



HAL
open science

Rôle du commerce ornemental dans l'invasion fulgurante de la pyrale du buis : traçage génétique des populations colonisant la Région Centre Val de Loire

Caroline Viot

► To cite this version:

Caroline Viot. Rôle du commerce ornemental dans l'invasion fulgurante de la pyrale du buis : traçage génétique des populations colonisant la Région Centre Val de Loire. Environnement et Société. 2018. hal-02790759

HAL Id: hal-02790759

<https://hal.inrae.fr/hal-02790759v1>

Submitted on 5 Jun 2020

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.

MASTER Sciences - Technologie – Santé
Mention Ecosystèmes, Agrosystèmes, Développement Durable
Spécialité Ecologie, Agroécologie, Biodiversité



Rôle du commerce ornemental dans l'invasion fulgurante de la pyrale du buis : traçage génétique des populations colonisant la Région Centre Val de Loire.

VIOT Caroline

Encadrant du stage : Jérôme Rousselet

Tuteur du mémoire : Annie Guillier

2163 avenue de la pomme de pin CS 40001 - Ardon 45075 ORLEANS CEDEX 2

MASTER Sciences - Technologie – Santé
Mention Ecosystèmes, Agrosystèmes, Développement Durable
Spécialité Ecologie, Agroécologie, Biodiversité



Rôle du commerce ornemental dans l'invasion fulgurante de la pyrale du buis : traçage génétique des populations colonisant la Région Centre Val de Loire.

VIOT Caroline

Encadrant du stage : Jérôme Rousselet

Tuteur du mémoire : Annie Guillier

2163 avenue de la pomme de pin CS 40001 - Ardon 45075 ORLEANS CEDEX 2

Remerciements

Je tiens remercier Marie-Anne Auger-Rozenberg pour m'avoir accueilli au sein de son unité, ainsi que Jérôme Rousselet pour m'avoir fait confiance et permis de travailler sur ce sujet passionnant. Je remercie également Audrey Bras qui a eu la patience de m'expliquer les mécaniques de mon stage suivant son projet de thèse et avoir répondu à mes questions, ainsi que Claudine Courtin pour m'avoir expliqué toutes les techniques en microsattellites et d'avoir été une agréable compagne de laboratoire. Emmanuelle Magnoux pour ses aides, ses réponses et ses nombreux conseils. Je tiens également à remercier l'ensemble de l'unité URZF pour leur accueil, mais également l'ensemble des personnes qui m'ont fourni des échantillons : Agathe Dupin, Alexis Bernard, Audrey Bras, Carlos Lopez, Caroline Carpentiez, Christian Cordier-Lallouet, Corinne Mariez, Elina Chatzimitriou, Francis Rachou-Langlatte (ONF), Jérôme Rousselet, Patrick Pineau, Paul Boisson, Stéphanie Marétheu, Vanille Thibault et La FREDON.

Pour terminer, je remercie ma tutrice Annie Guiller qui m'a aidé à écrire mon rapport et m'a apporté des conseils avisés.

Sommaire

Présentation de l'entreprise.....	1
Introduction.....	2
Synthèse bibliographique.....	6
1. <i>Cydalima perspectalis</i> , la pyrale du buis.	6
2. Comprendre l'invasion biologique pour comprendre l'expansion de <i>C. pers</i>	10
3. Les microsatellites : leur intérêt.....	11
Stage.....	13
1. Matériels et méthodes.....	13
2. Résultats.....	18
3. Discussion.	24
Conclusion.	27
Bilan personnel.....	28

Table des matières

Présentation de l'entreprise.....	1
Introduction.....	2
Synthèse bibliographique.....	6
1. <i>Cydalima perspectalis</i> , la pyrale du buis.....	6
1.1. La biologie de <i>Cydalima perspectalis</i>	6
1.2. Les hôtes, les origines potentielles et les aires de propagation connues de <i>C. pers.</i> ...	8
2. Comprendre l'invasion biologique pour comprendre l'expansion de <i>C. perspectalis</i>	10
2.1. Quelques rappels de base sur les invasions biologiques.....	10
2.2. Le rôle de la génétique dans l'invasion d'un nouveau milieu.	110
3. Les microsatellites : leur intérêt.....	11
3.1. Les propriétés des microsatellites.	11
3.2. Quels sont les limites des microsatellites ?.....	12
Stage.....	13
1. Matériels et méthodes.....	13
1.1. Matériel biologique.....	13
1.2. Extraction et purification de l'ADN.	13
1.3. PCR en plaque.....	14
1.4. Analyse des données génétiques.....	14
1.4.1. Approche population-centrée.	14
1.4.1.1. Structuration de la diversité génétique au sein des (sous)populations. 15	
1.4.1.2. Structuration de la diversité génétique entre (sous-)populations.....	16
1.4.2. Approche individu-centrée.	16
2. Résultats.....	18
2.1. Approche population-centrée.....	18
2.1.1. Structuration de la diversité génétique au sein des (sous-)populations.....	18
2.1.2. Structuration de la diversité génétique entre (sous-)populations.	19
2.2. Approche individu-centrée.....	19
2.2.1. Choix du meilleur niveau hiérarchique.	19
2.2.2. Structuration spatiale pour $K=3$	20
2.2.3. Structuration spatiale pour $K > 3$	22
3. Discussion.....	24
3.1. Structure hiérarchique des populations en Europe et en France.....	24
3.2. Structure des populations en Région Centre Val de Loire.....	26

Conclusion.....	27
Bilan personnel.....	28
Sources bibliographie.....	30
Glossaire.....	35
Annexes.....	36

Présentation de l'entreprise.

L'URZF est une unité de recherche, située à Orléans, appartenant au département Ecologie des Forêts, Prairies et milieux Aquatiques (EFPA) de l'INRA. Les travaux réalisés au sein de l'unité portent sur la caractérisation, autant sur le plan génétique, physiologique et comportemental, des populations d'insectes forestiers envahissants ou en expansion sous l'effet du changement climatique, que sur l'analyse des mécanismes gouvernant la réussite des invasions biologiques d'insectes, sur la mesure des risques écologiques et économique, tout ceci afin d'en déduire des mesures de gestion.

Les recherches sont déclinées suivant deux volets : « Populations en expansion sous l'effet du changement climatique » et « Invasions Biologiques ». Elles s'appuient sur une démarche pluridisciplinaire associant des chercheurs spécialisés en entomologie, écologie, génétique, physiologie et mathématiques appliqués.

L'URZF est dirigé depuis 2018 par la directrice de recherches Marie-Anne Auger-Rozenberg, succédant au docteur Alain Roques. L'unité comporte 18 permanents dont 1 assistante-ingénieur : Emmanuelle Magnoux, 5 chargés de recherches : Mathieu Laparie, Carlos Lopez-Vaamonde, Christelle Robinet, Jérôme Rousselet et Daniel Sauvard, 1 directrice adjointe : Sylvie Augustin, 1 entomologiste : Olivier Denux, 1 informaticien : Régis Phelut, 1 ingénieure d'études : Béatrice Courtiel, 1 gestionnaire d'unité : Marie Millier, 1 maître de conférences : Géraldine Roux et, 4 techniciens de recherche : Alexis Bernard, Claudine Courtin, Philippe Lorme et Patrick Pineau.

Fondé en 1946, l'Institut national de la recherche agronomique (INRA) est un organisme français de recherche placé sous la double tutelle du Ministère de la Recherche et du Ministère de l'Agriculture. Il est le premier institut de recherche agronomique en Europe et le deuxième en sciences agricoles dans le monde. L'Inra mène des recherches au service d'enjeux de société majeurs. Il bénéficie de partenariats avec des universités et de grands instituts de recherche scientifique dans le monde.

Les travaux de l'INRA concernent trois champs de recherche en forte interaction : l'agriculture, l'alimentation et l'environnement. Les recherches faites dans cet institut ont aussi pour ambition de relever les grands défis planétaires de demain dans une perspective de développement durable : assurer la nutrition humaine et la valorisation des territoires dans un contexte de changement climatique et d'épuisement des ressources fossiles.

Introduction

À la surface de la planète, les frontières ne sont que juridiques, fruits de l'imagination de l'être humain. Pour le vivant, il n'existe que des barrières biogéographiques, des barrières écologiques, limitant ou empêchant la dispersion. Parmi elles, selon les traits de vie des espèces, se trouvent les chaînes de montagnes, les landes désertiques ou encore les mers. De nombreuses espèces sont constamment en mouvement, cherchant à traverser ces barrières, modifiant au cours du temps leur répartition géographique afin de trouver la meilleure niche écologique pour leur survie. Ces nombreux déplacements sont souvent non intentionnels et peuvent provoquer des invasions biologiques. Celles-ci affectent les populations d'espèces natives et peuvent diminuer la biodiversité (McKinney & Lockwood, 1999 ; Mack *et al.*, 2000). L'invasion biologique est un phénomène où une espèce exotique, en colonisant un nouveau milieu, devient envahissante au détriment des autres espèces, dont l'être-humain, en ayant un impact écologique, économique et sanitaire. Le terme envahissant est important, car une espèce exotique s'installant dans un nouveau milieu n'est pas forcément invasive, pouvant trouver un équilibre avec les espèces déjà présentes sans altérer l'écosystème. Ce phénomène se décline en trois phases : l'introduction, l'établissement et l'expansion (Sakai *et al.*, 2001).

Le rythme des introductions et des établissements d'espèce allochtones n'a jamais été aussi élevé qu'actuellement. Les arthropodes terrestres sont les invasifs les plus courants, avec globalement un taux d'arrivée qui a doublé ces dernières décennies, et dont la majorité des espèces répertoriées sont des insectes (Roques, 2010b). L'espèce envahissante peut ne pas avoir d'impact sur son nouveau milieu et l'écosystème déjà en place, mais elle peut néanmoins le perturber, pouvant devenir un ravageur (Rodriguez *et al.*, 2005 ; Haack *et al.*, 2010). Cela entraîne des pertes financières très importantes dans le secteur agricole et forestier. De plus, cela peut conduire à des menaces pour la santé humaine (moustique tigre) et la biodiversité (frelon asiatique, capricornes asiatiques, ...) (Su 2013 ; Roques *et al.* 2015). Cette augmentation exponentielle des phénomènes d'invasion est fortement liée à l'anthropisation, l'augmentation des transports de marchandises et de personnes. L'augmentation du commerce mondial est un des facteurs contribuant à l'introduction non intentionnelle et à la survie d'organismes (champignons, insectes...) dans de nouvelles zones géographiques éloignées de leur région d'origine (annexe 1). Dans ces conditions, le principe de barrière géographique n'existe plus, les espèces étant transportées d'un point à un autre avec facilité, seule la condition environnementale de la zone d'introduction peut être un frein à l'invasion.

En Europe, nombreuses sont les espèces exotiques envahissantes (EEE). Environ 12 000 ont été introduites depuis d'autres continents ou transportées d'une région à une autre. Parmi celles-ci, un grand nombre d'espèces proviennent d'Asie, bénéficiant des forts volumes d'échanges commerciaux avec ce continent pour franchir des barrières biogéographiques (Roques, 2010 a,b ; Eschen *et al.*, 2017). En outre, dans un contexte d'évolution structurelle du secteur horticole à l'échelle mondiale (Widehem *et al.*, 2006 ; Dehnen-Schmutz *et al.*, 2010 ; Maxwell *et al.*, 2014 ; Van Kleunen, 2018), de plus en plus de données s'accumulent pour montrer

que le commerce de plantes ornementales constitue une route d'invasion majeure (Liebhold et al, 2012 ; Roques, 2010b, Eschen et al, 2017). Au cours de la période 2005-2014, le secteur de l'horticulture ornementale serait responsable de la majorité des introductions d'insectes d'importance agronomique en France (75%), notamment celui des plantes ligneuses (arbres, arbustes) et des palmiers correspondant pour l'essentiel à des essences ornementales (contre 5% pour la période 1950-1999, et 61% pour la période 2000-2005) (Martinez *et al.* 2014). On peut donc dire que le commerce de plante est un des responsables majeurs des transports accidentels des espèces envahissantes. Les espèces exotiques envahissantes sont souvent introduites avec leurs plantes hôtes, comme le cynips du châtaignier *Dryocosmus kuriphilus* (Avtzis & Matosevic, 2013), le charançon du palmier *Rhynchophorus ferrugineus* ou la pyrale du buis *Cydalima perspectalis* (Bella, 2013) mais elles peuvent aussi être introduites sur différents types de support comme le capricorne asiatique *Anoplophora glabripennis* (Vaes-Petignat & Nentwig, 2014) ou la punaise nord- américaine *Leptoglossus occidentalis* (Lesieur *et al.* 2014). Une fois sur leur nouveau territoire, leur expansion (et pas seulement leur introduction sur celui-ci) peut être facilitée par le transport de plants infestés. Leur propagation devient alors extrêmement rapide et massive, impossible à éradiquer, on parle d'expansion fulgurante dans les zones envahies.

