 10.2: Schéma du système de « Direct Current Electrical Penetration Graph » ou système d'électropénéetrographie en temps réel. Ce système contient (1) deux électrodes dont une reliée à l'insecte par un fil d'or et l'autre plantée dans le substrat de la plante au contact des racines, (2) un système d'amplification du signal, (3) une console permettant de réceptionner le signal et de moduler le voltage du courant électrique, (4) un convertisseur du signal reçu sous une forme digitale, (5) un ordinateur équipé d'un logiciel d'acquisition des données. (d'après www.epgsystems.eu)

Tableau 2.1 : Paramètres EPG utilisés dans l'étude du comportement d'exploration et d'alimentation de *Phloeomyzus passerinii* sur écorce de peuplier. D'après Pointeau et al (2012, 2013).

Comportement général de pénétration des stylets	Phase de traversée de cellule du parenchyme (b-lcp)
Nombre de piqûres	Nombre de b-lcp
Durée moyenne des piqûres (min)	Durée cumulée de b-lcp (min)
Durée cumulée des piqûres (min)	Phase d'ingestion soutenue (s-lcp)
Délai avant la première piqûre (min)	Délai avant la première s-lcp (min)
Phase suber (A)	Nombre de s-lcp
Nombre de A	Durée moyenne des s-lcp (min)
Durée moyenne des A (min)	Durée cumulée des s-lcp (min)
Durée cumulée des A (min)	Nombre de piqûres avant la première s-lcp
Phase extracellulaire du parenchyme (C)	Proportion du temps de piqûre passé en s-lcp (%)
Nombre de C	Proportion de pucerons initiant une s-lcp (%)
Durée cumulée des C (min)	

III. Principaux résultats

- Réactions corticales du peuplier :** Le développement des colonies de *P. passerinii* a induit des modifications des tissus corticaux du même ordre que celles décrites dans le chapitre 1 (Dardeau et al. 2014a, cf. Chap. 1). Alors que rien ne différencie les deux génotypes de peuplier sur les plants témoins, les pucerons provoquent des réponses différentes. Une hyperplasie des cellules du parenchyme cortical est visible dans les deux cas, mais la lignification des parois cellulaires de ce tissu modifié est beaucoup plus étendue et profonde chez le génotype moyennement résistant I-45/51 que chez le génotype sensible I-214.
- Effets de la préinfestation sur la démographie de *P. passerinii* :** La préinfestation a significativement diminué la période pré-reproductive sur le génotype sensible I-214. Cette diminution était suffisamment forte pour significativement augmenter le r_m et diminuer le temps de doublement sans que la fécondité n'ait été affectée. Si une tendance légère dans le même sens a été observée sur le génotype moyennement résistant I-45/51, l'impact de la préinfestation n'était significatif pour aucun des paramètres considérés.
- Effets de la préinfestation sur le comportement de *P. passerinii* :** la préinfestation a affecté le comportement de nutrition du puceron et plusieurs paramètres ont été affectés différemment selon le génotype. La préinfestation a diminué de moitié le délai avant la première piqûre et a diminué la durée de la phase suber (A) pour les deux génotypes. La préinfestation a énormément augmenté la durée des piqûres pour les deux génotypes, en particulier la durée de la phase d'ingestion soutenue (s-lcp). Le nombre moyen d'ingestions soutenues (s-lcp) n'a pas été modifié par la préinfestation sur I-214. En revanche, il a augmenté sur I-45/51 préinfesté. Sur les plants témoins des

deux génotypes, les pucerons avaient tendance à réaliser plusieurs piqûres même après avoir initié une phase d'ingestion soutenue. Sur les plants préinfestés, une seule piqûre avait lieu sur I-214, et la même tendance était suivie sur I-45/51. Enfin, la proportion de pucerons réalisant une phase d'ingestion soutenue a fortement augmenté sur les boutures préinfestées des deux génotypes. Le plus fort effet de l'interaction entre préinfestation et génotype a été observé pour la durée d'exploration du parenchyme, avec une durée de la phase extracellulaire (C) doublée sur I-45/51 préinfesté par rapport aux témoins, alors qu'elle n'a pas été modifiée sur I-214.

IV. Conclusions

L'hypothèse de nutrition est généralement appuyée par des études montrant une amélioration des performances physiologiques des herbivores s'alimentant sur tissus manipulés (Koyama et al. 2004; Diamond et al. 2008; Matsukura et al. 2012) ou une augmentation des concentrations en nutriments et/ou une diminution des composés de défense dans ces tissus (Nyman & Julkunen-Tiitto 2000; Sandström et al. 2000; Hammes et al. 2005; Matsukura et al. 2012; Body et al. 2013). En combinant des analyses de la physiologie et du comportement de *P. passerinii*, nous avons pu montrer pour la première fois que la manipulation de la plante hôte par un insecte phytophage peut avoir des implications comportementales.

L'amélioration des performances démographiques de *P. passerinii* sur boutures préinfestées par rapport aux témoins montre que la manipulation des tissus a bien amélioré leur valeur nutritive, comme cela peut s'observer chez d'autres insectes piqueurs-suceurs (Llewellyn & Hargreaves 1986; Matsukura et al. 2012; Takemoto et al. 2013). Cela confirme les travaux d'histologie précédents suggérant l'induction d'une pseudogalle dans les tissus corticaux de génotypes sensibles de peuplier. Il partage alors une stratégie commune aux Sternorrhynches de familles primitives comme les Adelgidae et les Phylloxeridae qui induisent souvent des déformations des tissus végétaux en se nourrissant de parenchyme (Blackman & Eastop 1994; Von Dohlen & Moran 2000).

La préinfestation a considérablement augmenté la durée de piqûre consacrée à la phase d'ingestion soutenue, considérée comme la phase de nutrition de *P. passerinii* (Pointeau et al. 2012). La préinfestation a donc amélioré l'acceptation de l'hôte par *P. passerinii*, d'autant plus que le délai avant la première piqûre a aussi été diminué. Ces modifications comportementales pourraient s'expliquer par une modification des stimuli à la surface de la plante, et/ou par les modifications anatomiques et biochimiques des tissus corticaux. Les pucerons orientent leurs stylets dans les tissus de leur hôte grâce aux composés pariétaux et cytosoliques des cellules végétales détectés pendant leur exploration (Tjallingii & Hogen Esch 1993; Powell et al. 2006; Pettersson et al. 2007). Le comportement des pucerons que nous avons installés sur tissus préinfestés est donc conditionné par les modifications cellulaires induites par leurs prédécesseurs. Ces tissus modifiés ont augmenté

l'acceptation de l'hôte par *P. passerinii*, en particulier sur génotype sensible, à en juger par l'augmentation de la fréquence et de la durée des phases d'ingestion soutenue. Les pucerons ont certainement perçu une amélioration de la qualité du substrat (au niveau des nutriments et/ou des composés de défense) et ainsi changé leur comportement en conséquence. Si certains pucerons phloémophages montrent ce genre de comportement après une courte préinfestation (González et al. 2002; Sauge et al. 2006), cela n'avait jamais été observé pour un insecte cécidogène ou une préinfestation longue.

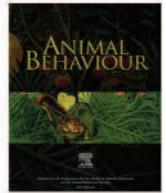
Sur le génotype moyennement résistant, malgré les modifications cellulaires observées, les performances démographiques du puceron n'ont pas été modifiées. Cependant, l'acceptation de l'hôte a été améliorée par la préinfestation en dépit de la résistance, comme en témoigne l'augmentation de fréquence et de durée des phases d'ingestion soutenue. La pseudogalle affectée par la résistance a donc amélioré l'acceptation de l'hôte sans pour autant que le substrat végétal n'ait été amélioré dans sa qualité nutritive, ou du moins suffisamment pour en constater les effets positifs sur la physiologie de l'insecte. La phase d'exploration du parenchyme (extra et intracellulaire) a duré plus longtemps sur génotype moyennement résistant, suggérant un ralentissement des stylets dans leur progression. Cela pourrait être dû à certains composés structuraux des parois cellulaires, les insectes avec des pièces buccales de type piqueur évitant souvent les parois épaisses (Staniland 1924; Rangasamy et al. 2009). Dans le cas du génotype I-45/51, la lignification très étendue dans la pseudogalle pourrait avoir contribué à cet entravement mécanique des stylets de *P. passerinii*.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Animal Behaviour

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anbehav

Host manipulation by a herbivore optimizes its feeding behaviour



France Dardeau^a, Sophie Pointeau^b, Arnaud Ameline^b, Françoise Laurans^c,
Anas Cherqui^b, François Lieutier^a, Aurélien Sallé^{a,*}

^a UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, Orléans, France

^b Unité de Recherche FRE 3498 CNRS, EDYSAN, Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés, Laboratoire de Bio-Ecologie des Insectes Phytophages et Entomophages, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

^c INRA, UR0588 Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Orléans, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2014
Initial acceptance 3 April 2014
Final acceptance 4 June 2014
Available online 25 July 2014
MS. number: 14-00125R

Keywords:

DC-EPG
host acceptance
host manipulation
host resistance
lignification
Phloeomyzus passerinii
Populus
pseudogall

Plant-manipulating herbivores can modify their host nutrients and defensive compounds to their own advantage. This generally results in enhanced performance of herbivores on modified tissues, but the anatomical and biochemical modifications undergone by host tissues could also modify the herbivores' behaviour. *Phloeomyzus passerinii* induces a reaction tissue in the bark of its susceptible poplar hosts, suggesting a host–plant manipulation by the aphid. We investigated whether the formation of this reaction tissue, confirmed by histological sections, affected the performance and feeding behaviour of the aphid. In addition we studied how host resistance affected these parameters by comparing two host genotypes of different susceptibility. Aphids developed faster on the preinfested susceptible host genotype, whereas no effect was detected on the resistant one, confirming an improvement in the host's nutritional value due to the preinfestation, in agreement with the nutrition hypothesis. The DC-EPG technique indicated that in both host genotypes, preinfestation shortened the delay until the first probe and increased both the rate and duration of sustained ingestion, and consequently host acceptance. This suggests that host manipulation can adjust not only the nutritional value of plant tissues at an optimal level for development but also host acceptance by the herbivores. In the resistant host genotype though, the number of probes and the duration of parenchyma exploration increased in the galled tissue, which was congruent with extensive cell wall modifications indicated by more extended induced lignification. The adaptive consequences of this modified feeding behaviour are discussed.

© 2014 The Association for the Study of Animal Behaviour. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

The mismatch in nutrient contents between plant and animal tissues is one of the major hurdles preventing animals from efficiently exploiting plant resources (Schoonhoven, Van Loon, & Dicke, 2005). To cope with this nutritional imbalance, herbivores have developed diverse behavioural, anatomical and physiological adaptations. For instance, nutrient requirements can be fulfilled by compensatory feeding, i.e. eating more when nutrient concentrations are low, or dietary mixing, i.e. feeding upon complementary food sources (Bernays, 1998; Cook, Bailey, McCrohan, Nash, & Woodhouse, 2000; Fink & Von Elert, 2006; Simpson, Sibly, Lee, Behmer, & Raubenheimer, 2004). Modified digestive tracts or metabolism can also enhance nutrient assimilation, and symbioses with microorganisms allow the synthesis of missing essential nutrients that cannot be synthesized by herbivores (Bernays, 1998;

Douglas, 2013). However, some herbivores have developed an alternative, but nonexclusive, strategy consisting of a remodelling of both physical and biochemical components of plant tissues, leading to an improved nutritional value. Such host manipulations are encountered, for instance, in some leaf-mining insects (Body, Kaiser, Dubreuil, Casas, & Giron, 2013), sap-feeders (Sandström, Telang, & Moran, 2000) and gall-inducing animals, including insects, mites and nematodes (Abad, Favery, Rosso, & Castagnone-Sereno, 2003; Price, Fernandes, & Waring, 1987). These herbivores can turn the feeding sites in their host plant into mobilizing sinks that may accumulate nutrients such as amino acids (Body et al., 2013; Hammes et al., 2005; Koyama, Yao, & Akimoto, 2004; Matsukura, Matsumura, & Tokuda, 2012; Saltzmann, Giovanini, Zheng, & Williams, 2008; Sandström et al., 2000; Suzuki, Fukushi, & Akimoto, 2009), sugars or starch (Matsukura et al., 2012; Shannon & Brewer, 1980) and chemical elements (Brewer, Bishop, & Skuhravý, 1987), while the concentrations of defensive compounds can decrease (Nyman & Julkunen-Tiitto, 2000).

The nutrition hypothesis states that host manipulation adjusts the nutritional value of plant tissues to an optimal level for the

* Correspondence: A. Sallé, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, Rue de Chartres, BP 6759, FR-45067 Orléans Cedex, France.

E-mail address: aurelien.salle@univ-orleans.fr (A. Sallé).

fitness of gall-inducers, which is probably also true for plant-manipulating herbivores in general (Hartley & Lawton, 1992; Price et al., 1987). This is supported by transplant experiments in which gall-inducing insects, and insects from other feeding guilds, exhibited faster larval growth (Diamond, Blair, & Abrahamson, 2008; Forrest, 1971; Koyama et al., 2004; Matsukura et al., 2012) and/or higher fecundity (Llewellyn & Hargreaves, 1986; Koyama et al., 2004) on galled than control tissues.

Besides physiological benefits, host manipulation may also affect different aspects of the feeding behaviour of the herbivores or their offspring. Since plant nutrients and secondary metabolites play a prominent role in host selection by herbivores (Schoonhoven et al., 2005), an improvement in the feeding substrate could enhance and quicken host acceptance. In addition, the anatomical and physiological changes that can occur in plant tissues during host manipulation (including gall differentiation), such as cell hypertrophy (increase in size), tissue hyperplasia (increase in cell multiplication) and cell wall modifications, may also change the probing behaviour, host acceptance and tissue consumption by the herbivores. For instance, short-duration preinfestations (i.e. previous probing and feeding) with nonmanipulating insect herbivores can modulate their feeding behaviour, by triggering induced resistance or susceptibility in their host plant (Dugravot et al., 2007; Gonzáles, Ramirez, Olea, & Niemeyer, 2002; Prado & Tjallingii, 1997; Sauge, Lacroze, Poëssel, Pascal, & Kervella, 2006). However, the effect of host manipulation on the way plant-manipulating herbivores in general feed upon their host has never been explored. Testing this hypothesis would require a model for which feeding behaviour is well known. Moreover, to allow easy comparisons between modified and control plant tissues, the model should preferentially initiate a reaction tissue that does not enclose it.

The woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Aphididae: Phloeomyzinae), lives in bark crevices of poplar trunks (Blackman & Eastop, 1994). Detailed histological and behavioural investigations have demonstrated that it feeds upon the shallow tissues of the cortical parenchyma (tissue located in the bark between the cork and the phloem) (Pointeau et al., 2012). Aphids use an unusual intracellular and extracellular stylet pathway which, in susceptible hosts, ends with sustained intracellular ingestion in parenchyma cells (Pointeau et al., 2012). For several weeks after probing, while the aphids are settled on the bark and reproducing, the parenchyma undergoes anatomical and biochemical modifications resulting in a conspicuous bark swelling on stem cuttings (Dardeau et al., 2014). The modified parenchyma is characterized by thin-walled, hypertrophied cells, deprived of vacuolar phenolic compounds, and it has been hypothesized that *P. passerinii* induces a pseudogall (i.e. a simple gall inducing misshaping of a tissue) within the cortical tissues of its host (Dardeau et al., 2014). The aphid induces similar reaction tissues in poplar genotypes that are either susceptible or partially resistant, that is, in which resistance affects both the development and the feeding behaviour of *P. passerinii* (Pointeau et al., 2011, 2012). Yet in the resistant genotype, the reaction zone appears disorganized and cell wall lignification is diffuse and extended, whereas it is restricted to the stylet's insertion zone and to the periphery of the reaction tissue in the susceptible genotype (Dardeau et al., 2014).

In agreement with the nutrition hypothesis, if *P. passerinii* induces a pseudogall, we predicted that its development should be enhanced on the modified tissues of its host. In addition, the cellular transformations (hypertrophy, hyperplasia, cell wall modifications, etc.), along with the potential biochemical changes in cell contents, may modify the feeding behaviour of the aphid. Moreover, any factor that would modify or interfere with pseudogall

formation, such as host resistance, should also consequently affect the performance and behaviour of the aphids. To test these three predictions we compared aphids' development and stylet penetration behaviour on normal and manipulated tissues of both a susceptible and a resistant poplar genotype.

METHODS

Two experiments were carried out, in 2010 and 2011, respectively, with the same aphid clone and the same plant material. In the first experiment, aphid performance parameters were compared between preinfested and control stem cuttings. After preinfestation by aphid colonies, fresh histological sections were prepared to observe plant reaction tissues. In the second experiment, the penetration of the aphid stylet was studied on preinfested stem cuttings by using the direct current electrical penetration graph (DC-EPG) technique. This technique is commonly used to investigate the hidden probing and feeding behaviour of insects with piercing–sucking mouthparts in plant tissues, by including an insect and its host plant in an electrical circuit (Giordanengo, 2014; Tjallingii, 1978). The electrical waveforms recorded can be related to the activity and stylet tip position within plant tissues. Both susceptible and resistant genotypes were used in each of these experiments.

Aphid Clone and Plant Genotypes

A monoclonal laboratory colony of *P. passerinii* was established from a parthenogenetic apterous (wingless) female, collected in October 2008 in Rebourstin (France) on a *Populus × canadensis* Dorskamp genotype. Monoclonal colonies are routinely used for physiological and behavioural investigations with aphids since they ensure good experimental reproducibility. Comparisons of aphid performance parameters and host susceptibility between different monoclonal colonies of *P. passerinii* did not reveal marked differences. In addition, data from cytochrome oxidase I and II and cytochrome b genetic fragments analyses confirmed that the colony used for the study belonged to the most common haplotype in France (Pointeau, n.d.). The colony was maintained in the laboratory on stem cuttings (25 cm long) of the *P. × canadensis* I-214 genotype under 21 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ relative humidity and a 16:8 h light:dark photoperiod.

Stem cuttings of two *P. × canadensis* genotypes commonly planted in France, I-214 and I-45/51, were used for the experiments. Previous investigations have confirmed that I-214 is highly susceptible to *P. passerinii*, whereas I-45/51 slows nymphal development and reduces the aphid's fecundity (Pointeau et al., 2011; Pointeau, Ameline, Sallé, Bankhead-Dronnet, & Lieutier, 2013). Stem cuttings (ca. 25 cm long, 2 cm diameter) were provided by the experimental nursery of Guéméné-Penfao (France). They were collected in the autumn of 2010 and 2011 for the two experiments, respectively, and kept at 2 °C in dry conditions until use. In June 2011 and June 2012, respectively, they were removed from storage, trimmed to 20 cm, and all buds except the terminal one were removed. The basal part was immersed in water for 5 days and then in liquid Exuberone for 20 min. The stem cuttings were planted in sand for 3 weeks and then transplanted into 2-litre pots containing a mix of 25% sand and 75% compost (Klasmann substrate 4 no. 267). Two weeks after planting, the rooted stem cuttings were transferred to a growth chamber with controlled environment until the end of the experiment (21 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ relative humidity, 16:8 h light:dark photoperiod and a photon flux density of $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). We used 55 stem cuttings of each host genotype for the first experiment and 50 for the second.

Experiment 1

Preinfestation

After 2 weeks of acclimation in the growth chamber, half of the stem cuttings of each host genotype were infested with three parthenogenetic females. Females were deposited on the lignified section of the stem cutting. If the females failed to install, new infestations were performed every 2 days until at least two females produced nymphs. Colonies developed over 5 weeks, which is the time required for the development of an extended reaction zone in the cortical parenchyma of the host plant (Dardeau et al., 2014). After these 5 weeks, all nymphs, adults and their wax were removed before the following experiments.

Preinfestation and host genotype effect on host tissues

After preinfestation, three infested and three control stem cuttings of each host genotype were used for histological investigations. Samples consisted of a 2 cm long cutting section taken around aphid colonies or at a similar position on the lignified part of control cuttings. Fresh histological cross sections (40 μm) were prepared from each sample with a sliding microtome (Reichert, Vienna, Austria). To visualize plant anatomy and to estimate the extent of lignification within tissues, sections were stained with Mirande's reagent. Each sample was soaked for 10 min in 2.4% (vol:vol) bleach, rinsed three times in distilled water, soaked for 3 min in 25% acetic acid and for 8 min in Mirande's reagent and finally rinsed three times in distilled water. Sections were then mounted in water to observe anatomy and lignification of bark tissues and examined under a light microscope (Leica DMR, Leica Microsystems, Vienna, Austria) equipped with a Leica DFC 320 digital camera.

Preinfestation and host genotype effects on aphid performance

Three parthenogenetic females were deposited on each cutting. For the preinfested stem cuttings, they were deposited on the swollen bark which indicates the existence of a reaction zone. For the control cuttings, aphids were placed in the middle of the lignified section. Infestations were repeated until at least three nymphs were observed on the stem cutting. Females and extra nymphs were then removed, and nymphs were monitored every 2 days until they started to reproduce. The prereproductive period (d) was estimated as the period from birth to the beginning of reproduction. Once females started to reproduce, the number of nymphs per female was checked every other day during a period equivalent to the prereproductive period (Md). The intrinsic rate of natural increase was then estimated using the formula $r_m = 0.74 (\ln Md)/d$ (Wyatt & White, 1977). The doubling time (DT) was calculated with the formula $DT = \ln 2/r_m$ (Birch, 1948). If more than one parthenogenetic female were monitored on the same stem cutting, the average prereproductive period and fecundity were used for calculations. Nymphal survival was also estimated as the ratio between the number of nymphs at the beginning of the monitoring and the number of nymphs that reached adulthood. The aphid performance parameters were monitored under controlled conditions, at $21 \pm 1^\circ\text{C}$, with $70 \pm 10\%$ relative humidity and a 16:8 h light:dark photoperiod.

Experiment 2

Preinfestation and host genotype effects on aphid behaviour

Preinfestations were performed in the same way as in experiment 1. Stylet penetration behaviour of *P. passerinii* was recorded by the DC-EPG technique on control and preinfested stem cuttings of the two poplar genotypes using the Giga-4 DC-amplifier (EPG systems, Wageningen, The Netherlands) (Tjallingii, 1978, 1988),

adjusted at ca. $70 \times$ gain. We used 3–5-day-old adult females of *P. passerinii* for the observations. The aphid was immobilized on the tip of an Eppendorf cone connected to a vacuum device. The wax wool covering the aphid's dorsum was gently removed using a thin paintbrush, and a thin gold wire (20 μm diameter and 2 cm long) connected to a copper electrode was attached to the aphid's dorsum by conductive water-based silver glue (EPG systems, Wageningen, The Netherlands). The electrode was then connected to the amplifier input of the DC-EPG system and the aphid was carefully placed in contact with the bark, on either a control or a preinfested area. Another electrode (10 cm copper wire, 2 mm diameter) was inserted into the pot containing the cutting. The whole aphid–plant system was placed inside a Faraday cage in a climate-controlled room at a temperature of $20 \pm 1^\circ\text{C}$ under electric fluorescent light. Each aphid was monitored for 12 h and 15–25 individuals were tested on control and preinfested stem cuttings of each poplar genotype.

Acquisition and analysis were performed using the Stylet+ software v01.22 (EPG systems, Wageningen, The Netherlands). Recordings were scored using DC-EPG waveforms described by Pointeau et al. (2012). Waveform A corresponds to a stylet's pathway through cork tissue, C to the aphid activities in extracellular spaces of the cortical parenchyma tissue, b-Icp (brief intracellular phase, shorter than 10 min) to the stylet's pathway through cortical parenchyma cells, and s-Icp (sustained intracellular phase, longer than 10 min) to the sustained intracellular phase in cortical parenchyma cells.

DC-EPG parameters were calculated using the EPG-Calc 6.1 software (Giordanengo, 2014). Eighteen relevant parameters were retained to describe stylet penetration behaviour. They were assigned to five categories defined by Pointeau et al. (2012): (1) 'general stylet penetration behaviour' including the mean number of probes per recording, the average and total duration of probing and the time from the beginning of the recording to the first probe; (2) the 'cork phase' including the mean number of phases with A waveforms per recording, their mean and total duration; (3) the 'extracellular parenchyma phase' including the mean number of phases with C waveforms per recording and their total duration; (4) the 'crossing of parenchyma phase' including the mean number and total duration of brief intracellular phases (b-Icp); and finally (5) the 'sustained intracellular phases' including the time from the first probe to first ingestion phases (s-Icp), the mean number and the mean and total duration of s-Icp, the number of probes performed after the first s-Icp, the percentage of probing duration devoted to s-Icp and the percentage of aphids showing s-Icp phase per treatment. The relative durations of nonprobing, cork, extracellular, brief intracellular and sustained intracellular phases were also calculated.

Data Analysis

To test the effect of host genotype, host manipulation by *P. passerinii* (referred to above as preinfestation) and their interaction on aphid performance and DC-EPG parameters, we performed two-tailed factorial analyses of variance (ANOVA). Prior to performing the ANOVAs, we checked the data normality with a Shapiro–Wilk's test and homoscedasticity with a Levene's test. When significant differences were detected, multiple mean comparisons were performed with a pairwise Student's t test, with a Holm correction for multiple comparisons. The percentage of aphids that performed a sustained ingestion phase was compared between modalities with pairwise Fisher exact tests. Comparisons of the relative durations of nonprobing, cork, extracellular, brief intracellular and sustained intracellular phases on the two host genotypes, preinfested or not, were performed with pairwise

Wilcoxon rank sum tests, with a Holm correction for multiple comparisons. All tests were performed using R 2.8.0 (R Development Core Team, 2013). Significance levels were set at $\alpha = 0.05$.

RESULTS

Preinfestation Effects on Host Tissues

Anatomical features were identical in the control stem cuttings of both host genotypes. Infestation by a colony of *P. passerinii* induced a reaction tissue in both host genotypes, but with a distinct pattern for each one (Fig. 1). Cell hyperplasia in the cortical parenchyma was clearly visible in both host genotypes. However, lignification was restricted and superficial in I-214, leaving large parts of the reaction tissue unaffected, whereas it was more extended and deeper and occurred on greater portions of the induced tissue in I-45/51.

Preinfestation and Host Genotype Effects on Aphid Performance

Preinfestation significantly shortened the prereproductive period but only on I-214 (Table 1). No effect was detected on fecundity, but the shortening of the prereproductive period was sufficient to increase r_m and decrease the doubling time significantly. For all considered parameters, there was no significant interaction between host genotype and preinfestation, yet pairwise comparisons indicated that preinfestation effects were significant only on I-214. Host genotype affected different development

parameters (Table 1). The most dramatic effect was observed on fecundity as aphids produced almost twice as many nymphs on I-214 than on I-45/51. As a result, on I-45/51 r_m was significantly lower and the doubling time was significantly higher than on I-214. This host genotype also negatively affected nymphs' survival, but only on control stem cuttings.

Preinfestation and Host Genotype Effects on Aphid Behaviour

Preinfestation and host genotype affected the behaviour of *P. passerinii*, and for several parameters, preinfestation acted differently depending on host genotype (Table 2). Host genotype affected mostly probing duration as probes were shorter in I-45/51. In addition, host acceptance was affected since, in controls, 16 of 24 aphids started a sustained ingestion phase in I-214 whereas only five of 25 did so in I-45/51.

Preinfestation affected various phases of the aphids' feeding behaviour on both I-214 and I-45/51. It dramatically lengthened the average and total duration of probing. This was achieved mostly through changes in the average and total duration of the sustained intracellular phase, for which a threefold and a fourfold increase were observed on I-214 and I-45/51, respectively. As a result, the probing time dedicated to this phase increased significantly in both host genotypes after preinfestation, especially for I-214 in which it represented most of both the probing and the recording duration (Table 2, Fig. 2).

While preinfestation tended to decrease the number of probes in I-214, and consequently the number of cork phases, it tended to increase them in I-45/51 (Table 2). These trends were not

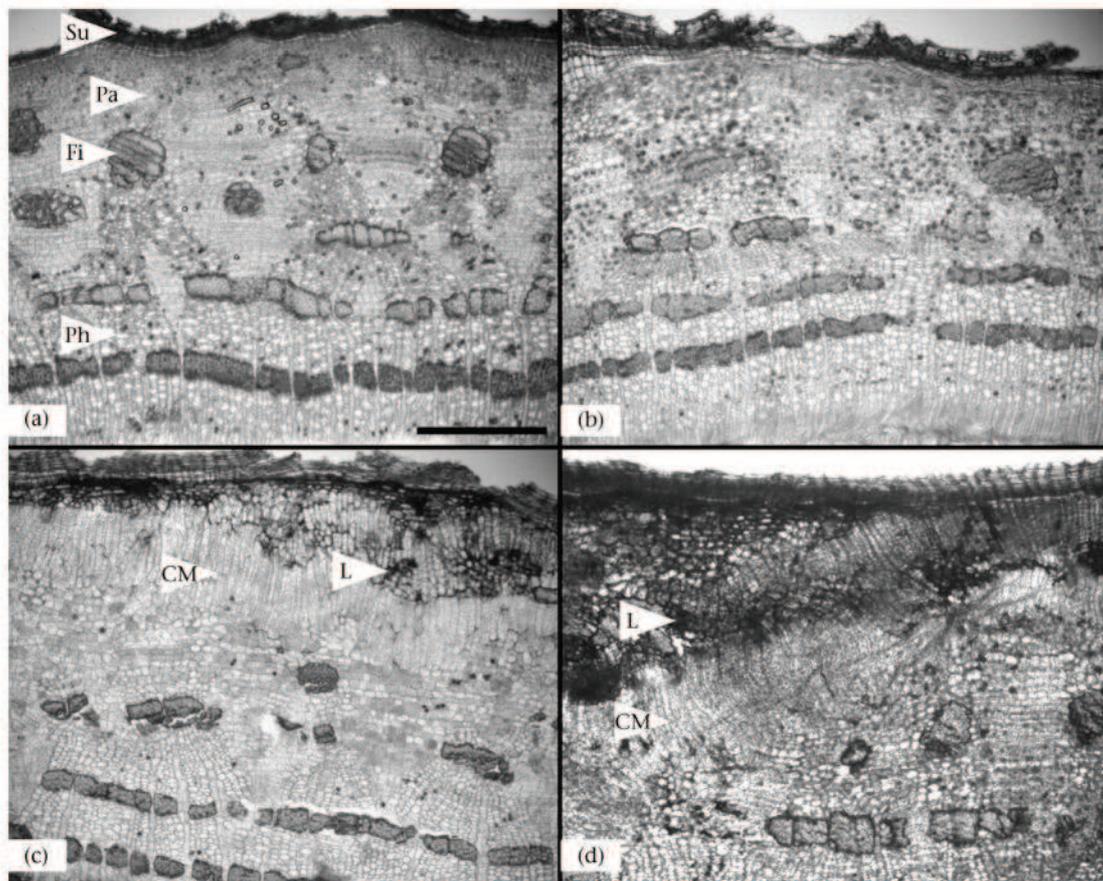


Figure 1. Fresh cross sections of bark samples from stem cuttings of two *Populus × canadensis* genotypes, I-214 and I-45/51, either unaffected or after 5 weeks of colonization by *P. passerinii*. Sections were stained with Mirande's reagent. Cell walls appear darker if lignified. (a) I-214 control, (b) I-45/51 control, (c) I-214 infested, (d) I-45/51 infested. Black bar represents 0.5 mm. The suber (cork) (Su), cortical parenchyma (Pa), sclerenchyma fibres (Fi), phloem (Ph), cell multiplication area (CM) and lignified area (L) are shown.

Table 1

Biological and demographic parameters (mean \pm SE) of *Phloeomyzus passerinii* reared on stem cuttings of two *Populus* \times *canadensis* genotypes: I-214 and I-45/51 which were preinfested or not (controls) by the aphid

Performance parameters	I-214		I-45/51		Source of variation			
	Control	Preinfested	Control	Preinfested	Genotype		Preinfestation	
	N=24	N=21	N=21	N=18	$F_{1,93}$	P	$F_{1,93}$	P
Nymphs' survival (%)	53 \pm 8 ab	55 \pm 6 b	26 \pm 7 a	45 \pm 8 ab	6.3	0.014	NS	NS
Prereproductive period (day)	15.9 \pm 0.3 b	14.2 \pm 0.2 a	16.0 \pm 0.3 b	15.2 \pm 0.3 b	NS	NS	23.8	<0.001
Fecundity (nymphs per female)	49 \pm 3 b	53 \pm 2 b	27 \pm 2 a	30 \pm 2 a	24.4	<0.001	NS	NS
r_m (nymphs per female per day)	0.182 \pm 0.003 b	0.206 \pm 0.003 c	0.157 \pm 0.005 a	0.166 \pm 0.004 a	20.8	<0.001	11.3	0.001
Doubling time (days)	3.82 \pm 0.07 b	3.38 \pm 0.05 c	4.46 \pm 0.15 a	4.21 \pm 0.11 a	13.2	<0.001	9.9	0.002

F and P values are from a factorial analysis of variance ($\alpha = 0.05$); different letters within a line indicate significantly different groups ($\alpha = 0.05$, pairwise t tests with a Holm correction for multiple comparisons). The prereproductive period is the period from birth to the production of the first offspring. Fecundity was recorded during a period equal to the prereproductive period.

significantly different between aphids on control and preinfested tissues within a host genotype, but resulted in significant differences between aphids on the two preinfested host genotypes. Likewise, the number of extracellular phases tended to decrease in I-214 after preinfestation, whereas it increased slightly in I-45/51, yet both patterns were not significant (Table 2). However, the most obvious effect of the interactions between preinfestation and host genotype was observed for the time spent by aphids foraging in the parenchyma (Table 2, Fig. 2). The total duration of the extracellular phases doubled significantly in I-45/51 compared with controls whereas there was no significant variation in I-214. A similar significant pattern was found for the crossings of parenchyma cells.

Regarding host acceptance, in both host genotypes, preinfestation reduced by half the delay before the first probe and shortened the duration of the stylet's pathway through the cork (Table 2). Yet the time required to start sustained ingestion once probing had started was equivalent among treatments. The number of sustained ingestions was approximately one per aphid in I-214 in both preinfested and control cuttings. In I-45/51, however, although

it was low in controls, it increased to two per aphid in preinfested stem cuttings. Once sustained ingestion was initiated in preinfested I-214 stem cuttings no additional probes were performed, but some occurred in controls. A similar trend was observed in I-45/51. Finally, in both host genotypes preinfestation significantly increased the percentage of aphids that engaged in a sustained ingestion phase as every aphid did so in I-214 and 15 of 17 in I-45/51 (Table 2).