Une majorité des insectes invasifs en Europe est asiatique, l'Asie étant devenue un acteur important dans le secteur horticole (Roques, 2010 ; 51% des espèces d'origine asiatique selon Martinez *et al.*, 2014). La Chine est l'un des plus grands pays producteurs et exportateurs de plantes d'ornement pour l'Europe. En Europe, ce sont les Pays-Bas qui dominent le marché des plantes ornementales, aussi bien dans la production que dans l'importation en provenance d'Asie (Cadic & Widehem, 2006). Ils redistribuent donc autant des plants produits en interne que des plants importés de Chine vers d'autres pays européens, ce qui en fait un point d'entrée de plants infestés et une plateforme de redistribution à l'intérieur du marché unique européen. De plus, avec l'augmentation du commerce sur internet et l'essor de la grande distribution, que ce soit avec les supermarchés généralistes ou les jardinerie spécialisées, les pays qui produisaient eux-mêmes leurs plants d'ornement avec un secteur horticole moins concentré (géographiquement et en nombre et taille d'entreprises), tel que la France, ne sont pas capables d'offrir de tels volumes. Ils sont poussés à importer depuis d'autres pays européens tels que les Pays-Bas ou les pays asiatiques des produits standardisés sur l'ensemble du marché et vendus en masse dans toutes les villes. Depuis la chute du mur qui séparait l'Europe de l'Est et de l'Ouest, et la suppression des barrières douanières internes au continent, ces mêmes pays exportent aussi vers les pays de l'Europe Centrale comme la Hongrie ou ceux entourant la Mer Noire telle la Russie (Gninenko *et al.* 2014). Tout ceci multiplierait les points d'introduction en Europe et les phénomènes dit « têtes de pont » (ou *bridgehead effect*), où un premier foyer sert de source aux suivants (Lombaert et al, 2010). La dispersion passive via ces transports accidentels peut donc constituer un facteur d'accélération de l'expansion. Pour finir, une fois plantés, les arbres ornementaux modifient les paysages durablement et sont disponibles pour servir également de tremplin à la dispersion active. Cette modification du milieu peut donc être un autre facteur anthropogénique d'accélération de l'expansion.

La pyrale du buis, *Cydalima perspectalis* Walker, est un Lépidoptère de la famille des Crambidae présente naturellement en Chine, Corée et Japon. Cet insecte est un défoliateur qui réalise son développement sur une quinzaine d'espèces d'arbres du genre *Buxus* (Castells *et al.*, 2011). Son succès à la vente engendre le même processus commercial que les autres plantes ornementales. Son commerce et ses importations depuis l'Asie, grand producteur de buis, ont ainsi fortement augmenté, emportant avec lui ce passager clandestin. Depuis 2007, ce serait de l'ordre de 10 millions de pieds qui auraient ainsi été importés (Eschen, comm. pers.). Son invasion en Europe a été fulgurante (Brua, 2013 ; Bras *et al.*, 2016 ; Roques *et al.*, 2016). *C. perspectalis* a été observé pour la première fois en Allemagne en 2007 à Weil am Rhein, puis cette espèce s'est propagée dans de nombreux pays de l'Europe et du Proche-Orient, où elle constitue une menace autant pour le patrimoine naturel (buxaies natives) que culturel (parcs et jardins à la française). Cet insecte est emblématique des processus contemporains d'invasions biologiques chez les insectes phytophages, que ce soit au niveau de la phase de transport et d'introduction (à une échelle intercontinentale) ou de la phase d'expansion dans l'aire envahie (à une échelle intra-continentale). Qu'elle soit passive ou active, l'expansion de *C. perspectalis* est attendue pour avoir laissé dans les populations de la zone envahie une signature génétique, qui couplée aux données commerciales du buis, doit permettre de reconstituer les routes empruntées par cet invasif. L'utilisation de marqueurs moléculaires¹ permet d'estimer la variabilité génétique et d'inférer les processus responsables de la façon dont elle se répartit et se structure dans le temps et l'espace. Très peu d'études génétiques ont été réalisées chez la pyrale du buis. À l'issue d'une analyse phylogéographique fondée sur la diversité de marqueurs mitochondriaux (à hérédité maternelle) dans des populations natives (Asie) et introduites (Europe) de l'espèce, Bras *et al.* (2016) ont cependant déduit qu'outre une origine chinoise des migrants, plusieurs introductions seraient probables. Audrey Bras a ensuite consacré sa thèse (2015-2018) sur le traçage génétique de la pyrale du buis depuis son aire d'origine à l'Europe et la France en utilisant des marqueurs plus polymorphes, biparentaux et codominants, de type microsatellites (Bras, 2018).

Le sujet suivant découle de ces études génétiques sur la pyrale du buis, afin d'étudier la structure génétique des populations à une échelle plus fine, en France et en Région Centre Val de Loire. Le but étant de comprendre comment elle s'est propagée aussi rapidement dans le pays. L'hypothèse est qu'une fois introduite via des importations de Chine vers l'Europe, le commerce de plants ornementaux a également accéléré sa propagation en Europe en multipliant les points d'introduction. La propagation de cette espèce résulterait donc à la fois de la dispersion active (vol des papillons) et de la dispersion passive (transports accidentels via les activités humaines). Parallèlement à l'étude de la dispersion active en manège de vol entreprise dans le laboratoire (approche directe, mais présentant certains biais), je me suis intéressée à la dispersion effective à travers l'étude de la structure génétique dans la zone envahie, qui résulte à la fois des événements d'introduction et de la dispersion active (approche indirecte). Une introduction correspond au transport et à l'établissement d'un nombre généralement limité d'individus, ce qui se traduit par un effet dit de fondation. Le goulot d'étranglement

démographique (effectif efficace réduit) entraîne une réduction de la diversité génétique et une distorsion des fréquences alléliques par rapport à la population source (plus ou moins fortes selon l'importance du goulot). Les populations introduites peuvent se différencier les unes des autres, car elles sont originaires de populations sources elles-mêmes différenciées, mais aussi car l'effet de fondation est un processus de nature stochastique. Le « tirage » des allèles dans la population source étant aléatoire (et non-exhaustif), des introductions indépendantes conduisent à des distorsions de fréquence différentes, et donc à une différenciation des populations introduites indépendamment qui est détectable avec des marqueurs génétiques neutres. La dispersion active va ensuite conduire à un « métissage » (*admixture*²) plus ou fort entre ces populations à une échelle de temps et d'espace qui dépend des capacités de vol de l'insecte (distance pouvant être parcourue entre le site d'émergence et le lieu de ponte qui varie entre espèces mais aussi entre individus au sein d'une espèce ; voir par exemple Klein et al, 2006), ainsi que de la structure du paysage qui les sépare. La dispersion passive due aux transports accidentels peut également conduire à des signatures d'*admixture* lorsque plusieurs sources sont mélangées pour fonder une nouvelle population, mais le patron spatial d'*admixture* attendu est différent (présentant des discontinuités spatiales au lieu d'un gradient en cas de dispersion active de proche en proche). Pour cela, des marqueurs microsatellites ont été utilisés pour décrire l'histoire actuelle de l'invasion en génotypant différentes populations en France afin de préciser les zones sources et les scénarios d'invasion et de dispersion possibles en se basant également sur les données historiques disponibles (signalements sur le terrain). Pour être plus précis, ce sont les empreintes de ces processus dans la structure génétique qui ont été recherchées au sein des populations (annexe 2).

J'ai choisi ce sujet de stage a été choisi en raison de l'aspect invasif du modèle étudié, mais aussi génétique. La génétique est un domaine que je maîtrisais moins et pourtant important autour du concept d'invasion afin de comprendre pourquoi de plus en plus d'espèces allochtones arrivent à s'intégrer dans de nouveaux milieux. Cette étude m'a permis de comprendre son importance et de maîtriser le sujet. Ce stage aussi m'a permis d'apprendre de nouvelles techniques autour de la génétique en plus de connaissances enrichissantes.

Synthèse bibliographique.

1. *Cydalima perspectalis*, la pyrale du buis.

Cydalima perspectalis (Walker, 1859) est un lépidoptère de la famille des Crambidae et de la sous-famille des Spilomelinae. Avant d'en arriver à cette taxonomie, la pyrale du buis s'est vu attribuer différents noms de genre depuis son arrivée en Europe : *Palpita* Hübner, 1808, *Glyphodes* Guenée, 1854 et *Neoglyphodes* Streltsov, 2008. Finalement, en 2010, Mally et Nuss ont clarifié la situation suite à des études morphologique et la pyrale du buis fut classée dans le genre *Cydalima*.

1.1. La biologie de *Cydalima perspectalis*.

Ce papillon nocturne est facilement reconnaissable à l'âge adulte. Il présente des ailes blanches ou brunes avec des irisations dorées et violacées. Son envergure moyenne est de 36 mm et de 44 mm pour son maximum. Les deux sexes se ressemblent, le mâle ayant seulement à l'extrémité de son abdomen une coloration brune plus étendue. Il possède également des touffes de longues écailles odoriférantes dévaginables. L'imago de *C. perspectalis* ne peut être confondu avec d'autres espèces locales en raison de sa taille et de ses motifs caractéristiques blanc et brun. L'espèce présente trois formes distinctes (figure 1) : une forme classique blanche avec les extrémités des ailes et du corps brun ; une variante de la première forme avec en plus une bande brune sur le bord inférieur des ailes antérieures ; enfin, il existe une forme entièrement brune hormis une tache ovale blanche sur les ailes antérieures (Brua, 2014). C'est sous la forme imago que la pyrale du buis effectue sa propagation naturelle.

Fig. 1 : Imago de *Cydalima perspectalis* sous forme a) classique blanche, b) brune et bande brune. (Photo de Zoran Bozovic, Josef Hlasek et inconnu)



La femelle peut pondre jusqu'à 600 œufs en une semaine, près de 1100 œufs sur l'ensemble de sa vie, chaque ponte comportant une 20ème d'œufs sous forme de petits paquets (Tabone *et al*, 2015). Pendant ses 15 jours de vie imaginaire où elle ne s'accouple qu'une fois, la femelle peut pondre plusieurs fois. Les œufs sont ronds et aplatis et se chevauchent comme

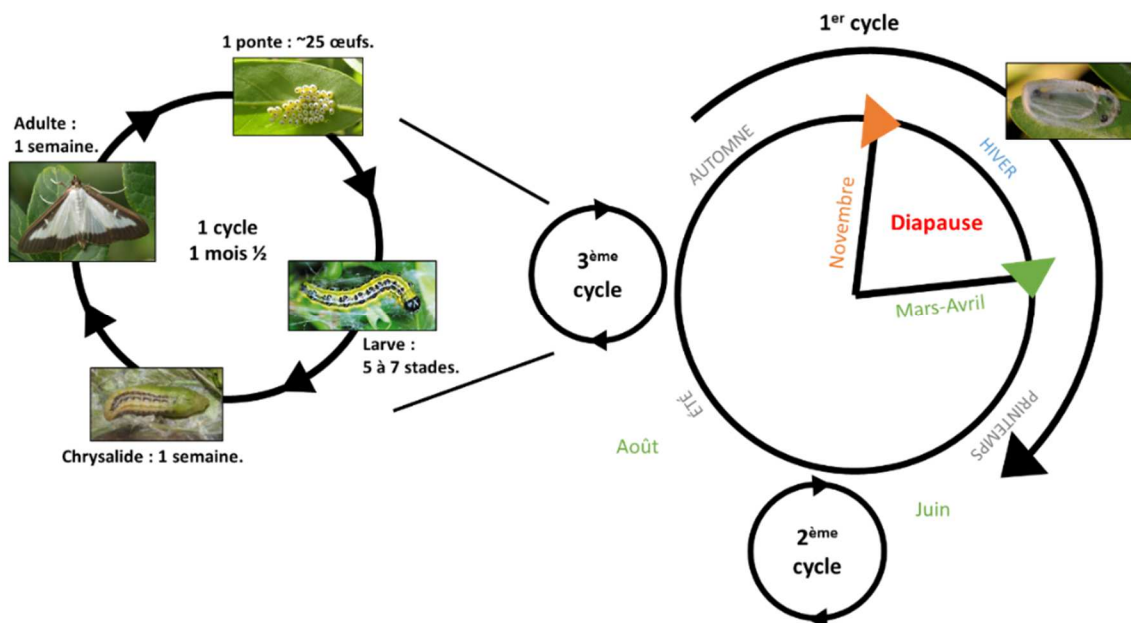
des écailles de poisson. A travers leur surface jaune et translucide, on peut observer un point noir, qui est la capsule céphalique de la chenille, juste avant l'éclosion.

Les larves possèdent 5 à 7 stades. Au dernier stade, la chenille peut faire jusqu'à 35-40 mm de long. Son corps est à dominance vert clair, strié longitudinalement de vert foncé, de jaune clair et de blanc (voir photo de couverture). Elle possède également des verrues noires et des longs poils blancs isolés. Au niveau de la partie thoracique, la chenille possède 3 paires de pattes jaunes et 5 paires de fausses pattes abdominales. Sa tête noire et luisante se démarque du reste du corps. A l'automne, les jeunes chenilles de dernière génération vont tisser un petit cocon entre deux feuilles de buis pour y faire leur diapause. Le développement s'arrête jusqu'aux premières chaleurs du printemps où elles reprennent leur activité et terminent leur développement.

Au stade nymphal, les chenilles à maturité tissent un cocon de soie. La chrysalide atteint 21 mm de long et est observable sur les feuilles de buis. Comme la chenille, elle est de couleur vert clair et jaune clair avec quatre lignes brun foncé séparé par des lignes claires au niveau dorsale. Sur l'arête dorsale s'y retrouve une bande brun orangé. La cuticule est translucide tout comme l'exuvie. Si elle est dérangée, elle agite vigoureusement son extrémité abdominale.

La pyrale du buis est un insecte polyvoltin et peut avoir 2 à 4 générations par an (site Ephytia). En France, elle effectue en général trois cycles de développement accompagné de 3 pics de dégâts : au début du printemps (mars - avril), en été (mi-juin - juillet) et au début de l'automne (septembre - novembre) (Brua, 2013) (figure 2). Après l'éclosion, le développement larvaire est rapide et peut durer entre 17 et 87 jours selon la température (15-30°C) et la source de nourritures (fiche technique Cabi). Les larves entrent en diapause l'hiver, celle-ci étant induite par les jours qui se raccourcissent (Wan, 2014).

Fig. 2 : Cycle biologique de la pyrale du buis. La chenille qui possède trois cycles dont une a la particularité de faire une diapause pendant l'hiver.



1.2. Les hôtes, les origines potentielles et les aires de propagation connues de *Cydalima perspectalis*.

L'origine de la pyrale du buis est asiatique, l'espèce étant présente naturellement en Chine, en Corée et au Japon. En 2016, Bras *et al.* ont montré que les haplotypes mitochondriaux retrouvés en France sont en faveur d'une origine chinoise, malgré une faible structuration génétique de la pyrale en Asie (et l'absence d'échantillons japonais). L'utilisation de marqueurs microsatellites et le recours à la méthode DIY ABC ont montré qu'il est vraisemblable qu'elle provienne de provinces côtières de Chine orientale (autour de Shangäi) qui font partie des principales régions chinoises productrices de buis. Elles ont également montré qu'il a eu au moins trois événements indépendants d'introduction à partir de cette seule région source. Dans son aire d'origine, la pyrale du buis fait son développement sur une quinzaine d'espèces appartenant au genre *Buxus* dont *Buxus microphylla*, très présent en Chine et utilisée en Asie comme plante ornementale dans les jardins et les parcs ; mais elle a également été signalée sur 3 autres espèces de ligneux : le houx à feuilles pourpres (*Ilex purpurea*), le fusain du Japon (*Euonymus japonicus*) et le fusain ailé (*Euonymus alatus*) (Casteels *et al.*, 2011). Les larves peuvent défolier complètement un buis et en raison de leur activité pendant toute la saison de croissance, et en cas d'attaques répétées, les plantes n'ont pas le temps de se rétablir et peuvent en mourir (Van der Straten *et Muus*, 2010).

C'est en mai 2007, dans une agglomération allemande proche de la Suisse et de la France : Weil-am-Rhein, que *C. perspectalis* a été signalée pour la première fois (Krüger, 2008). La pyrale fut sujette à une expansion fulgurante en Europe, elle est désormais présente dans une quinzaine de pays (Bella, 2013) : Suisse, Pays-Bas (2007), Slovaquie, Autriche, France, Grande-Bretagne (2008), Belgique, Liechtenstein, Italie (2010), Turquie, Hongrie, République Tchèque, Roumanie (2011), Croatie (2012), Slovaquie, Danemark et Russie (2013) (figure 3).

En France, elle a été aperçue en premier à Saint-Louis en août 2008, proche de Weil am Rhein, puis rapidement à Strasbourg en octobre 2008 (Feldtrauer *et al.*, 2009).

En Europe, la pyrale du buis n'a pas été observée ailleurs que sur les buis ; de plus, le buis commun *B. sempervirens* est très utilisé en ornement (Brua, 2014). En France, *C. perspectalis* a mis moins de sept ans pour s'implanter avec certitude dans 17 régions et 52 départements (figure 4), démontrant la grande dynamique d'expansion du papillon.

Fig. 3 : Carte restituant les signalements de la pyrale du buis, *Cydalima perspectalis*, en Europe. L'étoile correspond au premier signalement à Weil-am-Rhein (Rousselet, 2018 ; Bella, 2013).

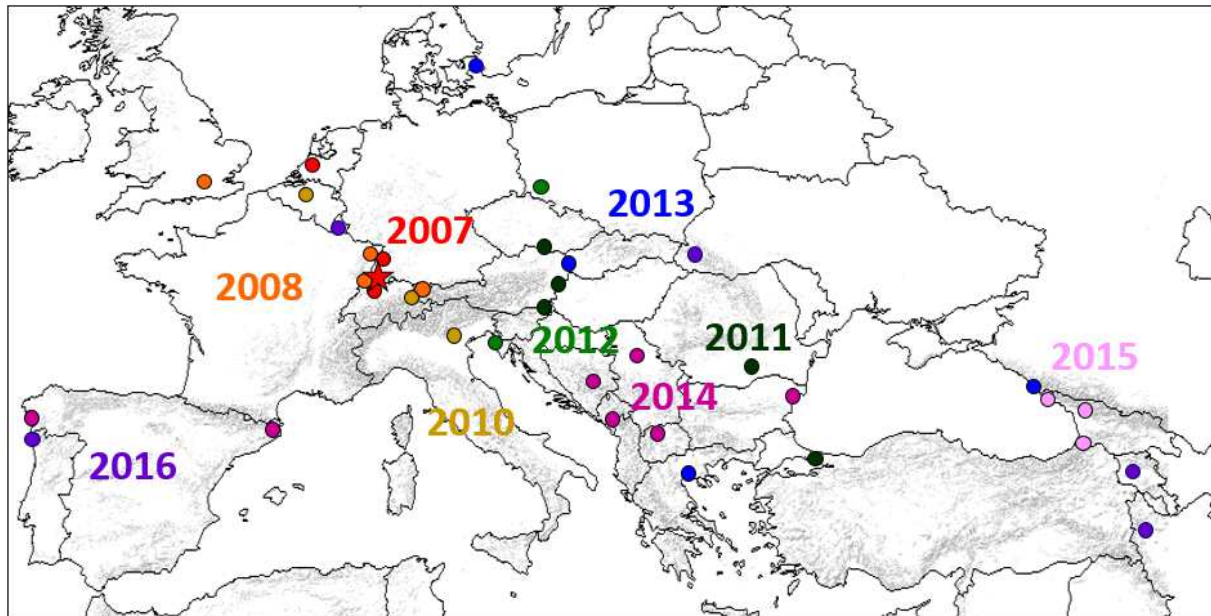
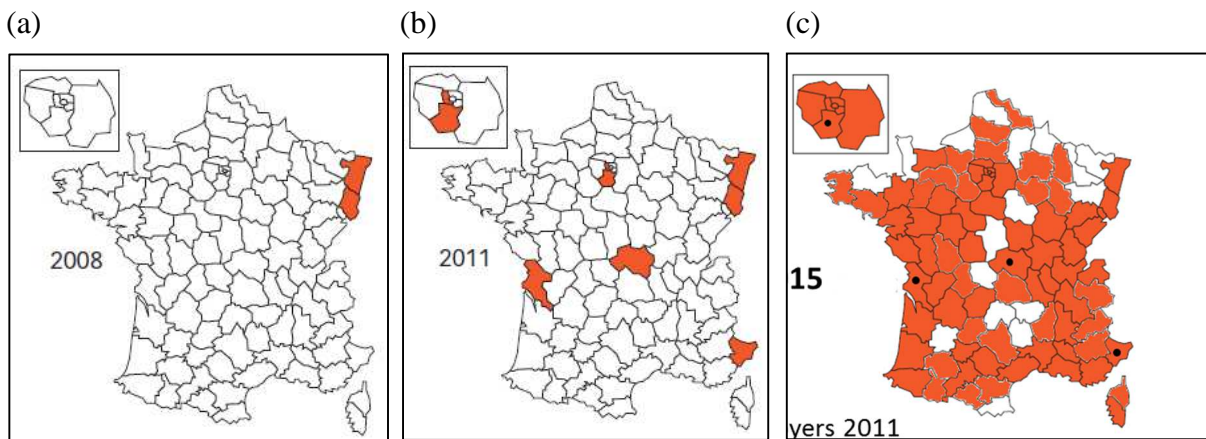


Fig. 4 : Cartes de présence certaine de la pyrale du buis *C. perspectalis* depuis sa première détection en France en 2008 jusqu'en 2016 (Brua, 2014). a) Première observation de la pyrale en France en Alsace 2008 ; b) En 2011, 4 nouvelles observations éloignées les unes des autres ; c) En 2016, plus de 79 départements sont envahis, montrant une invasion fulgurante en même pas dix ans.



2. Comprendre l'invasion biologique pour comprendre l'expansion de *Cydalima perspectalis*.

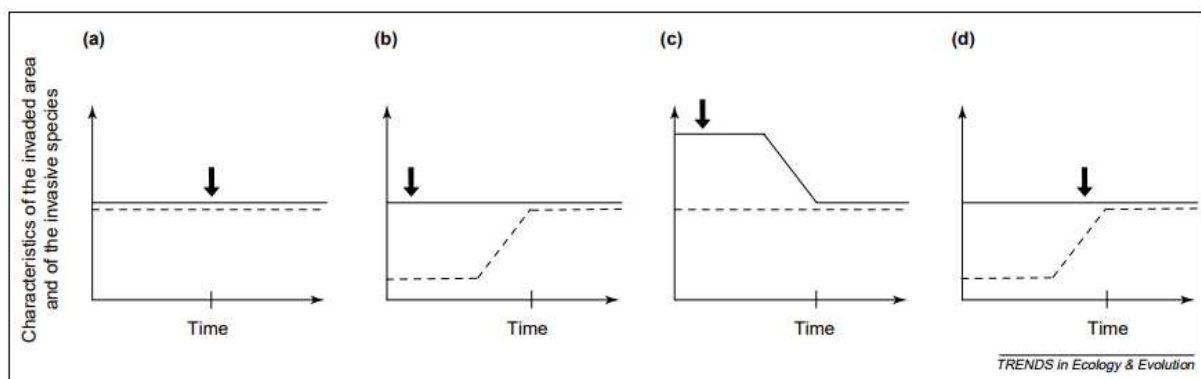
2.1. Quelques rappels de base sur les invasions biologiques.