DISCUSSION

The nutrition hypothesis has been supported by several investigations showing either an improvement in herbivores' performance while feeding on manipulated plant tissue (Diamond et al., 2008; Koyama et al., 2004; Matsukura et al., 2012), or modified concentrations of nutrients or secondary metabolites in manipulated plant tissues (Body et al., 2013; Hammes et al., 2005; Matsukura et al., 2012; Nyman & Julkunen-Tiitto, 2000; Sandström et al., 2000). In our study, the combination of physiological and

Table 2

DC-EPG parameters (mean \pm SE) calculated on 12 h recordings of *Phloeomyzus passerinii* feeding on the bark of the *Populus* \times *canadensis* genotypes I-214 and I-45/51 which were preinfested or not (controls) by the aphid

EPG parameters	I-214		I-45/51		Sources of variation						
	Control	Preinfested	Control	Preinfested	df	Genotype (G)		Preinfestation (P)		G \times P	
	N=24	N=15	N=25	N=17		F	P	F	P	F	P
General stylet penetration behaviour											
Number of probes	3.2 \pm 0.6 ab	2.0 \pm 0.3 a	3.2 \pm 0.3 ab	5.5 \pm 1.5 b	1, 77	NS	NS	NS	NS	4.97	0.035
Average duration of probes (min)	111 \pm 22 a	337 \pm 47 c	37 \pm 4 a	221 \pm 54 b	1, 77	7.57	0.007	40.56	<0.001	NS	NS
Total duration of probes (min)	225 \pm 31 b	517 \pm 34 c	117 \pm 18 a	459 \pm 50 c	1, 77	6.45	0.013	92.92	<0.001	NS	NS
Time prior to the first probe (min)	253 \pm 39 b	141 \pm 23 a	242 \pm 28 b	91 \pm 15 a	1, 77	NS	NS	17.69	<0.001	NS	NS
Cork phase (A)											
Number of A	3.2 \pm 0.6 ab	2.2 \pm 0.4 a	3.2 \pm 0.3 ab	5.6 \pm 1.5 b	1, 77	NS	NS	NS	NS	4.43	0.042
Average duration of A (min)	20 \pm 2 b	13 \pm 2 a	12 \pm 1 ab	8 \pm 2 a	1, 76	16.03	<0.001	11.10	0.001	NS	NS
Total duration of A (min)	56 \pm 9 b	26 \pm 5 a	39 \pm 5 ab	33 \pm 7 ab	1, 77	NS	NS	5.75	0.019	NS	NS
Extracellular parenchyma phase (C)											
Number of C	15 \pm 2	9 \pm 2	13 \pm 2	18 \pm 2	1, 77	NS	NS	NS	NS	5.00	0.028
Total duration of C (min)	54 \pm 7 a	37 \pm 9 a	50 \pm 8 a	112 \pm 24 b	1, 76	5.02	0.041	NS	NS	9.84	0.002
Crossing of parenchyma cells (b-lcp)											
Number of b-lcp	12 \pm 2	7 \pm 2	11 \pm 2	14 \pm 4	1, 77	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Total duration of b-lcp (min)	11 \pm 2 ab	9 \pm 2 a	5 \pm 2 a	22 \pm 5 b	1, 74	NS	NS	NS	NS	6.22	0.015
Sustained intracellular phase (s-lcp)											
Time prior to the first s-lcp (min)	155 \pm 46	118 \pm 42	213 \pm 76	196 \pm 45	1, 47	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Number of s-lcp	1.0 \pm 0.2 a	1.4 \pm 0.2 ab	0.3 \pm 0.2 a	2.0 \pm 0.4 b	1, 77	NS	NS	15.78	<0.001	6.24	0.015
Average duration of s-lcp (min)	102 \pm 23 a	393 \pm 54 b	33 \pm 13 a	212 \pm 54 a	1, 47	NS	NS	25.92	<0.001	NS	NS
Total duration of s-lcp (min)	157 \pm 35 a	445 \pm 44 b	84 \pm 64 a	333 \pm 53 b	1, 47	NS	NS	30.09	<0.001	NS	NS
Number of probes after the first s-lcp	1.0 \pm 0.3 b	0.0 \pm 0.0 a	1.4 \pm 0.9 b	0.4 \pm 0.2 ab	1, 47	NS	NS	12.62	<0.001	NS	NS
Probing time spent in s-lcp (%)	46 \pm 7 a	87 \pm 3 c	24 \pm 16 a	62 \pm 7 b	1, 47	NS	NS	39.49	<0.001	NS	NS
Aphids performing s-lcp (%) ^a	67 b	100 c	20 a	88 bc							

Degrees of freedom (df), F and P values are from a factorial analysis of variance ($\alpha = 0.05$), different letters within a line indicate significantly different groups ($\alpha = 0.05$, pairwise t tests with a Holm correction for multiple comparisons).

^a Differences between groups were estimated with pairwise Fisher exact tests.

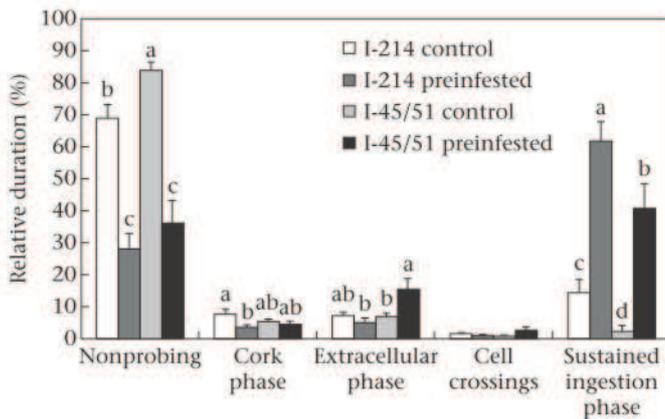


Figure 2. Average relative duration ($\% \pm \text{SE}$) of the different behavioural phases, recorded by DC-EPG, with parthenogenetic females of *P. passerinii* deposited on stem cuttings of the two *P. × canadensis*, I-214 and I-45/51, preinfested or not (controls) by the aphid. Letters indicate significant differences between modalities for the relative duration of a feeding phase, using a Wilcoxon rank sum test, with a Holm correction.

behavioural investigations allowed us to demonstrate, for the first time, that host manipulation can also have behavioural implications for plant-manipulating herbivores. Our results provide further support to the nutrition hypothesis, and extend the hypothesis to the field of behavioural ecology, by showing that host manipulation can adjust the nutritional value of plant tissues at a level that is optimal for host acceptance by the herbivores.

The induction of reactive tissues within a susceptible host enhanced *P. passerinii* nymphal development and consequently its natural rate of increase. This agrees with the nutrition hypothesis since, in the controlled conditions of the experiment, benefits for aphid development could only come from improved nutritional value of host tissues. Similar results have been reported for *Aphis pomi* and *Cicadulina bipunctata* on the galls they induce in their host plants (Llewellyn & Hargreaves, 1986; Matsukura et al., 2012). The faster nymphal development on modified host tissues also confirms the hypothesis that *P. passerinii* induces a pseudogall within the cortical parenchyma of its susceptible hosts. This aphid would then share common features with other parenchyma-feeding Sternorrhyncha, especially with primitive families such as Adelgidae and Phylloxeridae both of which frequently induce tissue deformation in the lignified tissues of their hosts (Blackman & Eastop, 1994; von Dohlen & Moran, 2000). Although previous investigations demonstrated that host manipulation could increase the gall-inducers' fecundity (Koyama et al., 2004; Llewellyn & Hargreaves, 1986), this did not occur in our study. During the 2 weeks of their nymphal development, aphids on control stem cuttings had time to trigger the induction of a pseudogall. This delay after probing is not sufficient for the differentiation of a mature pseudogall (Dardeau et al., 2014), but it might have been sufficient to increase the nutritional value of the feeding site, and consequently the fecundity of the aphids. At the same time, the nutritional value of the pseudogalls could have decreased in preinfested stem cuttings as a result of their age, as observed with *A. pomi* on apple trees (Llewellyn & Hargreaves, 1986).

In our experiment, preinfestation optimized the feeding behaviour of the aphids. The most dramatic effect in both host genotypes was a sharp increase in the rate and duration of sustained ingestion. In phloem-feeding aphids, final host acceptance is considered to occur when sustained sap ingestion starts (Powell, Tosh, & Hardie, 2006). Similarly, for *P. passerinii*, the exploration of susceptible host tissues typically ends with sustained intracellular ingestion, considered to be the nutrition phase (Pointeau et al.,

2012, 2013). Hence, preinfestation clearly improved host acceptance. The reduction in the delay prior to probing also resulted in faster host acceptance by the aphids. These behavioural modifications can have two nonexclusive origins, as results of the pseudogall formation: (1) a modification of the stimuli occurring at the plant surface and (2) an anatomical and biochemical remodelling of the cortical tissues.

The shortening of the delay prior to probing was probably caused by surface compounds since the first step in feeding site selection in aphids relies on surface stimuli, triggering probing (Pickett, Wadhams, & Woodcock, 1992; Powell et al., 2006). This reduction in nonprobing activities after preinfestation has been observed in other plant–aphid systems (González et al., 2002; Prado & Tjallingii, 1997). González et al. (2002) hypothesized that it was a consequence of an induced reduction in the amount of epicuticular waxes. These compounds were also implicated in the probing behaviour of *Chaitophorus leucomelas* on poplar hybrid leaves (Alfaro-Tapia, Verdugo, Astudilo, & Ramirez, 2007). Yet in our experiment we cannot rule out a potential effect of compounds previously deposited by conspecifics. The stimulation of aphid probing could also explain the reduction in cork phase duration after preinfestation. Detailed histological investigations did not reveal any modification in the cork structure that would favour stylet insertion (Dardeau et al., 2014). However, it has been hypothesized that the swelling of the reaction zone below the cork could facilitate the piercing of superficial cells by exerting pressure and thus weakening superficial tissues.

Regarding the tissues located beneath the cork, previous studies have shown that aphids rely on parietal and cytosolic compounds for their orientation and host acceptance (Pettersson, Tjallingii, & Hardie, 2007; Powell et al., 2006; Tjallingii & Hogen Esch, 1993). Preinfestation effects on an aphid's behaviour within its host would then be related only to the pseudogall formation. The existence of a pseudogall sharply increased host acceptance by the aphids, especially in the susceptible host genotype (i.e. I-214). In this genotype, the frequency of sustained ingestion rose to 100%, ingestion lasted for longer and was never followed by another probe. The faster nymphal development on galled tissues indicates that, in accordance with the nutrition hypothesis, the nutritional value of the host had been improved, owing to optimization of nutrient content and/or through a decrease in defensive compounds. Aphids were probably able to perceive this improvement and changed their feeding behaviour. Similar conclusions have been drawn from short-term preinfestations with phloem-feeding aphids leading to enhanced host acceptance (González et al., 2002; Saugé et al., 2006).

When host resistance interfered with the formation of the pseudogall, as in I-45/51, no benefits to the aphids' development were observed. Similarly, when host resistance impaired host manipulation by *C. bipunctata*, preinfestation did not result in enhanced development or survival (Matsukura et al., 2012; Tokuda et al., 2013). Yet, regardless of resistance, pseudogall formation also improved host acceptance by *P. passerinii* in the resistant host genotype as can be judged by the frequency and total duration of the sustained ingestion. This would imply that the pseudogall improved host acceptance by the gall-inducing insect but not, or to a limited extent, host suitability, as defined by Weis (1994). None the less, sustained ingestion occurred more frequently and was on average twice as short in galled I-45/51 than in galled I-214. Apparently, host manipulation in I-45/51 did not meet the requirements for permanent host acceptance. In addition, the longer total duration of both extracellular phases and cell crossings, suggests that the extracellular pathway and cell wall piercing was slowed down in galled I-45/51. This might result from the

deposition of structural compounds in cell walls since insects with piercing mouthparts, using an intracellular pathway, generally avoid thick-walled cells, as in sclerenchyma fibres (Rangasamy, Rathinasabapathi, McAuslane, Cherry, & Nagata, 2009; Staniland, 1924). For instance, histological sections showed that lignification was more extended in the resistant host genotype than in the susceptible one, confirming the previous observations on reactions induced by single aphids (Dardeau et al., 2014). Other structural compounds can accumulate in cell walls of plants under biotic aggression, such as callose (Benhamou, 1996) or methylated pectin in the middle lamella (Dreyer & Campbell, 1987), and may also have affected plant penetration by *P. passerinii*. Difficulties in penetrating the plant could also explain why the number of probes tended to increase in I-45/51. More frequent probes are generally related to host resistance in sap-feeders (Dugravot et al., 2007; Jiang, Nombela, & Muniz, 2001; Mesfin, Den Hollander, & Markham, 1995). This could have encouraged the aphid to leave the feeding site. However, the aphid was tethered and thus the DC-EPG technique did not allow it to explore much of the plant's surface and this might have led us to overestimate host acceptance in I-45/51.

How significant is the optimization of feeding behaviour for *P. passerinii*'s fitness? The behavioural adaptations of some herbivores to the nutritional imbalance, through compensatory feeding or dietary mixing, imply a lengthening of feeding or foraging durations, and therefore an increase in the risk of predation (e.g. Cruz-Rivera & Hay, 2000; Danner & Joern, 2003). On galled tissues, nymphal development of *P. passerinii* was almost 2 days shorter than on control tissues. The faster probing and the enhanced host acceptance of parthenogenetic females reduced the time devoted to nonprobing by almost 5 h. Extrapolation to nymphs must be made with caution but we hypothesize that host manipulation also shortened the nonprobing period, and that it slightly but significantly contributed to the shortening of nymphal development. This might also limit the dispersal of aphids on the stem, allowing nymphs to be protected by their parents' waxes (Smith, 1999). For *P. passerinii*, the optimization of its feeding behaviour may then have a complementary effect to the increase in r_m , by shortening the time spent on the host plant before reproduction starts. This suggests that host manipulation is a strategy that may benefit some herbivores by shortening their exposure to adverse biotic and abiotic factors.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the French ministry of Agriculture, Food processing and Forest (grant 2011–195). The Ph.D. thesis of F. Dardeau is funded by the French Ministry of Higher Education and Research. We are thankful for the insightful comments by the anonymous referees and Dr P. Smiseth.

References

- Abad, P., Favery, B., Rosso, M.-N., & Castagnone-Sereno, P. (2003). Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, 4, 217–224.
- Alfaro-Tapia, A., Verdugo, J. A., Astudillo, L. A., & Ramirez, C. C. (2007). Effect of epicuticular waxes of poplar hybrids on the aphid *Chaitophorus leucomelas* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Applied Entomology*, 131, 486–492.
- Benhamou, N. (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 1, 233–240.
- Bernays, E. A. (1998). Evolution of feeding behavior in insect herbivores. *BioScience*, 48, 35–44.
- Birch, L. C. (1948). The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology*, 17, 15–26.
- Blackman, R. L., & Eastop, V. F. (1994). *Aphids on the world's trees: An identification and information guide*. London, U.K.: CAB International in association with the Natural History Museum.
- Body, M., Kaiser, W., Dubreuil, G., Casas, J., & Giron, D. (2013). Leaf-miners co-opt microorganisms to enhance their nutritional environment. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 969–977.
- Brewer, J. W., Bishop, J. N., & Skuhřavý, V. (1987). Levels of foliar chemicals in insect-induced galls (Dipt., Cecidomyiidae). *Journal of Applied Entomology*, 104, 504–510.
- Cook, R. T., Bailey, S. E. R., McCrohan, C. R., Nash, B., & Woodhouse, R. M. (2000). The influence of nutritional status on the feeding behaviour of the field slug, *Deroceras reticulatum* (Müller). *Animal Behaviour*, 59, 167–176.
- Cruz-Rivera, E., & Hay, M. E. (2000). Can quantity replace quality? Food choice, compensatory feeding, and fitness of marine mesograzers. *Ecology*, 81, 201–219.
- Danner, B. J., & Joern, A. (2003). Resource-mediated impact of spider predation risk on performance in the grasshopper *Ageneotettix deorum* (Orthoptera: Acrididae). *Oecologia*, 137, 352–359.
- Dardeau, F., Deprost, E., Laurans, F., Lainé, V., Lieutier, F., & Sallé, A. (2014). Resistant poplar genotypes inhibit pseudogall formation by the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* Sign. *Trees*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00468-014-1014-1>.
- Diamond, S. E., Blair, C. P., & Abrahamson, W. G. (2008). Testing the nutrition hypothesis for the adaptive nature of insect galls: does a non-adapted herbivore perform better in galls? *Ecological Entomology*, 33, 385–393.
- von Dohlen, C. D., & Moran, N. A. (2000). Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71, 107–116.
- Douglas, A. E. (2013). Microbial brokers of insect-plant interactions revisited. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 952–961.
- Dreyer, D. L., & Campbell, B. C. (1987). Chemical basis of host-plant resistance to aphids. *Plant, Cell & Environment*, 10, 353–361.
- Dugravot, S., Brunissen, L., Létocart, E., Tjallingii, W. F., Vincent, C., Giordanengo, P., et al. (2007). Local and systemic responses induced by aphids in *Solanum tuberosum* plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 123, 271–277.
- Fink, P., & Von Elert, E. (2006). Physiological responses to stoichiometric constraints: nutrient limitation and compensatory feeding in a freshwater snail. *Oikos*, 115, 484–494.
- Forrest, J. M. S. (1971). The growth of *Aphis fabae* as an indicator of the nutritional advantage of galling to the apple aphid *Dysaphis devecta*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 14, 477–483.
- Giordanengo, P. (2014). EPG-Calc: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod-Plant Interactions*, 8, 163–169.
- González, W. L., Ramírez, C. C., Olea, N., & Niemeyer, H. M. (2002). Host plant changes produced by the aphid *Sipha flava*: consequences for aphid feeding behaviour and growth. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 103, 107–113.
- Hammes, U. Z., Schachtman, D. P., Berg, R. H., Nielsen, E., Koch, W., McIntyre, L. M., et al. (2005). Nematode-induced changes of transporter gene expression in Arabidopsis roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 1247–1257.
- Hartley, S. E., & Lawton, J. H. (1992). Host manipulation by gall-insects: a test of the nutrition hypothesis. *Journal of Animal Ecology*, 61, 113–119.
- Jiang, Y. X., Nombela, G., & Muniz, M. (2001). Analysis by DC-EPG of the resistance to *Bemisia tabaci* on an Mi-tomato line. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 99, 295–302.
- Koyama, Y., Yao, I., & Akimoto, S. I. (2004). Aphid galls accumulate high concentrations of amino acids: a support for the nutrition hypothesis for gall formation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 113, 35–44.
- Llewellyn, M., & Hargreaves, C. E. M. (1986). Biology and energetics of the gall inducing aphid *Aphis pomi* and *Dysaphis devecta*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 41, 273–283.
- Matsukura, K., Matsumura, M., & Tokuda, M. (2012). Host feeding by an herbivore improves the performance of offspring. *Evolutionary Biology*, 39, 341–347.
- Mesfin, T., Den Hollander, J., & Markham, P. J. (1995). Feeding activities of *Cicadumila mbila* (Hemiptera: Cicadellidae) on different host plants. *Bulletin of the Entomological Research*, 85, 387–396.
- Nyman, T., & Julkunen-Tiitto, R. (2000). Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 13184–13187.
- Petterson, J., Tjallingii, W. F., & Hardie, J. (2007). Host plant selection and feeding. In H. F. van Emdem, & R. Harrington (Eds.), *Aphids as crop pests* (pp. 87–113). Oxford, U.K.: CAB International.
- Pickett, J. A., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. (1992). The chemical ecology of aphids. *Annual Review of Entomology*, 37, 67–90.
- Pointeau, S. (n.d.). [Molecular phylogeny and population genetic structure of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii*]. Unpublished raw data.
- Pointeau, S., Ameline, A., Laurans, F., Sallé, A., Rahbé, Y., Bankhead-Dronnet, S., et al. (2012). Exceptional plant penetration and feeding upon cortical parenchyma cells by the woolly poplar aphid. *Journal of Insect Physiology*, 58, 857–866.
- Pointeau, S., Ameline, A., Sallé, A., Bankhead-Dronnet, S., & Lieutier, F. (2013). Characterization of antibiosis and antixenosis to the woolly poplar aphid (Hemiptera: Aphididae) in the bark of different poplar genotypes. *Journal of Economic Entomology*, 106, 473–481.
- Pointeau, S., Sallé, A., Lesieur, V., Bankhead-Dronnet, S., Bonnaïffoux, M., & Lieutier, F. (2011). Estimating the effect of poplar resistance on the performance of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii*, in various experimental conditions. *Canadian Journal of Forest Research*, 41, 1233–1241.
- Powell, D., Tosh, C. R., & Hardie, J. (2006). Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary and applied perspectives. *Annual Review of Entomology*, 51, 309–330.

- Prado, E., & Tjallingii, W. F. (1997). Effects of previous plant infestation on sieve elements acceptance by two aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *89*, 111–118.
- Price, P. W., Fernandes, G. W., & Waring, G. L. (1987). The adaptive nature of insect galls. *Environmental Entomology*, *16*, 15–24.
- R Development Core Team. (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rangasamy, M., Rathinasabapathi, B., McAuslane, H. J., Cherry, R. H., & Nagata, R. T. (2009). Role of leaf sheath lignification and anatomy in resistance against southern chinch bug (Hemiptera: Blissidae) in St. Augustinegrass. *Journal of Economic Entomology*, *102*, 432–439.
- Saltzman, K. D., Giovanini, M. P., Zheng, C., & Williams, C. E. (2008). Virulent Hessian fly larvae manipulate the free amino acid content of host wheat plants. *Journal of Chemical Ecology*, *34*, 1401–1410.
- Sandström, J., Telang, A., & Moran, N. A. (2000). Nutritional enhancement of host plants by aphids—a comparison of three aphid species on grasses. *Journal of Insect Physiology*, *46*, 33–40.
- Sauge, M. H., Lacroze, J.-P., Poëssel, J.-L., Pascal, T., & Kervella, J. (2006). Genotypic variation in induced resistance and induced susceptibility in the peach–*Myzus persicae* aphid system. *Oikos*, *113*, 305–313.
- Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J., & Dicke, M. (2005). *Insect-plant biology* (2nd ed.). New York: Oxford University Press.
- Shannon, R. E., & Brewer, J. W. (1980). Starch and sugar levels in three coniferous insect galls. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, *89*, 526–533.
- Simpson, S. J., Sibly, R. M., Lee, K. P., Behmer, S. T., & Raubenheimer, D. (2004). Optimal foraging when regulating intake of multiple nutrients. *Animal Behaviour*, *68*, 1299–1311.
- Smith, R. G. (1999). Wax glands, wax production and the functional significance of wax use in three aphid species (Homoptera: Aphididae). *Journal of Natural History*, *33*, 513–530.
- Staniland, L. N. (1924). The immunity of apple stocks from attacks of woolly aphids (*Eriosoma lanigerum*, Hausmann). Part II. The causes of the relative resistance of the stocks. *Bulletin of Entomological Research*, *15*, 157–170.
- Suzuki, D., Fukushi, Y., & Akimoto, S.-I. (2009). Do aphid galls provide good nutrients for the aphids?: comparisons of amino acid concentrations in galls among *Tetraneura* species (Aphididae: Eriosomatinae). *Arthropod-Plant Interactions*, *3*, 241–247.
- Tjallingii, W. F. (1978). Electronic recording of penetration behavior by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *24*, 721–730.
- Tjallingii, W. F. (1988). *Electrical recording of stylet penetration activities*. In A. K. Minks, & P. Herein (Eds.), *Aphids: Their biology, natural enemies and control* (Vol. 2B); (pp. 95–108). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Tjallingii, W. F., & Hogen Esch, T. H. (1993). Fine structure of aphid stylet routes in plant tissue in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology*, *18*, 317–328.
- Tokuda, M., Jikumaru, Y., Matsukura, K., Takebayashi, Y., Kumashiro, S., Matsumura, M., et al. (2013). Phytohormones related to host plant manipulation by a gall-inducing leafhopper. *PLoS One*, *8*, e62350.
- Weis, A. (1994). What can gallmakers tell us about natural selection on the components of plant defense? In P. W. Price, W. J. Mattson, & Y. N. Baranchikov (Eds.), *The ecology and evolution of gall-forming insects* (pp. 157–171). United States Department of Agriculture, General Technical Report NC-174.
- Wyatt, I. J., & White, P. F. (1977). Simple estimation of intrinsic rate of natural increase rates for aphids and tetranychid mites. *Journal of Applied Ecology*, *14*, 757–766.

CHAPITRE 3 : Impacts de la fertilité du sol sur les interactions arbre-puceron

Objectifs :

- Déterminer l'impact de la fertilisation sur le développement du puceron lanigère du peuplier.
- Estimer la capacité de *P. passerinii* à modifier les allocations d'acides aminés chez son hôte, au niveau de sa pseudogalle.
- Evaluer si la capacité du puceron à moduler les teneurs en acides aminés dans sa pseudogalle dépend du niveau de fertilisation et de son niveau de résistance de sa plante-hôte.

Article 3 :

Effects of fertilization on amino acid mobilization by a plant-manipulating insect

F. Dardeau, M. Body, A. Berthier, F. Miard, J.-P. Christidès, M. Feinard-Duranceau, D. Girou, F. Brignolas, F. Lieutier, A. Sallé

Resoumis prochainement

PRESENTATION DE L'ARTICLE 3

1. Contexte

La faible concentration en azote des tissus végétaux est un des facteurs limitant l'exploitation de plantes par les animaux (Strong et al. 1984; Schoonhoven et al. 2005). D'après l'hypothèse de nutrition, les insectes cécidogènes induisent des modifications biochimiques augmentant la valeur nutritive des tissus qu'ils manipulent (Price et al. 1987). Pour se faire, les galles deviennent des puits métaboliques attirant les nutriments des tissus en périphérie et peuvent ainsi accumuler des acides aminés (Larson & Whitham 1991; 1997; Silva et al. 1996; Koyama et al. 2004; Hakkarainen et al. 2005; Saltzmann et al. 2008; Suzuki et al. 2009). La pseudogalle induite par *Phloeomyzus passerinii* améliore ses performances et optimise son comportement de nutrition (Cf. Chap. 1 et 2), potentiellement suite à une optimisation nutritionnelle des tissus.

Tout facteur environnemental ou intrinsèque à une plante modifiant son contenu en azote, et plus particulièrement en acides aminés, peut avoir des conséquences fortes sur les herbivores en général (Awmack & Leather 2002; Schoonhoven et al. 2005).

Pour les cécidogènes, l'augmentation des teneurs en azote des plantes, par fertilisation du sol par exemple, peut nuire au développement des galles (McKinnon et al. 1999), avoir un effet positif sur les galles (Rossi & Stiling 1998), ou ne pas avoir d'effet (Gange & Nice 1997). De même, les teneurs en azote des galles peuvent augmenter (Abrahamson & McCrear 1986) ou rester stables (Abrahamson et al. 1988; Hartley & Lawton 1992; Gange & Nice 1997). Connaître l'impact de la fertilisation du sol sur les flux d'azote entre la plante et les galles permettrait de mieux comprendre les interactions entre l'insecte et sa plante hôte et ainsi d'adapter les pratiques culturales en fonction des ravageurs.

Notre étude a donc consisté à tester si le développement des pseudogalles de *P. passerinii* agit comme un puits métabolique et si la force de ce puits peut être affectée par les niveaux de fertilisation du sol et résistance des peupliers. Nous avons donc observé si (i) *P. passerinii* modifie les concentrations en acides aminés de sa pseudogalle, si (ii) la fertilisation du sol affecte ces contenus en acides aminés et les performances du puceron et si (iii) la résistance de l'hôte module ces phénomènes. Le développement de colonies de *P. passerinii* a donc été comparé sur deux génotypes de peuplier (une très sensible et un plus résistant) sous trois niveaux de fertilisation. Les acides aminés libres et protéiques ont été quantifiés dans l'écorce en fin d'expérience.

11. Protocole général

- **Peupliers et conditions expérimentales** : nous avons utilisé des boutures en pot de deux hybrides euraméricains de peupliers (*Populus x canadensis* Moench) : le génotype I-214, sensible, et le génotype I-45/51, de résistance intermédiaire (Pointeau et al. 2011). Après l'enracinement des boutures, une solution nutritive a été apportée manuellement deux fois par semaine pendant un mois afin de fournir les éléments minéraux en quantités non limitantes.

Les plants ont ensuite été séparés en trois groupes pour chaque génotype, attribués à trois niveaux de fertilisation du sol. Le premier groupe a continué à recevoir la même solution nutritive concentrée en tant que traitement optimal (O). Les deuxième et troisième groupes ont reçu la moitié et le quart des quantités optimales de macroéléments, correspondant aux traitements de fertilisations intermédiaire (I) et légère (L) respectivement.

- **Croissance des peupliers et développement des colonies de pucerons** : la croissance des boutures a été évaluée chaque mois à partir du déclenchement des différents traitements de fertilisation. En fin d'expérience, le nombre de rameaux secondaires a été compté.

Deux mois après le début des trois traitements de fertilisation, une partie des plants a été infestée avec des femelles parthénogénétiques issues d'une même lignée isofemelle. Le développement des colonies a été suivi pendant les 6 semaines suivantes en estimant les surfaces de colonies.

- **Dosages des acides aminés corticaux** : en fin d'expérience, des fragments d'écorce ont été prélevés sur les boutures de peuplier infestées ou témoins de toutes les modalités de fertilisation de chaque génotype. Les acides aminés ont été extraits puis purifiés à l'aide de kits de dérivation EZ:faast (Phenomenex Ltd). Un premier kit nous a permis d'isoler la fraction libre des acides aminés et un deuxième kit a ciblé les acides aminés protéiques (polymérisés). Les acides aminés des solutions d'extraction purifiées ont été dosés en chromatographie à phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Chaque acide aminé a alors été dosé grâce à un standard interne (norvaline). Certains étant indissociables sur le chromatogramme à cause de leur co-élution, ils ont été dosés ensemble. Nous avons ainsi mesuré 15 teneurs détectables sur tous les échantillons (Tableau 3.1). La teneur en acides aminés libres a été calculée en sommant les quantités de tous les acides aminés par échantillon, et de même pour la teneur en acides aminés protéique. La concentration totale en acides aminés a été calculée en sommant les fractions libres et protéiques par échantillon.

Tableau 3.1 : Acides aminés et groupes d'acides aminés co-élués utilisés pour les dosages dans cette étude. Les acides aminés en gras et aux abréviations soulignées sont considérés comme essentiels pour les insectes herbivores car ils sont incapables de les synthétiser eux-mêmes.

Acides aminés	Abréviations	Acides aminés	Abréviations
Alanine	Ala	Arginine + Asparagine + Méthionine	<u>Arg</u> + Asp + <u>Met</u>
Glycine	Gly	Glutamate + Phénylalanine + Cystéine	Glu + <u>Phe</u> + Cys
Valine	<u>Val</u>	Glycine	Gln
Leucine	<u>Leu</u>	Ornithine (jamais protéique)	Orn
Isoleucine	<u>Ile</u>	Lysine	<u>Lys</u>
Thréonine + Sérine	<u>Thr</u> + Ser	Tyrosine	Tyr
Proline	Pro	Tryptophane	<u>Trp</u>
Asparagine	Asn		

III. Principaux résultats

- **Croissance des peupliers** : la fertilisation a eu un effet positif sur la croissance et le nombre de rameaux secondaires des deux génotypes I-214 et I-45/51.
- **Développement des colonies de pucerons** : la fertilisation n'a pas eu d'effet significatif sur la croissance des colonies de pucerons sur les deux génotypes. La surface des colonies était positivement corrélée avec certaines teneurs en acides aminés.
- **Teneurs en acides aminés** : la réduction de fertilisation a diminué la teneur totale en acides aminés libres dans l'écorce des deux génotypes, mais n'a pas eu d'effet significatif sur la teneur totale en acides aminés protéiques. La concentration totale en acides aminés (libres + protéiques) n'a pas été modifiée par la fertilisation sur I-214 alors qu'elle a significativement augmenté sur I-45/51.

L'infestation par *P. passerinii* a augmenté les teneurs totales en acides aminés libres pour toutes les modalités de fertilisation, et les teneurs totales en acides aminés protéiques pour deux des trois modalités de fertilisation sur I-214. Aucun effet n'a été détecté sur I-45/51. Pour les acides aminés libres l'effet de l'infestation a été significativement modulé par le niveau de fertilisation. La teneur en acides aminés libres sur I-214 a été multipliée par 1.6, 3.1 et 4 par rapport aux témoins pour les traitements de fertilisation optimale (O), intermédiaire (I) et légère (L) respectivement.

Si l'on considère les acides aminés séparément, l'infestation a induit des accumulations significatives de certains acides aminés libres dans I-214, notamment des groupes Thr + Ser, Arg + Asp + Met et Glu + Phe + Cys, mais aussi de Leu et Pro. La plupart des modifications observées concernaient des acides aminés essentiels ou des groupes co-élués contenant au moins un acide aminé essentiel.

Concernant les acides aminés protéiques, l'infestation a fortement augmenté les teneurs en Lys et Tyr et aussi légèrement en Leu et Ile sur I-214 uniquement.

IV. Conclusions

L'initiation par *P. passerinii* d'une pseudogalle dans les tissus corticaux du peuplier a induit une mobilisation d'acides aminés libres et protéiques dans ces tissus modifiés. Cette accumulation était particulièrement nette pour les acides aminés libres et a concerné la plupart des acides aminés essentiels, nécessaires au développement des pucerons. Ces changements biochimiques suggèrent une amélioration de la valeur nutritive des tissus de l'hôte, comme on peut l'observer chez d'autres insectes phloémophages ou cécidogènes (Sandström et al. 2000; Koyama et al. 2004; Eleftherianos et al. 2005; Saltzmann et al. 2008; Suzuki et al. 2009). Comme les surfaces de colonies étaient corrélées avec les quantités d'acides aminés libres à la fois sur le génotype sensible et sur le résistant, cela suggère que ces nutriments sont essentiels pour *P. passerinii*, comme ils le sont pour les pucerons de façon générale (Karley et al. 2002; Wilkinson & Douglas 2003). Les résultats indiquent que l'intensité de la mobilisation en acides aminés libres par *P. passerinii* augmente quand la fertilisation diminue. L'intensité de la manipulation pourrait donc dépendre du déséquilibre alimentaire rencontré dans les tissus végétaux par l'insecte. Il est également possible que cette variation d'amplitude de la manipulation soit liée à une compétition entre puits métaboliques au sein de la plante hôte. En effet, l'augmentation du nombre de rameaux secondaires avec la fertilisation a pu limiter la mobilisation des nutriments vers les tissus modifiés par le puceron.

Les acides aminés protéiques se sont également concentrés suite à l'infestation par *P. passerinii*, indiquant des accumulations de protéines. Cela pourrait correspondre à une réponse de défense de l'hôte, mais cela reste incertain car aucun effet délétère n'a été observé dans cette étude. Au contraire, quelques corrélations entre la surface des colonies et des acides aminés protéiques suggèrent plutôt un effet bénéfique de ces derniers.

Sur génotype résistant, l'infestation n'a pas augmenté significativement les teneurs en acides aminés. Cela conforterait l'hypothèse d'un effet antibiotique lié à une plus faible valeur nutritive des tissus corticaux comparés aux génotypes sensibles (Pointeau et al. 2013, Dardeau et al. 2014b, cf. Chap. 2). L'extension limitée des colonies sur le génotype résistant a pu aussi limiter la taille des tissus modifiés en pseudogalle et limiter les accumulations d'acides aminés libres et protéiques, sous le seuil de détection.

La fertilisation n'a pas eu d'effet significatif sur le développement des colonies de pucerons. La manipulation des concentrations en acides aminés par le puceron a pu cependant masquer un effet de la fertilisation sur leur développement, notamment si on considère que les accumulations étaient d'autant plus fortes que la fertilisation était faible. Le gradient de niveau de fertilisation peut aussi avoir été trop étroit pour permettre de distinguer des effets sur le développement des pucerons.

Même si nos expériences ont été réalisées sur des boutures, la bonne transposabilité des tests de sensibilité de la serre au terrain (Pointeau et al. 2011) suggère que la très forte

mobilisation d'acides aminés dans les tissus attaqués par *P. passerinii* est certainement valable sur des arbres adultes en peupleraie. Lors de pullulations, les colonies de pucerons recouvrent les troncs de peuplier et pourraient donc totalement perturber le métabolisme azoté de l'arbre. Des études de l'impact des pullulations de *P. passerinii* sur les allocations de nutriments au sein des arbres permettraient peut-être de faire un lien avec les symptômes observés.

Article 3

Effects of fertilization on amino acid mobilization by a plant-manipulating aphid

Dardeau F. ⁽¹⁾, Body M. ⁽²⁾, Berthier A. ⁽¹⁾, Miard F. ⁽¹⁾, Christidès J.-P. ⁽²⁾, Feinard-Duranceau M. ⁽¹⁾, Brignolas F. ⁽¹⁾, Giron D. ⁽²⁾, Lieutier F. ⁽¹⁾, Sallé A. ⁽¹⁾

¹ UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, Rue de Chartres, BP 6759, FR-45067 Orléans Cedex, France.

² Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR 7261, CNRS/Université François Rabelais de Tours, Parc Grandmont, 37200, Tours, France.

Abstract

Nitrogen sources, in particular essential amino acids, are generally found at low concentrations in plant tissues, thereby limiting herbivore development. Host-manipulating herbivores can induce mobilizing sinks in their host tissues that improve their nutritional value. These sinks can alter nitrogen allocations within their host plant, yet their strength can be modulated by environmental factors and host physiology. We investigated whether the pseudogall induced by *Phloeomyzus passerinii* in the bark of its host plant also acts as a mobilizing sink, and whether the strength of this sink is affected by both the fertilization regime and resistance level of its host plant. We studied the development of *P. passerinii*'s colonies on stem-cuttings of both a resistant and a susceptible poplar genotype, under three fertilization regimes. After the development of colonies, free and protein-bound amino acid content of the galled tissues were quantified. Host resistance affected the development of aphid colonies. The process of fertilization increased bark content of free amino acid, which correlated with aphid colony surface area, but did not enhanced aphid development. Infestation triggered accumulations of both free and protein-bound amino acids in the susceptible genotype only. In particular, for protein-bound amino acids, lysine and tyrosine were accumulated. Likewise, for free amino acids, the co-eluted groups gathering threonine and serine, and glutamate, phenylalanine and cysteine were also accumulated. The strength of this mobilizing sink was more pronounced when fertilization decreased. These results suggest that the modification in nutrient allocations within trees due to *P. passerinii*'s outbreaks could explain the observed damage under field conditions. Nitrogen and carbohydrate reserve storage might also condition tree tolerance to aphid outbreak.

Key words: aphid, gall, mobilizing sink, *Phloeomyzus passerinii*, *Populus x canadensis*.

Introduction

Nutritional imbalance is one of the major hurdles preventing animals from efficiently exploiting plant resources. Amino acid content in particular can be a limiting factor for herbivore growth as they are generally found at low concentrations in plant tissues (Strong et al. 1984; Schoonhoven et al. 2006). Consequently environmental or plant-related factors that affect plant nitrogen content, or more precisely amino acid content, can have dramatic consequences on the performance of herbivore (Awmack and Leather 2002; Schoonhoven et al. 2006). To cope with this nutritional imbalance and its versatility, phytophagous insects have developed diverse arrays of pre- and post-ingestive strategies including the selection of specific feeding sites (Robert et al. 2012) or the association with symbionts (Douglas 2013). One of the most refined strategies, frequently encountered in endophagous and gall-inducing insects, consists of host-plant manipulation (Larson and Whitham 1991, 1997; Bronner 1992; Giron et al. 2007; Body et al. 2013). The nutrition hypothesis states that gall-inducing organisms can induce biochemical modifications that improve the nutritional value of their host tissues (Price et al. 1987). Enhanced insect development on galled tissues has been observed in different plant-insect systems (Koyama et al. 2004; Diamond et al. 2008; Matsukura et al. 2012). These mobilizing sinks are well known for sugar accumulation but can also accumulate amino acids (Koyama et al. 2004; Saltzmann et al. 2008; Suzuki et al. 2009). Several studies also report the transformation of galls into mobilizing sinks that can compete with the host-plant natural sinks and draw nutrients from the surrounding tissues (Larson and Whitham 1991, 1997; Silva et al. 1996; Hakkarainen et al. 2005). Such accumulations are not consistently observed though and it has been hypothesized that galling insects rather manipulate nitrogen compound levels and composition in their galls towards an optimum for their fitness than to a maximum (Hartley & Lawton 1992, Gange & Nice 1997, Hartley 1998).

In this context, it is a complex task to predict the impact of fertilization on both the population dynamics of a galling insect and the induced sink intensity in its host plant. Increasing nitrogen content in plants, through fertilization or other means, impeded galling success, enhanced it, or had no effect depending on which system was studied (Gange and Nice 1997; Rossi and Stiling 1998; McKinnon et al. 1999). Likewise, after fertilizer application, nitrogen content in galled tissue increased (Abrahamson and McCrea 1986) or remained unaffected (Abrahamson et al. 1988; Hartley and Lawton 1992; Gange and Nice 1997). Unraveling the impacts of a host-manipulating insect on amino acid allocation within its host plant, and how their relationship to soil fertility modulates them, would give a better understanding of the interactions between the insect and its host. An in depth analysis of these interactions could ultimately provide new insights on how gall-inducing pests can be managed.

The woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Signoret) (Aphididae: Phloeomyzinae), is a Palearctic species living in bark crevices of poplar trunks and is considered the most damaging pest of poplar plantations in Southern Europe, North Africa

and the Near East, (Arzone and Vidano 1984; Blackman and Eastop 1994; Sadeghi et al. 2007). Outbreaks are usually triggered on large trees in fertile plots. During these heavy infestations, colonies develop on the whole trunk and induce bark necroses, delays in bud breaking, tree growth reduction and sometimes extensive tree mortality (Arzone and Vidano 1984). The origin of symptoms and processes leading to tree death are still unknown. Aphid probing generates only minute damage to its host since this aphid feeds upon the shallow tissues of the cortical parenchyma (Pointeau et al. 2012). Following aphid probing, the parenchyma of susceptible poplar genotypes undergoes anatomical and biochemical modifications leading to the differentiation of a reaction tissue, characterized by thin-walled, hypertrophied cells (Dardeau et al. 2014a). This modified parenchyma enhances aphids' development and host acceptance, indicating that *P. passerinii* induces the formation of a pseudogall in the cortical tissues of its susceptible hosts (Dardeau et al. 2014b). Conversely, in a resistant poplar genotype, pseudogall formation was hampered and benefits for both aphids' development and feeding behavior were less obvious (Dardeau et al. 2014a, 2014b). According to the nutrition hypothesis, we expected that the enhanced development and host acceptance of *P. passerinii* on its pseudogall in susceptible hosts were consequences of an improvement of the nutritional value of its host tissues, which could be impaired in resistant host genotypes. Considering the prevalence of *P. passerinii* outbreaks in fertile poplar stands and the importance of free amino acids for aphids' nutrition, we have hypothesized that the insect triggers a finely-tuned regulation of these compounds in its pseudogall and that fertilization may have an additive or synergistic effect.

We present here the results of an experiment aiming at testing if a developing pseudogall of *P. passerinii* acts as a mobilizing sink and if the strength of this sink is affected by both the fertilization regime and resistance level of its host plant. More specifically, our objectives were (i) to test if *P. passerinii* modifies amino acid content in induced pseudogall tissues, (ii) to investigate the effect of fertilization on the amino acid content of galled tissues and on aphid development, (iii) to assess if host resistance can modulate both the effect of fertilization and the amino acid content of galled tissues. For this, we compared the development of woolly poplar aphid colonies on stem-cuttings of both a resistant and a susceptible poplar genotype under three fertilization regimes. After the development of colonies, free and protein-bound amino acid content of the galled tissues were quantified by GC-MS analyses.

Materials and methods

Plants and insects

Stem-cuttings of two of *Populus x canadensis* Moench. Hybrids, I-214 and I-45/51, were obtained in January 2012 from the experimental nursery of Guéméné Penfao (France).

Previous experiments and field observations have indicated that I-214 is highly susceptible to *P. passerinii*, while I-45/51 negatively affects aphid development and fecundity (Pointeau et al. 2011; Pointeau et al. 2013).

Aphids originated from a colony established in October 2008 from an apterous parthenogenetic aphid collected in Reboursin (France). This clonal colony belonged to the most common haplotype that has so far been identified in France (Pointeau et al. unpublished data from combined analyses of three mitochondrial DNA fragments, Cytochrome oxidase I and II and Cytochrome b genetic fragments). The colony was maintained under the breeding conditions developed by Arru (1974), in a climate controlled chamber (21 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ RH and 16L:8D photoperiod), on I-214 stem-cuttings which provide an optimal rearing host for this aphid.

Plants cultivation and growth monitoring

Cultivation and infestation were performed in a greenhouse (INRA Orléans, France), where temperature was controlled (20 ± 2 °C). The experiment was performed with 120 stem-cuttings (30 cm long), 60 for each poplar genotype. The stem-cuttings were kept at 5°C until they were planted in February 2012 in 12 L pots filled with quartz sand and under tap water irrigation. Irrigation was automated and soil water content was maintained at field capacity throughout the experiment. Six weeks after planting while cuttings were rooted, a modified Hoagland's nutrient solution was manually applied to each stem-cutting. The macroelements contained in the nutrient solution were (in mM) 268 NH_4NO_3 , 77 K_2HPO_4 , 37 CaCl_2 , and 31 MgSO_4 . The microelements were (in μM) 4834 H_3BO_3 , 951 MnSO_4 , 80 ZnSO_4 , 33 CuSO_4 , 11 Na_2MoO_4 , and 14 FeSO_4 . This fertilization was applied during one month; thereafter the stem-cuttings were separated into three fertilization treatments, with 20 stem-cuttings of each genotype per treatment. For the first one, the optimal treatment (O), the same nutrient solution as formerly described was applied to each stem-cutting until the end of the experiment. For the second and third ones, the intermediate (I) and low (L) treatments, half and quarter of the macroelements provided in the optimal treatment were applied respectively to each stem-cutting until the end of the experiment. A similar amount of microelements was applied to the three treatments. Once the different fertilization treatments were applied, plant growth was monitored monthly with basal stem diameter and height of the newly formed shoot. Stem-cuttings were checked weekly for stem-borers on buds and aphids and whiteflies on leaves. These pests were mechanically removed when detected. At the end of experiment, the number of lateral shoots was counted on seven stems per modality.

Aphid infestation and monitoring

Two months after the beginning of the different fertilization treatments, 15 stem-cuttings per modality were infested with aphids. Three apterous parthenogenetic females were deposited at mid-height on the stem cuttings under a gelatin capsule for 48 h. The establishment of aphids was then checked, and new infestations were performed when necessary. Once three females were established, the gelatin capsule was removed and the colony growth was monitored for 6 weeks according to the protocol described by Pointeau et al. (2011). Briefly, every week a picture was taken of the two opposite sides of the infested stem cuttings. The colony areas were then estimated using ImageJ 1.40 (National Institutes of Health). For each stem cutting, the two opposite areas were summed. To prevent contamination of uninfested controls, colonies development on infested stem-cuttings was restricted to the lignified section of the stem-cutting by applying glue at the base and at the top.

Amino Acid Extraction and Analysis

At the end of infestation monitoring, bark samples were collected to measure concentrations of both protein-bound and free amino acids. Samples were collected on seven randomly selected infested stem-cuttings and five controls for each fertilization treatment and genotype respectively. Samples were collected with a chisel from the suber to the cambial area and immediately frozen in liquid nitrogen. They were then lyophilized for 48 h, hand-ground to a fine powder in a mortar and pestle under liquid nitrogen, and weighed. Amino acid concentrations were analyzed by derivatization using an EZ:faast amino acid analysis kit (Phenomenex Ltd, Aschaffenburg, Germany) and subsequent quantification via GC-MS system composed of an AutoSystem XL gas chromatograph coupled to a TurboMass mass spectrometer (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). The protocol of analysis was adapted from Morehouse et al. (2013).

For the free amino acid analysis, some samples had to be pooled due to their small size and low concentration in amino acids. Ground plant tissues (85 mg) were suspended in 950 μ L of a mixture of 25% acetonitrile and 0.01 M HCl (1 : 3, v : v) and centrifugated at 3000 rpm during 2 min. For protein-bound amino acids prior to derivatization, 70 mg were suspended in 700 μ L of 4 M methanesulfonic acid in a glass tube. The air in the tube was replaced by nitrogen gas and the tube was sealed. Tubes were heated for 2 h at 150°C. Once cooled, the pH of the solution was adjusted to 1.5 by adding 1 M sodium carbonate. The solution was transferred in a 1.5 mL eppendorf tube, vortexed and centrifugated at 3000 rpm for 2 min. Norvaline was used as an internal standard. Supernatant samples (500 μ L) were then subjected to derivatization, concentrated under a stream of nitrogen gas and injected immediately into the GC-MS system.

Samples were separated on a ZB-AAA column (10 m × 0.25 mm, Phenomenex Ltd) using helium as the carrier gas at a constant flow of 1.1 mL min⁻¹. The GC oven temperature ramped from 110 to 320 °C at a rate of 30 °C min⁻¹, with the temperature at the injection port maintained at 250 °C. The MS was maintained with a temperature of 200 °C at the electron impact source and 310 °C at the inlet line. The scan range was 3.5 scans per second. Under these conditions, 2 µL samples were injected in the splitless mode (30 s). Purified amino acids were sourced from Phenomenex and Sigma-Aldrich. Chromatograms were analyzed using the TurboMass software (version 5.4.2). The elution did not allow the separation of all amino acids. Threonine was co-eluted with serine, glutamate with phenylalanine and cysteine, and arginine with aspartate and methionine. Detectable quantities were found for all amino acids except histidine.

For each sample, the total free and protein-bound amino acid content was estimated by adding all the amino acids detected. Similarly the total amino acid content was calculated by summing free and protein-bound amino acid content of each sample.

Data analysis

The effects of poplar genotype and fertilization on plant growth parameters and aphids colony development were assayed with ANOVAs. Analyses on amino acid content were performed with non-parametrical test as the data did not fit normal distribution. Permutational multivariate ANOVAs (PERMANOVA) (Anderson 2001) were computed, with 1000 permutations, to test the simultaneous responses of either protein-bound or free amino acid content to the poplar genotype, the fertilization level, and infestation by *P. passerinii* and their interactions. The effect of fertilization, infestation and poplar genotype on the total content of amino acid (free, protein-bound or the sum of free and protein-bound) was tested with Kruskal-Wallis and Wilcoxon rank sum tests. For each amino acid, or group of co-eluted amino acids, the effect of infestation was assessed with Wilcoxon rank sum tests. If infestation had no effect, the effect of fertilization was assessed with a Kruskal Wallis test on all the samples, but when infestation had a significant effect, the effect of fertilization was assessed on the control stem-cuttings only. Pearson's correlation tests were performed to estimate the relationship between the area of aphid colony on a stem-cutting and the amino acid content encountered in the bark. All tests were performed using R 2.8.0 (R core team 2013). Significance levels were set at $\alpha = 0.05$.

Results

Plant growth and Insect Development

Both the height and the basal diameter of the newly formed shoots differed between the genotypes, I-214 stems being taller (height for controls at the end of the experiment: 375 ± 3 cm vs. 298 ± 5 cm, $F_{1,119} = 137.7$, $P < 0.001$) and thicker (at the end of the experiment: $F_{1,119} = 17.2$, $P < 0.001$) (fig. 1). Fertilization also had a positive effect on the basal diameter (fig. 1). The effect of fertilization was significant 2 and 3 months after the differentiation of fertilization regimes for I-214 and I-45/51 respectively, and persisted between the two extreme treatments until the end of the experiment ($F_{2,58} = 23.7$, $P < 0.001$ and $F_{2,58} = 4.6$, $P = 0.015$ for I-214 and I-45/51 respectively, at the end of the experiment). Stem borers attacked some stem-cuttings at random and destroyed their apical shoot, impairing their apical growth. As a result, no fertilization effect was detected on stem height. The number of lateral shoots was not affected by genotype but fertilization had a positive effect as a six-fold increase was observed between the two extreme fertilization regimes (L: 2.2 ± 0.8 , I: 6.2 ± 1.4 , O: 12.9 ± 1.8 , $F_{2,40} = 15.9$, $P < 0.001$).

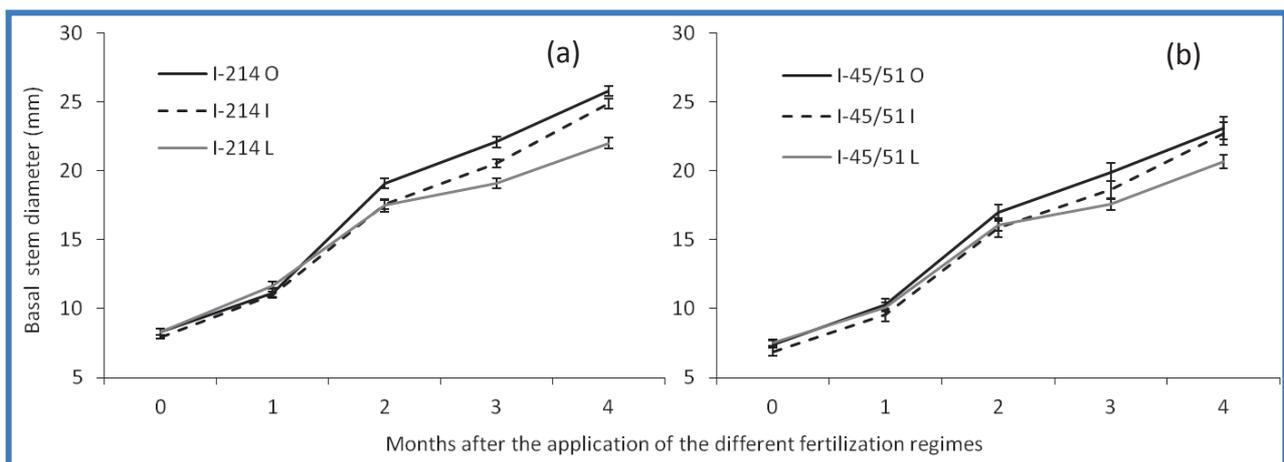


Figure 1 : Radial growth (mean \pm SE) of newly formed shoots from stem-cuttings of two *P. x canadensis* genotypes, I-214 and I-45/51, under three fertilization regimes (O: optimum, I: intermediate, L: low, see text for further details)

Colonies failed to develop on some stem-cuttings, which were thus discarded from the analyses, and the remaining 17 to 19 replications per modality were used for the statistical tests. Aphid colony surface area was affected by the genotype from the second week after infestations until the end of experiment. At that time, colonies were approximately 5-folds larger on I-214 than on I-45/51 ($F_{1,96} = 171.4$, $P < 0.001$) (Fig. 2). At the end of the monitoring, colonies of some stem-cuttings totally covered the lignified section. No significant effect of fertilization on colony growth was observed on both genotypes (fig. 2).

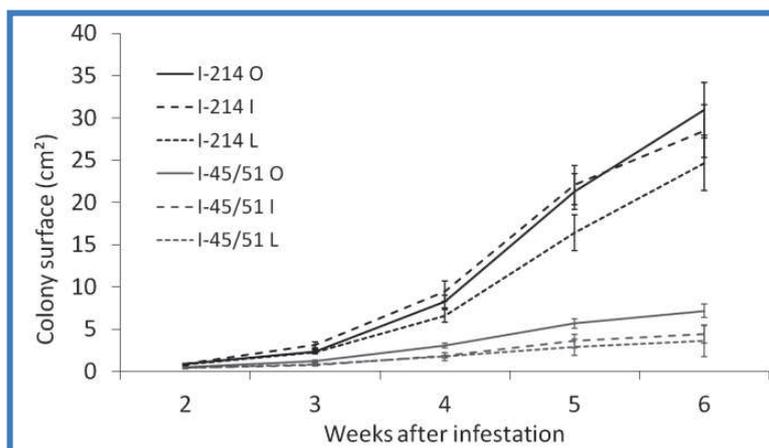


Figure 2 : Surface area (mean \pm SE) of *P. passerinii*'s colonies on stem-cuttings of two *P. x canadensis* genotypes, I-214 and I-45/51, under three fertilization regimes (O: optimum, I: intermediate, L: low, see text for further details)

Total Amino Acid Content

Control stem-cuttings of both genotypes, within a same fertilization regime, did not differ in their total content of either free, protein-bound or both amino acids (fig. 3). However, compared to I-45/51, infested I-214 exhibited higher amounts of free, protein-bound and total amino acids than I-45/51, but only for the low fertilization regime ($P = 0.004, 0.016, 0.006$ respectively).

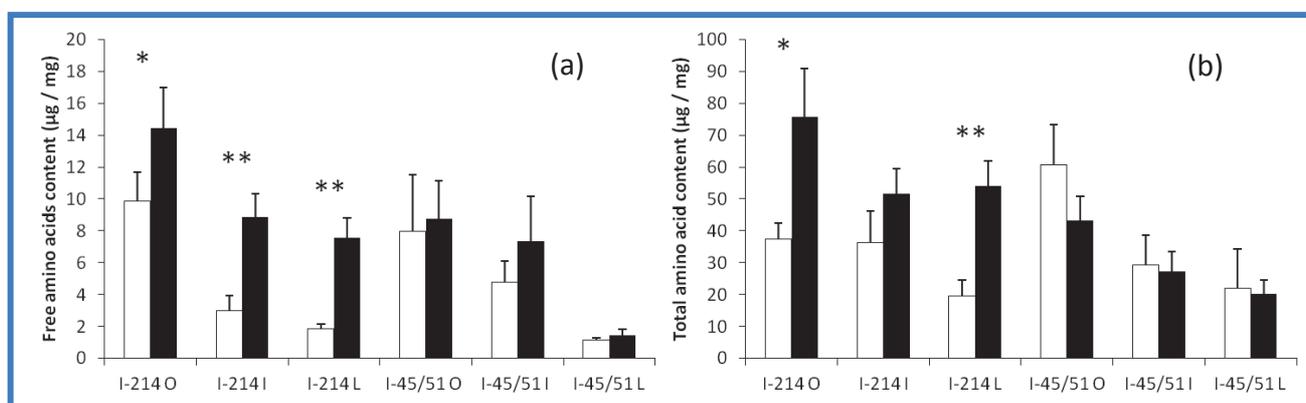


Figure 3 : Free (a) and total (b) amino acid content in the bark of stem-cuttings of two *P. x canadensis* genotypes, I-214 and I-45/51, under three fertilization regimes (O: optimum, I: intermediate, L: low, see text for further details), infested (black filling) or not (white filling) by *P. passerinii*. * indicate significant differences between infested and control stem-cuttings using a Wilcoxon rank sum test

Fertilization affected the total content of free amino acids in both genotypes (fig. 3a, $H_{2,29} = 10.7, P = 0.005$; $H_{2,27} = 16.1, P < 0.001$ for I-214 and I-45/51 respectively), but had no significant effect on the total content of protein-bound amino acids. Infestation increased both the total free and protein-bound amino acid content in I-214, but affected none of

them in I-45/51 (fig. 3a). For the free amino acids, the magnitude of increase in I-214 of the total content was different according to the fertilization regime. Total content of free amino acids increased between control and infested stem-cuttings by 1.6, 3.1 and 4.0 for the optimal, intermediate and low fertilization treatments respectively (fig. 3a). For protein-bound amino acids, the total content in I-214 increased from $29 \pm 7 \mu\text{g}/\text{mg}$ in the controls to $54 \pm 7 \mu\text{g}/\text{mg}$ in the infested stem-cuttings ($H_{1,33} = 7.5$, $P = 0.006$).

The total amino acid content (i.e. free and protein-bound) in the bark of I-214 was not affected by fertilization, but increased in the bark of I-45/51 (fig. 3b, $H_{2,27} = 6.4$, $P = 0.04$). Infestation increased the total amino acid content in I-214 by 2.0 and 2.8 for optimal and low fertilization treatments respectively (fig. 3b).

Free Amino Acid Content

PERMANOVAs performed on all the free amino acids extracted from both I-214 and I-45/51 indicated significant effects of genotype ($P < 0.001$), genotype x infestation ($P = 0.006$) and genotype x fertilization ($P = 0.008$). Both factors acted differently depending on genotype. Consequently, PERMANOVAs were performed for each genotype separately (table 1). Fertilization affected the free amino acid content of both genotypes. Infestation had a dramatic effect on free amino acid content in I-214 but no effect was observed in I-45/51. The effect of infestation on the free amino acid content in I-214 was significantly modulated by fertilization.

Table 1 : Results of the multivariate analyses by PERMANOVAs considering the effect of fertilization at three different levels, infestation by *P. passerinii*, and their combination on the free and protein-bound amino acid (A A) content of the bark of two poplar genotypes, I-214 (susceptible) and I-45/51 (resistant)

Sources of variations	I-214				I-45/51			
	Free A A		Protein-bound A A		Free A A		Protein-bound A A	
	Pseudo- <i>F</i>	P-value	Pseudo- <i>F</i>	P-value	Pseudo- <i>F</i>	P-value	Pseudo- <i>F</i>	P-value
Fertilization (F)	6.27	0.001	0.91	ns	7.67	< 0.001	1.96	ns
Infestation (I)	14.34	< 0.001	7.81	< 0.001	1.09	ns	0.35	ns
F x I	2.77	0.027	1.83	ns	0.35	ns	0.35	ns

Some free amino acids were particularly abundant in both genotypes: the group threonine + serine and the group arginine + aspartate + methionine representing approximately 35 and 22 % of all free amino acids, respectively (table 2, supplementary data 1). Controls of both genotypes differed in only one free amino acid content, isoleucine ($P = 0.025$), that was more abundant in I-214, in the low fertilization regime. In infested stem-cuttings however, free amino acid content was frequently higher in I-214 than in I-45/51.

This was significant for threonine + serine, glutamate + phenylalanine + cysteine and lysine in optimal and low fertilization treatments, alanine in intermediate and low fertilization regimes, and valine, leucine, isoleucine, proline, arginine + aspartate + methionine in the low fertilization treatment only ($P < 0.05$ in all cases).

Table 2: Effects of fertilization (F) at three different levels, and infestation (I) by *P. passerinii*, on the content of the different free and protein-bound amino acids in the bark of two poplar genotypes, I-214 and I-45/51 Pearson's coefficients (r) indicate the relationship between amino acid content and the surface area of aphid colonies measured on the stem-cuttings. Underlined amino acids are essential amino acids for aphids in general.

	I-214						I-45/51					
	Free A A			Protein-bound A A			Free A A			Protein-bound A A		
	F	I	r	F	I	r	F	I	r	F	I	R
Ala	0.001	ns	0.17	ns	ns	0.01	< 0.001	ns	0.50	ns	ns	0.70***
Gly	ns	ns	0.07	ns	ns	0.12	0.03	ns	0.06	ns	ns	0.56
<u>Val</u>	0.013	ns	0.72**	ns	ns	0.08	< 0.001	ns	0.49	ns	ns	0.57
<u>Leu</u>	ns	0.002	0.74***	ns	0.019	0.26	0.001	ns	0.71**	ns	ns	0.63**
<u>Ile</u>	0.049	ns	0.49*	ns	0.025	0.36	< 0.001	ns	0.32	ns	ns	0.59**
<u>Thr</u> Ser	0.009	< 0.001	0.64**	ns	ns	0.13	0.004	ns	0.71**	ns	ns	0.56
Pro	0.035	0.047	0.17	ns	ns	0.21	0.006	ns	0.86***	ns	ns	0.61**
Asn	0.006	Ns	0.21	ns	ns	-0.02	0.032	ns	0.51**	ns	ns	0.55
<u>Arg</u> Asp <u>Met</u>	ns	0.008	0.46	ns	ns	0.32	0.010	ns	0.66**	ns	ns	0.18
Glu <u>Phe</u> Cys	0.041	< 0.001	0.52*	ns	ns	0.28	0.027	ns	0.76**	ns	ns	0.69**
Gln	ns	ns	0.13	ns	ns	0.09	0.026	ns	0.66**	ns	ns	0.30
Orn	ns	ns	0.11	na	na	na	0.025	ns	0.67**	na	na	na
<u>Lys</u>	0.023	ns	0.20	ns	< 0.001	0.60**	0.041	ns	0.38	ns	ns	0.68**
Tyr	ns	ns	0.21	ns	< 0.001	0.34	0.044	ns	0.79***	ns	ns	0.80***
<u>Trp</u>	ns	ns	0.35	ns	ns	-0.26	0.014	ns	0.66**	ns	ns	0.57

*** indicate a significant correlation with $P < 0.001$, ** a significant correlation with $P < 0.01$, and * a significant correlation with $P < 0.05$. Kruskal-Wallis tests were performed to assess the effect of fertilization and Wilcoxon rank sum tests for the effect of infestation. ns: not significant, na: not applicable.

An increased fertilization induced an accumulation of some amino acids in I-214 and of all of them in I-45/51. Infestation also induced the accumulation of amino acids in I-214, particularly for the groups gathering threonine + serine and glutamate + phenylalanine + cysteine, but also for leucine, proline and the group arginine + aspartate + methionine. Most of these alterations concern essential amino acids or co-eluted groups containing essential amino acids.

Protein-Bound Amino Acid Content

PERMANOVAs performed on all the protein-bound amino acids extracted from both I-214 and I-45/51 indicated only a significant genotype effect ($P = 0.006$), but no effect of either fertilization or infestation. Considering each genotype separately (table 1), fertilization did not change the protein-bound amino acid content. Infestation however had a dramatic effect on the content of protein-bound amino acids in I-214 but not in I-45/51.

In both genotypes, the group glutamate + phenylalanine + cysteine represented approximately 25 % of all proteic amino acids and lysine approximately 16 %. Controls of both poplar genotypes did not differ in their protein-bound amino acid content. However, compared to I-45/51, infested I-214 contained higher amounts of threonine + serine, lysine and tyrosine for optimal and low fertilization regimes, and more alanine, glycine, leucine, isoleucine, and glycine + phenylalanine + cysteine for the low fertilization regime only ($P < 0.05$ in all cases).

No effect of fertilization regime was detected for both genotypes (table 2, supplementary data 2). Infestation triggered in I-214 dramatic increases in lysine and tyrosine and, to a lesser extent, in leucine and isoleucine.

Relationships with Colony Development

The surface areas of aphid colonies recorded were positively correlated with some of the amino acid content (table 2). For the free amino acids, five and 10 amino acid content out of 15 were positively correlated with the surface area of aphid colony on I-214 and I-45/51, respectively. For the protein-bound amino acids, seven were correlated with colony surface area on I-45/51, while only lysine was correlated on I-214.

Discussion

Environment may modulate the intensity and outcome of host-manipulation by herbivores (Abrahamson and McCrea 1986, Rossi and Stiling 1998, McKinnon et al. 1999). However, few studies have considered how nutrient mobilization could depend on the nutritional value of host tissues, and generally they did not consider a gradient of resources (Abrahamson and McCrea 1986, Hartley and Lawton 1992; Gange and Nice 1997). In the plant-galling insect interaction studied, the strength of amino acid mobilization induced in galled tissues in a susceptible host decreased when fertilization increased.

Pseudogall initiation by *P. passerinii* created a mobilizing sink in the cortical tissues of its host, accumulating both protein-bound and free amino acids. The accumulation was especially sharp for free amino acids, and in particular for essential amino acids, i.e. amino

acids which are synthesized by animals. This observation suggests a manipulation by the aphids to improve the nutritional quality of their host's tissues. Similar increases in free amino acid content has also been reported in feeding sites of either phloem feeding aphids or gall-inducing insects (Sandström et al. 2000; Koyama et al. 2004; Eleftherianos et al. 2006; Saltzmann et al. 2008; Suzuki et al. 2009). Amino acids are essential nutrients for aphids (Karley et al. 2002; Wilkinson and Douglas 2002), and, since in our experiment aphid colony surface areas correlated with bark amounts of free amino acids, this general statement is certainly true for *P. passerinii* as well. This generalization was particularly obvious on I-45/51, in which the positive effect of constitutive amino acid content on aphids was not blurred plant manipulation by the insect, since infestation did not modify amino acid content in this genotype. An additional support to an improvement of host nutritional quality through an accumulation of free amino acids is provided by a previous study, indicating that on galled tissues both nymphal development and host acceptance of *P. passerinii* were enhanced (Dardeau et al. 2014b). However, it must be noted that *P. passerinii* seems to feed upon the cortical parenchyma only (Pointeau et al. 2012), while our samples gathered all bark tissues. A more accurate investigation, involving a collection of the ingested fluids using a stylectomy of the aphid mouthparts, might prove useful to determine if *P. passerinii*'s feeding substrate is really improved.

The free amino acids accumulation increased when the fertilization regime decreased, possibly indicating that host manipulation could depend on the magnitude of the nutritional imbalance. A reverse trend was found with different plant/gall-inducing insects systems in which treatments increased the nitrogen content of control tissues but not in galled ones (Hartley and Lawton 1992; Gange and Nice 1997). This was regarded as a down-regulation exerted by the insect to maintain the nitrogen content at an optimal level. It could be hypothesized that *P. passerinii* is able to trigger an up-regulation of free amino acid content, which intensity would rely on the initial content of host tissues. Alternatively, the increasing number of lateral shoots produced by poplars in response to fertilization could have increased the competition among sinks within the plant, thereby limiting the impact of pseudogalls on amino acid allocation. Several studies have demonstrated that natural sinks like catkins or buds can compete with galls and impair galling success or insect survival (Larson and Whitham 1991, 1997). Investigating how plant architecture affects the development of aphid colonies would help in determining the relative importance of these two phenomena.

Protein-bound amino acids also accumulated following infestation. Galls may accumulate proteins, different from those naturally occurring in non-galled tissues (Schönrogge et al. 2000). This may also result from defensive reactions from the host which is unlikely in this system as no deleterious effect was detected in our experiment. Conversely, some protein-bound amino acid content correlated positively with the surface area of aphid colonies, suggesting a benefit for the insects. However, aphids seem to have a limited ability to digest proteins in general and are considered to rely mostly on free amino

acids for their nutritional requirements (Rahbé et al. 1995). In these conditions, the observed correlations might be incidental. Nevertheless, protein digestion can also occur in some cases, providing supplemental amino acids to the aphids (Cristofolletti et al. 2003; Pyati et al. 2011).

Infestations did not result in significant accumulations of amino acids in the resistant host genotype, I-45/51. Consequently, infested I-214 tissues contained higher concentrations in several free and protein-bound amino acids than I-45/51. This supports the hypothesis that the prolonged development and low fecundity exhibited by aphids on I-45/51 could result from a low nutritional quality of bark tissues in this resistant genotype (Pointeau et al. 2013; Dardeau et al. 2014b). Behavioral investigations showing that host acceptance was enhanced on galled tissues of I-45/51 have suggested that biochemical modifications could upgrade the quality of the feeding substrate (Dardeau et al. 2014b). However, resistance mechanisms alter the pseudogall formation in this genotype and impair colony development (Dardeau et al. 2014a, 2014b). Consequently, the relative amount of galled tissues in the bark could have been lower in I-45/51 than in I-214 in the present experiment. Both phenomena would have affected the strength of the induced nutrient sink, resulting in undetectable biochemical modifications. Further investigations are needed to test whether alteration of pseudogall differentiation or limitation of aphid population in this resistant genotype impeded significant accumulations of amino acids in bark tissues.