L'invasion biologique est un phénomène qui se décompose en trois phases : l'introduction, l'établissement et l'expansion. Chaque phase agit comme un filtre, car dépend de la capacité des individus à franchir chacune des barrières rencontrées. Ainsi, ce processus peut échouer et l'introduction d'espèce exotique devenant envahissante est minoritaire en cas

d'absence ou de rareté en plantes-hôtes, de conditions climatiques défavorables, voire de présence de prédateurs, de pathogènes ou de compétiteurs dans la nouvelle aire de répartition. En absence de ces facteurs de régulation, l'espèce exotique se trouve favorisée par rapport aux autres espèces locales et peut connaître une expansion démographique et spatiale (annexe 3).

L'invasion biologique présente plusieurs scénarios, décrit par Facon *et al.* en 2006 (figure 5). Ils décrivent comment le succès des invasions biologiques peut être affecté par différents facteurs tels que la migration de l'organisme envahissant, les paramètres environnementaux de la zone envahie et l'évolution interne de l'organisme envahissant. Il existe trois scénarios d'invasions théoriques possibles : le changement de migration, le changement de l'environnement et le changement évolutif. Ces théories ont été basées sur des extrêmes, et des cas intermédiaires peuvent très bien se produire.

Fig. 5 : Scénarios d'invasion théorique (Facon *et al.*, 2006). Les lignes en pointillées représente les caractéristiques de la zone envahie, tandis que la ligne continue sont celles des espèces envahissantes. Le premier contact (par migration) potentiel entre l'espèce et la zone envahie et le début des processus d'invasion se font au niveau de la flèche. (a) Scénario 1 : l'invasion de fait par simple changement migratoire de l'espèce. (b) Scénario 2 : Le milieu subit des changements permettant l'installation d'espèce envahissante. (c) Scénario 3 : Une espèce subie des changements génétiques la rendant envahissante pour un milieu donné. (d) Scénario 1+2 : scénario mixte entre le 1 et le 2, il faut un changement dans la migration et le milieu pour déclencher une invasion.



2.2. Le rôle de la génétique dans l'invasion d'un nouveau milieu.

Le succès ou l'échec d'une invasion biologique est aussi influencé par des facteurs génétiques. En général, on considère que plus il y a de diversité génétique, plus l'espèce a de chances de s'adapter à son nouveau milieu, mais l'espèce, ou les individus introduits, peuvent aussi être, par chance, préadaptés à leur nouveau milieu et prédisposés à être envahissants. Cependant, il existe des paradoxes génétiques en biologie de l'invasion (Allendorf et Lundquist, 2003). Une population introduite est généralement caractérisée par une faible abondance et présente une diminution de diversité génétique causé par un goulot d'étranglement. Ce petit effectif peut donc provoquer une dérive génétique de la population introduite, mais également engendrer de la consanguinité. En parallèle, ces populations introduites vont souvent devoir côtoyer les espèces autochtones du nouveau milieu qui sont déjà adaptées aux conditions

locales. Cependant, l'absence de co-évolution avec les espèces introduites peut être un avantage majeur. Dans leurs nouvelles aires de répartition, une espèce exotique ne rencontrera pas forcément ses régulateurs naturels, favorisant leur expansion démographique (Colautti *et al.*, 2004).

Pour faire face à ces paradoxes, les populations introduites doivent avoir un effectif minimal assurant leur viabilité (Allendorf et Lundquist, 2003), ce qui peut se produire en cas d'introduction massive (rarement le cas) ou d'introductions multiples apportant du matériel génétique et contrebalançant l'effet de la dérive génétique (Sakai *et al.*, 2001). Lorsque ces premières introductions sont réussies, ces populations installées peuvent aussi servir de source pour l'infestation de nouvelles régions, tel que Lombaert et al, 2010 le décrit pour *Harmonia axyridis*, la coccinelle asiatique.

3. Les microsatellites : leur intérêt.

3.1. Les propriétés des microsatellites.

Les microsatellites sont composés de motifs d'un à six nucléotides répétés un grand nombre de fois dans les génomes nucléaires de la plupart des taxons. Ils sont donc aussi appelés : séquences répétées en tandem ou SSR (Simple Sequence Repeats). Un locus de microsatellite varie généralement d'une longueur entre 5 et 40 séquences répétées, même s'il est possible d'observer des chaînes plus longues de répétitions. Les répétitions de dinucléotides, trinucleotides et tétranucleotidiques sont les choix les plus courants pour les études génétiques moléculaires ; d'autant plus que les répétitions dinucléotidiques représentent la majorité des microsatellites pour de nombreuses espèces (Li *et al.* 2002). Les répétitions trinucleotides et hexanucléotidiques sont les classes de répétition plus susceptibles d'apparaître dans les régions codantes, car ils ne provoquent pas un cadre de lecture (Toth *et al.* 2000). Pour finir, les répétitions mononucléotidiques sont moins fiables en raison de problèmes avec l'amplification (Li *et al.* 2002). La variabilité étant la « matière première » du généticien, les microsatellites avec leur grand nombre d'allèles fournissent un haut degré d'information.

Ce qui rend les microsatellites intéressants est qu'ils possèdent un fort taux de mutation caractéristique (Kelkar *et al.*, 2010). Ce taux de mutation élevé rend les microsatellites fortement polymorphes et repose sur le nombre d'unités de répétition constituant le SSR, changeant d'un individu à l'autre. Ils mutent souvent par des erreurs de glissement et lors des checkpoints correctifs lors de la réplication de l'ADN ; ceux-ci modifient principalement le nombre de répétitions et donc la longueur de la chaîne de répétition. De ce fait, les allèles diffèrent en longueur et ils peuvent être distingués par électrophorèse sur gel à haute résolution ou dans un séquenceur à capillaires. De nombreux microsatellites ont des grands taux de mutation (entre 10^{-2} and 10^{-6} mutations par locus par génération, et en moyenne 5.10^{-4}) qui génèrent des niveaux élevés de diversité allélique nécessaire pour les études génétiques des processus agissant sur des échelles de temps écologiques (Schlötterer, 2000). Les marqueurs microsatellites sont plus variables que les séquences mitochondriales utilisés dans les études phylogéographiques, et contrairement à eux, ils sont généralement isolés à partir du génome

nucléaire et sont donc à hérédité biparentale. Contrairement à d'autres marqueurs moléculaires comme les AFLP³, ils présentent l'avantage d'être codominants (les deux allèles sont détectables chez un individu hétérozygote). Généralement plus abondants dans des régions non codantes, ils sont neutres vis-à-vis de la sélection et constituent de bons marqueurs pour inférer l'histoire des populations. Pour détecter le brassage génétique, les microsatellites sont assez efficaces (Clayton *et al.*, 1998 ; Gill, 2001) et sont particulièrement adaptés pour l'étude de l'*admixture*, quand deux populations précédemment isolées et génétiquement différenciées se mélangent (Vignal *et al.*, 2002). De plus, les microsatellites sont plus utiles pour détecter les expansions récentes de la population ; en effet, l'accumulation de nouvelles mutations, qui renseigne sur l'expansion de la population, nécessite des périodes courtes pour faire évoluer rapidement loci (Morin *et al.*, 2004).

3.2. Quels sont les limites des microsatellites ?

Les microsatellites présentent certains inconvénients : une phase de développement long et coûteux et un débit relativement faible en raison de difficultés pour la gestion de l'automatisation et des données. Par conséquent, l'utilisation continue de microsatellites dépendra probablement de la possibilité de surmonter certaines de ces limitations (Guichoux, 2011). Pour commencer, le grand nombre d'allèles par locus microsatellites, implique que pour une estimation précise des fréquences alléliques, il est nécessaire d'avoir des échantillons de grande taille. Ensuite, il y a plus de risque d'avoir beaucoup de mutations spontanées avec les microsatellites dans une lignée donnée, ce qui peut rendre difficile la reconstruction de la filiation génétique (Ellegren, 2000). A cela, le taux élevé de mutation récurrente des microsatellites, avec des risques d'homoplasie⁴ de taille, font d'eux de mauvais indicateurs de l'histoire des populations à une grande échelle de temps (Li *et al.*, 2002 ; Ellegren, 2004 ; Morin *et al.*, 2004 ; Schlötterer, 2004). De plus, la variabilité au niveau des marqueurs microsatellites hautement polymorphes peut ne pas exactement refléter la diversité génomique sous-jacente (Vali *et al.*, 2008 ; Ljungqvist *et al.*, 2010). Il peut également exister des allèles dits « nuls » du fait de mutation au niveau du site d'accrochage de l'amorce empêchant l'amplification par PCR de certains allèles. Les hétérozygotes allèle nul / allèle amplifié apparaissent homozygote pour l'allèle amplifié, ce qui fausse l'estimation de l'hétérozygotie et crée des écarts à l'équilibre d'Hardy-Weinberg artificiels.

La seule méthode utilisée pour le dosage des microsatellites est l'électrophorèse sur gel capillaire couplée à une détection à base de fluorescence (Butler *et al.*, 2001 ; Koumi *et al.*, 2004). Les amplifications PCR utilisés pour les SSR rendent plus difficile l'étude d'échantillons d'ADN fortement dégradés, tels que des matières fécales ou des échantillons mal conditionnés (Seddon *et al.*, 2005 ; Morin & McCarthy, 2007).

Stage

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériel biologique.

Des chenilles de *Cydalima perspectalis* prélevées sur différents sites de la France (annexe 4) ont été utilisées pour les extractions des ADNs, ainsi que des imagos venant de Legnano et Lucques en Italie (30 individus chacun), de Delémont en Suisse (21), de Andel au Pays-Bas (28) et de Weil-am-Rhein (Allemagne) et Saint-Louis (France) regroupés en une population (30).

Des chenilles de différents stades larvaires ont été prélevées et conservées dans de l'alcool à 90°. La taille des échantillons était de 1 à 30 individus selon les sites. Les chenilles des premiers stades, petites, ont été utilisées en entier, tandis qu'un segment a été prélevé sur les plus grosses. Dans la mesure du possible, les chenilles génotypées provenaient de collectes sur des pieds de buis différents afin de minimiser les risques d'appareillement. Toutefois, pour certaines populations à basse densité, deux à quatre individus du même pied ont pu dans de rares cas être utilisés. Pour les adultes, une patte ou du muscle thoracique a été prélevée.

1.2. Extraction et purification de l'ADN.

L'extraction et la purification de l'ADN ont été faites avec le kit QIAGEN. Les échantillons de chenilles ont été lavés à l'eau distillée ; puis ont été placés dans des tubes Eppendorf contenant 180µl de tampon d'extraction (tampon de lyse Buffer ATL), avant d'être broyées manuellement. 20µl de protéase K ont été rajoutée et les tubes ont été incubés pendant toute une nuit au bain-marie à 56°C.

Le lendemain, 200µl de Buffer AL ont été rajoutées dans chaque tubes Eppendorf avant d'être incubées pendant 10 minutes au bain-marie à 56°C. 200µl d'éthanol à 96% ont été ensuite rajouté. Les solutions ont été pipetées et placées dans des colonnes DNeasy Mini spin avant d'être centrifugé pendant 1 minutes à 6000g. Les colonnes ont été récupérées et placées dans de nouveaux tubes collecteurs, les anciens contenant les déchets sont jetés. Ensuite, 500µl de Buffer AW1 ont été rajoutées puis les colonnes ont été centrifugées. Après récupération des colonnes, 500µl de Buffer AW2 ont été rajoutées. Les colonnes ont été centrifugées pendant 3 minutes à 20000g. Les colonnes ont été transférées dans des tubes Eppendorf puis 200µl de Buffer AE (solution d'élution) ont été rajouté. Après une incubation d'une minute à température ambiante, les solutions ont été centrifugées pendant 1 minute à 6000 g. Les solutions dans les tubes Eppendorf contenant l'ADN ont été récupérées et les colonnes jetées. Puis l'ADN a été quantifié à l'aide d'un nanodrop

Le nanodrop est un spectropfluorimètre et il permet de vérifier la qualité et la quantité d'ADN et ainsi savoir si la solution d'ADN doit être diluée avant PCR. Pour cela, il utilise une longueur d'onde de 260 nm qui est la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques. Une seconde mesure à 280 nm permet de contrôler la pureté d'extraction, c'est-à-dire la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN en faisant le rapport de l'absorbance 280 nm sur

l'absorbance 260 nm. La machine a été initialisée avec 1,5µl d'eau distillée pour faire un blanc. Les échantillons d'ADN sont mesurés un par un avec un nettoyage à l'eau pure entre chaque mesure. Si la solution contient plus de 50 ng/µl d'ADN, elle sera diluée lors de la mise en plaque. Le rapport de pureté 260/280 doit être compris entre 1,80 et 2.