Fertilization did not significantly influence the growth of aphid colonies, which only tended to be larger on both genotypes when fertilization increased. Fertilization increased free amino acid content in both genotypes, and affected to a limited extent the architecture and growth of plants. The manipulation of amino acid content by the aphid, along with a dependence on the fertilization regime, may possibly blur the effect of fertilization on aphid development. The range of fertilization regimes considered might also have been too narrow, as suggested by the limited differences among stem-cuttings under different treatment modalities, to detect any influence of fertilization on aphid development.

The sharp increase in amino acid content in tissues infested by *P. passerinii* raises the question of the impact of aphid outbreaks on nutrient allocations within trees. Our study was conducted on stem-cuttings, while aphids are mostly found on mature trees in field conditions. However, resistance studies on stem-cuttings have proven to be congruent to field investigations performed on trees (Pointeau et al. 2011), and reaction tissues observed in stem-cuttings are similar to what can be found in tree bark. We hypothesize that similar amino acid sinks are induced by *P. passerinii* in trees under field conditions. During outbreaks, trunks are covered with aphid colonies. This would certainly result in a drastic drain, totally remodeling amino acid allocation within trees. A similar remodeling could be expected with carbon allocation as pseudogall formation tends to mobilize starch reserves in the surrounding cortical parenchyma (Dardeau et al. 2014a). Such reallocations could explain

the damage observed after outbreaks, or at least would be more involved in damage intensity than the minute effect resulting from aphid probing. Studying nitrogen and carbon allocations in trees during outbreaks would give a further insight on *P. passerinii* impacts on host physiology. With this in mind, our results suggest that trees might be less tolerant to outbreaks in low fertility stands, due to the induction of stronger sinks by aphids when the bark content in amino acids are low. Resource availability would then be important to consider for investigations on the tolerance of host plants to manipulation by herbivores.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the French Ministry of Agriculture, Food Processing and Forest. The PhD thesis of F. Dardeau is funded by the French Ministry of Higher Education and Research. We thank Ryan A. Richardson for helpful comments on the manuscript.

References

- Abrahamson WG, McCrea KD (1986) Nutrient and biomass allocation in *Solidago altissima*: effects of two stem gallmakers, fertilization, and ramet isolation. *Oecologia* 68: 174-180.
- Abrahamson WG, Anderson SS, McCrea KD (1988) Effects of manipulation of plant carbon nutrient balance on tall goldenrod resistance to a gallmaking herbivore. *Oecologia* 77: 302-306.
- Arru GM (1974) Metodo per valutare la resistenza dei pioppi all'Afide lanigero (*Phloeomyzus passerinii* Sign.). *Cellulosa e Carta* 25: 45-49.
- Arzone A, Vidano C (1984) Indagini su *Phloeomyzus passerinii* (Sign.) in Piemonte. *Ann. Fa.c Sci. Agr. Univ. Torino* 13: 337-356.
- Awmack CS, Leather SR (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Ann. Rev. Entomol.* 47: 817-844.
- Blackman RL, Eastop VF (1994) *Aphids on the world's trees: an identification and information guide*. CAB International in association with the Natural History Museum, London, U. K.
- Body M, Kaiser W, Dubreuil G, Casas J, Giron D. (2013) Leaf-miners co-opt microorganisms to enhance their nutritional environment. *J. Chem. Ecol.* 39: 969-977.

Bronner R (1992) The role of nutritive cells in the nutrition of Cynipids and Cecidomyiids. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (eds) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, pp. 102-117.

Cristofolletti PT, Ribeiro AF, Deraison C, Rahbé Y, Terra WR (2003) Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J. Ins. Physiol.* 49: 11-24.

Dardeau F, Deprost E, Laurans F, Lainé V, Lieutier F., Sallé A. (2014a) Resistant poplar genotypes inhibit pseudogall formation by the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* Sign. *Trees* 28: 1007-1019.

Dardeau F, Pointeau S, Ameline A, Laurans F, Cherqui A, Lieutier F, Sallé A (2014b) Host manipulation by a herbivore optimizes its feeding behaviour. *Anim. Behav.* 95: 49-56.

Diamond SE, Blair CP, Abrahamson WG (2008) Testing the nutrition hypothesis for the adaptive nature of insect galls: does a non-adapted herbivore perform better in galls? *Ecol. Entomol.* 33: 385-393.

Douglas AE (2013) Microbial brokers of insect-plant interactions revisited. *J. Chem. Ecol.* 39: 952-961.

Eleftherianos I, Vamvatsikos P, Ward D, Gravanis F (2006) Changes in the levels of plant total phenols and free amino acids induced by two cereal aphids and effects on aphid fecundity. *J. Appl. Entomol.* 130: 15-19.

Gange AC, Nice HE (1997) Performance of the thistle gall fly, *Urophora cardui*, in relation to host plant nitrogen and mycorrhizal colonization. *New. Phytol.* 137: 335-343.

Giron D, Kaiser W, Imbault N., Casas J. (2007) Cytokinin-mediated leaf manipulation by a leafminer caterpillar. *Biol. Lett.* 3: 340-343.

Hakkarainen H, Roininen H, Virtanen R (2005) Negative impact of leaf galls on arctic-alpine dwarf willow, *Salix herbacea*. *Polar. Biol.* 28: 647-651.

Hartley SE (1998) The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? *Oecologia* 113: 492-501.

Hartley SE, Lawton JH (1992) Host manipulation by gall-insects: a test of the nutrition hypothesis. *J. Anim. Ecol.* 61: 113-119.

Karley AJ, Douglas AE, Parker WE (2002) Amino acid composition and nutritional quality of potato leaf phloem sap for aphids. *J. Exp. Biol.* 205: 3009-3018.

- Koyama Y, Yao I, Akimoto SI (2004) Aphid galls accumulate high concentrations of amino acids: a support for the nutrition hypothesis for gall formation. *Entomol. Exp. Appl.* 113: 35-44.
- Matsukura K, Matsumura M, Tokuda M (2012) Host feeding by an herbivore improves the performance of offspring. *Evol. Biol.* 39: 341-347.
- McKinnon ML, Quiring DT, Bauce E (1999) Influence of tree growth rate, shoot size and foliar chemistry on the abundance and performance of a galling adelgids. *Funct. Ecol.* 13: 859-876.
- Morehouse NI, Mandon N, Christidès J-P, Body M, Casas J. (2013) Seasonal selection and resource dynamics in a seasonally polyphenic butterfly. *J. Evol. Biol.* 26: 175-185.
- Nyman T, Julkunen-Tiitto R (2000) Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *PNAS* 97: 13184–13187.
- Pointeau S, Sallé A, Lesieur V, Bankhead-Dronnet S, Bonnaffoux, M, Lieutier, F (2011) Estimating the effect of poplar resistance on the performance of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii*, in various experimental conditions. *Can. J. For. Res.* 41: 1233-1241.
- Pointeau S, Ameline A, Laurans F, Sallé A, Rahbé Y, Bankhead-Dronnet S, Lieutier F (2012) Exceptional plant penetration and feeding upon cortical parenchyma cells by the woolly poplar aphid. *J. Ins. Physiol.* 58: 857-866.
- Pointeau S, Ameline A, Sallé A, Bankhead-Dronnet S, Lieutier F (2013) Characterization of antibiosis and Antixenosis to the woolly poplar aphid (Hemiptera: Aphididae) in the bark of different poplar genotypes. *J. Econ. Entomol.* 106: 473-481.
- Price PW, Fernandes GW, Waring GL (1987) The adaptive nature of insect galls. *Environ. Entomol.* 16: 15-24.
- Pyati P, Bandani AR, Fitches E, Gatehouse JA (2011) Protein digestion in cereal aphids (*Sitobion avenae*) as a target for plant defence by endogenous proteinase inhibitors. *J. Ins. Physiol.* 57: 881-891.
- R Core Team (2013) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rahbé Y, Sauvion N, Febvay G, Peumans WJ, Gatehouse AMR (1995) Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol. Exp. Appl.* 76:143-155.
- Rossi AM, Stiling P (1998) The interactions of plant clone and abiotic factors on a gall-making midge. *Oecologia* 116: 170-176.

Sadeghi SE, Rajabi-Mazhar NA, Moharramipour S. (2007) A study on the incidence of woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Hom.: Aphididae), on poplar species and clones in Hamedan Province, Iran. *J. Entomol. Soc. Iran* 26: 47-59.

Saltzman KD, Giovanini MP, Zheng C, Williams CE (2008) Virulent Hessian fly larvae manipulate the free amino acid content of host wheat plants. *J. Chem. Ecol.* 34: 1401-1410.

Sandström J, Telang A, Moran NA (2000) Nutritional enhancement of host plants by aphids - a comparison of three aphid species on grasses. *J. Ins. Physiol.* 46: 33-40.

Schönrogge K, Harper LJ, Lichtenstein CP (2000) The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): similarities between cynipid galls and seeds. *Plant, Cell, Environ.* 23: 215-222.

Schoonhoven LM, Van Loon JJA, Dicke M (2006) *Insect-plant biology*. Oxford University Press, New York, USA. 440p.

Silva IM, Andrade GI, Fernandes GW, Lemos Filho JP (1996) Parasitic relationships between a gall-forming insect *Tomoplagia rudolphi* (Diptera: Tephritidae) and its host plant (*Vernonia polyanthes*, Asteraceae). *Ann. Bot.* 78: 45-48.

Strong DR, Lawton JH, Southwood R (1984) *Insects on plants. Community patterns and mechanisms*. CAB International, Wellingford, U. K. 313p.

Suzuki D, Fukushi Y, Akimoto S-I (2009) Do aphid galls provide good nutrients for the aphids?: Comparisons of amino acid concentrations in galls among *Tetraneura* species (Aphididae: Eriosomatinae). *Arthropod-Plant Interact.* 3: 241-247.

Wilkinson TL, Douglas AE (2002) Phloem amino acids and the host plant range of the polyphagous aphid, *Aphis fabae*. *Entomol. Exp. Appl.* 106: 103-113.

Appendix 1: Free amino acid contents (mean \pm SE, $\mu\text{g} / \text{mg}$ dry matter) in the bark of I-214 and I-45/51 poplar genotypes. Stem-cuttings were grown under three fertilization regimes (O: optimal, M: intermediate, L: low, see text for further details) and infested or not with *P. passerinii*.

	I-214						I-45/51					
	Infested			control			infested			control		
	O (n = 6)	I (n = 6)	L (n = 6)	O (n = 4)	I (n = 4)	L (n = 4)	O (n = 6)	I (n = 5)	L (n = 5)	O (n = 4)	I (n = 5)	L (n = 4)
Ala	0.93 \pm 0.26	0.57 \pm 0.23	0.21 \pm 0.07	1.20 \pm 0.43	0.14 \pm 0.08	0.08 \pm 0.02	0.68 \pm 0.22	0.35 \pm 0.17	0.06 \pm 0.01	0.61 \pm 0.25	0.27 \pm 0.04	0.04 \pm 0.01
Gly	0.64 \pm 0.28	0.34 \pm 0.09	0.49 \pm 0.16	0.56 \pm 0.16	0.15 \pm 0.07	0.18 \pm 0.07	0.63 \pm 0.27	0.49 \pm 0.30	0.24 \pm 0.13	0.53 \pm 0.18	0.24 \pm 0.06	0.22 \pm 0.13
Val	0.64 \pm 0.21	0.41 \pm 0.05	0.32 \pm 0.11	0.77 \pm 0.31	0.27 \pm 0.12	0.11 \pm 0.02	0.46 \pm 0.16	0.49 \pm 0.15	0.08 \pm 0.01	0.37 \pm 0.13	0.58 \pm 0.19	0.06 \pm 0.01
Leu	0.10 \pm 0.03	0.07 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.06 \pm 0.03	0.06 \pm 0.02	0.01 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.01 \pm 0.00
Ile	0.27 \pm 0.10	0.21 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02	0.32 \pm 0.11	0.13 \pm 0.06	0.09 \pm 0.05	0.30 \pm 0.05	0.23 \pm 0.09	0.03 \pm 0.01	0.18 \pm 0.05	0.17 \pm 0.08	0.02 \pm 0.01
Thr Ser	7.97 \pm 1.23	4.45 \pm 1.19	2.62 \pm 0.35	3.33 \pm 0.68	0.90 \pm 0.27	0.51 \pm 0.14	2.07 \pm 0.31	1.76 \pm 0.56	0.46 \pm 0.19	3.56 \pm 1.04	2.19 \pm 0.79	0.21 \pm 0.08
Pro	0.22 \pm 0.04	0.22 \pm 0.04	0.14 \pm 0.03	0.32 \pm 0.13	0.12 \pm 0.04	0.05 \pm 0.01	0.23 \pm 0.11	0.25 \pm 0.08	0.05 \pm 0.01	0.10 \pm 0.04	0.09 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01
Asn	0.35 \pm 0.13	0.17 \pm 0.05	0.08 \pm 0.02	0.56 \pm 0.15	0.14 \pm 0.08	0.04 \pm 0.00	0.56 \pm 0.24	0.28 \pm 0.12	0.06 \pm 0.03	0.22 \pm 0.15	0.19 \pm 0.09	0.04 \pm 0.01
Arg Asp Met	2.34 \pm 0.51	1.81 \pm 0.32	2.47 \pm 0.68	2.01 \pm 0.49	0.88 \pm 0.35	0.57 \pm 0.12	1.14 \pm 0.41	1.10 \pm 0.25	0.35 \pm 0.08	1.38 \pm 0.58	1.14 \pm 0.14	0.41 \pm 0.14
Glu Phe Cys	0.80 \pm 0.08	0.45 \pm 0.05	0.79 \pm 0.18	0.51 \pm 0.14	0.21 \pm 0.09	0.14 \pm 0.02	0.34 \pm 0.14	0.56 \pm 0.23	0.09 \pm 0.02	0.31 \pm 0.12	0.16 \pm 0.06	0.05 \pm 0.02
Gln	0.07 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.15 \pm 0.11	0.07 \pm 0.04	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00	0.12 \pm 0.10	0.05 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02
Orn	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.04 \pm 0.03	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.14 \pm 0.13	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.03 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01
Lys	0.06 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.10 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.04 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00
Tyr	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
Trp	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.09 \pm 0.08	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.01 \pm 0.00

Appendix 2: Protein-bound amino acid contents (mean \pm SE, μg / mg dry matter) in the bark of I-214 and I-45/51 poplar genotypes. Stem-cuttings were grown under three fertilization regimes (O: optimal, I: intermediate, L: low, see text for further details) and infested or not with *P. passerinii*.

	I-214							I-45/51							
	Infested			control				infested			control				
	O (n = 6)	I (n = 7)	L (n = 7)	O (n = 4)	I (n = 5)	L (n = 5)	O (n = 7)	I (n = 6)	L (n = 7)	O (n = 5)	I (n = 5)	L (n = 5)	O (n = 5)	I (n = 5)	L (n = 5)
Ala	5.00 \pm 1.02	4.35 \pm 1.03	5.42 \pm 1.15	3.80 \pm 1.14	5.53 \pm 1.57	2.09 \pm 0.24	3.63 \pm 0.72	3.74 \pm 1.52	2.49 \pm 0.45	4.83 \pm 1.11	2.57 \pm 0.93	1.96 \pm 0.53			
Gly	3.34 \pm 0.52	2.93 \pm 0.58	3.42 \pm 0.61	2.71 \pm 1.69	3.45 \pm 1.03	1.91 \pm 0.40	2.65 \pm 0.76	3.37 \pm 1.33	1.42 \pm 0.25	3.67 \pm 0.99	2.12 \pm 0.87	1.96 \pm 0.73			
Val	3.81 \pm 1.11	4.64 \pm 2.78	3.02 \pm 0.71	1.70 \pm 0.71	2.00 \pm 0.53	0.91 \pm 0.12	2.19 \pm 0.42	2.52 \pm 1.23	1.38 \pm 0.22	3.11 \pm 0.98	3.16 \pm 1.79	1.06 \pm 0.17			
Leu	3.66 \pm 1.10	2.07 \pm 0.37	2.99 \pm 0.68	1.33 \pm 0.46	2.00 \pm 0.56	0.84 \pm 0.05	1.87 \pm 0.19	2.03 \pm 1.00	1.13 \pm 0.20	2.88 \pm 0.89	1.21 \pm 0.46	1.16 \pm 0.17			
Ile	3.02 \pm 0.80	1.56 \pm 0.20	2.67 \pm 0.54	1.32 \pm 0.45	1.77 \pm 0.49	0.63 \pm 0.04	1.74 \pm 0.26	2.01 \pm 1.10	0.79 \pm 0.22	2.36 \pm 0.70	0.91 \pm 0.37	0.87 \pm 0.13			
Thr Ser	5.27 \pm 1.35	4.16 \pm 1.85	2.61 \pm 0.90	1.61 \pm 0.37	2.10 \pm 1.07	1.75 \pm 0.97	2.06 \pm 0.33	1.91 \pm 1.11	0.91 \pm 0.23	3.80 \pm 0.92	1.09 \pm 0.36	1.15 \pm 0.56			
Pro	1.09 \pm 0.30	0.60 \pm 0.12	1.21 \pm 0.44	0.72 \pm 0.40	1.14 \pm 0.31	0.59 \pm 0.06	0.74 \pm 0.19	1.62 \pm 0.92	0.66 \pm 0.08	1.25 \pm 0.29	0.63 \pm 0.25	0.39 \pm 0.09			
Asn	0.15 \pm 0.05	0.12 \pm 0.06	0.20 \pm 0.06	0.12 \pm 0.02	0.35 \pm 0.21	0.11 \pm 0.04	0.12 \pm 0.03	0.19 \pm 0.09	0.10 \pm 0.02	0.26 \pm 0.08	0.13 \pm 0.03	0.31 \pm 0.07			
Arg Asp Met	1.50 \pm 0.69	1.05 \pm 0.78	0.51 \pm 0.20	0.21 \pm 0.08	0.83 \pm 0.20	1.13 \pm 0.68	0.70 \pm 0.28	0.48 \pm 0.22	1.01 \pm 0.83	0.51 \pm 0.10	0.88 \pm 0.39	3.33 \pm 0.98			
Glu Phe Cys	17.4 \pm 6.0	8.08 \pm 1.39	13.1 \pm 3.2	6.10 \pm 1.58	9.25 \pm 3.45	3.82 \pm 0.64	7.25 \pm 0.60	4.24 \pm 0.52	4.58 \pm 0.94	13.8 \pm 4.4	5.53 \pm 2.26	4.89 \pm 0.63			
Gln	0.83 \pm 0.31	0.41 \pm 0.06	1.03 \pm 0.29	0.72 \pm 0.40	0.37 \pm 0.14	0.63 \pm 0.18	0.36 \pm 0.10	0.41 \pm 0.12	0.23 \pm 0.06	0.81 \pm 0.36	0.23 \pm 0.04	0.51 \pm 0.32			
Lys	20.1 \pm 4.5	8.78 \pm 1.38	12.5 \pm 2.4	5.60 \pm 1.27	5.47 \pm 3.14	2.77 \pm 0.40	6.98 \pm 1.34	4.41 \pm 0.86	3.91 \pm 1.22	7.07 \pm 2.96	4.87 \pm 2.32	3.35 \pm 0.41			
Tyr	4.65 \pm 1.11	2.46 \pm 0.21	2.87 \pm 0.84	1.45 \pm 0.28	1.51 \pm 0.89	0.52 \pm 0.09	1.83 \pm 0.52	1.97 \pm 0.75	0.77 \pm 0.25	2.83 \pm 0.46	1.15 \pm 0.44	0.55 \pm 0.13			
Trp	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.07 \pm 0.04	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01	0.71 \pm 0.69	0.04 \pm 0.02	0.09 \pm 0.04	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01			

CHAPITRE 4 : Impacts de l'irrigation du sol sur les interactions arbre -puceron

Objectifs :

- Déterminer l'impact du statut hydrique du sol sur le développement du puceron lanigère du peuplier.
- Etudier l'effet du déficit hydrique sur la croissance des pseudogalles induites par le puceron.
 - Evaluer si les effets du déficit hydrique sur les interactions puceron-peuplier dépendent du génotype de la plante-hôte et de son niveau de résistance

Article 4 :

Host genotype modulates the effects of water deficit on a plant-manipulating aphid

F. Dardeau, A. Berthier, M. Feinard-Duranceau, F. Brignolas,
F. Laurans, F. Lieutier, A. Sallé

Soumis prochainement

PRESENTATION DE L'ARTICLE 4

I. Contexte

Dans un contexte où une augmentation de la fréquence et de l'intensité des épisodes de sécheresse est attendue dans plusieurs régions du monde (Allen et al. 2010; Lindner et al. 2010; IPCC 2013), le peuplier, connu pour sa sensibilité au déficit hydrique (Bréda et al. 2006) pourrait être particulièrement touché. On sait qu'un déficit hydrique peut augmenter ou diminuer les concentrations en nutriments et en composés de défense des plantes (Brodbeck & Strong 1987; Inbar et al. 2001; Gutbrodt et al. 2011; Walter et al. 2012), et ainsi modifier leur résistance aux herbivores (Koricheva et al. 1998; Huberty & Denno 2004; Jactel et al. 2012). Le déficit hydrique peut avoir des effets variables sur le niveau de résistance des plantes en fonction de l'intensité du stress généré (Larsson 1989; Koricheva et al. 1998; Huberty & Denno 2004; Jactel et al. 2012) et la stratégie d'exploitation de la plante par l'herbivore (Koricheva et al. 1998; Huberty & Denno 2004). Le cas des insectes cécidogènes peut être assez complexe car ils interagissent à la fois avec le métabolisme primaire et secondaire de leur hôte (Nyman & Julkunen-Tiitto 2000; Matsukura et al. 2012). Si un déficit hydrique semble généralement avoir un effet négatif sur les insectes cécidogènes (Koricheva et al. 1998, Huberty et Denno 2004), ces derniers peuvent toutefois être favorisés dans certains cas si les mécanismes de résistance de la plante sont altérés (De Bruyn 1995; Björkman 1998; 2000).

La formation de la pseudogalle induite par *P. passerinii* nécessite des multiplications et des croissances cellulaires importantes, entraînant ponctuellement des hypertrophies (cf. Chap. 2). Une altération du métabolisme primaire pourrait par conséquent avoir des effets négatifs sur l'insecte. La résistance à cet insecte semble pour partie faire intervenir des processus de lignification (cf. chap. 2). Une altération du métabolisme secondaire pourrait ainsi, chez les génotypes résistants, avoir des effets positifs sur l'insecte. Les objectifs de cette étude étaient (i) tester si un déficit hydrique modifie le développement du puceron et la formation de la pseudogalle et (ii) tester si l'effet d'un déficit hydrique sur les interactions peuplier/puceron lanigère peut dépendre du niveau résistance de l'hôte. Nous avons donc comparé les effets de trois niveaux d'irrigation sur les interactions du puceron avec deux génotypes de peuplier aux niveaux de résistance contrastés.

II. Protocole général

- **Peupliers et conditions expérimentales :** deux génotypes de peuplier ont été utilisés dont un très sensible à *P. passerinii* (I-214) et un de résistance intermédiaire (I-45/51) affectant le développement des colonies mais pas l'installation des pucerons (Pointeau et al. 2011). L'expérience a été réalisée en serre avec des boutures en pot, séparées en

trois groupes pour chaque génotype. Le premier groupe a été maintenu en irrigation automatique (irrigation haute WH) et les deux autres groupes ont été arrosés manuellement afin de diminuer respectivement de un tiers (irrigation intermédiaire WI) et deux tiers (irrigation légère WL) les volumes d'eau apportés. Le statut hydrique du sol pour les trois modalités d'irrigation a été évalué par des mesures du potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{pd}) avant l'installation de pucerons et en fin d'expérience.

- **Suivi de la croissance et de la physiologie des peupliers** : La croissance des plants, leur architecture et leur activité photosynthétique ont été suivies régulièrement à partir de la mise en place des trois modalités d'irrigation.
- **Infestations et suivi des colonies de *P. passerinii*** : 5 semaines après la modification des modalités d'irrigation, des larves ont été déposées sur une partie des boutures, pour chaque modalité, et le développement des colonies qui en ont découlées a ensuite été suivi pendant 5 semaines en estimant les surfaces de colonies (Pointeau et al. 2011).
- **Réactions des tissus corticaux** : en fin d'expérience, les modifications des tissus corticaux de peuplier ont été observées grâce à des coupes transversales fraîches (40 μm) colorées au Carmino-vert sur quelques échantillons (cf. Chap. 1). La surface totale des pseudogalles et de la surface de ce tissu contenant des cellules lignifiées ont été mesurées et le pourcentage de lignification des pseudogalles a été estimé.

III. Principaux résultats

- **Statut hydrique du sol** : les modalités d'arrosage ont affecté le statut hydrique du sol de la même façon pour les deux génotypes, avec une diminution progressive du déficit hydrique pendant l'avancée de l'expérience. Les modalités d'irrigation ont été bien différenciées avec des valeurs de Ψ_{pd} ayant atteint -0.10, -0.49 et -0.75 MPa pour les modalités de haute (WH), intermédiaire (WI) et légère (WL) irrigation respectivement.
- **Croissance et physiologie des peupliers** : pour les deux génotypes, la diminution d'arrosage a significativement affecté la croissance, réduit le nombre de rameaux secondaires et diminué l'activité photosynthétique.
- **Réactions corticales des peupliers** : le déficit hydrique n'a pas empêché l'apparition de multiplications cellulaires et de lignification, mais a réduit l'extension la taille des pseudogalles dans les deux génotypes. Le pourcentage de pseudogalle lignifiée n'a pas été affecté significativement par le niveau d'irrigation, mais a eu tendance à augmenter avec l'intensification du déficit hydrique dans le génotype sensible, et au contraire à diminuer dans le génotype résistant.
- **Développement des colonies de pucerons** : seul le déficit hydrique fort a affecté la taille des colonies la taille des colonies sur le génotype sensible de peuplier. Sur le génotype

résistant, l'irrigation intermédiaire (WI) a augmenté la croissance des colonies par rapport à l'irrigation optimale (WH) et faible (WL).

IV. Conclusions

Les cécidogènes sont généralement négativement affectés par un déficit hydrique, principalement parce que la réduction de croissance générale de la plante se traduit également dans le développement des tissus manipulés (Larsson 1989; Koricheva et al. 1998; Huberty & Denno 2004). Si cela se confirme dans notre étude sur le génotype de peuplier sensible, un déficit hydrique intermédiaire améliore au contraire les performances de *P. passerinii* sur le génotype résistant. Cela pourrait être dû soit à une réponse différente des génotypes à la contrainte hydrique se traduisant par des réponses différentes à l'attaque du puceron, soit à une perturbation de mécanismes de défense existant uniquement sur le génotype résistant.

Les deux génotypes de peuplier ont globalement répondu de la même façon aux déficits hydriques, qui ont fortement affecté leur développement. En réponse, la taille de la pseudogalle de *P. passerinii* a été d'autant plus diminuée que le déficit hydrique était fort, ce qui est classiquement observé chez les insectes cécidogènes (Birch et al. 1992; De Bruyn 1995; Björkman 1998; 2000). Cependant, les performances des pucerons n'ont pas évolué de façon linéaire avec la taille des pseudogalles. Alors que la pseudogalle était déjà affectée par le déficit hydrique d'intensité intermédiaire (WI), la taille des colonies n'a pas diminué sur I-214 et a même au contraire augmenté sur I-45/51. Or, la taille des galles est d'ordinaire reliée aux performances de ses habitants (Birch et al. 1992; Glynn & Larsson 1994; Mckinnon et al. 1999). Il est possible que le déficit hydrique ait modifié les allocations entre puits métaboliques au sein de la plante. En diminuant le nombre de rameaux secondaires, le déficit hydrique a pu ainsi favoriser la translocation des nutriments normalement alloués à leur formation vers la pseudogalle et ainsi contrebalancer les effets négatifs sur la croissance de la galle, au moins dans le cas de l'irrigation intermédiaire (WI). Sous irrigation légère (WL), il est probable que l'impossibilité pour le puceron à créer un tissu suffisamment mobilisateur de nutriments ait affecté son développement.

Comme les deux génotypes ont répondu de façon similaire au déficit hydrique intermédiaire, l'amélioration des performances du puceron sur génotype résistant I-45/51 est probablement due à une atténuation de ses mécanismes de défense. Les plantes luttent souvent contre les insectes cécidogènes en produisant des métabolites secondaires comme des composés phénoliques ou en déclenchant des réponses hypersensibles (Raman et al. 2009; Björkman 2000; Fernandes & Negreiros 2001; Höglund et al. 2005). Concernant *P. passerinii*, les génotypes de peuplier résistants accumulent des composés phénoliques et renforcent leurs parois cellulaires par une lignification étendue (Dardeau et al. 2014a, cf. Chap. 1). Ici la surface de lignification a diminué avec l'intensité du stress hydrique, mais aucune différence significative n'a été montrée cependant entre génotypes.

Article 4

Host genotype modulates the effects of water deficit on a plant-manipulating aphid

Dardeau F. ⁽¹⁾, Berthier A. ⁽¹⁾, Feinard-Duranceau M. ^(1,2), Brignolas F. ^(1,2), Laurans F. ⁽³⁾, Lieutier F. ⁽¹⁾, Sallé A. ⁽¹⁾

¹ Université d'Orléans, UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, BP 6759, F-45067 Orléans, France

² INRA, USC1328 Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales, BP 6759, F-45067 Orléans, France

³ INRA, UR0588 Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, F-45075, Orléans, France

Abstract

Successful plant manipulation by herbivores requires a reconfiguration of both the primary and secondary metabolism of the plant. Water deficit can interfere with the primary and secondary metabolisms and is generally predicted to negatively affect the development of gall-inducing insects. We assessed whether host genotype could modulate water deficit effects on a gall-inducing aphid, *Phloeomyzus passerinii*, developing on poplars, which are known to be among the most susceptible trees to water deficit. Stem-cuttings of two poplar genotypes, with a different resistance level to *P. passerinii*, were grown under three irrigation treatments, and subsequently infested with the same aphid clone. Plant growth parameters and aphid colonies development were recorded, and the development and organization of the pseudogall induced by the aphid was observed thanks to histological investigations. The three irrigation treatments resulted in three levels of water deficit. Mean predawn leaf water potential reached -0.10, -0.49 and -0.75 MPa in the high, intermediate and low irrigation treatments respectively. In both genotypes, growth, architecture and photosynthesis were similarly affected. The severe water deficit negatively reduced the development of aphids on both genotypes. Nonetheless, while the intermediate water deficit did not affect the development of aphids on the susceptible genotype, it enhanced their development on the resistant one. The size of the pseudogall induced by the aphids in the bark of their host progressively diminished when water deficit increased. Lignification, believed to be an important component of poplar resistance to *P. passerinii*, also progressively decreased with water deficit. The involvement of physiological and architecture modifications due to water deficit on the development of aphids is discussed. The results demonstrate that host genotype can modulate water deficit effects on the development of a galling aphid thereby affecting predictions on the outcome of droughts on stand resistance to plant-manipulating herbivores.

Key words: gall, lignification, nutrient sinks, *Phloeomyzus passerinii*, *Populus*

Introduction

In different regions of the world, progressive increases in frequency and severity of droughts are expected during the upcoming century (Allen et al., 2010; Lindner et al., 2010; IPCC, 2013). This is a critical issue for plant-herbivore interactions as the availability of environmental resources can affect plants allocations to primary or secondary metabolisms. Water deficit is known to enhance or decrease both the nutritional value of plant tissues and their content in defensive compounds (Brodbeck and Strong, 1987; Inbar et al., 2001; Gutbrodt et al., 2011; Walter et al., 2012), which in turn modify their resistance to herbivores (Koricheva et al., 1998; Huberty and Denno, 2004; Jactel et al., 2012). Deficit intensity can affect the outcome of a water shortage on plant resistance level (Larsson, 1989; Koricheva et al., 1998; Huberty and Denno, 2004; Jactel et al. 2012). For instance, the growth differentiation hypothesis states that any environmental factor limiting more plant growth than photosynthesis would enhance secondary metabolism, and consequently host resistance to herbivores (Loomis, 1932; Herms and Mattson, 1992; Stamp, 2003). As a result, a higher host resistance level is generally expected for intermediate values within a resource gradient (Herms and Mattson, 1992; Stamp, 2003). A parabolic relationship between water availability and host resistance, with higher resistance levels during a mild stress, has been observed in some studies (Christiansen and Glosli, 1996; Sallé et al., 2008), but not consistently though (Glynn et al., 2004; Hale et al., 2005).

The impact of water deficit on plant-herbivore interactions may also depend on the feeding strategy of the herbivore. For instance, boring insects generally perform better on water stressed plants, while leaf-chewers are negatively affected (Koricheva et al., 1998; Huberty and Denno, 2004). For herbivores performing host manipulation, like gall-formers, the situation might be more complex though as, to achieve manipulation, these organisms generally have to alter both the primary and secondary metabolism of their host plant (Nyman and Julkunen-Tiitto, 2000; Matsukura et al., 2012; Body et al., 2013; Dardeau et al., *subm.*). The meta-analyses performed by Koricheva et al. (1998) and Huberty and Denno (2004) concluded that water deficit generally negatively affect the survival or colonization density of gall-formers. Nonetheless, several studies also indicated that although drought reduces gall size, it could have sometimes positive effects on galling success or gall densities, probably by altering resistance mechanisms (De Bruyn, 1995; Björkman, 1998; 2000). This suggests that drought could favor host plant manipulation in resistant hosts in situations where water deficit affects the resistance mechanisms, while still allowing a reconfiguration of their primary metabolism by the herbivore.

The woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Sign.), is a major pest of poplar stands in Europe, the Near East and Northern Africa, which following outbreaks can cause extended tree mortalities (Arzone and Vidano, 1984; Sadeghi et al., 2007; Baubet & Goudet, 2010). This aphid feeds upon the cortical parenchyma of poplar stems, where it induces pseudogalls, characterized by the multiplication of thin-walled hypertrophied cells, a depletion of soluble phenolic compounds and a peripheral lignification of cell walls (Poiteau

et al., 2012; Dardeau et al., 2014a). The pseudogall differentiation enhances nymphal development and optimizes the feeding behaviour of the aphids (Dardeau et al., 2014b). Poplar resistance to this insect is highly variable among poplar species and hybrids, and can affect aphid settlement, development and/or fecundity (Sadeghi et al., 2007; Pointeau et al., 2011; 2013). In resistant host genotypes, pseudogall formation can be totally or partially inhibited, through processes involving apparently a fast and extended lignification of the attacked host tissues (Dardeau et al., 2014a; 2014b). Depending on its intensity, water deficit can have no or a negative effect on lignin deposition in wound periderms which differentiate in wounded tree bark (Puritch and Mullick, 1975; Biggs and Cline, 1986), and could therefore alter poplar resistance to *P. passerinii*. Poplars are fast growing trees, requiring high water availability to sustain a high productivity (Tschaplinski & Blake, 1989; Tschaplinski et al., 1994), and are among the less resistant tree species to drought (Bréda et al., 2006). Global change, and the increase in drought occurrence and intensity, is then likely to affect poplar interactions with *P. passerinii*.

We have investigated how water deficit influenced the interactions of *P. passerinii* with its host tree. Our objectives were (i) to assess whether water deficit modified aphid development and pseudogall differentiation, (ii) to investigate whether water deficit interacted with host resistance. For this, we have considered the effect of three different levels of irrigation on aphid interactions with two poplar genotypes, with different resistance level to the aphid.

Materials and methods

Plants and insects

Stem-cuttings of I-214 and I-45/51, two of the most planted *Populus x canadensis* Moench. hybrids in France, were obtained in January 2012 from the experimental nursery of Guéméné Penfao (France). Previous experiments and field observations have indicated that I-214 is highly susceptible to *P. passerinii*, while I-45/51 negatively affects the development and fecundity of the aphid (Pointeau et al. 2011; 2013). *Phloeomyzus passerinii* develops a pseudogall in the cortical tissues of I-214 while the differentiation of the pseudogall is hampered in I-45/51 (Dardeau et al. 2014a), and host manipulation results in lower benefits for the aphid (Dardeau et al. 2014b).

Aphids originated from a colony established in October 2008 from an apterous parthenogenetic aphid collected at Reboursin (France). This clonal colony belongs to the most common haplotype that has so far been identified in France (Pointeau et al. unpublished data from combined analyses of three mitochondrial DNA fragments, Cytochrome oxidase I and II and Cytochrome b genetic fragments). The colony was

maintained under the breeding conditions developed by Arru (1974), in a climate controlled chamber (21 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ RH and 16L:8D photoperiod), on I-214 stem-cuttings.

Plants cultivation and infestation

Cultivation and infestation were performed in a greenhouse (INRA Orléans, France), where temperature was controlled (20 ± 2 °C). The experiment was performed with 75 stem-cuttings (30 cm-long) for each poplar genotype, distributed over 80 m². The stem-cuttings were kept at 5 °C until they were planted in February 2012 in 12 L pots filled with quartz sand. All buds except the terminal one were removed to allow growth of only one new shoot. Tap water irrigation was automated and regulated by a tensiometer to maintain the soil water content at field capacity. Seven weeks after planting 50 mL of a nutrient solution was manually applied to each plant. The nutrient solution was then applied twice a week, until the end of the experiment. The macroelements contained in the nutrient solution were (in mM) 268 NH₄NO₃, 77 K₂HPO₄, 37 CaCl₂, and 31 MgSO₄. The microelements were (in μM) 4834 H₃BO₃, 951 MnSO₄, 80 ZnSO₄, 33 CuSO₄, 11 Na₂MoO₄, and 14 FeSO₄.

Two weeks after (mid-April), the stem-cuttings of each genotype were randomly separated into three groups of 25 stem-cuttings, with different irrigation levels. The first group, with high water availability (WH), was kept at field capacity under automated irrigation until the end of experiment. The stem-cuttings of the second group, with an intermediate water availability (WI), received two thirds of the water volume provided by automated irrigation, while the third group, in which a low water availability was applied (WL), received only one third of this volume of water. Automated irrigation provided 300 ± 20 , 305 ± 15 and 350 ± 20 mL of water per day and per stem-cutting in April, May and June respectively, following poplars needs. The second and third groups were manually irrigated every other day with water volumes calculated to follow the automated irrigation evolution. Stem-cuttings of both genotypes were mixed and organized in 8 blocks for each water treatment with 5 to 8 individuals per block.

Five weeks after the beginning of the water shortage, 20 plants per modality were infested with aphids. Three apterous parthenogenetic females were deposited at mid-height on the initial shoot of the stem-cuttings, under a gelatin capsule for 48 h. The establishment of aphids was then checked, and new infestations were performed until stem-cuttings had 6 to 10 established nymphs. Once nymphs were established, the apterous parthenogenetic females, extra nymphs and gelatin capsules were removed. All poplars with less than 6 nymphs after 10 days were removed from the experiment, leaving 15 to 19 replicates per modality. To prevent the contamination of uninfested controls, colonies development on infested plants was restricted to the lignified section of the stem-cutting by applying glue at the base and at the top. The colonies developed during five weeks, and then the experiment was stopped.

Plants monitoring

Water status

Predawn leaf water potential (Ψ_{pd} , MPa) was used as an index for soil water potential and was measured with a pressure chamber (PWI Instruments, Albany, OR, USA) before infestation and at the end of the experiment ($n = 5$ per water treatment for each genotype in May and $n = 5$ per water and infestation treatments for each genotype in June). All measurements were made the same day and always a day before the manual watering of WI and WL poplars.

Plant growth and physiology

Once the different irrigation treatments were applied, the plant growth was monitored monthly with measurements of the basal diameter and height of the newly formed axial shoot on all stem-cuttings. The number of lateral shoots was also recorded. Just before the application of the different irrigation regimes (April) and at the end of the experiment (July), the dry biomass of roots and shoots, summing the initial shoot, the newly formed axial stem and the branches, were estimated. Samples were collected from 5 stem-cuttings per genotype in April and from 4 control and 10 infested stem-cuttings per modality in July. Samples were dried two days at 103°C before weighting. These dry biomasses were used to estimate the relative growth rates (RGR) of shoots and roots separately using the formula $RGR = [\ln(m_2) - \ln(m_1)]/\Delta t$, where m_1 is the average initial dry biomass for each genotype (April), m_2 is the measured final biomass (July) and Δt is the 79 days time interval between the two dates (Fichot et al., 2010).

Net CO₂ assimilation rate (A_{CO_2} , $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) was measured with a portable gas exchange system (LI-6400XT, Li-Cor) once before water shortage application and every month after, on the same stem-cuttings. Measurements were made during two successive sunny days between 10:00 h and 17:00 h local time on a fully illuminated leaf (foliar rank of 14 or 15, counting from the first top leaf exceeding 20 mm in length) ($n = 5$ per modality). Temperature (20°C), photosynthetic photon flux density ($1\ 500\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), air flow rate ($500\ \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$) and CO₂ flow ($400\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) were controlled in the leaf chamber. The average vapor pressure difference was 1.32 ± 0.03 kPa throughout the experiment. Measurements were logged after leaf equilibration inside the chamber.

Bark reactions

The pseudogall induced by *P. passerinii* in the bark of susceptible poplar genotypes can be distinguished, with histological investigations, as a tissue with multiplying cells, and slightly lignified areas in the center and at the periphery of this tissue (Dardeau et al. 2014a).

In resistant genotypes, similar elements are present but in a more diffuse and less organized pattern. In particular, lignification is generally more intense and extended within the pseudogall, probably interfering with cell multiplication and enlargement. Samples were collected by cutting 2 cm long sections of stem-cuttings. For infested samples, 3 stem-cuttings per water treatment and per genotype were used, providing 1 to 8 reaction areas per plant to be analyzed. Stem-cuttings were selected according to their aphid colony surface (see Aphid performance) to reflect the average colony surface encountered within each genotype and each water treatment. For uninfested stem-cuttings, 1 plant per genotype and per modality was used. For each sample, cross sections (40 μm) were soaked 10 min in 2.4 % (vol:vol) sodium hypochlorite, washed in distilled water, then immersed 3 min in 25 % (vol:vol) acetic acid, 8 min in Mirande's reagent (Deysson, 1954) and finally washed in distilled water. Sections were then mounted in water to observe anatomy and lignification of bark tissues. Cellulosic cell walls appeared in pink and lignified cell walls appeared in blue-green. Pictures were taken immediately and the software ImageJ 1.40 (National Institutes of Health) was used to measure the total area of the pseudogall and the area of the pseudogall with lignified cell walls. The percentage of the pseudogall area with lignified cell walls was also calculated.

Aphid performance

The growth of aphid colonies was monitored during 5 weeks, according to the protocol described by Poiteau et al. (2011). Briefly, every week a picture of the two opposite sides of an infested stem-cutting was taken. The colony area was then estimated using ImageJ 1.40. For each stem-cutting, the two opposite areas were summed.

Data analysis

All tests were carried out with the statistical software R 2.11.0 (R Development Core Team, 2013). Significance levels were set at $\alpha = 0.05$. As data did not meet the requisite for homoscedasticity and normality for all variables, comparisons of medians were performed with non-parametrical tests including Wilcoxon rank sum tests or Kruskal-Wallis tests, followed by pairwise Wilcoxon rank sum tests, with a Holm correction for multiple comparisons. Means are expressed with their standard error.

Results

Water status

As no significant infestation effect was observed results from infested and uninfested stem-cuttings were pooled for June measurements. The Ψ_{pd} never differed between poplar genotypes, within a same water treatment, in both May and June. Consequently the results of both genotypes were pooled. The Ψ_{pd} was close to 0 MPa throughout the experiment for the WH treatment (Fig. 1). After one month of water deficit and at the end of the experiment (Fig. 1), water treatments significantly affected Ψ_{pd} . Within each water treatments, Ψ_{pd} values significantly decreased between May and June ($p = 0.047$ for WH and $p < 0.001$ for WI and WL).

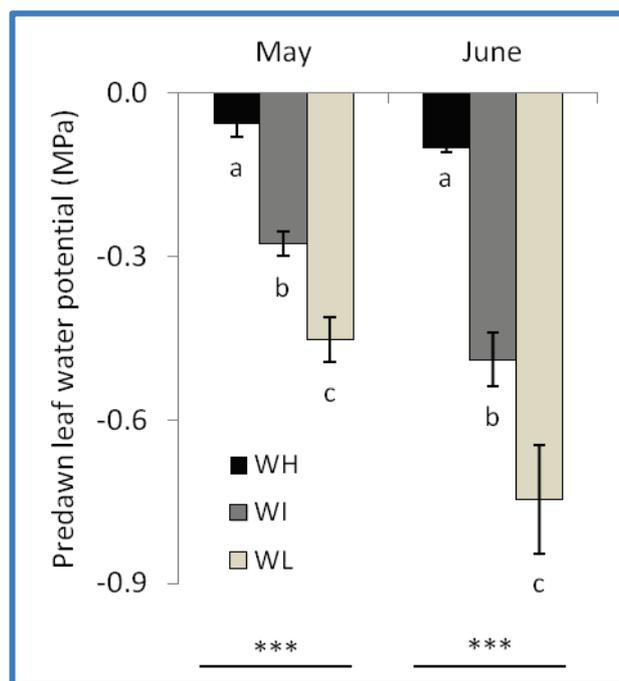


Figure 1: Predawn leaf water potential (Ψ_{pd} , \pm SE) of two *P. x canadensis* genotypes, I-214 and I-45/51, under three irrigation treatments (WH = high water availability, WI = intermediate water availability, WL = low water availability), five and ten weeks (May and June respectively) after the application of the water deficit. Different letters indicate significantly different groups at the same time of measurement ($\alpha = 0.05$, pairwise Wilcoxon rank sum test with a Holm correction). * indicate a significant irrigation effect on Ψ_{pd} for both genotypes ($\alpha < 0.001$, Kruskal-Wallis test).**

Plant growth and physiology

No significant infestation effect was detected on growth and physiological parameters; consequently results from infested and uninfested stem-cuttings were pooled.

Stem heights were smaller for I-45/51 than I-214 stem-cuttings all along the experiment ($p < 0.001$ for all water treatments) (Fig. 2a). For both genotypes, the water treatment significantly affected the apical growth as water shortage dramatically reduced the height of the newly formed shoots, and the reduction was more pronounced for the WL

treatment (Fig. 2a). Similarly, the basal diameters were always significantly smaller for I-45/51 than I-214 stem-cuttings, for every water treatments ($p < 0.01$ for all treatments in July). The radial growth was also affected by the water irrigation regime. The radial growth increment of I-214 stem-cuttings was 24.2 ± 0.3 , 11.7 ± 0.2 and 10.0 ± 0.1 mm for WH, WI and WL treatments respectively, and 22.29 ± 0.54 , 10.22 ± 0.16 and 8.61 ± 0.26 mm for WH, WI and WL treatments respectively, on I-45/51 stem-cuttings ($p < 0.001$ among all treatments).

The number of lateral shoots varied according to genotype and water treatments. For well-watered plants, the number of lateral shoots was higher in I-45/51 than in I-214 ($p < 0.01$) but it was lower for plants under an intermediate irrigation level ($p < 0.01$) (I-214: 8.3 ± 1.0 for WH, 2.2 ± 0.6 for WI, 1.8 ± 0.5 for WL; I-45/51: 14.8 ± 1.1 for WH, 0.14 ± 0.14 for WI, 1.45 ± 0.5 for WL). Water shortage significantly reduced the number of lateral shoots in both genotypes ($p < 0.001$ for both genotypes). For I-45/51, this number was significantly the lowest, and almost null, for the intermediate irrigation treatment ($p < 0.001$ compared to WH and $p < 0.01$ compared to WL).

Regarding RGR, no significant difference was observed between genotypes except for roots RGR in the WI treatment which was higher for I-45/51 ($p < 0.01$) (Fig. 2b). Water shortage significantly reduced shoots and roots RGR of both genotypes (Fig. 2b).

Before water deficit initiation, the A_{CO_2} was not significantly different between genotypes (Fig. 2c, April). In WH treatment, A_{CO_2} was higher for I-45/51 after one month of water deficit (May, $p < 0.01$) but not after. After one month of water deficit, no difference was observed between genotypes within the WI and WL treatments. After three months of water deficit, in WI treatment, A_{CO_2} was higher for I-214 stem-cuttings, while in WL treatment, it was higher for I-45/51 ($p < 0.05$) (Fig. 2c). For both genotypes, WI and WL treatments negatively affected the A_{CO_2} ($p < 0.001$ for both genotypes) (Fig. 2c). For both genotypes, and every irrigation regime, A_{CO_2} significantly decreased during the experiment ($p < 0.05$ in all cases).

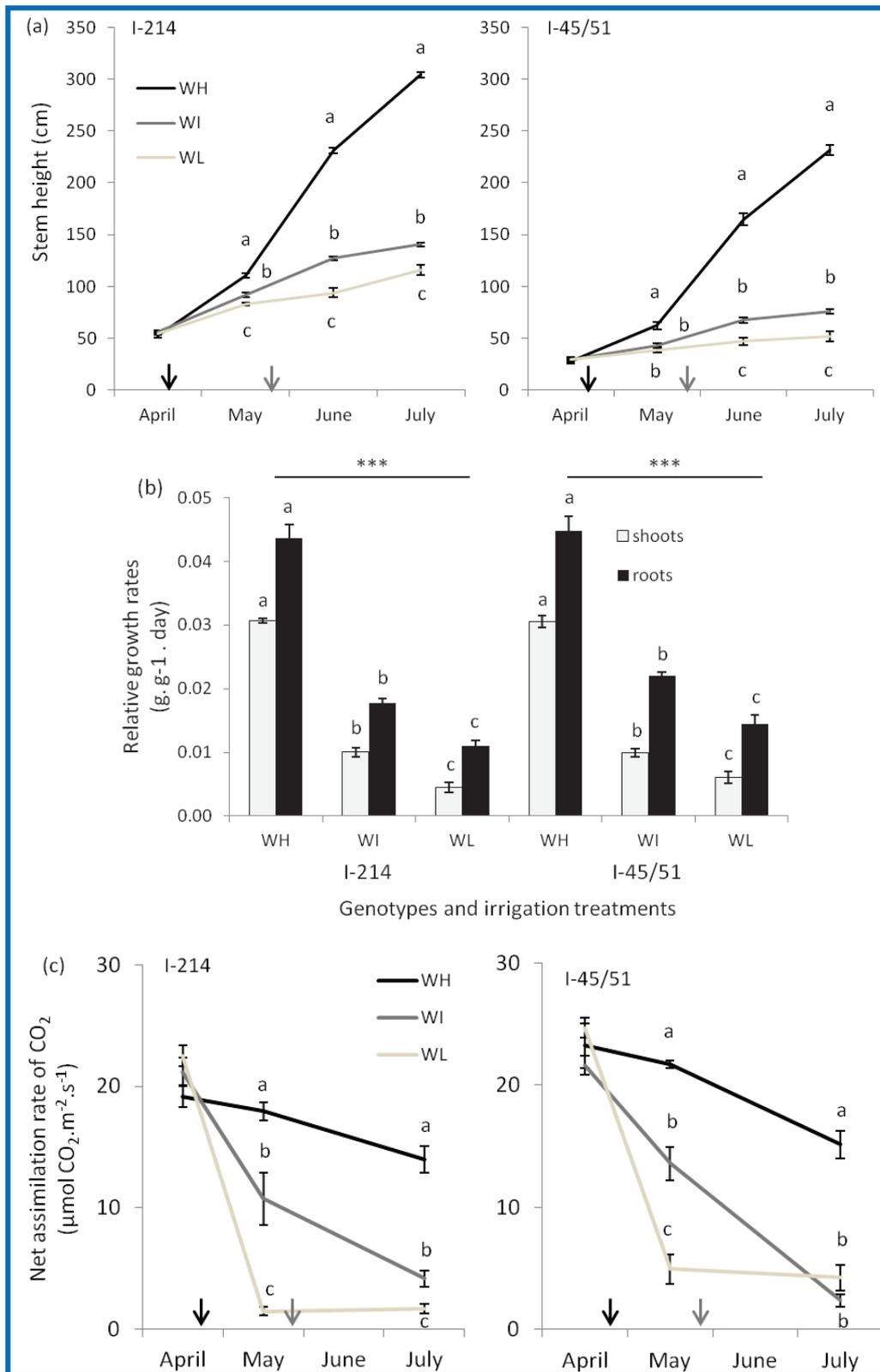


Figure 11: Growth and physiological parameters of stem-cuttings of two *P. x canadensis* genotypes, I-214 (left) and I-45/51 (right), under three irrigation treatments (WH = high water availability, WI = intermediate water availability, WL = low water availability). (a) mean stem height (\pm SE), (b) relative growth rates (RGR, \pm SE) of shoots (black bars) and roots (open bars), (c) net assimilation rate of CO₂ (\pm SE). In the figures (a) and (c), the black arrow indicates the beginning of water deficit application, and the grey arrow indicates the beginning of infestation by *P. passerinii*. Different letters between curves indicate significantly different groups at the same time of measurement ($\alpha = 0.05$, pairwise Wilcoxon rank sum test with a Holm correction). In the figures (b) * indicate a significant irrigation effect on roots and shoots RGR for both genotypes ($\alpha < 0.001$, Kruskal-Wallis test).**

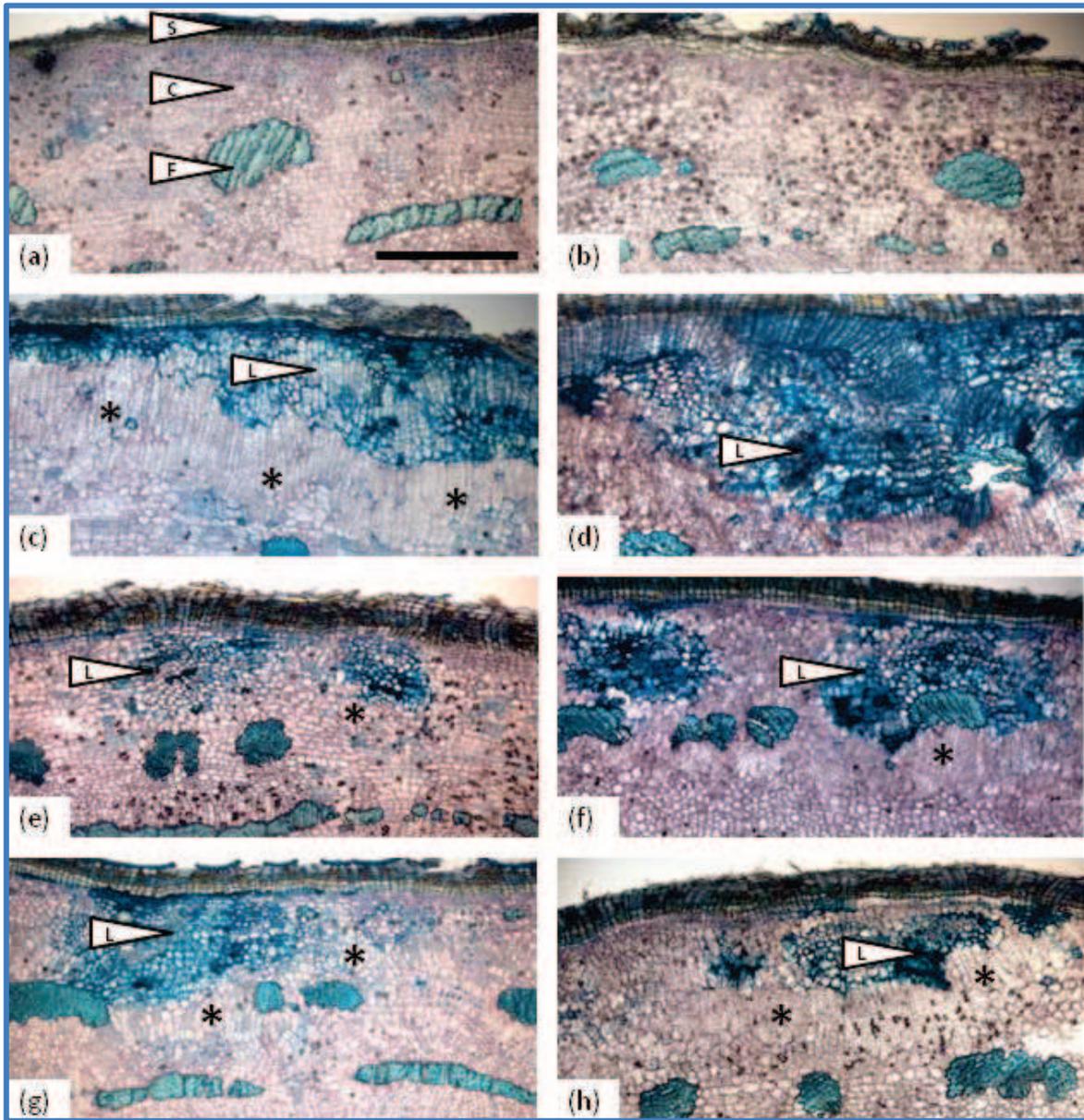


Figure 3: Fresh cross sections (40 μm) of the bark of two *P. x canadensis* genotypes, I-214 (left column) and I-45/51 (right column), infested or not with *Phloeomyzus passerinii*, and under three irrigation regimes, stained with Mirande's reagent. (a) and (b) are controls, without aphid, with high water availability. (c) and (d) are cortical reactions to *P. passerinii*, in plants under optimal irrigation, showing an extended cell multiplication area (*) for both genotypes and lignification (L). (e) and (f) are cortical reactions in plants with an intermediate irrigation level, showing a reduced cell multiplication area and lignification. (g) and (h) are cortical reactions in plants with a low irrigation level, showing a small cell multiplication area and a localized lignification. Mirande's reagent is showing cellulosic cell walls in pink and lignified cell walls in blue-green. S = suber, C = cortical parenchyma, F = sclerenchyma fibers, * = cell multiplication area, L = lignification. Black scale represents 0.5 mm.

Bark reactions

Infestations by *P. passerinii* induced typical pseudogalls in the susceptible poplar genotype (I-214), with stacked cells undergoing periclinal divisions, and localized lignification of cell walls, in the center and at the periphery of the reaction area (Fig. 3a, 3c). In the resistant genotype (I-45/51), lignification was more intense and extended, without precise localization (Fig. 3b, 3d). Water shortage did not affect the occurrence of cell multiplication and lignification, but sharply reduced their extension (Fig. 3e - h). The area of the pseudogall, and of its lignification did not differ significantly between genotypes. Water shortage reduced the size of the pseudogall and of the lignified area (Fig. 4). The percentage of the pseudogall area with lignified cell walls did not vary significantly between genotypes and according to the water regime. This percentage tended to increase when water shortage increased in I-214 ($34 \pm 7\%$ for WH, $47 \pm 4\%$ for WI and $69 \pm 5\%$ for WL), while it tended to decrease in I-45/51 ($58 \pm 6\%$ for WH, $46 \pm 3\%$ for WI and $39 \pm 9\%$ for WL).

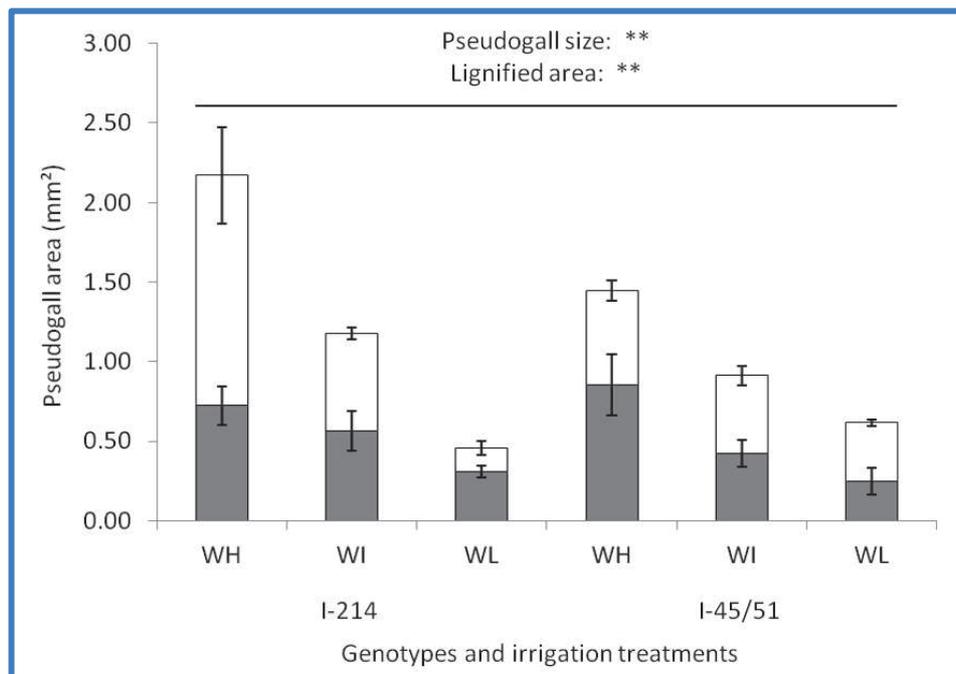


Figure 4: Size of pseudogalls induced by *P. passerinii* in the cortical parenchyma of two *P. x canadensis* genotypes, I-214 (left) and I-45/51 (right), under three irrigation treatments (WH = high water availability, WI = intermediate water availability, WL = low water availability). Black bars represent the mean surface (\pm SE) of the pseudogall with lignified cell walls, open bars represent the mean surface (\pm SE) of the pseudogall without lignified cell walls. ** indicate a significant irrigation effect on the size of pseudogall and lignified area ($\alpha < 0.01$, Kruskal-Wallis test).

Aphid performance

The surface of aphid colonies area was similar on both genotypes at the beginning of the monitoring (Fig. 5). In WH and WI treatments, colonies grew faster on I-214 than on I-45/51 ($p < 0.05$ for the second week and then $p < 0.001$ until the end of the experiment),

while they did not differ for the WL treatment. For I-214, water treatments affected the surfaces of aphid colonies after 2 weeks of monitoring ($H = 7.48$, $df = 2$, $p < 0.05$). The WL treatment negatively affected the size of colonies compared to both WH and WI treatments ($p < 0.001$ after 5 weeks of monitoring for both WH and WI treatments), but there was no difference between WI and WH treatments (Fig. 5). On I-45/51, water treatments affected the surfaces of aphid colonies after 4 weeks of monitoring ($H = 7.00$, $df = 2$, $p < 0.05$). The WI treatment enhanced the growth of aphid colonies compared to WH and WL treatments ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ after 5 weeks of monitoring for WH and WL treatments respectively), but no difference was observed between WH and WL treatments (Fig. 5).

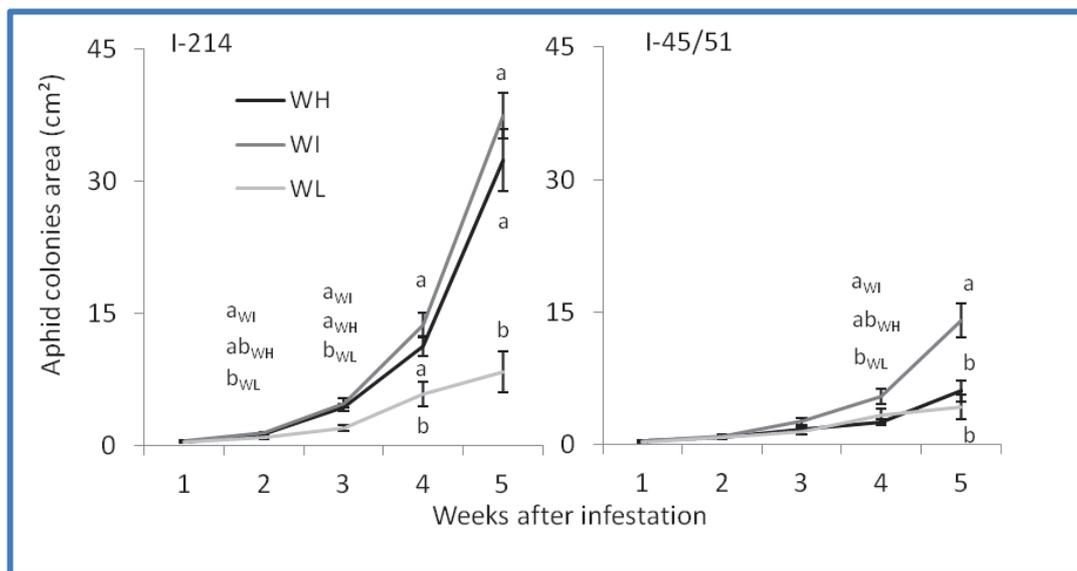


Figure 12: Evolution of the mean surface (\pm SE) of *Phloeomyzus passerinii*'s colonies on the bark of two *P. x canadensis* genotypes, I-214 (left) and I-45/51 (right), under three irrigation treatments (WH = high water availability, WI = intermediate water availability, WL = low water availability). Different letters indicate significantly different values between treatments ($\alpha = 0.05$, Wilcoxon rank sum test with a Holm correction).

Discussion

Host manipulating herbivores are predicted to be adversely affected by water deficit, mostly because the reduction in plant growth, due to water shortage, impairs the initiation and growth of manipulated tissues (Larsson, 1989; Koricheva et al., 1998; Huberty and Denno, 2004). Although our results with the susceptible host genotype support this prediction, we found that an intermediate water deficit enhanced the performance of this gall-inducing aphid on the resistant host genotype. This interacting effect between host genotype and water deficit on aphid performance can have different, but non-exclusive, origins. The two genotypes may have differed in their response to water shortage, which could in turn have resulted in different responses to aphid attacks. Alternatively water

shortage can have affected resistance mechanisms that occur only in the resistant poplar genotype, and not in the susceptible one.

Overall, the two poplar genotypes considered in our study responded similarly to water shortage, yet with slight variations in the intensity of their responses. The three irrigation regimes induced similar gradients of water deficit intensity, with lower predawn leaf water potentials when irrigation decreased. This resulted for both genotypes in a fast decrease in apical and radial growth, and in a sharp reduction of the number of lateral shoots. Although I-214 stem-cuttings were bigger than those of I-45/51, their relative growth rates (RGR) were close and decreased similarly when water deficit increased, except for roots RGR that was slightly but significantly higher for I-45/51 than for I-214 under the intermediate irrigation treatment. This is congruent with a previous field investigation that reported a lower tolerance to a mild drought for I-214 than for I-45/51 (Monclus et al., 2006). The net assimilation rate of CO₂ (A_{CO_2}) was also drastically reduced by water deficit for both genotypes. Stomatal closure is one of the earliest responses to drought, which, depending on water deficit intensity, can slightly decrease photosynthesis or totally inhibit it (Marron et al., 2013). For both genotypes, the reduction in A_{CO_2} was immediate and very sharp for the low irrigation treatment while it was more progressive for the intermediate irrigation treatment.

These modifications in host physiology, growth and architecture have in turn affected the interactions with the gall-inducing aphid. The size of the pseudogall decreased when the water deficit increased. This is congruent with previous observations on other gall-inducing insects (Birch et al. 1992, De Bruyn, 1995; Björkman, 1998; 2000). Surprisingly, the size of the manipulated tissue was not linearly related to aphid performance in our experiment. For the intermediate irrigation treatment, while the development of the pseudogall was already affected, the size of aphid colonies did not decrease on I-214 and even increased on I-45/51. Gall size is often related to galler performance though (Birch et al., 1992; Glynn and Larsson, 1994; Mc Kinnon et al., 1999). This suggests that there could be a threshold in pseudogall size above which the performance of *P. passerinii* is not improved anymore. An alternative hypothesis is that water deficit affected within-plant competition among sinks. Manipulated host tissues generally act as mobilizing sinks that can compete with the host-plant natural sinks and draw nutrients from the surrounding tissues (Larson and Whitham 1991, 1997; Silva et al. 1996; Hakkarainen et al. 2005). It has been hypothesized that the number of lateral shoots of poplar stem-cuttings could counteract the mobilization of amino acids by the pseudogall of *P. passerinii* (Dardeau et al. subm.). As water deficit strongly reduced the number of lateral shoots, it could have favored nutrients drain by the pseudogall, thereby counterbalancing the deleterious effects of the impairment of its growth, at least for the intermediate irrigation level. When water deficit was high, the sharp inhibition of pseudogall development probably impaired nutrient mobilization and consequently aphid development.

As responses to water deficit were quite similar between genotypes, the enhancement of aphid performance on the resistant poplar genotype, when the irrigation level was intermediate, would more likely be due to a release in resistance mechanisms. Resistance mechanisms to gall-inducing insects can involve secondary metabolites like phenolic compounds (Raman et al., 2009; Björkman, 2000), or hypersensitive responses with cell death, fast deposition of lignin and biosynthesis of secondary metabolites (Fernandes and Negreiros, 2001; Höglund et al., 2005). For *P. passerinii*, resistant poplar genotypes are characterized by a rapid accumulation of soluble phenolic compounds in the cortical parenchyma, which fade away within few weeks, and an intense and extended lignification across the reaction area (Dardeau et al. 2014a; 2014b). The surface of lignified cortical parenchyma in the tissues probed by the aphids decreased progressively when water deficit increased. This is congruent with previous studies mentioning an inhibition of lignification processes, but mostly during a severe water deficit (Puritch and Mullick 1975, Biggs and Cline 1986). No significant difference between genotypes was found for lignified surfaces or for the proportion of the reaction tissue with lignification, probably due to the limited number of replications that we were able to perform. Only trends were distinguished, which were congruent though with previous observations (Dardeau et al. 2014a; 2014b), since the reaction zones in the resistant I-45/51 were more lignified than in the susceptible I-214 for the optimal irrigation treatment. When water deficit increased, the proportion of reaction tissue with lignification tended to decrease in the resistant poplar genotype while it tended to increase in the susceptible one. This might have helped the aphid to achieve a better host manipulation and consequently improved its performance on the resistant genotype under intermediate water deficit. Further experiments would be necessary though to assess this hypothesis. The fact that an intermediate water deficit decrease host resistance in a resistant genotype contradicts the Growth Differentiation Balance Hypothesis (Herms and Mattson, 1992). Yet it should be noted that at the intermediate irrigation level, A_{CO_2} was already affected, hence it is unsure that secondary metabolites have accumulated. In addition the involvement of secondary metabolites, besides lignin, in poplar resistance to *P. passerinii* is still unclear.