1.3. PCR en plaque.

Pour l'optimisation de la PCR, le kit Quiagen contenant une solution Mix MULTIPLEX PCR, une solution de RNase et de Q solution a été utilisé. Dans le cas de la pyrale du buis, 15 marqueurs ont été développés et répartis dans 3 mix en fonction de leur température d'hybridation (annexe 5). Une fois le mix préparé, 115µl ont été déposés par puits dans une barrette, puis à l'aide d'une pipette multicanaux, 9µl ont été déposés par puits sur la plaque. Les puits ont été complétés avec 1µl d'ADN à l'aide d'une plaque ADN préparé précédemment avant d'être passé au thermocycleur.

Sous la hotte, 960 µl de formamide + 28,8 µl de marqueur de taille GeneScan 600LIZ ont été mis dans un tube. La solution a été répartie dans une barrette avec environ 110 µl par puits. Puis 9 µl par puits ont été répartie sur la plaque et ensuite 1 µl d'ADN de chaque PCR. Un tapis blanc a été mis sur la plaque avant de sortir de la hotte. Ensuite, la plaque a été dénaturée pendant 3 minutes à 96°C puis placée directement sur la glace. Le tapis blanc a été remplacé par un tapis gris et conservé à 4°C pour envoi au séquenceur ou mis au congélateur en attendant de la passer au séquenceur. Les tailles de fragments obtenues après le séquençage, ont été lues à l'aide du logiciel Genemapper®.

1.4. Analyse des données génétiques.

L'analyse des données génétiques a pour objectif de caractériser la structure génétique des populations et d'estimer les flux de gènes entre celles-ci. Ainsi, une différenciation génétique forte signifie peu d'échanges d'individus entre les populations.

1.4.1. Approche population-centrée.

Pour cela, le logiciel Genetix (v. 4.05) (Belkhir et al 1996-2004) a été utilisé. Il permet de calculer les valeurs des indices F de Wright (Wright, 1969 ; Weir & Cockerham, 1984) dont Fis et Fst. Ces indices s'intéressent à la distribution de la diversité génétique entre différents niveaux hiérarchiques que sont les individus (niveau I), les sous-populations (niveau S pour *subpopulation* dans la nomenclature de Wright ; on parle plus facilement habituellement de populations en langage commun) et la population théorique totale (niveau T). Ces indices sont calculés à l'échelle de la population totale ou à l'échelle des (sous-)populations à partir d'échantillons de population composés de plusieurs individus qui doivent être en nombre suffisant pour être représentatif de celle-ci (approche population-centrée). De ce fait, dans le cadre de l'étude, seuls les Fis et Fst des populations avec un effectif \geq à 20 ont été calculés.

Lorsque la distribution de la variabilité génétique s'écarte de celle attendue sous l'hypothèse d'Hardy-Weinberg, cela signifie que des régimes de reproduction (homogamie, hétérogamie, autofécondation, consanguinité, ...) ou des forces évolutives (migration, sélection,

dérive, mutation) ont modifié les fréquences alléliques et/ou les fréquences génotypiques (appréhendées synthétiquement via le degré d'hétérozygotie, c'est à-dire la fréquence relative des hétérozygotes et des homozygotes considérée à différents niveaux hiérarchiques).

1.4.1.1. Structuration de la diversité génétique au sein des populations.

L'indice F_{IS} renseigne sur les écarts entre hétérozygotie observée et celle attendue selon l'équilibre de Hardy-Weinberg au sein des sous-populations. Il considère donc comment se distribuent les allèles d'une population entre les individus ($F_{IS} = [\bar{H}_S] - H_I / \bar{H}_S$). Cet indice varie de -1 à 1 et donne des informations en particulier sur le degré de consanguinité existant au sein d'une population ($F_{IS} > 0$ traduisant un excès d'homozygotes par rapport à H-W, ce qui est par exemple le cas lors d'une reproduction entre apparentés génétiquement proches) ou encore sur l'importance d'immigration récente ($F_{IS} < 0$ traduisant un excès d'hétérozygotes). Un $F_{IS} > 0$ peut également être dû à des marqueurs qui ne sont pas à l'équilibre notamment du fait de la présence d'allèles nuls. Un F_{IS} nul signifie que les conditions d'Hardy-Weinberg sont globalement respectées (panmixie, taille efficace $\sim \infty$, ...) et la population est dite à l'équilibre (*i.e.* les fréquences génotypiques sont celles attendues sous l'équilibre d'Hardy-Weinberg). La significativité de l'écart à zéro des valeurs de F_{IS} est testée au moyen de tests statistiques non paramétriques (qui ne supposent pas que les données suivent une loi de distribution connue avec un nombre de paramètres définis à l'avance). A partir du jeu de donnée réel initial, des jeux de données sont simulés en permutant les allèles à l'intérieur de chaque population, créant ainsi des génotypes au hasard, et une nouvelle valeur de F_{IS} est calculée pour chaque jeu simulé. La valeur de F_{IS} observée sur les données réelles est ensuite comparée à la distribution des valeurs simulées, ce qui permet d'obtenir une estimation de la probabilité d'obtenir une valeur supérieure ou égale à la valeur observée sous l'hypothèse nulle (équilibre d'H-W). Si la proportion de valeurs simulées supérieures à la valeur observée sur données réelles est inférieure au seuil de 5%, la valeur de F_{IS} est considérée significativement différente de zéro et l'hypothèse nulle est rejetée. Inversement, si la proportion de valeur est supérieure à 5%, l'écart est non significatif et la population est considérée à l'équilibre. Trivialement, cela signifie que les permutations au hasard, qui normalement devraient le plus souvent « casser » une structure qui existerait, ont été capables de créer dans plus de 5% des cas des jeux de données avec plus de structuration que les observations, ce qui indique en fait l'absence de structuration dans le jeu de donnée réel. Nous avons réalisé ici 5000 permutations.

1.4.1.2. Structuration de la diversité génétique entre populations.

L'indice F_{ST} quantifie le degré de différenciation des sous-populations résultant d'une subdivision de l'ensemble, à travers la quantification des écarts entre l'hétérozygotie observée dans les sous-populations et celle attendue dans une population théorique totale à l'équilibre d'H-W ($F_{ST} = [H_T - \bar{H}_S] / H_T$). Il considère donc comment se distribue l'ensemble des allèles entre les différentes sous-populations. Cet indice varie de 0 à 1. Dans cette étude, l'estimateur de Weir & Cockerham (1984) a été utilisé pour des données multilocus multiallèles sans considérer d'hypothèses particulières en matière de nombre de populations, de taille des échantillons et de fréquence des hétérozygotes. Les valeurs de F_{ST} ont été estimées par paire de

populations et présentées sous forme d'une demi-matrice donnant les valeurs de F_{ST} entre les différentes populations. La significativité de l'écart à zéro des valeurs de F_{ST} observées, indiquant ici une structuration spatiale, a également été testée par permutations sur le même principe que les F_{IS} , mais cette fois par permutation globale des individus (permutations sur les génotypes et non sur les allèles). Nous avons réalisé ici 1000 permutations.

1.4.2. Approche individu-centrée.

Ce type d'approche se base, non sur un échantillon de population (composé d'un nombre minimal d'individus) à partir duquel on calcule des indices (F statistiques) traduisant la façon dont se répartit la diversité génétique entre individus au sein des populations (F_{IS}) et entre populations (F_{ST}), mais sur le génotype multilocus des individus eux-mêmes pour les assigner à des groupes dont les membres partagent des patrons similaires de variation génétique. Un des intérêts est notamment de pouvoir travailler sur des échantillons de très petite taille pour un site donné (jusqu'à l'individu lui-même seul). Il est donc possible d'intégrer également dans son jeu de données des individus de sites où la densité de population est très faible.

Nous avons ici utilisé le logiciel Structure (Pritchard, 2000) qui, pour former ces groupes, analyse les différences dans la distribution des variants génétiques entre populations avec un algorithme itératif bayésien (Pritchard, 2000 ; Porras-Hurtado, 2013). Pour un nombre de *clusters*⁵ (K) fixé, l'algorithme cherche à constituer K groupes en minimisant le déséquilibre d'Hardy-Weinberg (groupes génétiquement les plus homogènes possible). Les individus sont assignés à ces *clusters* avec un coefficient d'appartenance à chaque *cluster* (*membership*). Dans les approches population-centrées, on utilise plusieurs marqueurs surtout pour éviter de raconter l'histoire d'un locus en particulier (qui n'est pas forcément représentative de l'évolution neutre de l'ensemble du génome) et on tire partie de l'information associée à différents degrés de polymorphisme des marqueurs. Chaque locus contribue à l'information globale, mais est considéré indépendamment. Dans cette approche individu-centrée, on tire cette fois pleinement partie de l'information multilocus en cherchant également à minimiser le déséquilibre de liaison. Du « métissage » (*admixture*) entre des populations précédemment isolées et différenciées génétiquement se traduit par des associations préférentielles d'allèles à différents loci qui mettent plus ou moins de générations à se résorber. Contrairement aux méthodes multivariées, c'est une méthode qui repose sur un modèle explicite dont il faut respecter les hypothèses sous-jacentes (Pritchard, 2000 ; Porras-Hurtado, 2013) ; Jay, 2011). L'identification de la structure hiérarchique avec Structure peut notamment poser problème en cas d'isolement par la distance (IBD) mais dans notre cas on s'attend à ce que la structuration de la diversité génétique soit fortement et principalement modélisée par les événements d'introduction. Avec l'algorithme de Structure, on explore différents niveaux de *clusterisation* (et donc la structure hiérarchique des populations) et on cherche à en interpréter la pertinence biologique et à déterminer le nombre de *clusters* optimal rendant compte au mieux du jeu de données. Il s'agit donc de détecter le niveau hiérarchique de structure le plus élevé pour les scénarios testés. Pour chaque K , nous avons effectué 10 *runs* avec les paramètres suivants : 50 000 mcmc (*Markov Chain Monte Carlo*) 50 000 burnins, *admixture* model (pour le choix de l'*ancestry model*),

correlated allele frequencies model (pour le choix de l'*allele frequency model*) (Pritchard et al, 2009 ; Falush *et al.*, 2003). Pour chaque simulation (*run*), une valeur de probabilité postérieure (conditionnelle) est calculée (« *estimated Ln Prob of data* ou $\ln \Pr(X|K)$ où X sont les données et K le nombre de *clusters*). Pour déterminer le nombre de K optimal, nous avons commencé par considérer l'évolution du ratio $\Pr(X|K)$ pour un cas donné sur la somme de celui-ci pour tous les K. Par exemple pour K=1, nous avons : $Posterior\ Prob\ K1 = \frac{e^{\ln \Pr(X|K1)}}{e^{\ln \Pr(X|K1)} + e^{\ln \Pr(X|K2)} + \dots + e^{\ln \Pr(X|Kmax)}}$ Mais nous avons ici principalement utilisé le critère ΔK d'Evanno (2005) à l'aide du programme Structure Harvester (Earl & von Holdt, 2012 ; <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) qui permet une meilleure estimation du K optimal. La statistique ΔK est basée sur le taux de changement dans le logarithme de la probabilité des données entre valeurs successives de K.

2. Résultats.

Au total, 571 individus ont été génotypés parmi les 49 localités échantillonnées. Certains individus ont été mal ou pas amplifiés en raison, sans doute, d'une mauvaise conservation lors de la collecte ou de l'envoi. Mais ils restent très minoritaires en comparaison au nombre d'individus traités, ainsi, tous les échantillons de population disponibles ont pu être analysés.

2.1. Approche population-centrée.

2.1.1. Structuration de la diversité génétique au sein des (sous-)populations.

Les valeurs de Fis sont présentées dans le tableau 1 (le détail par type de marqueurs est présenté dans l'annexe 6). La majorité des populations ont des Fis proches de 20%, ce qui est très élevé. Nantes possède la valeur la plus élevée (34%) alors que Blois (4%) et Pyrénées (9%) ont les valeurs les plus basses.