Our results support the fact that, in addition to the feeding guild and deficit intensity, host genotype can affect the outcome of a water deficit on the interactions between an herbivore and its host plant, as described by Björkman (2000). For *P. passerinii*, an intermediate water deficit decreased the resistance of a resistant genotype, but aphid performance was still lower than on the susceptible genotype. Yet considering the high variability in resistance to *P. passerinii* among poplar genotypes available for plantation in Europe (Pointeau et al., 2011), the scenario could be very different depending on the genotypes considered, and predictions of pests population dynamics under drought conditions should therefore be performed with caution.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the French Ministry of Agriculture, Food Processing and Forest. The PhD thesis of F. Dardeau is granted by the French Ministry of Higher Education and Research.

References

- Allen C.D., Macalady A.K., Chenchouni H., Bachelet D., McDowell N., Vennetier M., Kitzberger T., Rigling A., Breshears D.D., Hogg E.H., Gonzalez P., Fensham R., Zhang Z., Castro J., Demidova N., Lim J.-H., Allard G., Running S. W., Semerci A., Cobb N. (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For. Ecol. Manage.* 259: 660–684.
- Arru G.M. (1974) Metodo per valutare la resistenza dei pioppi all’Afide lanigero (*Phloeomyzus passerinii* Sign.). *Cellulosa e Carta* 25: 45-49.
- Arzone A., Vidano C. (1984) Indagini su *Phloeomyzus passerinii* (Sign.) in Piemonte. *Ann. Fac. Sci. Agr. Univ. Torino* 13: 337-356.
- Baubet O., Goudet M. (2010) Situation du puceron lanigère en 2009. *For. Entr.* 194: 50-54.
- Biggs A.R., Cline R.A. (1986) Influence of irrigation on wound response in peach bark. *Can. J. Plant. Path.* 8: 405-408.
- Birch M.L., Bronner R., Rohfritsch O. (1992) Biology of *Dasineura affinis* (Cecidomyiidae) and influence of its gall on *Viola odorata*. In: Shorthouse J.D., Rohfritsch O. (eds) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, pp. 171-184.
- Björkman C. (1998) Opposite, linear and non-linear effects of plant stress on a galling aphid. *Scand. J. For. Res.* 13: 177-183.
- Björkman C. (2000) Interactive effects of host resistance and drought stress on the performance of a gall-making aphid living on Norway spruce. *Oecologia* 123: 223-231.
- Body M., Kaiser W., Dubreuil G., Casas J., Giron D. (2013) Leaf-miners co-opt microorganisms to enhance their nutritional environment. *J. Chem. Ecol.* 39: 969-977.
- Bréda N., Huc R., Granier A., Dreyer E. (2006) Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Ann. For. Sci.* 63: 625-644.
- Brodbeck B., Strong D. (1987) Amino acid nutrition of herbivorous insects and stress to host

Plants. In: Barbosa P., Shultz J.C. (eds) *Insect outbreaks*. Academic Press, San Diego, pp. 347-364.

Christiansen E., Glosli A.M. (1996) Mild drought enhances the resistance of Norway spruce to a bark beetle-transmitted blue-stain fungus. *USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. NC 183*: 192-199.

Dardeau F., Deprost E., Laurans F., Lainé V., Lieutier F., Sallé A. (2014a) Resistant poplar genotypes inhibit pseudogall formation by the wooly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* Sign. *Trees* 28: 1007-1019.

Dardeau F., Pointeau S., Ameline A., Laurans F., Cherqui A., Lieutier F., Sallé A. (2014b) Host manipulation by a herbivore optimizes its feeding behaviour. *Anim. Behav.* 95: 49-56.

Dardeau F., Body M., Berthier A., Miard F., Christidès J.-P., Feinard-Duranceau M., Brignolas F., Giron D., Lieutier F., Sallé A. (subm.) Effects of fertilization on amino acid mobilization by a plant-manipulating insect. *J. Chem. Ecol.*

De Bruyn L. (1995) Plant stress and larval performance of a dipterous gall former. *Oecologia* 101: 461-466.

Deysson G. (1954) *Eléments d'anatomie des plantes vasculaires*. Sedes, Paris, 266 p.

Fernandes G.W., Negreiros D. (2001) The occurrence and effectiveness of hypersensitive reaction against galling herbivores across host taxa. *Ecol. Entomol.* 26: 46-55.

Fichot R., Barigah T.S., Chamaillard S., Le Thiec D., Laurans F., Cochard H., Brignolas F. (2010) Common trade-offs between xylem resistance to cavitation and other physiological traits do not hold among unrelated *Populus deltoids* × *Populus nigra* hybrids. *Plant, cell & environ.* 33: 1553-1568.

Glynn C., Larsson S. (1994) Gall initiation success and fecundity of *Dasineura marginemtorquens* on variable *Salix viminalis* host plants. *Entomol. Exp. Appl.* 73: 11-17.

Glynn C., Rönnerberg-Wästljung A.C., Julkunen-Tiitto R., Weih M. (2004) Willow genotype, but not drought treatment, affects foliar phenolic concentrations and leaf-beetle resistance. *Entomol. Exp. Appl.* 113: 1-14.

Gutbrodt B., Mody K., Dorn S. (2011) Drought changes plant chemistry and causes contrasting responses in lepidopteran herbivores. *Oikos* 120: 1732-1740.

Hakkarainen H., Roininen H., Virtanen R. (2005) Negative impact of leaf galls on arctic-alpine dwarf willow, *Salix herbacea*. *Polar Biol.* 28: 647-651.

Hale B.K., Herms D.A., Hansen R.C., Clausen T.P., Arnold D. (2005) Effects of drought stress and nutrient availability on dry matter allocation, phenolic glycosides, and rapid induced resistance of poplar to two lymantriid defoliators. *J. Chem. Ecol.* 31: 2601-2620.

Herms D.A., Mattson W.J. (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Quart. Rev. Biol.* 67: 283-335.

Höglund S., Larsson S., Wingsle G. (2005) Both hypersensitive and non-hypersensitive responses are associated with resistance in *Salix viminalis* against the gall midge *Dasineura marginemtorquens*. *J. Exp. Bot.* 56: 3215-3222.

Huberty A.F., Denno R.F. (2004) Plant water stress and its consequences for herbivorous insects: a new synthesis. *Ecol.* 85: 1383-1398.

Inbar M., Doostdar H., Mayer R.T. (2001) Suitability of stressed and vigorous plants to various insect herbivores. *Oikos* 94: 228-235.

IPCC (2013) Summary for Policymakers. In: Stocker T.F., Qin D., Plattner G.-K., Tignor M., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P.M. (eds), *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge and New York.

Jactel H., Petit J., Desprez-Loustau M.L., Delzon S., Piou D., Battisti A., Koricheva J. (2012) Drought effects on damage by forest insects and pathogens: a meta-analysis. *Glob. Change Biol.* 18: 267-276.

Koricheva J., Larsson S., Haukioja E., Keinänen M. (1998) Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos* 83: 212-226.

Larson K.C., Whitham T.G. (1991) Manipulation of food resources by a gall-forming aphid: the physiology of sink-source interactions. *Oecologia* 88: 15-21.

Larson K.C., Whitham T.G. (1997) Competition between gall aphids and natural plant sinks: plant architecture affects resistance to galling. *Oecologia* 109: 575-582.

Larsson S. (1989) Stressful times for the plant stress: insect performance hypothesis. *Oikos* 56: 277-283.

Lindner M., Maroschek M., Netherer S., Kremer A., Barbati A., Garcia-Gonzalo J., Seidl R., Delzon S., Corona P., Kolström M., Lexer M.J., Marchetti M. (2010) Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *For. Ecol. Manage.* 259: 698-709.

Loomis W.E. (1932) Growth-differentiation balance vs. carbohydrate-nitrogen ratio. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 29: 240-245.

Marron N., Gielen B., Brignolas F., Gao J., Johnson J.D., Karnosky D.F., Polle A., Scarascia-Mugnozza G., Schroeder W.R., Ceulemans R. (2013) Abiotic Stresses. In: Isebrand J.G., Richardson J. (eds) *Poplars and Willows: Trees for Society and the Environment*, CABI, Wallingford, U.K. pp. 337-442.

Matsukura K., Matsumura M., Tokuda M. (2012) Host feeding by an herbivore improves the performance of offspring. *Evol. Biol.* 39: 341-347.

McKinnon M.L., Quiring D.T., Bauce E. (1999) Influence of tree growth rate, shoot size and foliar chemistry on the abundance and performance of a galling adelgids. *Funct. Ecol.* 13: 859-876.

Monclus R., Dreyer E., Villar M., Delmotte F.M., Delay D., Petit J.M., Barbaroux C., Le Thiec D., Bréchet C., Brignolas F. (2006). Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* × *Populus nigra*. *New Phytol.* 169: 765-777.

Nyman T., Julkunen-Tiitto R. (2000) Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *PNAS* 97: 13184–13187.

Pointeau S., Sallé A., Lesieur V., Bankhead-Dronnet S., Bonnaffoux M., Lieutier F. (2011) Estimating the effect of poplar resistance on the performance of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii*, in various experimental conditions. *Can. J. For. Res.* 41: 1233-1241.

Pointeau S., Ameline A., Laurans F., Sallé A., Rahbé Y., Bankhead-Dronnet S., Lieutier F. (2012) Exceptional plant penetration and feeding upon cortical parenchyma cells by the woolly poplar aphid. *J. Insect Physiol.* 58: 857-866.

Pointeau S., Ameline A., Sallé A., Bankhead-Dronnet S., Lieutier F. (2013) Characterization of antibiosis and Antixenosis to the woolly poplar aphid (Hemiptera: Aphididae) in the bark of different poplar genotypes. *J. Econ. Entomol.* 106: 473-481.

Puritch G.S., Mullick D.B. (1975) Effect of water stress on the rate of non-suberized impervious tissue formation following wounding in *Abies grandis*. *J. Exp. Bot.* 26: 903-910.

R Core Team (2013) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Raman A., Beiderbeck R., Herth W. (2009) Early subcellular responses of susceptible and resistant *Vitis* taxa to feeding by grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae*. *Bot. Helv.* 119: 31-39.

Sadeghi S.E., Rajabi-Mazhar N.A., Moharramipour S. (2007) A study on the incidence of woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Hom.: Aphididae), on poplar species and clones in Hamedan Province, Iran. *J. Entomol. Soc. Iran* 26: 47-59.

Sallé A., Ye H., Yart A., Lieutier F. (2008) Seasonal water stress and the resistance of *Pinus yunnanensis* to a bark-beetle-associated fungus. *Tree Physiol.* 28: 679-687.

Silva I.M., Andrade G.I., Fernandes G.W., Lemos Filho J.P. (1996) Parasitic relationships between a gall-forming insect *Tomoplagia rudolphi* (Diptera: Tephritidae) and its host plant (*Vernonia polyanthes*, Asteraceae). *Ann. Bot.* 78: 45-48.

Stamp N. (2003) Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Quart. Rev. Biol.* 78: 23-55.

Tschaplinski T.J., Blake T.J. (1989) Water-stress tolerance and late-season organic solute accumulation in hybrid poplar. *Can. J. Bot.* 67: 1681-1688.

Tschaplinski T.J., Tuskan G.A., Gunderson C.A. (1994) Water-stress tolerance of black and eastern cottonwood clones and four hybrid progeny. I. Growth, water relations, and gas exchange. *Can. J. For. Res.* 24: 364-371.

Walter J., Hein R., Auge H., Beierkuhnlein C., Löffler S., Reifenrath K., Schädler M., Weber M., Jentsch A. (2012) How do extreme drought and plant community composition affect host plant metabolites and herbivore performance? *Arthropod-Plant Interact.* 6: 15-25.

CONCLUSION GÉNÉRALE

1. Synthèse des travaux de la thèse

A. Caractérisation des interactions entre *Phloeomyzus passerinii* et son arbre hôte

Les travaux réalisés ont permis de démontrer que *P. passerinii* appartient, au sein des phytophages, à la guildes des galligènes comme les autres pucerons à stylets courts colonisant des tissus lignifiés. La réaction induite par l'insecte dans les tissus corticaux de son hôte est très différente d'un périoderme de blessure classiquement observable après une blessure mécanique. Cette réaction présente, chez un génotype sensible à l'insecte, une certaine organisation, avec une zone centrale en partie lignifiée, une zone périphérique caractérisée par des empilements de cellules en divisions et des cellules hypertrophiées et enfin une zone distale, peu épaisse, de cellules lignifiées avec des accumulations de composés phénoliques. La zone périphérique, avec ses multiplications et hypertrophies cellulaires présente des similitudes avec les tissus nourriciers induits par certains galligènes chez leur plante-hôte. Les modifications anatomiques n'entraînant que la déformation de tissus préexistants, et non la différenciation d'un organe nouveau, les tissus manipulés ont été qualifiés de pseudogalle pour cet insecte.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'intérêt de manipuler les tissus de sa plante-hôte pour un herbivore. Compte-tenu que les tissus différenciés par *P. passerinii* ne l'englobent pas, des effets de protection par rapport aux contraintes biotiques (prédateurs et parasites) et abiotiques (par exemple le dessèchement) sont peu probables. Reste l'hypothèse de nutrition (Price et al. 1987), stipulant que les galligènes manipulent les tissus de leur hôte afin d'optimiser leur valeur nutritive. Les analyses histochimiques, biochimiques, physiologiques et comportementales ont donné des résultats congruents, confortant cette hypothèse, et confirmant par conséquent la nature des tissus induits par le puceron lanigère. Les observations histochimiques ont indiqué notamment la disparition progressive de la zone périphérique de composés de défense, les composés phénoliques vacuolaires, présents de façon constitutive dans le parenchyme cortical. Ces observations indiquent aussi la disparition des réserves en amidon de la zone de réaction et de sa périphérie, ce qui suggère une remobilisation de ces réserves et la formation possible d'un puits métabolique au niveau de la pseudogalle consommant ces réserves. Les analyses biochimiques ont aussi montré que la pseudogalle est le siège d'une accumulation d'acides aminés libres, pour la plupart essentiels à l'alimentation des pucerons, ainsi que d'acides aminés protéiques. Ceci est concordant avec la possibilité de formation d'un puits

métabolique détournant les réserves carbonées et azotées de la plante. Ces modifications biochimiques, même si elles sont cohérentes avec une amélioration nutritive des tissus végétaux, ne suffisent pas cependant à appuyer l'hypothèse de nutrition car elles pourraient simplement résulter d'une réponse de la plante-hôte à l'agression. Néanmoins l'hypothèse de nutrition est aussi confortée par l'amélioration des performances démographiques des insectes sur les tissus modifiés et par le fait que ces tissus modifiés modifient nettement leur comportement de nutrition. En particulier la vitesse et le taux d'acceptation du substrat ont été nettement améliorés, ce qui confirme que les tissus modifiés en pseudogalle sont rapidement reconnus comme un substrat acceptable pour *P. passerinii* et/ou qu'ils stimulent leur consommation par le puceron.

Concernant l'impact de la nutrition du puceron sur le peuplier, les travaux d'histologie, sur le délai d'infestation considéré, n'ont pas permis de mettre en évidence des nécroses étendues dans les tissus infestés. Il est toutefois possible que sur des durées plus longues, les tissus de la pseudogalle, fortement sollicités, finissent par dépérir. Les déformations induites par la formation de la pseudogalle, si elles engendrent des gonflements visibles extérieurement sur des boutures, restent invisibles sur arbres en conditions naturelles, et restent superficielles. Compte-tenu de l'épaisseur du phloème chez les peupliers matures, il est peu probable que le gonflement de la pseudogalle dans le parenchyme cortical entraîne un blocage de la circulation de la sève élaborée, par exemple en écrasant les tissus conducteurs. En revanche la disparition des réserves en amidon et l'accumulation des acides aminés libres et protéiques suggère que la pseudogalle est un puits métabolique. Le recouvrement des troncs par des colonies de puceron, et la différenciation de pseudogalles sur de grandes surfaces, pourrait alors fortement affecter les allocations carbonées et azotées dans les arbres-hôtes.

B. Modulations des interactions par la résistance de l'hôte

Dans les génotypes de peuplier résistants, la formation de la pseudogalle est plus ou moins inhibée selon le niveau de résistance. Sur le génotype très résistant Brenta, la lignification et l'accumulation de composés phénoliques est extrêmement rapide après la piqûre, empêchant probablement la dé-différenciation puis re-différenciation des cellules du parenchyme. La formation de la pseudogalle est alors totalement inhibée. C'est pourquoi même si *P. passerinii* est capable de piquer dans l'écorce de ce génotype de peuplier, il n'y reste jamais plus d'une semaine et est donc incapable d'y développer des colonies. Sur le génotype de résistance intermédiaire, I-45/51, la formation de la pseudogalle est partiellement inhibée seulement. La lignification des parois se fait aussi de façon plus rapide, plus intense et plus étendue que sur le génotype sensible et pourrait limiter ou entraver la différenciation des trois zones de la pseudogalle observées dans le génotype sensible. La rigidification des tissus, suite à la lignification, pourrait être un frein à l'exploration des tissus

par *P. passerinii*. Les études réalisées grâce à l'EPG indiquent un ralentissement de la progression de ses stylets jusqu'au site de nutrition dans le génotype de résistance intermédiaire, ce qui oblige parfois le puceron à changer de site de piqûre et à piquer davantage sa plante-hôte que lorsqu'il est sur un génotype sensible. La lignification pourrait aussi contribuer à limiter les bénéfices nutritionnels de la pseudogalle. Bien que le comportement de nutrition indique une amélioration du substrat suite à la manipulation par l'insecte chez le génotype de résistance intermédiaire, l'intensité du puits métabolique induit semble être plus faible que chez le génotype sensible car aucune accumulation d'acides aminés n'a pu être détectée dans ces tissus lors de l'expérience de fertilisation.

Des composés phénoliques s'accumulent aussi les premières semaines au niveau du site de piqûre chez les génotypes résistants de peuplier, mais ils disparaissent ensuite progressivement des tissus de la pseudogalle. Leur implication dans les mécanismes de résistance du peuplier reste à établir. Classiquement, ce sont plutôt des mécanismes de réponse hypersensible qui interviennent dans la résistance des plantes-hôtes à des insectes galligènes. Ici rien ne permet d'affirmer que ce type de réponse intervient. En effet la réponse hypersensible est caractérisée par des nécroses cellulaires rapides qui n'ont pas été observée ici. Le mécanisme basé sur la lignification des tissus pourrait être une réponse originale à une tentative de manipulation par un herbivore.

C. Modulation des interactions par l'environnement

Par rapport aux deux paramètres environnementaux considérés, la contrainte hydrique et la fertilisation, seule la contrainte hydrique a nettement affecté les interactions entre le puceron lanigère et sa plante-hôte. Pour les deux paramètres, outre les aspects liés à la croissance de l'hôte et au métabolisme secondaire, les modifications d'architecture de la plante-hôte pourraient jouer un rôle très important dans la modulation des interactions, notamment en jouant sur les allocations de ressources au sein de la plante.

La fertilisation du sol a modifié la qualité nutritive potentielle des tissus de peuplier, notamment en augmentant les teneurs en acides aminés dans les tissus de l'écorce. Néanmoins, il semble que la manipulation du peuplier par *P. passerinii* soit modulable en fonction de la qualité nutritive des tissus, et donc indirectement en fonction de la fertilité du sol. En effet, l'intensité du puits métabolique généré par la pseudogalle est d'autant plus forte que le niveau de fertilisation est faible. Cela pourrait limiter les effets délétères d'une inadéquation nutritionnelle forte et en parallèle masquer les effets bénéfiques en termes de valeur nutritionnelle d'une fertilisation. Cette capacité à moduler les teneurs en composés nutritifs en fonction de leur concentration initiale, même si elle trouve son origine dans des modifications architecturales de la plante, pour conférer à l'insecte une certaine plasticité par rapport aux contraintes environnementales.

La contrainte hydrique a eu des effets sur les interactions puceron – peuplier dépendant à la fois de l'intensité de la contrainte exercée et du niveau de résistance de la plante-hôte considérée. Cette contrainte a notamment affecté deux paramètres fondamentaux de l'interaction entre *P. passerinii* et son arbre-hôte : la taille des tissus manipulés et la lignification de ces derniers. Pour le génotype sensible, I-214, un déficit de niveau intermédiaire a diminué la taille de la pseudogalle mais pas les performances du puceron. La qualité nutritive du tissu modifié est donc restée non limitante pour le puceron. Pour le génotype de résistance intermédiaire, I-45/51, ce même niveau d'irrigation intermédiaire a favorisé le développement des colonies de puceron par rapport aux conditions optimales. Si l'on considère les allocations en nutriments à l'échelle de la plante, cela peut être dû à une compétition entre puits métaboliques au sein de l'arbre. La production de rameaux ayant diminué avec le déficit hydrique, les nutriments ont pu alors être redirigés vers les pseudogalles. Il est aussi possible que la lignification des tissus de la pseudogalle ait été moins intense et que ce relâchement des mécanismes de résistance ait favorisé l'insecte. Enfin, un déficit hydrique plus fort diminue encore davantage l'étendue des pseudogalles et affecte le développement des pucerons même sur génotype sensible. Les tissus modifiés n'ont vraisemblablement pas pu constituer un tissu nutritif adéquat dans ce cas.

D. Apports des travaux réalisés à la thématique générale des interactions plantes-insectes phytophages

Les différentes expériences réalisées ont permis d'approfondir les connaissances sur la biologie et l'écologie du puceron lanigère du peuplier, un ravageur important des peupleraies, dont le mode de vie et les interactions avec son arbre-hôte étaient, jusqu'à récemment, assez mal connus. Les résultats obtenus ouvrent de nouvelles voies de recherche et d'applications potentielles pour la gestion de ce ravageur (cf. perspectives).

Dans un contexte plus large, ces travaux confirment des observations déjà réalisées avec d'autres modèles d'étude sur les interactions plantes - herbivores manipulateurs. La probable amélioration de la qualité nutritive des tissus *via* la disparition de composés toxiques (composés phénoliques solubles) et l'accumulation de composés nutritionnels (acides aminés) a été décrite précédemment pour d'autres manipulateurs de plantes (Price et al. 1987, Rey 1992; Rohfritsch 1992; Nyman & Julkunen-Tiitto 2000, Saltzmann et al. 2008, Suzuki et al. 2009). De même l'amélioration des performances des insectes sur les tissus manipulés a été plusieurs fois démontrée (Koyama et al. 2004, Diamond et al. 2008, Matsukura et al. 2012). Nos résultats confortent donc l'hypothèse de nutrition (Price et al. 1987).

Nos travaux apportent aussi des informations nouvelles sur les interactions complexes entre un herbivore manipulateur et sa plante-hôte. Tout d'abord les implications comportementales de l'hypothèse de nutrition n'avaient jamais été abordées avant ce travail. Nos résultats montrent que la manipulation engendre des modifications comportementales importantes en termes de nutrition, avec de probables conséquences adaptatives.

Les mécanismes de résistance qui semblent impliqués sont eux aussi originaux par rapport à la littérature et aux autres modèles étudiés puisqu'apparemment la résistance est liée à une capacité à lignifier les tissus explorés par le puceron, ce qui entrave la formation de sa pseudogalle, et affecte son comportement d'exploration et d'acceptation des tissus, et non à une réponse hypersensible comme cela a pu être décrit précédemment dans plusieurs systèmes plantes – galligènes (Balch et al. 1964, Miles 1989).

Il y a assez peu d'études qui ont été réalisées sur les modulations environnementales des interactions plantes – galligènes. Cependant plusieurs synthèses et méta-analyses s'accordent sur le fait que des contraintes environnementales affectant la croissance de la plante-hôte ont des effets négatifs sur les galligènes (Koricheva et al. 1998; Huberty & Denno 2004; Jactel et al. 2012). Nos résultats tempèrent un peu cette affirmation en montrant que ces effets négatifs sur la plante peuvent aussi, chez des génotypes résistants, amoindrir les réactions de défense et ainsi favoriser l'insecte. Cela a été rarement mis en évidence chez les galligènes et devrait davantage être pris en considération par rapport à des prédictions de dommages suite à des modifications environnementales. La plasticité observée dans l'amélioration du substrat nutritif a déjà été décrite pour d'autres galligènes. Notre travail repose cependant sur un gradient de conditions de fertilisation et suggère une manipulation d'autant plus forte des teneurs en composés nutritifs que l'inadéquation nutritionnelle est élevée, ce qui n'avait jamais été mis en avant auparavant.

II. Perspectives amenées par cette thèse

A. Mécanismes de manipulation par le puceron

S'il est acquis que *P. passerinii* initie la formation d'une pseudogalle dans les tissus corticaux du peuplier, on ne sait pas comment sont déclenchés les différents mécanismes de mise en place de ces tissus modifiés. Il est admis que les composés salivaires des insectes piqueurs jouent un rôle important dans les déformations générées dans les tissus de leur plante hôte (Miles 1968).

Plusieurs aspects font que l'analyse des sécrétions salivaires du puceron lanigère du peuplier serait intéressante à mener. Son mode de pénétration des tissus, très vulnérant, est atypique pour les pucerons en général et pourrait nécessiter une composition salivaire

particulière par rapport à celle étudiée chez les pucerons suceurs de sève plus classiques. L'action mécanique de la pénétration vulnérante des stylets pourrait être renforcée par une action chimique de la salive. D'autre part son action galligène implique probablement la présence d'effecteurs protéiques dans sa salive permettant une recombinaison du métabolisme de sa plante hôte. Des tests préliminaires ont permis la collecte de salive (collaboration Anas Cherqui, laboratoire BIPE, Amiens). Des analyses par protéomique de la salive et par transcriptomique des glandes salivaires seront réalisées prochainement dans le cadre du projet InsectEffect afin d'identifier les peptides présents dans la salive de *P. passerinii*, potentiellement impliqués dans l'induction de sa pseudogalle (coord. D. Giron, IRBI). La croissance et la différenciation assez rapides et étendues de la pseudogalle de *P. passerinii* suggèrent également l'implication de phytohormones ou d'équivalents de phytohormones, fréquemment associés à des insectes manipulateurs (Engelbrecht et al. 1969, Elzen 1983, Mapes & Davies 2001a et b, Straka et al. 2010, Yamaguchi et al. 2012, Body et al. 2013, Bartlett & Connor 2014). Ces composés pourraient être synthétisés par le puceron mais également par ses endosymbiotes bactériens (Kaiser et al. 2010, Feldharr 2011, Frago et al. 2012, Su et al. 2013). Il serait donc aussi intéressant de s'intéresser aux phytohormones sécrétées par l'insecte et/ou présentes dans le site de différenciation des pseudogalles.

D'autre part, une caractérisation plus fine des modifications corticales induites par *P. passerinii*, en termes d'ultrastructure et de biochimie permettrait de mieux comprendre les modifications induites par le puceron. Les modifications ultrastructurales sont fréquentes au niveau des galles d'insectes, avec par exemple un noyau hypertrophié, un cytoplasme abondant et des organites plus nombreux témoignant d'une forte activité métabolique (Rohfritsch 1992). Des observations préliminaires en microscopie électronique à transmission ont été réalisées sur les cellules hypertrophiées de la zone périphérique de la pseudogalle de *P. passerinii* indiquent cependant que ces cellules possèdent encore une grande vacuole, contrairement aux tissus nourriciers classiques. La fonction précise de la zone périphérique de la galle avec ses multiplications et hypertrophies cellulaires reste donc encore à établir. Il est possible notamment que les gonflements observés aient pour but de mettre les fluides sous pression et favoriser la nutrition passive chez le puceron, les pucerons suceurs de sève, s'alimentant normalement de manière passive (Pollard 1973, Tjallingii 1988, 1995). Une analyse des fluides consommés, et des pressions exercées sur ces fluides, pourrait être réalisée par stylectomie, comparative avec des pucerons s'alimentant sur des pseudogalles et des tissus normaux. Cela permettrait de bien caractériser la valeur nutritive des fluides effectivement consommés par l'insecte et d'étendre l'analyse à d'autres composés, non considérés dans les travaux présentés ici, comme les sucres solubles qui jouent souvent un rôle dans la qualité nutritionnelle de galles d'autres insectes (Matsukura et al. 2012).

B. Mécanismes de résistance des peupliers

La populiculture française a désormais intégré les risques liés aux pullulations de puceron lanigère et la sensibilité des génotypes de peuplier au puceron est prise en compte lors des nouvelles plantations. Il est essentiel de sélectionner des stratégies de défense efficaces chez le peuplier qui limiteraient toutefois les capacités de contournement de la résistance par le ravageur. Il faut pour cela miser sur des résistances de niveau intermédiaire et sur un cumul de plusieurs caractères d'intérêt. Notre étude a pour l'instant permis de mettre en avant un rôle probable de la lignification des parois cellulaires dans la résistance du peuplier. Les composés phénoliques pourraient aussi être impliqués. Une caractérisation de tous les composés phénoliques présents dans l'écorce du génotype sensible I-214 et du génotype de résistance intermédiaire I-45/51 de manière constitutive et suite à une infestation est en cours (stages M2 Esmatullah Barakzoy et Thibaud Fidel). Les résultats préliminaires ont mis en évidence plusieurs composés, encore à identifier, dont les teneurs diminuent ou augmentent chez les deux génotypes en présence de *P. passerinii*.

Si nous n'avons pas observé de différences constitutives entre nos génotypes de peuplier, il est possible que nous n'ayons pas pu les mettre en évidence par nos approches. Des structures physiques ou des composés chimiques à la surface des troncs pourraient intervenir. En effet, la texture de l'écorce est très différente visuellement entre génotypes de peupliers et en fonction de l'âge des arbres. Certaines sont très lisses, d'autres présentent de larges côtes longitudinales, ou peuvent être ornées de trichomes plus ou moins nombreux et l'architecture des ramifications peut être très différente. Or, ces caractéristiques pourraient être liées à des mécanismes de résistance ou au contraire favoriser le puceron. Nos travaux suggèrent que le nombre de rameaux pourrait avoir une influence sur les performances du puceron en modulant notamment sa capacité à mobiliser des nutriments vers son site d'alimentation à cause de la compétition entre puits métaboliques. Des pratiques comme l'élagage régulier pourraient donc favoriser le puceron en diminuant cette compétition ou en rendant les parties attaquées plus vigoureuses car bénéficiant de davantage de nutriments, comme on peut l'observer avec d'autres insectes cécidogènes (Martinez & Wool 2003, Cornelissen et al. 2008). Enfin, des composés répulsifs ou anti-appétants, ou encore des cires protectrices (Bernays & Chapman 1994, Gatehouse 2002, Chen 2008) pourraient être impliqués, y compris sur les génotypes résistants étudiés, car l'imposition d'un hôte aux pucerons a pu malgré tout les conduire à piquer.

La lignification des tissus infestés semble être un critère intéressant à prendre en compte pour la résistance au puceron. On peut donc imaginer que des génotypes de peuplier présentant davantage de tissus lignifiés de façon constitutive dans leur parenchyme pourraient être moins favorables à l'insecte. Nos observations histologiques ont permis de voir que *P. passerinii* avait tendance à retirer ses stylets partiellement ou totalement et à changer l'orientation ou la position de sa piqûre lorsqu'il rencontrait un îlot de sclérenchyme car nous observons plusieurs gaines salivaires ou une ramification de celle-ci. De plus,

lorsque cela arrivait il y avait souvent déclenchement d'une forte lignification et une accumulation de composés phénoliques dans cette zone. Ces résultats restent à confirmer mais on peut penser qu'une plus forte densité de fibres de sclérenchyme dans le parenchyme pourrait être un frein à l'exploration des stylets du puceron et perturber la formation des pseudogalles, comme cela peut l'être pour certains phloéophages (Rangasamy et al. 2009).

Plusieurs caractères d'intérêt dans la résistance à *P. passerinii* pourraient donc être ciblés dans les programmes de sélection d'hybrides de peuplier. L'important est cependant de trouver un compromis avec notamment les qualités du bois et la vitesse de croissance des arbres. Il serait intéressant de savoir si l'émergence de génotypes sensibles ou de résistance intermédiaire ne serait pas liée à une sélection sur des paramètres de croissance ou de faibles capacités de lignification des parois pouvant être ciblés dans les programmes d'amélioration.

C. Implications des interactions dans les mortalités de peupliers

Nos travaux ont été réalisés sur des boutures enracinées en salle climatique ou en serre donc il n'est pas certain que les mécanismes soient transposables à l'échelle d'arbres adultes en peupleraie. Cependant, les travaux précédents sur les niveaux de sensibilité de différents génotypes de peuplier (Pointeau et al. 2011) ont montré une bonne transposabilité des performances des pucerons entre ces deux échelles. On peut donc supposer que les mécanismes en jeu soient les mêmes. Partant de ce principe, la caractérisation des interactions entre *P. passerinii* et son hôte permettent d'émettre des hypothèses quant à l'origine des symptômes observés en peupleraie. Les craquelures de l'écorce pourraient être liées à la destruction partielle du phellogène engendré par la formation des pseudogalles. Les nécroses corticales pourraient apparaître à cause des compressions engendrées par le gonflement de la pseudogalle qui peut écraser les cellules sous-jacentes, ou alors suite à la mortalité des cellules de la pseudogalle lorsque le puceron cesse de s'y alimenter. L'absence de débourrement des rameaux inférieurs et les ralentissements de croissance pourraient être dus à un épuisement des réserves de l'arbre en cas de grosse infestation. On peut imaginer que cet épuisement puisse conduire jusqu'à la mort des arbres si les flux carbonés et azotés sont trop fortement perturbés pour maintenir un fonctionnement normal.

Des travaux sont en cours pour évaluer la relation entre la durée et l'intensité d'infestation par *P. passerinii*, les réserves carbonées de l'arbre et l'état sanitaire des arbres (stage M1 Romain Jerger). Les premiers résultats montrent une relation très nette et négative entre les teneurs en amidon en automne et les durées de colonisation des arbres

par *P. passerinii*, et entre les teneurs en amidon et la réduction voire l'absence de débourrement des arbres au printemps suivant.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, Y., 1992. The advantage of attending ants and gall aggregation for the gall wasp *Andricus symbioticus* (Hymenoptera: Cynipidae). *Oecologia*, 89(2), p.166-167.
- Abrahamson, W.G., Anderson, S.S. & McCrea, K.D., 1988. Effects of manipulation of plant carbon nutrient balance on tall goldenrod resistance to a gallmaking herbivore. *Oecologia*, 77(3), p.302-306.
- Abrahamson, W.G. & McCrea, K.D., 1986. Nutrient and biomass allocation in *Solidago altissima*: effects of two stem gallmakers, fertilization, and ramet isolation. *Oecologia*, 68(2), p.174-180.
- Abrahamson, W.G., McCrea, K.D. & Anderson, S.S., 1989. Host Preference and Recognition by the Goldenrod Ball Gallmaker *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *American Midland Naturalist*, 121(2), p.322.
- Aggarwal, R. et al., 2014. Avirulence Effector Discovery in a Plant Galling and Plant Parasitic Arthropod, the Hessian Fly (*Mayetiola destructor*). *PLoS ONE*, 9(6), p.e100958.
- Agrios, G.N., 1997. *Plant pathology*. New York: Academic Press.
- Akman Gündüz, E. & Douglas, A.E., 2009. Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1658), p.987-991.
- Allegro, G., 1997. Nuove infestazioni di afide lanigero del pioppo (*Phloeomyzus passerinii* sign.) in pianura padana. *Sherwood Foreste ed alberi oggi*, 27, p.41-45.
- Allegro, G., Picco, F. & Bianco, B., 1996. Resistance behaviour to *Phloeomyzus passerinii* of some recently - selected Italian poplar clones. In: *Proceedings of the 20th session of the International Poplar Commission, part 1*, Budapest, Hungary, p.199-208.
- Allen, C.D. et al., 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management*, 259(4), p.660-684.
- Allison, J. D., & Daniel Hare, J., 2009. Learned and naive natural enemy responses and the interpretation of volatile organic compounds as cues or signals. *New Phytologist*, 184(4), p.768-782.
- Alsop, F.J. & Laughlin, T.F., 1991. Changes in spruce-fir avifauna of Mt. Guyout, Tennessee 1967-1985. *Journal of the Tennessee Academy of Science*, (66), p.207-209.
- Amman, G.D. & Speers, C.F., 1965. Balsam Woolly Aphid in the Southern Appalachians. *Journal of Forestry*, 63(1), p.18-20.

- Aparisi, C., 1971. Noticia sobre el afido lanigero del chopo *Phloeomyzus passerinii* Signoret, y ensayos para su tratamiento. *Plagas Forestales*, 14, p.3–11.
- Arru, G.M., 1974. Metodo per valutare la resistenza dei pioppi all'afide lanigero (*Phloeomyzus passerinii* Sign.). *Cellulosa e carta*, 25, p.45-49.
- Arzone, A., 1986. Contributo alla conoscenza dei limitatori di *Phloeomyzus passerinii* (Sign.). *Annali dell'Accademia di Agricoltura di Torino*, 129, p.139-158.
- Arzone, A. & Vidano, C., 1984. Indagini su *Phloeomyzus passerinii* (sign.) in Piemonte. *Annali della Facolta di Scienza Agrari della Universita degli Studi di Torino*, 13, p.337-356.
- Awmack, C.S. & Leather, S.R., 2002. Host Plant Quality and Fecundity in Herbivorous Insects. *Annual Review of Entomology*, 47(1), p.817-844.
- Bailey, J.K. & Whitham, T.G., 2006. Interactions between cottonwood and beavers positively affect sawfly abundance. *Ecological Entomology*, 31(4), p.294-297.
- Bailey, R. et al., 2009. Host Niches and Defensive Extended Phenotypes Structure Parasitoid Wasp Communities. *PLoS Biol*, 7(8), p.e1000179.
- Balch, R.E., 1952. Studies of the Balsam Woolly Aphid, *Adelges Piceae* (Ratz.) (Homoptera : Phylloxeridae) and Its Effects on Balsam Fir, *Abies Balsamea* (L.) Mill, Canada Department of Agriculture, Vol. 867.
- Balch, R.E., Clark, J. & Bonga, J.M., 1964. Hormonal Action in Production of Tumours and Compression Wood by an Aphid. *Nature*, 202(4933), p.721-722.
- Barbaroux, C. & Bréda, N., 2002. Contrasting distribution and seasonal dynamics of carbohydrate reserves in stem wood of adult ring-porous sessile oak and diffuse-porous beech trees. *Tree Physiology*, 22(17), p.1201-1210.
- Barbaroux, C., Bréda, N. & Dufrêne, E., 2003. Distribution of above-ground and below-ground carbohydrate reserves in adult trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). *New Phytologist*, 157(3), p.605-615.
- Barbehenn, R.V. et al., 2009. Hydrolyzable tannins as « quantitative defenses »: Limited impact against *Lymantria dispar* caterpillars on hybrid poplar. *Journal of Insect Physiology*, 55(4), p.297-304.
- Barbehenn, R.V. & Constabel, P.C., 2011. Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72(13), p.1551-1565.
- Barjadze, S., Gratiashvili, N. & Gorgadze, O., 2011. Description of fundatrices of *Zelkovaphis caucasica* (Hemiptera: Aphididae: Eriosomatinae) and its life cycle. *Annales de la Société Entomologique de France*, 47(3-4), p.514-518.

- Barnewall, E.C. & Clerck-Floate, R.A.D., 2012. A preliminary histological investigation of gall induction in an unconventional galling system. *Arthropod-Plant Interactions*, 6(3), p.449-459.
- Bartlett, L. & Connor, E.F., 2014. Exogenous phytohormones and the induction of plant galls by insects. *Arthropod-Plant Interactions*, 8(4), p.339-348.
- Battisti, A. et al., 2014. Invasion by the chestnut gall wasp in Italy causes significant yield loss in *Castanea sativa* nut production. *Agricultural and Forest Entomology*, 16(1), p.75-79.
- Baubet, O. & Goudet, M., 2010. Bilan de la Santé des Forêts en 2009. Situation du puceron lanigère en 2009. Département de la santé des forêts, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris.
- Bayon, C. & Mathelin, J., 1980. Carbohydrate fermentation and by-product absorption studied with labelled cellulose in *Oryctes nasicornis* larvae (Coleoptera:Scarabaeidae). *Journal of Insect Physiology*, 26(12), p.833-840.
- Behmer, S.T., 2006. Insect dietary needs: Plants as food for insects. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. Taylor & Francis.
- Behmer, S.T., 2009. Insect Herbivore Nutrient Regulation. *Annual Review of Entomology*, 54(1), p.165-187.
- Behmer, S.T., 2008. Nutrition in Insects. J. L. Caspinera, éd. *Encyclopedia of Entomology*, p.1576-1583.
- Behmer, S.T. & Nes, W.D., 2004. Insect sterol nutrition and physiology: a global overview. , (31), p.1-72.
- Bequaert, J., 1924. Galls that secrete honeydew: a contribution to the problem as to whether galls are altruistic adaptations. *Bulletin of the Brooklyn Entomological Society*, 19, p.101-124.
- Bernays, E.A., 1998. Evolution of feeding behavior in insect herbivores. Success seen as different ways to eat without being eaten. , 48(1), p.35-44.
- Bernays, E.A. & Chapman, R.F., 1994. *Host-Plant Selection by Phytophagous Insects*, Springer.
- Biddle, P.G. & Tinsley, T.W., 1967. *Virus diseases of forest trees*. In: *Report on Forest Research, commonwealth, Forest Institute, Oxford*, 156-159.
- Biggs, A.R., 1992. Anatomical and Physiological Responses of Bark Tissues to Mechanical Injury. In: *Defense Mechanisms of Woody Plants Against Fungi*. Blanchette R.A., Biggs A.R., éd, p. 13-40.
- Biggs, A.R., 1984. Discussion: Response of bark tissues to injury and infection. *Canadian Journal of Forest Research*, 14, p.351-356.

- Biradar, S.K. et al., 2004. Identification of flanking SSR markers for a major rice gall midge resistance gene *Gm1* and their validation. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(7), p.1468-1473.
- Birch, M.L., 1974. Studies on gall formation in *Viola odorata* by *Dasyneura affinis* Kieffer (Diptera: Cecidomyiidae), with emphasis on the experimental modification of this process. Ph. D. Thesis. University of Reading, England.
- Birch, M.L., Brewer, J.W. & Rohfritsch, O., 1992. Biology of *Dasyneura affinis* (Cecidomyiidae) and influence of its gall on *Viola odorata*. *Biology of Insect-Induced Galls*, p.171–184.
- Björkman, C., 2000. Interactive effects of host resistance and drought stress on the performance of a gall-making aphid living on Norway spruce. *Oecologia*, 123(2), p.223-231.
- Björkman, C., 1998. Opposite, linear and non-linear effects of plant stress on a galling aphid. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 13(1-4), p.177-183.
- Blackman, R.L. & Eastop, V.F., 2008. *Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs*, John Wiley & Sons.
- Blackman, R.L. & Eastop, V.F., 1994. *Aphids on the world's trees: an identification and information guide*, CAB International in association with The Natural History Museum.
- Body, M. et al., 2013. Leaf-Miners Co-opt Microorganisms to Enhance their Nutritional Environment. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), p.969-977.
- Botha, C.E.J. & Matsiliza, B., 2004. Reduction in transport in wheat (*Triticum aestivum*) is caused by sustained phloem feeding by the Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*). *South African Journal of Botany*, 70(2), p.249-254.
- Bréda, N. et al., 2006. Temperature forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals of Forest Science*, 63(6), p.625-644.
- Brodbeck, B. & Strong, D., 1987. Amino acid nutrition of herbivorous insects and stress to host plants. In: *Insect outbreaks*, Barbosa, P. & Schultz, J. C., éd, p.347-364.
- Bronner, R., 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of Cynipids and Cecidomyiids. In J. D. Shorthouse & O. Rohfritsch, éd. *Biology of insect-induced galls*. New York, p. 102-117.
- Brown, M.W., Glenn, D.M. & Wisniewski, M.E., 1991. Functional and Anatomical Disruption of Apple Roots by the Woolly Apple Aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, 84(6), p.1823-1826.
- De Bruyn, L., 1995. Plant stress and larval performance of a dipterous gall former. *Oecologia*, 101(4), p.461-466.

- Bugg, T.D. et al., 2011. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), p.394-400.
- Burd, J.D., Burton, R.L. & Webster, J.A., 1993. Evaluation of Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphididae) Damage on Resistant and Susceptible Hosts with Comparisons of Damage Ratings to Quantitative Plant Measurements. *Journal of Economic Entomology*, 86(3), p.974-980.
- Cagampang, G.B., Pathak, M.D. & Juliano, B.O., 1974. Metabolic Changes in the Rice Plant during Infestation by the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal (Hemiptera: Delphacidae). *Applied Entomological Zoology*, 9, 174-184.
- Caillaud, M.-C. et al., 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology*, 165(1), p.104-113.
- Calatayud, P.A., Desneux, N. & Le Gall, P., 2013. Caractéristiques chimiques des plantes. In *Interactions insectes-plantes*. Sauvion, N., Calatayud P.-A., Thiéry, D., Marion-Poll, F., éd. Editions Quae et IRD. p.217-228.
- Calatayud, P.-A. & Rahbé, Y., 2013. Le tube digestif des insectes. In *Interactions insectes-plantes*. Sauvion, N., Calatayud P.-A., Thiéry, D., Marion-Poll, F., éd. Editions Quae et IRD. p. 115-125.
- Carter, C.I., 1977. Impact of green spruce aphid on growth: can a tree forget its past? In: *Research and Development paper, Forestry Commission*, (116), p.8 pp.
- Castro, A.C. et al., 2012. Source–sink relationship and photosynthesis in the horn-shaped gall and its host plant *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, 83, p.121-126.
- Chen, M.-S., 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15(2), p.101–114.
- Chen, Y., Ciaramitaro, T. & Poland, T.M., 2011. Moisture content and nutrition as selection forces for emerald ash borer larval feeding behaviour. *Ecological Entomology*, 33(3), p.344-354.
- Clissold, F. j., Sanson, G. d. & Read, J., 2004. Indigestibility of plant cell wall by the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 112(3), p.159-168.
- Cockfield, S.D., 1988. Relative availability of nitrogen in host plants of invertebrate herbivores: three possible nutritional and physiological definitions. *Oecologia*, 77(1), p.91-94.
- Cole, R.A., 1997. The relative importance of glucosinolates and amino acids to the development of two aphid pests *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* on wild and cultivated *brassica* species. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 85, p.121-133.

- Collins, C.M., Rosado, R.G. & Leather, S.R., 2001. The impact of the aphids *Tuberolachnus salignus* and *Pterocomma salicis* on willow trees. *Annals of Applied Biology*, 138(2), p.133-140.
- Connor, E.F. et al., 2012. The mechanism of gall induction makes galls red. *Arthropod-Plant Interactions*, 6(4), p.489-495.
- Connor, E.F. & Taverner, M.P., 1997. The Evolution and Adaptive Significance of the Leaf-Mining Habit. *Oikos*, 79(1), p.6.
- Cook, J.M. & Rasplus, J.-Y., 2003. Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(5), p.241-248.
- Corio-Costet, M.-F. & Lieutier, F., 2013. Associations insectes-champignons. In *Interactions insectes-plantes*. Sauvion, N., Calatayud P.-A., Thiéry, D., Marion-Poll, F., éd. Editions Quae et IRD. p.271-278.
- Cornelissen, T., Wilson Fernandes, G. & Vasconcellos-Neto, J., 2008. Size does matter: variation in herbivory between and within plants and the plant vigor hypothesis. *Oikos*, 117(8), p.1121-1130.
- Cottrell, T.E., Wood, B.W. & Ni, X., 2010. Application of plant growth regulators mitigates chlorotic foliar injury by the black pecan aphid (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science*, 66(11), p.1236-1242.
- Cristofolletti, P.T. et al., 2003. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 49(1), p.11-24.
- Currie, Y. et al., 2014. Transient Heat Stress Compromises the Resistance of Wheat (Poales: Poaceae) Seedlings to Hessian Fly (Diptera: Cecidomyiidae) Infestation. *Journal of Economic Entomology*, 107(1), p.389-395.
- Daly, H.V., Doyen, J.T. & Ehrlich, P.R., 1998. Introduction to insect biology and diversity. p.x + 564 pp.
- Danell, K. & Huss-Danell, K., 1985. Feeding by Insects and Hares on Birches Earlier Affected by Moose Browsing. *Oikos*, 44(1), p.75.
- Della Beffa, G., 1936. Contributo alla conoscenza degli insetti parassiti dei pioppi. Il *Phloeomyzus passerinii* Sign. (Afade lanigero dei pioppi). *Bolletino Laboratorio Sperimentale e Osservatorio Fitopatologia*, (13), p.17-23.
- Delplanque, A. et al., 1998. Les insectes associés aux peupliers. INRA-MEMOR, Bruxelles, Belgique.
- Dhileepan, K., 2004. The applicability of the plant vigor and resource regulation hypotheses in explaining *Epiblema* gall moth-*Parthenium* weed interactions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 113(1), p.63-70.

- Diamond, S.E., Blair, C.P. & Abrahamson, W.G., 2008. Testing the nutrition hypothesis for the adaptive nature of insect galls: does a non-adapted herbivore perform better in galls? *Ecological Entomology*, 33(3), p.385-393.
- Dini, F., Sartor, C. & Botta, R., 2012. Detection of a hypersensitive reaction in the chestnut hybrid 'Bouche de Bétizac' infested by *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, p.67-73.
- Dixon, A.F.G., 1997. Adaptations of phytophagous insects to life on trees, with particular reference to aphids. In A. D. Watt, N. E. Stork, & M. D. Hunter, éd. *Forests and Insects*. London: Springer Science & Business Media, p. 1-14.
- Dixon, A.F.G., 1998. *Aphid Ecology: An Optimization Approach*. Chapman & Hall, London
- Dixon, A.F.G. et al., 1993. The role of food quality and competition in shaping the seasonal cycle in the reproductive activity of the sycamore aphid. *Oecologia*, 95(1), p.89-92.
- Dixon, A.F.G., Kindlmann, P. & Jarošik, V., 1995. Body size distribution in aphids: relative surface area of specific plant structures. *Ecological Entomology*, 20(2), p.111-117.
- Dixon, A.F.G. & Logan, M., 1973. Leaf Size and Availability of Space to the Sycamore Aphid *Drepanosiphum platanoides*. *Oikos*, 24(1), p.58.
- Dohleman, F.G. et al., 2012. Seasonal dynamics of above- and below-ground biomass and nitrogen partitioning in *Miscanthus × giganteus* and *Panicum virgatum* across three growing seasons. *GCB Bioenergy*, 4(5), p.534-544.
- Von Dohlen, C.D.V. & Moran, N.A., 2000. Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71(4), p.689-717.
- Doom, D. & Lambers, H.R., 1962. Over hot massaal voorkomen van de schimmelluis *Phloeomyzus* redelei HRL op populieren in 1961 in Nederland. *Nederl. Bosb. Tijdschr*, 34(6), p.202-208.
- Dorchin, N., Cramer, M.D. & Hoffmann, J.H., 2006. Photosynthesis and sink activity of wasp-induced galls in *Acacia pycnantha*. *Ecology*, 87(7), p.1781-1791.
- Douglas, A.E., 2009. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23(1), p.38-47.
- Douglas, A.E., 2003. The Nutritional Physiology of Aphids. In *Advances in Insect Physiology*. Academic Press, p. 73-140.
- Douglas, A.E., 1993. The nutritional quality of phloem sap utilized by natural aphid populations. *Ecological Entomology*, 18(1), p.31-38.
- Douglas, A.E., Minto, L.B. & Wilkinson, T.L., 2001. Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. *Journal of Experimental Biology*, 204(2), p.349-358.

- Dowd, P.F., 1992. Insect fungal symbionts: A promising source of detoxifying enzymes. *Journal of Industrial Microbiology*, 9(3-4), p.149-161.
- DSF, Département de la Santé des Forêts, 2006. Information Santé des Forêts : Puceron lanigère du peuplier Ministère de l'agriculture, et de la pêche, Paris.
- DSF, Département de la Santé des Forêts, 2012. Information Santé des Forêts : Puceron lanigère du peuplier Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire, Paris.
- Dsouza, M.R. & Ravishankar, B.E., 2014. Nutritional sink formation in galls of *Ficus glomerata* Roxb.(Moraceae) by the insect *Pauropsylla depressa* (Psyllidae, Hemiptera). *Tropical Ecology*, 55(1), p.129–136.
- Dugravot, S. et al., 2007. Local and systemic responses induced by aphids in *Solanum tuberosum* plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 123(3), p.271–277.
- Du, Y.-P., Wang, Z.-S. & Zhai, H., 2011. Grape root cell features related to phylloxera resistance and changes of anatomy and endogenous hormones during nodosity and tuberosity formation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(3), p.291–297.
- Eleftherianos, I. et al., 2005. Changes in the levels of plant total phenols and free amino acids induced by two cereal aphids and effects on aphid fecundity. *Journal of Applied Entomology*, 130(1), p.15-19.
- Elzen, G.W., 1983. Cytokinins and insect galls. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 76(1), p.17-19.
- Van Emden, H.F., 2007. Host-plant resistance. In *Aphids As Crop Pests*. H. F. V. Emden & R. Harrington, éd.. Wallingford, p. 447-462.
- Engelbrecht, L., Orban, U. & Heese, W., 1969. Leaf-miner Caterpillars and Cytokinins in the « Green Islands » of Autumn Leaves. *Nature*, 223(5203), p.319-321.
- Eyles, A. et al., 2009. Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytologist*, 185(4), p.893–908.
- Fay, P.A. & Hartnett, D.C., 1991. Constraints on growth and allocation patterns of *Silphium integrifolium* (Asteraceae) caused by a cynipid gall wasp. *Oecologia*, 88(2), p.243-250.
- Fay, P.A., Hartnett, D.C. & Knapp, A.K., 1993. Increased photosynthesis and water potentials in *Silphium integrifolium* galled by cynipid wasps. *Oecologia*, 93(1), p.114-120.
- Fay, P.A., Preszler, R.W. & Whitham, T.G., 1996. The functional resource of a gall-forming adelgid. *Oecologia*, 105(2), p.199-204.

- Feldhaar, Heike. 2011. « Bacterial Symbionts as Mediators of Ecologically Important Traits of Insect Hosts ». *Ecological Entomology* 36 (5): 533-43.
- Fernandes, G.W. et al., 1999. Ant effects on three-trophic level interactions: plant, galls, and parasitoids. *Ecological Entomology*, 24(4), p.411-415.
- Fernandes, G.W., Duarte, H. & Lüttge, U., 2003. Hypersensitivity of *Fagus sylvatica* L. against leaf galling insects. *Trees - Structure and Function*, 17(5), p.407-411.
- Fernandes, G.W. & Negreiros, D., 2001. The occurrence and effectiveness of hypersensitive reaction against galling herbivores across host taxa. *Ecological Entomology*, 26(1), p.46-55.
- Feyereisen, R., 2006. Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions*, 34(6), p.1252-1255.
- De Fine Licht, H.H. et al., 2013. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(2), p.583-587.
- Fisher, M., 1987. The effect of previously infested spruce needles on the growth of the green spruce aphid, *Elatobium abietinum*, and the effect of the aphid on the amino acid balance of the host plant. *Annals of Applied Biology*, 111(1), p.33-41.
- Fitzgerald, T.D. et al., 1991. Leaf shelter-building caterpillars harness forces generated by axial retraction of stretched and wetted silk. *Journal of Insect Behavior*, 4(1), p.21-32.
- Flaherty, L. & Quiring, D., 2008. Plant module size and dose of gall induction stimulus influence gall induction and galler performance. *Oikos*, 117(11), p.1601-1608.
- Florentine, S.K., Raman, A. & Dhileepan, K., 2005. Effects of Gall Induction by *Epiblema strenuana* on Gas Exchange, Nutrients, and Energetics in *Parthenium hysterophorus*. *BioControl*, 50(5), p.787-801.
- Forneck, A. et al., 2002. Histochemistry and anatomy of phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) nodosities on young roots of grapevine (*Vitis* spp). *Vitis*, 41(2), p.93-98.
- Forrest, J.M.S., 1971. The Growth of *Aphis fabae* as an Indicator of the Nutritional Advantage of Galling to the Apple Aphid *Dysaphis devecta*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 14(4), p.477-483.
- Forrest, J.M.S. & Dixon, A.F.G., 1975. The induction of leaf-roll galls by the apple aphids *Dysaphis devecta* and *D. plantaginea*. *Annals of Applied Biology*, 81(3), p.281-288.
- Fox, L.R. & Macauley, B.J., 1977. Insect grazing on *Eucalyptus* in response to variation in leaf tannins and nitrogen. *Oecologia*, 29(2), p.145-162.
- Frago, Enric, Marcel Dicke, et H. Charles J. Godfray. 2012. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 27 (12): 705-11.

- Frenzel, M. et al., 2000. Ecological comparisons across geographical distributions: the thistle gall fly *Urophora cardui* (Diptera: Tephritidae) on two different *Cirsium* hosts. *European Journal of Entomology*, 97(2), p.183-189.
- Fritz, R.S., Crabb, B.A. & Hochwender, C.G., 2000. Preference and performance of a gall-inducing sawfly: a test of the plant vigor hypothesis. *Oikos*, 89(3), p.555-563.
- Fukui, A. et al., 2002. A leaf-rolling caterpillar improves leaf quality. *Entomological Science*, 5(3), p.263-266.
- Fukui, A., 2001. Indirect interactions mediated by leaf shelters in animal–plant communities. *Population Ecology*, 43(1), p.31-40.
- Furlan, C.M., Salatino, A. & Domingos, M., 2004. Influence of air pollution on leaf chemistry, herbivore feeding and gall frequency on *Tibouchina pulchra* leaves in Cubatão (Brazil). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(3), p.253-263.
- Gange, A.C. & Nice, H.E., 1997. Performance of the thistle gall fly, *Urophora cardui*, in relation to host plant nitrogen and mycorrhizal colonization. *New Phytologist*, 137(2), p.335-343.
- Gasnier-Fauchet, F., Gharib, A. & Nardon, P., 1986. Comparison of methionine metabolism in symbiotic and aposymbiotic larvae of *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae)—I. Evidence for a glycine N-methyltransferase-like activity in the aposymbiotic larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 85(1), p.245-250.
- Gatehouse, J.A., 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*, 156(2), p.145-169.
- Giordanengo, P. et al., 2010. Compatible plant-aphid interactions: how aphids manipulate plant responses. *Comptes Rendus Biologie*, 333(6-7), p.516–523.
- Giordanengo, P., 2014. EPG-Calc: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod-Plant Interactions*, 8(2), p.163-169.
- Giron, D. et al., 2007. Cytokinin-mediated leaf manipulation by a leafminer caterpillar. *Biology Letters*, 3(3), p.340-343.
- Giron, D. & Glevarec, G., 2014. Cytokinin-Induced Phenotypes in Plant-Insect Interactions: Learning from the Bacterial World. *Journal of Chemical Ecology*, 40, p. 826-835.
- Giron, D., Huguet, E. & Dedeine, F., 2013. Manipulation de la plante par les insectes endophytes. In *Interactions insectes-plantes*. Sauvion, N., Calatayud P.-A., Thiéry, D., Marion-Poll, F., éd. Editions Quae et IRD. p. 295-302.
- Girousse, C. et al., 2005. Aphid Infestation Causes Different Changes in Carbon and Nitrogen Allocation in Alfalfa Stems as Well as Different Inhibitions of Longitudinal and Radial Expansion. *Plant Physiology*, 137(4), p.1474-1484.

- Glynn, C. & Larsson, S., 1994. Gall initiation success and fecundity of *Dasineura marginemtorquens* on variable *Salix viminalis* host plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 73(1), p.11-17.
- Gonçalves-Alvim, S.J., Santos, M.C.F.V. dos & Fernandes, G.W., 2001. Leaf Gall Abundance on *Avicennia germinans* (Avicenniaceae) along an Interstitial Salinity Gradient. *Biotropica*, 33(1), p.69-77.
- González, W. I. et al., 2002. Host plant changes produced by the aphid *Sipha flava*: consequences for aphid feeding behaviour and growth. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 103(2), p.107-113.
- Gould, G.G. et al., 2007. Variation in Eastern Cottonwood (*Populus deltoides* Bartr.) Phloem Sap Content Caused by Leaf Development May Affect Feeding Site Selection Behavior of the Aphid, *Chaitophorous populicola* Thomas (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, 36(5), p.1212-1225.
- Granett, J. et al., 2001. Biology and Management of Grape Phylloxera. *Annual Review of Entomology*, 46(1), p.387-412.
- Greeney, H.F. & Jones, M.T., 2003. Shelter building in the HesperIIDae: a classification scheme for larval shelters. *Journal of Research on the Lepidoptera*, 37, p.27-36.
- Gutbrodt, B., Mody, K. & Dorn, S., 2011. Drought changes plant chemistry and causes contrasting responses in lepidopteran herbivores. *Oikos*, 120(11), p.1732-1740.
- Habib, R. & Ghani, M.A., 1970. Eriosomatinae on poplars and their natural enemies in West Pakistan. *Technical Bulletin, Commonwealth Institute of Biological Control*, (13), p.43-58.
- Hakkarainen, H., Roininen, H. & Virtanen, R., 2005. Negative impact of leaf galls on arctic-alpine dwarf willow, *Salix herbacea*. *Polar Biology*, 28(8), p.647-651.
- Hammes, U.Z. et al., 2005. Nematode-Induced Changes of Transporter Gene Expression in *Arabidopsis* Roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(12), p.1247-1257.
- Harris, M.O. et al., 2003. GRASSES AND GALL MIDGES: Plant Defense and Insect Adaptation. *Annual Review of Entomology*, 48(1), p.549-577.
- Hartley, S.E. & Lawton, J.H., 1992. Host-Plant Manipulation by Gall-Insects: A Test of the Nutrition Hypothesis. *The Journal of Animal Ecology*, 61(1), p.113.
- Heath, M.C., 2000. Hypersensitive response-related death. In E. Lam, H. Fukuda, & J. Greenberg, éd. In: *Programmed Cell Death in Higher Plants*. Springer, Netherlands, p. 77-90.
- Hjältén, J. & Price, P.W., 1996. The Effect of Pruning on Willow Growth and Sawfly Population Densities. *Oikos*, 77(3), p.549.

- Höglund, S., 2014. Timing of growth determines fitness and performance of a galling insect on willow. *Ecological Entomology*, 39(2), p.159-167.
- Höglund, S., Larsson, S. & Wingsle, G., 2005. Both hypersensitive and non-hypersensitive responses are associated with resistance in *Salix viminalis* against the gall midge *Dasineura marginemtorquens*. *Journal of Experimental Botany*, 56(422), p.3215-3222.
- Huang, M.-Y. et al., 2014. Herbivorous insects alter the chlorophyll metabolism of galls on host plants. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(3), p.431-434.
- Huberty, A.F. & Denno, R.F., 2004. Plant water stress and its consequences for herbivorous insects: a new synthesis. *Ecology*, 85(5), p.1383-1398.
- Hullé, M., 1998. Les Pucerons des arbres forestiers - Cycle biologique et activité de vol. INRA Edition., Paris.
- Inbar, M. et al., 2010. Why do many galls have conspicuous colors? A new hypothesis. *Arthropod-Plant Interactions*, 4(1), p.1-6.
- Inbar, M., Doostdar, H. & Mayer, R.T., 2001. Suitability of stressed and vigorous plants to various insect herbivores. *Oikos*, 94(2), p.228-235.
- Inouye, B.D. & Agrawal, A.A., 2004. Ant mutualists alter the composition and attack rate of the parasitoid community for the gall wasp *Disholcaspis eldoradensis* (Cynipidae). *Ecological Entomology*, 29(6), p.692-696.
- IPCC 2013. Summary for Policymakers. In: *Climate change 2013: The physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Stocker T. F., Qin D., Plattener G.-K., Tignor M., Allen S. K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Midgley P. M., éd.. Cambridge University, Cambridge and New-York.
- Jactel, H. et al., 2012. Drought effects on damage by forest insects and pathogens: a meta-analysis. *Global Change Biology*, 18(1), p.267-276.
- James, D. G., & Grasswitz, T. R., 2005. Synthetic herbivore-induced plant volatiles increase field captures of parasitic wasps. *BioControl*, 50(6), p.871-880.
- Jansen-González, S., Teixeira, S. de P. & Pereira, R.A.S., 2012. Mutualism from the inside: coordinated development of plant and insect in an active pollinating fig wasp. *Arthropod-Plant Interactions*, 6(4), p.601-609.
- Jeanneau, Y., 1968. Considérations sur la tumorigenèse induite par *Eriosoma lanigerum* Hausm. sur *Pirus malus* L. et mise en évidence d'un gradient pathogène. *Bulletin de la Société Botanique Française*, (115), p.529-540.

- Kaiser, W. et al., 2010. Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1692), p.2311-2319.
- Karley, A.J., Douglas, A.E. & Parker, W.E., 2002. Amino acid composition and nutritional quality of potato leaf phloem sap for aphids. *Journal of Experimental Biology*, 205(19), p.3009-3018.
- Kato, K. & Hijii, N., 1997. Effects of gall formation by *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hym., Cynipidae) on the growth of chestnut trees. *Journal of Applied Entomology*, 121(1-5), p.9-15.
- Kazana, E. et al., 2007. The cabbage aphid: a walking mustard oil bomb. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1623), p.2271-2277.
- Kellow, A.V., Sedgley, M. & Heeswijck, R.V., 2004. Interaction Between *Vitis vinifera* and Grape Phylloxera: Changes in Root Tissue During Nodosity Formation. *Annals of Botany*, 93(5), p.581-590.
- Kessler, A., & Baldwin, I. T., 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291(5511), p.2141-2144.
- Khajuria, C. et al., 2013. Mobilization of lipids and fortification of cell wall and cuticle are important in host defense against Hessian fly. *BMC Genomics*, 14(1), p.423.
- Kimberling, D.N., Scott, E.R. & Price, P.W., 1990. Testing a new hypothesis: plant vigor and phylloxera distribution on wild grape in Arizona. *Oecologia*, 84, p.1-8.
- Kimmerer, T.W. & Potter, D.A., 1987. Nutritional quality of specific leaf tissues and selective feeding by a specialist leafminer. *Oecologia*, 71(4), p.548-551.
- Kindlmann, P. & Dixon, A.F.G., 1989. Developmental Constraints in the Evolution of Reproductive Strategies: Telescoping of Generations in Parthenogenetic Aphids. *Functional Ecology*, 3(5), p.531.
- Konno, H., Nakato, T. & Tsumuki, H., 2003. Altered matrix polysaccharides in cell walls of pocket galls formed by an aphid on *Distylium racemosum* leaves. *Plant, Cell & Environment*, 26(12), p.1973-1983.
- Koricheva, J. et al., 1998. Regulation of Woody Plant Secondary Metabolism by Resource Availability: Hypothesis Testing by Means of Meta-Analysis. *Oikos*, 83(2), p.212.
- Koricheva, J. & Larsson, A., 1998. Insect performance on experimentally stressed woody plants: A Meta-Analysis. *Annual Review of Entomology*, 43, p.195-216.
- Koyama, Y., Yao, I. & Akimoto, S.-I., 2004. Aphid galls accumulate high concentrations of amino acids: a support for the nutrition hypothesis for gall formation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 113(1), p.35-44.

- Kozlov, M.V. et al., 2012. Delayed local responses of downy birch to damage by leafminers and leafrollers. *Oikos*, 121(3), p.428-434.
- Künkler, N., Brandl, R. & Brändle, M., 2013. Changes in Clonal Poplar Leaf Chemistry Caused by Stem Galls Alter Herbivory and Leaf Litter Decomposition. *PLoS ONE*, 8(11), p.e79994.
- Kurzfeld-Zexer, L., Wool, D. & Inbar, M., 2010. Modification of tree architecture by a gall-forming aphid. *Trees*, 24(1), p.13-18.
- Küster, E., 1911. Die Gallen der Pflanzen. Ein Lehrbuch der Botaniker und Entomologen. S. Hirzel, éd., Leipzig.
- Lapietra, B. & Allegro, G., 1990. Susceptibility to *Phloeomyzus passerinii* Sign. of poplar clones cultivated in Italy. *Informatore Fitopatologico*, 40(11), p.41-44.
- Larson, K.C., 1998. The impact of two gall-forming arthropods on the photosynthetic rates of their hosts. *Oecologia*, 115(1-2), p.161-166.
- Larson, K.C. & Whitham, T.G., 1997. Competition between gall aphids and natural plant sinks: plant architecture affects resistance to galling. *Oecologia*, 109(4), p.575-582.
- Larson, K.C. & Whitham, T.G., 1991. Manipulation of food resources by a gall-forming aphid: the physiology of sink-source interactions. *Oecologia*, 88(1), p.15-21.
- Larsson, S., 1989. Stressful Times for the Plant Stress: Insect Performance Hypothesis. *Oikos*, 56(2), p.277.
- Lee, K.P., Raubenheimer, D. & Simpson, S.J., 2004. The effects of nutritional imbalance on compensatory feeding for cellulose-mediated dietary dilution in a generalist caterpillar. *Physiological Entomology*, 29(2), p.108-117.
- Lefcheck, J.S. et al., 2013. Physiological effects of diet mixing on consumer fitness: a meta-analysis. *Ecology*, 94(3), p.565-572.
- Lieutier, F., 2004. Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, A Synthesis. Lieutier, F., Day, K. R., Battisti, A., Grégoire, J.-C., Evans, H. F., éd.. Springer.
- Lieutier, F. & Berryman, A.A., 1988. Preliminary histological investigations of the defense reactions of three pines to *Ceratocystis clavigera* and two chemical elicitors. *Canadian Journal of Forest Research*, 18(10), p.1243-1247.
- Lieutier, F., Yart, A. & Salle, A., 2009. Stimulation of tree defenses by Ophiostomatoid fungi can explain attack success of bark beetles on conifers. *Annals of Forest Science*, 66(8), p.801-801.
- Lindner, M. et al., 2010. Climate change impacts, adaptative capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecology and Management*, 259, p.698-709.