Tableau 1 : Valeurs de Fis pour les échantillons de population dont l'effectif est supérieur ou égal à 20 individus (toutes sont significatives au seuil de 5%).

Population	Fis
Nice	0.19516
Strasbourg	0.25448
Saintes	0.23716
La Rochelle	0.22747
Legnaro	0.29251
Paris	0.18891
Creuzier-le-Vieux	0.23723
Orléans	0.23422
Nantes	0.34455
Chartres	0.11308
Tours	0.16573
Blois	0.04464
Pyrénées	0.09919
Lucques	0.17815
Weil-Am-Rhein	0.14829
Andel	0.18484
Délémont	0.27219

En regardant les Fis des marqueurs population par population (annexe 6), certains se sont révélés très déséquilibrés dans tous les échantillons de population ou presque (en particulier BTM15, BTM22 et BTM40). En les retirant, on améliore nettement les valeurs Fis qui se rapprochent de l'équilibre cependant, cela ne change pas énormément les Fst et le *clustering* obtenu. De ce fait, le choix a été fait de tous les garder en première approche.

2.1.2. Structuration de la diversité génétique entre populations.

Toutes les valeurs de Fst sont significativement différentes de zéro au seuil de 5% (tableau 2). Les valeurs sont très élevées entre les primo-foyers de Creuzier-le-Vieux, Paris et Strasbourg (de 18 à 28% selon les comparaisons deux à deux), entre Saintes et Strasbourg (22,5%) et entre Nice et Strasbourg (20,8%). Elles sont modérées entre Nice et Creuzier-le-Vieux ou Paris (respectivement 8,5% et 9,5%) et faible entre Nice et Saintes (3.5%).

Tableau 2 : Demi-matrices représentant respectivement les FST entre les populations des primo-foyers de pyrale du buis et les distances géographiques euclidiennes entre eux.

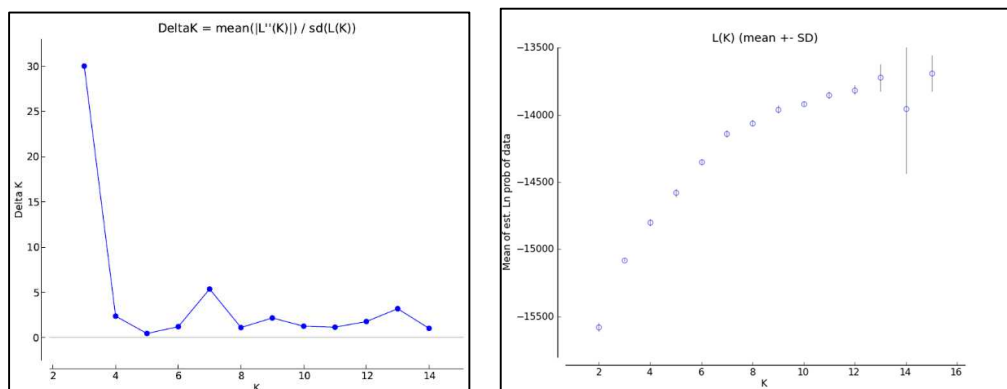
FST / km	Nice	Strasbourg-Kehl	Saintes	Paris	Creuzier	WeilaR
Nice	-	0.20837	0.03458	0.09474	0.08579	0.12099
Strasbourg-Kehl	545 km	-	0.22520	0.27822	0.18211	0.11363
Saintes	665 km	708 km	-	0.07430	0.07238	0.15556
Paris	688 km	397 km	413 km	-	0.17637	0.18912
Creuzier	408 km	422 km	318 km	311 km	-	0.13415
WeilaR	435 km	111 km	663 km	415 km	356 km	-

2.2. Approche individu-centrée.

2.2.1. Choix du meilleur niveau hiérarchique.

Les résultats de Structure et de Structure Harvester ont donné l'optimum à K=3. La valeur la plus élevée de ΔK est obtenue pour ce nombre de *clusters* (figure 6a). En parallèle, l'évolution des estimations du ln P(X|K) montre un gain d'information jusqu'à K=7, valeur de K à partir de laquelle on tend à atteindre un plateau (et à partir de 13 une forte variabilité entre *runs*) (figure 6b). Le nombre de *clusters* considéré principalement pour l'interprétation des résultats a donc été K=3.

Fig. 6 : a) Evolution de ΔK en fonction de K b) Estimation du ln P(X|K) en fonction de K.



2.2.2. Structuration spatiale pour K=3.

A l'échelle de la France (figure 7), les trois *clusters* ainsi définis sont spatialement très structurés. Le *cluster* en rouge sur la figure 7 a une distribution centrée sur l'Est du pays, le long du Rhin au niveau des frontières franco-allemande et franco-suisse. Dans cette région, les individus sont en très grande majorité très proches génétiquement les uns des autres et les populations sont donc très homogènes, composées presque uniquement d'individus assignés à ce seul *cluster*. A Weil-Am-Rhein et Saint-Louis (le premier foyer européen de 2007 en Allemagne qui s'est étendu en France en 2008), 28 individus sur 30 ont un coefficient de *membership*⁶ supérieur à 70% pour ce *cluster* dont 25 sur 30 supérieur à 90% (et seulement $2/30 \leq 50\%$). A Strasbourg (et Kehl) où la pyrale a été signalée en 2008, 29 individus sur 30 ont un coefficient de *membership* supérieur à 90% pour le *cluster* « rouge » (et seulement $1/30$ un *membership* < 20%), A Délémont en Suisse, on trouve 19 individus sur 21 avec des valeurs de *membership* supérieures à 80% (dont $17/21 > 90\%$ et seulement $2/21 < 5\%$). A l'exception de Nice où le génotype de 15 individus sur 30 est à plus de 50% assigné à ce *cluster*, on le retrouve dans les autres populations avec un niveau d'affiliation (*membership*) très faible ($83/571$ individus > 5% ; $31/571$ entre 10 et 50%, et seulement $22/571$ entre 50 et 70%).

La distribution du *cluster* en vert est centrée sur l'Ile-de-France. La plupart des individus autour du premier foyer d'IdF (observés dans l'Essonne en 2009) sont assignés en totalité à ce *cluster* (29 individus sur 40 sur l'ensemble Paris-Rungis-Soisy avec un *membership* > à 90%, et seulement $5/40 < 50\%$ et $3/40 < 80\%$). Ce *cluster* se rencontre dans les autres régions de France et d'Europe (dont Nantes, La Rochelle, Saintes, Pyrénées, Nice, Weil-am-Rhein, Délémont, Italie, Pays-Bas) mais avec des contributions faibles (voir carte 10), à l'exception de sites de la région Centre Val de Loire (Chinon, Montrichard, Valençay, Issoudun, Le Blanc, Blois, Menetou-Salon) où un grand nombre d'individus présentent un coefficient de *membership* supérieur à 50% (39 sur 47) et même supérieur à 90% (29 sur 47 ; voir carte 11).

Le *cluster* « bleu » est fortement représenté dans sud et l'ouest de la France ainsi qu'en Italie et aux Pays-Bas. C'est à Creuzier-le-Vieux et Saintes (deux primo-foyers français) et à Lucques (près de la principale zone d'import-export italienne) que la proportion d'individus présentant un coefficient de *membership* supérieur à 90% est la plus élevée (21 individus sur 30, 20 individus sur 30 et 25 individus sur 30 respectivement). Nice, et dans une moindre mesure Andel aux Pays-Bas, sont les localités où les 3 *clusters* co-occurrent le plus.

A l'échelle de la Région Centre (figure 8), les *clusters* vert et bleu dominant mais ne sont pas structurés en deux groupes spatialement distincts. Un grand nombre d'individus ne sont pas assignés en totalité à l'un ou l'autre des *clusters* (voir figure 8). 145 sur 268 de l'ensemble de la région possèdent moins de 80% d'assignation au *cluster* vert et $177/268$ au *cluster* bleu. Il y a un effet de « patchwork ».

Fig. 7 : Distribution spatiale à l'échelle de l'Europe de l'Ouest des coefficients individuels d'assignation (membership) pour $K=3$ (seuls 24 sites d'échantillonnage sont représentés)

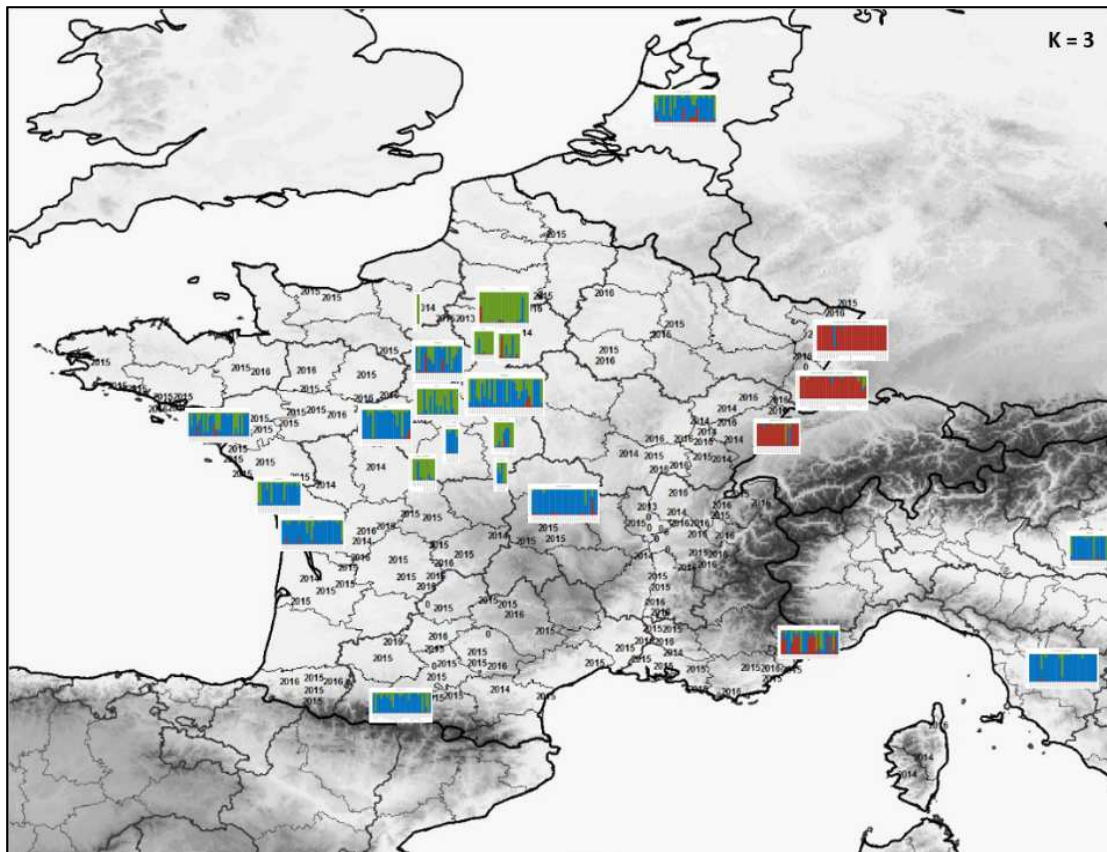
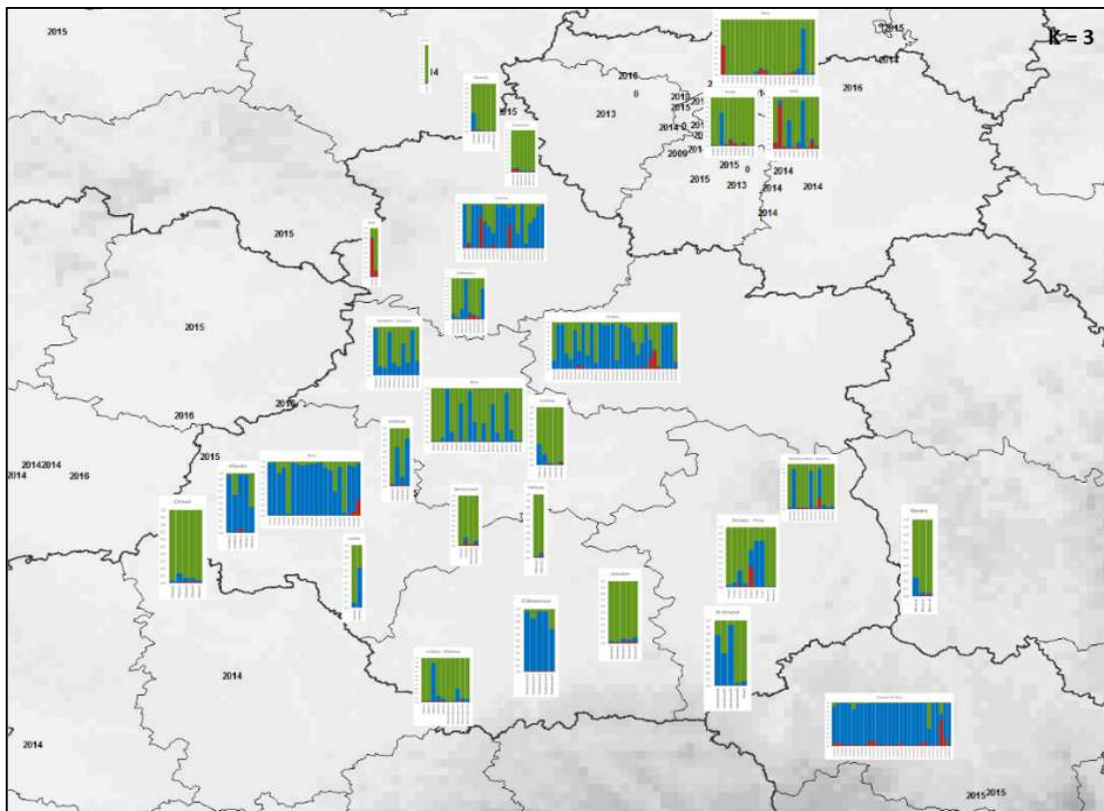


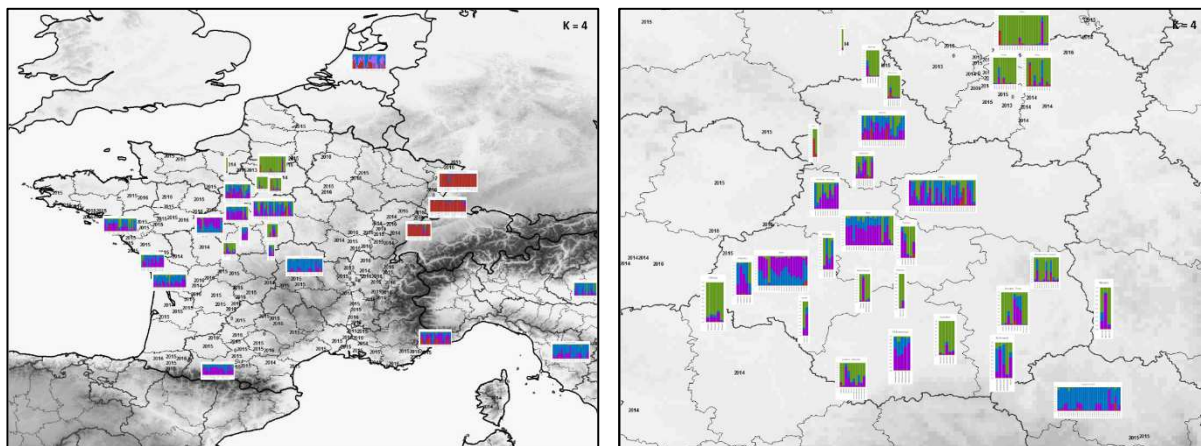
Fig. 8 : Distribution spatiale à l'échelle de la région Centre Val de Loire des coefficients individuels d'assignation (membership) pour $K=3$ (tous les échantillons sont représentés)



2.2.3. Structuration spatiale pour $K > 3$.

Pour $K=4$ (figure 9), seuls 4 individus sur les 571 de l'ensemble du jeu de données sont assignés à plus de 90% au nouveau *cluster* et seulement 28/571 à plus de 80%. Il est fortement représenté uniquement dans les populations qui présentaient des signatures d'*admixture* pour $K=3$. Pour les trois autres *clusters*, leur distribution correspond respectivement pour l'essentiel aux régions où les *clusters* à $K=3$ étaient presque exclusivement ou fortement représentés. Les résultats sont similaires pour $K=5$ et $K=6$ (voir annexe 7ab).

Fig. 9 : Distribution à l'échelle de la France et de la Région Centre VdL des coefficients individuels d'assignation (*membership*) pour $K=4$.



3. Discussion.

3.1. Structure hiérarchique des populations en Europe et en France : plusieurs introductions.

Bras et al (2016 ; en préparation) ont montré à l'aide de marqueurs mitochondriaux que les populations de la zone d'introduction étaient principalement structurées en trois grands ensembles : l'Europe de l'Ouest où l'insecte a été observé pour la première fois et où la diversité haplotypique était la plus élevée, l'Europe Centrale et les Balkans, et l'Europe orientale et le Moyen-Orient. L'analyse de la structure hiérarchique des populations d'Europe de l'ouest réalisée ici montre également une forte structuration spatiale de la diversité génétique au sein de ce territoire qui n'avait pas été mise en évidence avec les marqueurs mitochondriaux.

La structure des populations indique qu'il existe au moins 3 événements indépendants d'introduction sur ou à proximité territoire français. Le critère d'Evanno (2005), ΔK , indique en effet que le nombre optimal de *clusters* est $K=3$ pour ce jeu de données (figure 6a). Des événements d'introductions indépendants, accompagnés de fortes distorsions de fréquences alléliques dues au goulot d'étranglement (effet de fondation), peuvent rendre compte des valeurs élevées de l'indice de fixation F_{st} (qui mesure le degré de différenciation) entre les trois paires de *clusters* inférés par Structure (de 10 à 13% environ selon les paires). Il est par ailleurs à noter que les valeurs de F_{st} calculées à l'aide de Genetix entre les premiers foyers français

caractéristiques de ces trois *clusters* atteignent même 28% entre Strasbourg/Kehl et Paris, 18% entre Weil-am-Rhein et Paris, 18 % entre Strasbourg/Kehl et Creuzier-le-Vieux, 16% entre Weil-am-Rhein et Saintes, et 17% entre Paris et Creuzier-le-Vieux. Ces processus d'introduction et de goulot d'étranglement peuvent également rendre compte de valeurs de Fis parfois élevées, avec des populations non encore revenues à l'équilibre, mais au vu des capacités de dispersion, du nombre de génération par an, et de la prolifération rapide de l'insecte, ces dernières pourraient en fait être liés à des problèmes avec certains marqueurs ou certains échantillonnages.

Tableau 2 : Demi-matrices représentant respectivement les FST entre les populations des primo-foyers de pyrale du buis et les distances géographiques euclidiennes entre eux.

FST / km	Nice	Strasbourg-Kehl	Saintes	Paris	Creuzier	WeilaR
Nice	-	0.20837	0.03458	0.09474	0.08579	0.12099
Strasbourg-Kehl	545 km	-	0.22520	0.27822	0.18211	0.11363
Saintes	665 km	708 km	-	0.07430	0.07238	0.15556
Paris	688 km	397 km	413 km	-	0.17637	0.18912
Creuzier	408 km	422 km	318 km	311 km	-	0.13415
WeilaR	435 km	111 km	663 km	415 km	356 km	-

La distribution dans l'espace des trois *clusters* montre qu'il existe des régions où les populations sont nettement différenciées génétiquement et présentent très peu d'*admixture* entre les *clusters* identifiés. Ceci correspond à la signature génétique attendue de populations introduites indépendamment les unes les autres, et servant de source aux individus à l'origine d'*admixture* en se propageant vers d'autres foyers.

La première de ces régions correspond à celle du Rhin au niveau des frontières franco-allemande et franco-suisse et inclut Weil-am-Rhein / Saint-Louis, le premier foyer détecté en Europe (2007) et en France (2008), et Strasbourg / Kehl, le second détecté en France (2008). Un seul événement d'introduction suivi d'une propagation dans les environs par dispersion active (vol du papillon) est suffisant avec le présent jeu de données pour rendre compte de la distribution spatiale du *cluster* qui y prédomine très largement. Les distances entre le premier foyer et Délémont sont en effet compatibles avec les capacités de vol observées au laboratoire (même si celles-ci sont probablement surestimées par rapport aux conditions naturelles). En manège de vol, un papillon parcourt en moyenne 23 km sur l'ensemble de sa vie, avec un maximum enregistré à 71 km, ce qui représente par extrapolation, 75 km par an en moyenne, pour un maximum de 200 km pour les meilleurs disperseurs (Bras et al, en préparation). Toutefois, on ne peut pas exclure qu'il y ait eu plusieurs introductions plus ou moins indépendantes dans la région. Même s'ils appartiennent au même cluster (figure 7 et 9 pour K=3-4, annexe 7a pour K=5-7), les foyers de Weil-am-Rhein / Saint-Louis et Strasbourg / Kehl sont relativement fortement différenciés ($F_{st} = 12\%$) au vu de la faible distance géographique qui les sépare (111 km), et ils ont été détectés à seulement quelques mois d'intervalle, ce qui laisse peu de temps pour une propagation par dispersion active malgré la faible distance. Les

zones où prédomine le second *cluster* correspondent principalement à l'Île de France où a été détecté un des 5 premiers foyers français en 2009 dans l'Essonne (à proximité duquel sont distribués nos échantillons de Rungis, Paris et Soisy). Celui-ci correspond donc bien à un autre événement d'introduction indépendant du premier, et non à un signalement partiel du processus de colonisation du territoire (avec une présence de l'insecte entre les premiers foyers distants les uns des autres mais une absence de signalements). Le troisième *cluster* a une distribution beaucoup plus vaste, et plusieurs sites dispersés sur le territoire français et européen montrent peu d'*admixture* avec donc une très forte prédominance de ce *cluster*. Les régions où il prédomine très largement rassemblent ainsi les Pyrénées, mais aussi, et surtout, deux des cinq premiers foyers français (Creuzier-le-Vieux et Saintes avec à proximité le port de La Rochelle), ainsi que l'Italie et les Pays-Bas (deux plaques tournantes du commerce ornemental en Europe).

Si l'on considère un nombre de K supérieur à 3, le gain de vraisemblance est plus faible pour atteindre un plateau à partir de $K=7$ (accompagné d'une plus forte variance entre *runs*) (figure 6b), et ceci ne permet pas de démontrer l'existence d'autres événements indépendants d'introduction (ayant pu conduire à des différenciations génétiques plus faibles entre foyers au sein de cette région, par exemple avec des introductions en masse depuis la même zone source). Toutefois, la distance géographique entre les foyers de Saintes et de Creuzier-le-Vieux, détectés la même année, n'apparaît pas compatible avec une dispersion active (qui ne peut expliquer que la propagation dans les départements voisins les années suivantes). Considérer un plus grand nombre de *clusters* semble essentiellement permettre de distinguer différents degrés d'*admixture* entre les trois *clusters* primordiaux mis en évidence avec le critère d'Evanno (les *clusters* pour un nombre de K plus élevé apparaissent dans les populations où l'*admixture* est forte pour $K=3$). Les principales zones d'*admixture* correspondent ainsi à la Région Centre Val de Loire considérée dans sa globalité, et à Nice, le dernier des cinq premiers foyers qui existait déjà en France en 2011. D'ailleurs, les valeurs de F_{st} entre Nice et les autres primo-foyers sont faibles (3,5%) à modérées (environ 9%), à l'exception de Strasbourg, le premier foyer (21%), alors qu'elles sont très élevées entre primo-foyers de *clusters* différents (18 à 28%). Bras et al (données non publiées) ont montré à l'aide de la méthode DIY ABC que les scénarios d'invasion les plus vraisemblables pour certaines des 8 populations européennes étudiées impliquaient des phénomènes « tête de pont » où un premier foyer sert par la suite de source à d'autres transports accidentels dans des régions encore indemnes ou déjà colonisées, avec donc parfois en outre de l'*admixture* (plusieurs foyers existants contribuant à la formation d'un nouveau) (voir par exemple Lombaert et al, 2010). Ceci pourrait être le cas pour le foyer de Nice, mais le sous-échantillonnage dans le sud-est ne permet pas de distinguer les contributions de la dispersion passive (transport accidentel via des plantes d'ornement) ou de la dispersion active (vol du papillon) dans la constitution de ce foyer avec le jeu de données actuel. Une fois décrits et sélectionnés les sites les plus pertinents en Europe, la méthode DIY ABC (limitée par la lourdeur des calculs) pourrait être appliquée également à une partie du jeu de données obtenu au cours de mon stage pour tester des scénarios d'invasion un peu plus complexe que ceux que l'on peut inférer avec cette première approche que j'ai mise en œuvre.