- Liu, X. et al., 2007. Gene Expression of Different Wheat Genotypes During Attack by Virulent and Avirulent Hessian Fly (*Mayetiola destructor*) Larvae. *Journal of Chemical Ecology*, 33(12), p.2171-2194.
- Llewellyn, M. & Hargreaves, C.E.M., 1986. Biology and energetics of the gall inducing aphids *Aphis pomi* and *Dysaphis devectora*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 41(3), p.273-281.
- Madhusudhan, V.V. & Miles, P.W., 1998. Mobility of salivary components as a possible reason for differences in the responses of alfalfa to the spotted alfalfa aphid and pea aphid. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 86(1), p.25-39.
- Manson, J. S., & Thomson, J. D., 2009. Post-ingestive effects of nectar alkaloids depend on dominance status of bumblebees. *Ecological Entomology*, 34(4), p.421-426.
- Mapes, C.C. & Davies, P.J., 2001a. Cytokinins in the ball gall of *Solidago altissima* and in the gall forming larvae of *Eurosta solidaginis*. *New Phytologist*, 151(1), p.203-212.
- Mapes, C.C. & Davies, P.J., 2001b. Indole-3-acetic acid and ball gall development on *Solidago altissima*. *New Phytologist*, 151(1), p.195-202.
- Marini-Filho, O.J. & Fernandes, G.W., 2012. Stem galls drain nutrients and decrease shoot performance in *Diplusodon orbicularis* (Lythraceae). *Arthropod-Plant Interactions*, 6(1), p.121-128.
- Martinez, J.-J.I., 2010. Anti-insect effects of the gall wall of *Baizongia pistaciae* [L.], a gall-inducing aphid on *Pistacia palaestina* Boiss. *Arthropod-Plant Interactions*, 4(1), p.29-34.
- Martinez, J.-J.I., 2008. Impact of a gall-inducing aphid on *Pistacia atlantica* Desf. trees. *Arthropod-Plant Interactions*, 2(3), p.147-151.
- Martinez, J.-J.Y. & Wool, D., 2002. Differential response of trees and shrubs to browsing and pruning: the effects on *Pistacia* growth and gall-inducing aphids. *Plant Ecology*, 169(2), p.285-294.
- Martin, J.S., Martin, M.M. & Bernays, E.A., 1987. Failure of tannic acid to inhibit digestion or reduce digestibility of plant protein in gut fluids of insect herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 13(3), p.605-621.
- Maskato, Y., Talal, S., Keasar, T., & Gefen, E., 2014. Red foliage color reliably indicates low host quality and increased metabolic load for development of an herbivorous insect. *Arthropod-Plant Interactions*, 8(4), p.285-292.
- Matsukura, K., Matsumura, M. & Tokuda, M., 2012. Host Feeding by an Herbivore Improves the Performance of Offspring. *Evolutionary Biology*, 39(3), p.341-347.

- Matsukura, K., Matsumura, M. & Tokuda, M., 2009. Host manipulation by the orange leafhopper *Cicadulina bipunctata*: gall induction on distant leaves by dose-dependent stimulation. *Naturwissenschaften*, 96(9), p.1059-1066.
- Maugard, F., 1996. Attaque d'un ravageur inhabituel dans le Sud-Ouest de la France : le puceron lanigère du peuplier. Les Cahiers du DSF. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris.
- McArt, S.H. et al., 2009. Summer dietary nitrogen availability as a potential bottom-up constraint on moose in south-central Alaska. *Ecology*, 90(5), p.1400-1411.
- Mcculloch Martin, M., 1992. The Evolution of Insect-Fungus Associations: From Contact to Stable Symbiosis. *American Zoologist*, 32(4), p.593-605.
- McCutcheon, J.P., McDonald, B.R. & Moran, N.A., 2009. Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), p.15394-15399.
- McCutcheon, J.P. & Moran, N.A., 2007. Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), p.19392-19397.
- Mckinnon, M.L., Quiring, D.T. & Bauce, E., 1999. Influence of tree growth rate, shoot size and foliar chemistry on the abundance and performance of a galling adelgid. *Functional Ecology*, 13(6), p.859-867.
- Miles, P W. 1968. « Insect Secretions in Plants ». *Annual Review of Phytopathology* 6 (1), p.137-64.
- Miles, P.W., 1989a. Specific responses and damage caused by Aphidoidea. In A. K. Minks & P. Harrewijn, éd. *Aphids: Their Biology, natural enemies and control*. Amsterdam, The Netherlands, p. 23-47.
- Miles, P.W., 1989b. The response of plants to the feeding on Aphidoidea: principles. In A. K. Minks & P. Harrewijn, éd. *Aphids. Their biology, natural enemies and control. Volume 2C*. Amsterdam, p. 1-21.
- Mittler, T.E., 1958. Studies on the Feeding and Nutrition of *Tuberolachnus Salignus* (Gmelin) (Homoptera, Aphididae) II. The Nitrogen and Sugar Composition of Ingested Phloem Sap and Excreted Honeydew. *Journal of Experimental Biology*, 35(1), p.74-84.
- De Moraes, C. M., Lewis, W. J., Pare, P. W., Alborn, H. T., & Tumlinson, J. H., 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 393(6685), p.570-573.
- Moran, N.A., 1992. The Evolution of Aphid Life Cycles. *Annual Review of Entomology*, 37(1), p.321-348.
- Moran, N.A., McCutcheon, J.P. & Nakabachi, A., 2008. Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annual Review of Genetics*, 42(1), p.165-190.

- Motta, L.B. et al., 2005. Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(10), p.971-981.
- Mound, L.A., 1971. The Complex of Thysanoptera in Rolled Leaf Galls on *Geijera*. *Australian Journal of Entomology*, 10(2), p.83-97.
- Müllick, D.B., 1977. The Non-Specific Nature of Defense in Bark and Wood During Wounding, Insect and Pathogen Attack. In F. A. Loewus & V. C. Runeckles, éd. *The Structure, Biosynthesis, and Degradation of Wood*. Recent Advances in Phytochemistry. Springer US, p. 395-441..
- Myers, J.H. & Post, B.J., 1981. Plant nitrogen and fluctuations of insect populations: A test with the cinnabar moth—tansy ragwort system. *Oecologia*, 48(2), p.151-156.
- Nabity, P.D. et al., 2013. Leaf-galling phylloxera on grapes reprograms host metabolism and morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(41), p.16663-16668.
- Nageleisen, L.M. et al., 2010. La santé des forêts. Maladies, insectes, accidents climatiques... Diagnostic et prévention. Editions IDF.
- Nakabachi, A. & Ishikawa, H., 1999. Provision of riboflavin to the host aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by endosymbiotic bacteria, *Buchnera*. *Journal of Insect Physiology*, 45(1), p.1-6.
- Nardon, P. et al., 2002. Occurrence of endosymbiosis in dryophthoridae weevils: Cytological insights into bacterial symbiotic structures. *Symbiosis*, 33(3), p.227-241.
- Nardon, P. & Heddi, A., 2013. La symbiose chez les insectes phytophages et granivores. In: *Interactions insectes-plantes*. Sauvion, N., Calatayud P.-A., Thiéry, D., Marion-Poll, F., éd. Editions Quae et IRD. p.127-136.
- Näsholm, T. & Ericsson, A., 1990. Seasonal changes in amino acids, protein and total nitrogen in needles of fertilized Scots pine trees. *Tree Physiology*, 6(3), p.267-281.
- Noda, H. & Koizumi, Y., 2003. Sterol biosynthesis by symbiotes: cytochrome P450 sterol C-22 desaturase genes from yeastlike symbiotes of rice planthoppers and anobiid beetles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(6), p.649-658.
- Noda, H., Wada, K. & Saito, T., 1979. Sterols in *Laodelphax striatellus* with special reference to the intracellular yeastlike symbiotes as a sterol source. *Journal of Insect Physiology*, 25(5), p.443-447.
- Nyman, T. & Julkunen-Tiitto, R., 2000. Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), p.13184-13187.

- Ohkuma, M., Noda, S. & Kudo, T., 1999. Phylogenetic Diversity of Nitrogen Fixation Genes in the Symbiotic Microbial Community in the Gut of Diverse Termites. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), p.4926-4934.
- De Oliveira, D.C. et al., 2011. Is the oxidative stress caused by *Aspidosperma* spp. galls capable of altering leaf photosynthesis? *Plant Science*, 180(3), p.489-495.
- Olofsson, J. & Strengbom, J., 2000. Response of galling invertebrates on *Salix lanata* to reindeer herbivory. *Oikos*, 91(3), p.493-498.
- Orondo, S.B.O. & Day, R.K., 1994. Cypress aphid (*Cinara cupressi*) damage to a cypress (*Cupressus lusitanica*) stand in Kenya. *International Journal of Pest Management*, 40(2), p.141-144.
- Peccoud, J. et al., 2010. Evolutionary history of aphid-plant associations and their role in aphid diversification. *Comptes Rendus Biologies*, 333(6-7), p.474-487.
- Pechan, T. et al., 2002. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), p.13319-13323.
- Petersen, M.K. & Sandström, J.P., 2001. Outcome of indirect competition between two aphid species mediated by responses in their common host plant. *Functional Ecology*, 15(4), p.525-534.
- Pettersson, J., Tjallingii, W.F. & Hardie, J., 2007. Host-plant Selection and Feeding. In H. F. V. Emden & R. Harrington, éd. *Aphids As Crop Pests*. Oxford, U.K.: CABI, p. 87-113.
- Pointeau, S. et al., 2013. Characterization of Antibiosis and Antixenosis to the Woolly Poplar Aphid (Hemiptera: Aphididae) in the Bark of Different Poplar Genotypes. *Journal of Economic Entomology*, 106(1), p.1-9.
- Pointeau, S. et al., 2011. Estimating the effect of poplar resistance on the performance of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii*, in various experimental conditions. *Canadian Journal of Forest Research*, 41(6), p.1233-1241.
- Pointeau, S. et al., 2012. Exceptional plant penetration and feeding upon cortical parenchyma cells by the woolly poplar aphid. *Journal of Insect Physiology*, 58, p.857-866.
- Pointeau, S., 2011. Interactions peuplier - puceron lanigère (*Phloeomyzus passerinii* (Sign.)) et processus à l'origine de l'émergence et de l'expansion des pullulations. PhD thesis. Université d'Orléans.
- Pollard, D.G., 1973. Plant Penetration by Feeding Aphids (Hemiptera, Aphidoidea): a Review. *Bulletin of Entomological Research*, 62, p.631-714.

- Powell, G., Tosh, C.R. & Hardie, J., 2006. Host Plant Selection by Aphids: Behavioral, Evolutionary, and Applied Perspectives. *Annual Review of Entomology*, 51(1), p.309-330.
- Prado, E. & Tjallingii, W.F., 1997. Effects of previous plant infestation on sieve element acceptance by two aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 82(2), p.189-200.
- Price, P.W. et al., 1998. Global patterns in local number of insect galling species. *Journal of Biogeography*, 25(3), p.581-591.
- Price, P.W., 1991. The Plant Vigor Hypothesis and Herbivore Attack. *Oikos*, 62(2), p.244.
- Price, P.W., Fernandes, G.W. & Waring, G.L., 1987. Adaptive Nature of Insect Galls. *Environmental Entomology*, 16(1), p.15-24.
- Quisenberry, S.S. & Ni, X., 2007. Feeding injury. In *Aphids as crop pests*. H. F. van Emden and R. Harrington, éd. CABI, Wallingford. p.331-352.
- Rajabi-Mazhar, N.A., Moharramipour, S. & Sadeghi, S.E., 2003. Antixenosis resistance to woolly aphid in *Phloeomyzus passerinii* Sign. (Hom.: Aphididae) different polar clones. *Journal of the Entomological Society of Iran*, (22), p.31-44.
- Raman, A., 2012. Gall induction by hemipteroid insects. *Journal of Plant Interactions*, 7(1), p.29-44.
- Raman, A. et al., 2006. Metabolite mobilization in the stem galls of *Parthenium hysterophorus* induced by *Epiblema strenuana* inferred from the signatures of isotopic carbon and nitrogen and concentrations of total non-structural carbohydrates. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119(2), p.101-107.
- Raman, A. & Ananthkrishnan, T.N., 1983. On the developmental morphology of the rosette galls of *Acacia leucophloea* Willd., (Mimosaceae) induced by *Thilakothrips hablu* Ramk. (Thysanoptera: Insecta). *Proceedings: Animal Sciences*, 92(5), p.343-350.
- Raman, A., Beiderbeck, R. & Herth, W., 2009. Early subcellular responses of susceptible and resistant *Vitis* taxa to feeding by grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae*. *Botanica Helvetica*, 119(1), p.31-39.
- Rangasamy, M. et al., 2009. Role of Leaf Sheath Lignification and Anatomy in Resistance Against Southern Chinch Bug (Hemiptera: Blissidae) in St. Augustinegrass. *Journal of Economic Entomology*, 102(1), p.432-439.
- Rea, R.V., 2013. The Influence of Willow *Salix* sp. Rose Insect Galls on Moose *Alces alces* Winter Browsing. *The Canadian Field-Naturalist*, 126(3), p.189-193.
- Rey, L.A., 1992. Developmental morphology of two types of Hymenopterous galls. In J. D. Shorthouse & O. Rohfritsch, éd. *Biology of insect-induced galls*. Oxford University, Oxford, p. 87-101.

- Rocha, S. et al., 2013. Gall induction may benefit host plant: a case of a gall wasp and eucalyptus tree. *Tree Physiology*, 33(4), p.388-397.
- Rohfritsch, O., 1990. Aphid stylet movement and host-plant reaction in the case of Adelgidae on spruce. In *Aphid-plant genotype interactions*. R. K. Campbell & R. D. Eikenbary, éd. Elsevier, N. Y., p. 101-116.
- Rohfritsch, O., 1992. Patterns in gall development. In J. D. Shorthouse & O. Rohfritsch, éd. *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, p. 60-86.
- Rohfritsch, O. & Anthony, M., 1992. Strategies in gall induction by two groups of Homopterans. In J. D. Shorthouse & O. Rohfritsch, éd. *Biology of insect-induced galls*. New York, p. 102-117.
- Roininen, H., Price, P.W. & Bryant, J.P., 1997. Response of Gallling Insects to Natural Browsing by Mammals in Alaska. *Oikos*, 80(3), p.481.
- Rossi, A.M. & Stiling, P., 1998. The interactions of plant clone and abiotic factors on a gall-making midge. *Oecologia*, 116(1-2), p.170-176.
- Rostás, M. et al., 2013. Gall volatiles defend aphids against a browsing mammal. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), p.1-12.
- Sadeghi, S.E., Rajabi-Mazhar, N.A. & Moharramipour, S., 2007. A study on the incidence of woolly poplar aphid, *Phloemyzus passerinii* (Hom.: Aphididae) on poplar species and clones in Hamedam province, Iran. *Journal of Entomological Society of Iran*, 26(2), p.47-59.
- Sagers, C.L., 1992. Manipulation of Host Plant Quality: Herbivores Keep Leaves in the Dark. *Functional Ecology*, 6(6), p.741.
- Saltzman, K.D. et al., 2008. Virulent Hessian Fly Larvae Manipulate the Free Amino Acid Content of Host Wheat Plants. *Journal of Chemical Ecology*, 34(11), p.1401-1410.
- Samsone, I., Andersone, U. & Ievinsh, G., 2011. Gall midge *Rhabdophaga rosaria*-induced rosette galls on *Salix*: morphology, photochemistry of photosynthesis and defense enzyme activity. *Environmental and Experimental Biology*, 9, p.29-36.
- Sandberg, S.L. & Berenbaum, M.R., 1989. Leaf-tying by tortricid larvae as an adaptation for feeding on phototoxic *Hypericum perforatum*. *Journal of Chemical Ecology*, 15(3), p.875-885.
- Sandström, J.P. & Moran, N.A., 2001. Amino acid budgets in three aphid species using the same host plant. *Physiological Entomology*, 26(3), p.202-211.
- Sandström, J., Telang, A. & Moran, N.A., 2000. Nutritional enhancement of host plants by aphids — a comparison of three aphid species on grasses. *Journal of Insect Physiology*, 46(1), p.33-40.

- Santos, J.C. & Fernandes, G.W., 2010. Mediation of herbivore attack and induced resistance by plant vigor and ontogeny. *Acta Oecologica*, 36(6), p.617-625.
- Sasaki, T., Kawamura, M. & Ishikawa, H., 1996. Nitrogen recycling in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Involvement of yeast-like endosymbionts in uric acid metabolism. *Journal of Insect Physiology*, 42(2), p.125-129.
- Sauge, M.H. et al., 2006. Genotypic variation in induced resistance and induced susceptibility in the peach-*Myzus persicae* aphid system. *Oikos*, 113, p.305-313.
- Sauge, M.H., Kervella, J. & Rahbé, Y., 1998. Probing behaviour of the green peach aphid *Myzus persicae* on resistant *Prunus* genotypes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 89, p.223-232.
- Scheirs, J., De Bruyn, L. & Verhagen, R., 2001. Nutritional benefits of the leaf-mining behaviour of two grass miners: a test of the selective feeding hypothesis. *Ecological Entomology*, 26(5), p.509-516.
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A. & Dicke, M., 2005. *Insect-plant biology* 2^e éd., Oxford University Press.
- Scriber, J.M. & Feeny, P., 1979. Growth of Herbivorous Caterpillars in Relation to Feeding Specialization and to the Growth Form of Their Food Plants. *Ecology*, 60(4), p.829-850.
- Shannon, R.E. & Brewer, J.W., 1980. Starch and sugar levels in three coniferous insect galls. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 89(1-5), p.526-533.
- Shorthouse, J.D. & Rohfritsch, O. éd., 1992. *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New-York. 1992 pp. x + 285 pp.
- Shorthouse, J.D., Wool, D. & Raman, A., 2005. Gall-inducing insects – Nature's most sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology*, 6(5), p.407-411.
- Signoret, V., 1875. Description d'un aphidien nouveau (*Schizoneura passerinii*). *Annales de la Société Entomologique de France*, (59), p.CCII-CCIII.
- Silva, I.M. et al., 1996. Parasitic Relationships between a Gall-forming Insect *Tomoplagia rudolphi* (Diptera: Tephritidae) and its Host Plant (*Vernonia polyanthes*, Asteraceae). *Annals of Botany*, 78(1), p.45-48.
- Simpson, S.J. et al., 2002. A comparison of nutritional regulation in solitary- and gregarious-phase nymphs of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology*, 205(1), p.121-129.
- Sinclair, R.J. & Hughes, L., 2010. Leaf miners: The hidden herbivores. *Austral Ecology*, 35(3), p.300-313.

- Six, D.L., 2012. Ecological and Evolutionary Determinants of Bark Beetle —Fungus Symbioses. *Insects*, 3(1), p.339-366.
- Smallegange, R. C., Van Loon, J. J. A., Blatt, S. E., Harvey, J. A., Agerbirk, N., & Dicke, M., 2007. Flower vs. leaf feeding by *Pieris brassicae*: glucosinolate-rich flower tissues are preferred and sustain higher growth rate. *Journal of chemical ecology*, 33(10), p.1831-1844.
- Sopow, S.L. et al., 2003. Evidence for long-distance, chemical gall induction by an insect. *Ecology Letters*, 6(2), p.102-105.
- De Sousa, E.M.R. & Inacio, M.L., 2005. New aspects of *Platypus cylindrus* Fab. (Coleoptera: Platypodidae) life history on cork oak stands in Portugal. In *Entomological Research in Mediterranean Forest Ecosystems*. F. Lieutier and D. Ghaïoule, éd.. Editions INRA, Paris, p. 147-168.
- Southwood, T.R.E., 1973. The insect/plant relationship - and evolutionary perspective. In H. F. Van Emden, éd. *Insect/Plant Relationships*. Blackwell, London, p. 3-30.
- Staniland, L.N., 1924. The Immunity of Apple Stocks from Attacks of Woolly Aphis (*Eriosoma lanigerum*, Hausmann). Part II. The Causes of the Relative Resistance of the Stocks. *Bulletin of Entomological Research*, 15(02), p.157-170.
- Starmer, W.T. & Fogleman, J.C., 1986. Coadaptation of *Drosophila* and yeasts in their natural habitat. *Journal of Chemical Ecology*, 12(5), p.1037-1055.
- Stern, D.L. & Foster, W.A., 1996. The Evolution of Soldiers in Aphids. *Biological Reviews*, 71(1), p.27-79.
- Stone, G.N. et al., 2002. The Population Biology of Oak Gall Wasps (hymenoptera: Cynipidae). *Annual Review of Entomology*, 47(1), p.633-668.
- Stone, G.N. & Schönrogge, K., 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(10), p.512-522.
- Stone, G., Schonrogge, K. & Csóka, G., 2010. Three person views of the future of gall research. *Cecidology*, 25, p.58-68.
- Straka, J.R., Hayward, A.R. & Emery, R.J.N., 2010. Gall-inducing *Pachypsylla celtidis* (Psyllidae) infiltrate hackberry trees with high concentrations of phytohormones. *Journal of Plant Interactions*, 5(3), p.197-203.
- Straw, N.A. et al., 2000. The impact of green spruce aphid, *Elatobium abietinum* (Walker), and root aphids on the growth of young Sitka spruce in Hafren Forest, Wales: effects on height, diameter and volume. *Forest Ecology and Management*, 134(1-3), p.97-109.

- Straw, N.A. et al., 1998. The impact of green spruce aphid, *Elatobium abietinum* (Walker), on the growth of young Sitka spruce in Hafren Forest, Wales: pattern of defoliation and effect on shoot growth. *Forest Ecology and Management*, 104(1–3), p.209–225.
- Strong, D.R., Lawton, J.H. & Southwood, S.R., 1984. *Insects on plants. Community patterns and mechanisms*. Blackwell Scientific Publications Oxford, U.K., pp. vi + 313 pp.
- Stuart, J.J. et al., 2012. Gall Midges (Hessian Flies) as Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 50(1), p.339–357.
- Su, Q., Huipeng P., Baiming L., Dong C., Wen X., Qingjun W., Shaoli W., Baoyun X., et Youjun Z. 2013. « Insect Symbiont Facilitates Vector Acquisition, Retention, and Transmission of Plant Virus ». *Scientific Reports* 3, article 1367.
- Sumerford, D.V., Abrahamson, W.G. & Weis, A.E., 2000. The effects of drought on the *Solidago altissima*-*Eurosta solidaginis*-natural enemy complex: population dynamics, local extirpations, and measures of selection intensity on gall size. *Oecologia*, 122(2), p.240–248.
- Suzuki, D.K., Fukushi, Y. & Akimoto, S., 2009. Do aphid galls provide good nutrients for the aphids?: Comparisons of amino acid concentrations in galls among *Tetraneura* species (Aphididae: Eriosomatinae). *Arthropod-Plant Interactions*, 3(4), p.241–247.
- Tabuchi, K. et al., 2011. Bottom-up trophic cascades caused by moose browsing on a natural enemy of a galling insect on balsam fir. *Basic and Applied Ecology*, 12(6), p.523–531.
- Tabuchi, K., Ueda, A. & Ozaki, K., 2010. Contrasting Effects of Deer Browsing on Oviposition Preference, Neonate Survival and Potential Fecundity of a Galling Insect. *Ecoscience*, 17(4), p.379–386.
- Takemoto, H. et al., 2013. Previous infestation of pea aphids *Acyrtosiphon pisum* on broad bean plants resulted in the increased performance of conspecific nymphs on the plants. *Journal of Plant Interactions*, 8(4), p.370–374.
- Taper, M.L. & Case, T.J., 1987. Interactions between oak tannins and parasite community structure: Unexpected benefits of tannins to cynipid gall-wasps. *Oecologia*, 71(2), p.254–261.
- Telang, A. et al., 1999. Feeding damage by *Diuraphis noxia* results in a nutritionally enhanced phloem diet. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91(3), p.403–412.
- Thaler, J. S., 1999. Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature*, 399(6737), p.686–688.
- Theobald, F.V., 1929. The plant lice or Aphididae of Great Britain. Vol. 3, Headley Bros., London.

- Thompson, G.A. & Goggin, F.L., 2006. Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), p.755-766.
- Tjallingii, W.F., 1989. Electrical recording of stylet penetration activities. In: *Aphids: Their Biology, natural enemies and control*. A. K. Minks & P. Harrewijn, éd. Vol. 2B. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p. 95-108.
- Tjallingii, W.F., 1978. Electronic Recording of Penetration Behaviour by Aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24(3), p.721-730.
- Tjallingii, W.F., 1994. Sieve element acceptance by aphids. *European Journal of Entomology*, 91, p.47-52.
- Tjallingii, W.F. & Hogen Esch, T.H., 1993. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology*, 18(3), p.317-328.
- Tokuda, M. et al., 2013. Phytohormones Related to Host Plant Manipulation by a Gall-Inducing Leafhopper. *PLoS ONE*, 8(4), p.e62350.
- Tooker, J.F. et al., 2008. Gall insects can avoid and alter indirect plant defenses. *New Phytologist*, 178(3), p.657-671.
- Tooker, J.F. & Hanks, L.M., 2006. Tritrophic Interactions and Reproductive Fitness of the Prairie Perennial *Silphium laciniatum* Gillette (Asteraceae). *Environmental Entomology*, 35(2), p.537-545.
- Tooker, J.F. & Helms, A.M., 2014. Phytohormone Dynamics Associated with Gall Insects, and their Potential Role in the Evolution of the Gall-Inducing Habit. *Journal of Chemical Ecology*, p.1-12.
- Tooker, J.F. & Moraes, C.M.D., 2011. Feeding by Hessian Fly (*Mayetiola destructor* [Say]) Larvae on Wheat Increases Levels of Fatty Acids and Indole-3-Acetic Acid but not Hormones Involved in Plant-Defense Signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30(2), p.158-165.
- Unsicker, S. B., Kunert, G., & Gershenzon, J., 2000). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current opinion in plant biology*, 12(4), p.479-485.
- Vala, J.C. et al., 2011. *Phloeomyzus passerinii* (Signoret, 1875) dit Puceron lanigère du Peuplier (Hemiptera Sternorrhyncha Aphididae). *L'Entomologiste*, 67(2), p.49-55.
- Vecchi, C. et al., 2013. The redifferentiation of nutritive cells in galls induced by Lepidoptera on *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn. reveals predefined patterns of plant development. *Protoplasma*, 250(6), p.1363-1368.

- Vidotti, G., 1960. Osservazioni sulla etologia ed ecologia del *Phloeornyzus passerinii* Sign. nella zona di Este (Homoptera Aphididae Aphidinae). *Atti 1st. Ven. Sci. Lett. Arti*, 118, p.203–218.
- Walter, J. et al., 2012. How do extreme drought and plant community composition affect host plant metabolites and herbivore performance? *Arthropod-Plant Interactions*, 6(1), p.15-25.
- Walters, D.R., McRoberts, N. & Fitt, B.D.L., 2008. Are green islands red herrings? Significance of green islands in plant interactions with pathogens and pests. *Biological Reviews*, 83(1), p.79-102.
- Washburn, J.O., 1984. Mutualism Between a Cynipid Gall Wasp and Ants. *Ecology*, 65(2), p.654.
- Watanabe, Y., Shinzato, N. & Fukatsu, T., 2003. Isolation of Actinomycetes from Termites' Guts. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(8), p.1797-1801.
- Weis, A.E., Walton, R. & Crego, C.L., 1988. Reactive Plant Tissue Sites and the Population Biology of Gall Makers. *Annual Review of Entomology*, 33(1), p.467-486.
- White, T.C.R., 2011. Galls on smaller leaves do not refute the plant vigour hypothesis. *Brazilian Journal of Biology*, 71(4), p.1027-1028.
- Whitham, T.G., 1978. Habitat Selection by *Pemphigus* Aphids in Response to Resource Limitation and Competition. *Ecology*, 59(6), p.1164.
- Whitham, T.G., 1979. Territorial behaviour of *Pemphigus* gall aphids. *Nature*, 279(5711), p.324-325.
- Wilkinson, T.L. & Douglas, A.E., 2003. Phloem amino acids and the host plant range of the polyphagous aphid, *Aphis fabae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 106(2), p.103-113.
- Williams, I.S. & Dixon, A.F.G., 2007. Life cycles and polymorphism. In *Aphids as Crop Pests*. H. F. Van Emden & R. Harrington, éd. CABI, Wallingford, p. 69-86.
- Willmer, P.G., 1980. The effects of a fluctuating environment on the water relations of larval Lepidoptera. *Ecological Entomology*, (5), p.271-292.
- Wink, M., 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*, 75(2), p.225-233.
- Wink, M. & Schneider, D., 1990. Fate of plant-derived secondary metabolites in three moth species (*Syntomis mogadorensis*, *Syntomeida epilais*, and *Cretonotos transiens*). *Journal of Comparative Physiology B*, 160(4), p.389-400.

- Wittstock, U., Agerbirk, N., Stauber, E. J., Olsen, C. E., Hippler, M., Mitchell-Olds, T., ... & Vogel, H., 2004. Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), p.4859-4864.
- Wool, D., 2005. Differential colonization of host trees by galling aphids: Selection of hosts or selection by hosts? *Basic and Applied Ecology*, 6(5), p.445-451.
- Wool, D. & Manheim, O., 1988. The effects of host-plant properties on gall density, gall weight and clone size in the aphid *Aploneura lentisci* (Pass.)(Aphididae: Fordinae) in Israel. *Researches on Population Ecology*, 30(2), p.227-234.
- Yamaguchi, H. et al., 2012. Phytohormones and willow gall induction by a gall-inducing sawfly. *New Phytologist*, 196(2), p.586-595.
- Yang, C.-M. et al., 2003. Herbivorous insect causes deficiency of pigment-protein complexes in an oval-pointed cecidomyiid gall of *Machilus thunbergii* leaf. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 44, p.315-321.
- Zein, R.E. et al., 2011. Seasonal changes of C and N non-structural compounds in the stem sapwood of adult sessile oak and beech trees. *Tree Physiology*, 31(8), p.843-854.
- Zhang, B., Lou, Y.-M. & Qiao, G.-X., 2013. A new genus and species of Macrosiphini (Hemiptera, Aphididae) from China, living on *Isodon eriocalyx*. *ZooKeys*, 359, p.1-12.
- Zhu, L. et al., 2012. Rapid Mobilization of Membrane Lipids in Wheat Leaf Sheaths During Incompatible Interactions with Hessian Fly. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(7), p.920-930.
- Zhu, L., Liu, X. & Chen, M.-S., 2010. Differential Accumulation of Phytohormones in Wheat Seedlings Attacked by Avirulent and Virulent Hessian Fly (Diptera: Cecidomyiidae) Larvae. *Journal of Economic Entomology*, 103(1), p.178-185.
- Zientz, E. et al., 2006. Relevance of the Endosymbiosis of *Blochmannia floridanus* and Carpenter Ants at Different Stages of the Life Cycle of the Host. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), p.6027-6033.
- Zvereva, E.L., Lanta, V. & Kozlov, M.V., 2010. Effects of sap-feeding insect herbivores on growth and reproduction of woody plants: a meta-analysis of experimental studies. *Oecologia*, 163(4), p.949-960.

France DARDEAU

Modulation de la manipulation du peuplier par le puceron lanigère, *Phloeomyzus passerinii* (Sign.), via la résistance de l'hôte et l'environnement

Résumé : *Phloeomyzus passerinii* est un important ravageur des peupleraies en Europe. Ce puceron se développe sur les troncs de peuplier, avec un mode nutrition mal connu, et présente des performances variables selon les génotypes de peuplier. Dans une optique de gestion de cet insecte, il était nécessaire de clarifier la nature de ses interactions trophiques avec son hôte. En complément, nous avons étudié comment la résistance de l'hôte et des facteurs environnementaux, comme la fertilisation et une contrainte hydrique, pouvaient affecter ces interactions. Des approches histologiques et biochimiques ont permis de mettre en évidence l'induction par l'insecte d'un tissu organisé dans l'écorce d'un génotype sensible (I-214), qualifiable de pseudogalle, où les composés phénoliques solubles disparaissent mais où des acides aminés s'accumulent. Des approches complémentaires ont montré que le comportement de nutrition du puceron était optimisé sur ces tissus modifiés, et son développement larvaire amélioré. Concernant les mécanismes de résistance, dans un génotype très résistant (Brenta), la formation de la pseudogalle était totalement inhibée, suite à une lignification intense et étendue des tissus, empêchant l'installation du puceron. Dans un génotype de résistance intermédiaire (I-45/51), la formation était seulement partiellement inhibée, diminuant les performances démographiques et comportementales de l'insecte, et la capacité du tissu modifié à accumuler des acides aminés. Pour étudier l'impact environnemental, nous avons considéré les effets de trois niveaux de fertilisation et de trois niveaux d'irrigation du sol. La fertilisation n'a pas modifié les performances du puceron, probablement à cause d'une accumulation d'acides aminés par la pseudogalle d'autant plus forte que la fertilisation était faible. Le déficit hydrique a affecté les interactions, notamment au travers d'un effet génotype dépendant, favorisant le développement de l'insecte lors d'une contrainte intermédiaire chez le génotype résistant seulement et affectant négativement le développement chez les génotypes sensible et résistant lors d'une contrainte élevée.

Mots clés : interactions plante-insecte, galle, manipulation, nutrition, comportement, parenchyme cortical, fertilisation, déficit hydrique, acides aminés, histologie, biochimie, électropénétrographie, écophysiologie, Aphididae, *Populus x canadensis*

Modulation of poplar manipulation by the woolly aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Sign.), via host resistance and environment

Summary: *Phloeomyzus passerinii* is an important pest of cultivated poplar stands in Europe. It develops on poplar trunks, thanks to an undefined feeding mode, and exhibits variable performances depending on poplar genotypes. To develop efficient management strategies, we have investigated the trophic interactions between this pest and its host. In addition, we have studied how host resistance and environmental factors, like fertilization and water deficit, could affect these interactions. Histological and biochemical approaches highlighted the induction by the aphid of an organized tissue in the bark of a susceptible poplar genotype (I-214), considered as a pseudogall, where soluble phenolic compounds disappear but amino acids accumulate. Behavioral and physiological approaches showed that the aphid nutrition behavior is optimized on these modified tissues, and that its nymphal development is improved. Regarding resistance mechanisms, on a highly resistant genotype (Brenta), pseudogall formation was totally inhibited, due to an intense and extended lignification, preventing aphid settlement. On a moderately resistant genotype (I-45/51), pseudogall formation was only partially inhibited, reducing demographic and behavioral performances of the insect, and the ability of the pseudogall to accumulate amino acids. To study environmental impacts, we considered the effects of three soil fertilization levels and three irrigation levels. Fertilization did not modify aphid performances, probably due to an increase in amino acids accumulation by the pseudogall when fertilization decreased. Water deficit affected the interactions, through a genotype dependant effect, favoring insect development under an intermediate deficit on the resistant genotype only, and negatively affecting the development on both susceptible and resistant genotypes during a severe water deficit.

Keywords: plant-insect interactions, gall, manipulation, nutrition, behaviour, cortical parenchyma, fertilization, water deficit, amino acid, histology, biochemistry, electropenetrography, ecophysiology, Aphididae, *Populus x canadensis*



Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207
Université d'Orléans, rue de Chartres, BP6759, 45067
Orléans cedex 2