3.2. Structure des populations en Région Centre Val de Loire : une contribution vraisemblable de la dispersion passive via des « têtes de pont »

L'échantillonnage à une échelle fine en Région Centre Val de Loire suggère l'existence de phénomènes « tête de pont » à l'instar de ce qu'ont montré Bras et al (données non publiées) à large échelle en Europe.

Dans l'ensemble, les populations de la Région Centre Val de Loire sont caractérisées par une forte *admixture* entre deux des trois *clusters*, celui d'Ile-de-France et celui représenté au plus près par les « primo-foyers » de Creuzier-le-Vieux au sud, et de Saintes au sud-ouest (tous deux détectés en 2011). Comme pour Nice, les données génétiques actuelles et les analyses conduites ne permettent pas de distinguer à elles seules entre des scénarios faisant intervenir des contributions des différents *clusters* sources via de la dispersion passive ou de la dispersion active, d'autant que ces hypothèses ne sont pas exclusives. Au vu des capacités de vol de la pyrale du buis telles qu'elles ont été mesurées au laboratoire, une propagation de proche en proche et une rencontre des deux *clusters* dans la région pourraient apparaître suffisantes pour rendre compte du patron général observé à grande échelle (surtout plusieurs années après les premières détections). Néanmoins, localement, la structure génétique de certains sites en région Centre Val de Loire n'apparaît pas pouvoir faire intervenir cette seule explication. Par exemple, à Chinon, Valençay ou Issoudun les individus sont génétiquement très proches les uns des autres, sont très apparentés aux individus d'Ile-de-France tout en étant éloignés géographiquement, et sont fortement différenciés des individus des sites environnants (en particulier à Chinon). De la même façon, le patron d'*admixture*, et la forte contribution du *cluster* « Creuzier-le-Vieux / Saintes / Italie / Pays-Bas » à Chartres (qui est un des sites de la région les éloignés des régions où prédomine ce *cluster*) est difficilement explicable avec les données actuelles par la seule dispersion active de l'insecte depuis le sud, que ce soit Saintes ou Creuzier-le-Vieux. La structure génétique des populations en région Centre Val de Loire apparaît être en partie faite de *patches* et ne semble donc pas seulement résulter d'un gradient de « métissage » entre des foyers d'introduction qui lui seraient uniquement extérieurs. L'explication la plus vraisemblable semble ici être la dispersion passive avec plusieurs autres introductions apparentées aux premières (notamment via une ou des sources franciliennes de plantes d'ornement ou via de mêmes arrivages massifs et simultanés en plusieurs points du territoire depuis un *hub* commercial à l'étranger), et non une diffusion de proche en proche par dispersion active à partir de deux sources uniques. Il est à rappeler qu'il s'est vendu en France de 2011 à 2014, près de 2 millions de buis par an, dont une grande partie dans la grande distribution et les jardinerie spécialisées (FranceAgrimer, 2012, 2013, 2014, 2015).

Conclusion.

Depuis son signalement en Europe en 2008, plusieurs événements d'introduction ont structuré la diversité génétique des populations de pyrale du buis en France. Les fortes capacités de dispersion active de l'insecte, ainsi que des transports accidentels et des introductions en de multiples points du territoire liés au commerce d'ornement, sont vraisemblablement responsables des patrons observés aussi bien à une échelle régionale que nationale, et peuvent donc rendre compte du caractère fulgurant de l'invasion de cette espèce. Une fois la structure génétique des populations aux échelles française et européenne mieux décrite, il serait intéressant de mettre en œuvre sur un sous-jeu de données d'autres méthodes bayésiennes d'assignations génétiques d'individus et de tests de scénarios d'invasions pour préciser la part de la dispersion passive et le rôle du commerce ornemental.

Bilan personnel

Les débuts de ce stage furent consacrés à l'apprentissage que ce soit sur les connaissances de la génétique qui m'étaient inconnues ou sur les techniques utilisées. Fort heureusement, j'ai eu de très bons professeurs : Jérôme Rousselet et Audrey Bras pour le théorique et Claudine Courtin pour la pratique. Ça n'a pas toujours été facile de comprendre tous les concepts et encore maintenant des détails m'échappent mais j'ai fortement apprécié d'apprendre de nouvelles choses en rapport avec mon cursus. C'était fortement motivant et c'est ce qui me plaît dans les sciences. La génétique est un domaine où j'avais des lacunes et ce stage m'a permis de les combler en partie, de la redécouvrir avec une autre vision que la vision académique.

Comme mon précédent stage, la rigueur fut de mise, les sciences en demandant énormément. Le respect du protocole, de ce qu'on doit faire au risque de rater l'expérience, une compétence importante dans ce domaine que ce stage a su m'apporter à travers une concentration et une organisation stricte indispensable en raison de mes jeux de données conséquents.

Au cours de ces six mois, j'ai fait énormément d'extraction et de PCR microsatellite. Ces manipulations ont composé 50% de mon temps et m'ont montré que le travail en laboratoire peut être redondant pour avoir un maximum de données et de bon résultat. 30% de mon activité fut consacrée à l'analyse des données, où j'ai appris à utiliser les logiciels GeneMapper (J'ai eu la chance de voir comment programmer les données suite à la mort de l'ordinateur, nous obligeant de recréer tous les patrons. Il faut savoir tirer le positif dans le malheur), Genetix et Structure (expliqué, mais pas utilisé puisque c'est M. Rousselet qui a lancé l'analyse avec moi). Le reste du temps était consacré à la recherche bibliographique, tâche indispensable pour connaître ce qui a été déjà fait sur le sujet, mais aussi avoir des éléments pour discuter des résultats.

J'ai rencontré quelques difficultés, mineurs. Parfois, des échantillons étaient introuvables, parfois du matériel venait à manquer (rupture de colonne DNeasy ou de marqueur de tailles), parfois des pannes (*Rest in Peace* petit ordinateur et hotte à aspiration). Des imprévus qui retardaient les manipulations et donc le stage.

J'ai donc pu constater que le temps était mon pire ennemi, passant sans que je m'en rende compte, ce qui me poussait à accélérer mes actions et à être encore plus organisée. Heureusement, j'étais bien entouré pour m'aider et c'était plus que motivant.

Sur le plan professionnel, ce stage correspondait tout à fait à l'idée que je me faisais d'un travail en laboratoire. Ce n'était pas toujours passionnant, surtout lorsque je devais faire tous les jours la même chose, mais le plaisir de voir les résultats finaux après six mois de dur labeur n'a pas de prix. Surtout, lorsque ces résultats nous offrent ce qu'on attendait. La peur de voir aucune structuration des populations m'avait angoissé vers les derniers instants. Ce que je

regrette, c'est sans doute la monotonie du sujet. Les protocoles étaient déjà en place et je n'ai pas eu le plaisir d'en mettre en place comme j'ai pu le faire sur mon stage de toxicologie en Master 1. J'avais l'impression d'avoir moins de liberté sur ce sujet.

J'ai eu tout de même la chance de faire un stage qui me plaît, même si au final, j'ai plus un faible pour la toxicologie comme j'ai pu faire en master 1. De plus, en faisant ce stage, je me suis posé beaucoup de questions sur moi et mon avenir. Serais-je capable de faire une thèse comme je l'ai toujours voulu ? À vrai dire, je n'arrive toujours pas à répondre à cette question. Mais en discutant avec des membres de l'équipe, et surtout avec Emmanuelle Magnoux et Béatrice Courtial, j'ai pu découvrir d'autres alternatives. Alors après avoir obtenu mon diplôme, j'ai décidé de préparer différents concours d'entrée à l'INRA et au CNRS pour y devenir ingénieur, mais aussi celui de police scientifique métier qui m'a toujours fait rêver (ça ne coûte rien d'essayer), tout en continuant mes recherches de thèses au cas où je trouve la perle d'un sujet qui me passionne et me motive. En parallèle, j'espère trouver un travail en rapport avec mes compétences pour occuper l'année (voire avec de la chance, finalement, y rester).

Sources bibliographie

Publications, articles.

- Allain E., 2015.** Chiffres-clés 2014/15, Prévisions 2015/16. FranceAgriMer ISSN n°2257-0640
- Allendorf, F.W. and Lundquist L.L., 2003.** Introduction: Population Biology, Evolution and Control of Invasive Species. *Conservation Biology* 17: 24-30. doi : 10.1046/j.1523-1739.2003.02365.x.
- Avtzis, DN., Matosevic, D., 2013.** Taking Europe by storm: A first insight in the introduction and expansion of *Dryocosmus kuriphilus* in Central Europe by mtDNA. *ŠUMARSKI LIST* 137:387–394.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F., 1996-2004.** GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bella, S., 2013.** The box tree moth *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) continues to spread in southern Europe : new records for Italy (Lepidoptera Pyraloidea Crambidae). *Redia*, 96 : 51-55.
- Bras, A., 2014.** Invasion fulgurante de la Pyrale du Buis *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) en Europe : Approche phylogéographique et caractérisation de la diversité génétique. Rapport bibliographique M2, URZF INRA Orléans.
- Bras, A., Courtin, C., Kenis, M., Bernard, A., Roques, A., Rousset, J., Auger- Rosenberg, M-A., 2016.** L'invasion fulgurante de la pyrale du buis en France et en Europe : diversité génétique et approche phylogéographique. 4e conférence sur l'entretien des Jardins, Espaces Végétalisés et Infrastructures, Oct 2016, Toulouse, France. <hal-01608243>
- Bras, A., Sauné, L., Roques, A., Rousset, J. et Auger-Rozenberg, MA., 2018.** Isolation and characterization of 15 microsatellite markers for the highly invasive box tree moth *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Eur. J. Entomol.* 115: 264–267. doi: 10.14411/eje.2018.026.
- Brua, C., 2013.** La pyrale du buis, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859), espèce exotique envahissante, caractéristiques de sa dynamique d'expansion en France et en Europe, des dégâts occasionnent sur les buis (*buxus* spp) et des stratégies de lutte. AFPP – 3e conférence sur l'entretien des espaces verts, jardins, gazons, forêts, zones aquatiques et autres zones non agricoles. Toulouse.
- Brua, C., 2014.** La pyrale du buis : le point sur cette espèce envahissante. *Phytoma* n°675, 16-22.
- Butler JM., Ruitberg CM., Vallone PM., 2001.** Capillary electrophoresis as a tool for optimization of multiplex PCR reactions. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 369, 200–205.
- Butler JM., Buel E., Crivellente F., McCord BR., 2004.** Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*, 25, 1397–1412.
- Cadic, A., Widehem, C., 2006.** L'horticulture Ornementale Française. Structure, Acteurs et Marchés. Un Point Sur INRA Editions, Paris (France) 2-7380-1207-8.
- Casteels, H., Witters, J., Vandierendonck, S., Van Remoortere, L., Goossens, F., 2011.** First report of *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera : crambidae) in Belgium. *Comm. Appl. Biol. Sci*, Ghent University, 76/2.
- Cheyppe-Buchmann S., 2010.** Variabilité génétique, Hybridation et succès des Invasions biologiques. Université de Nice-Sophia Antipolis - UFR Sciences, Ecole Doctorale de Sciences Vie et Santé.
- Colautti R.I., and MacIsaac H.J., 2004.** A neutral terminology to define 'invasive' species. *Diversity and Distributions* 10: 135-141.
- Chamberlain JS., Gibbs RA., Rainer JE., Nguyen PN., Thomas C., 1988.** Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16, 11141–11156.

- Chen JW., Uboh CE., Soma LR. et al., 2010.** Identification of racehorse and sample contamination by novel 24-plex STR system. *Forensic Science International Genetics*, 4, 158–167.
- Clayton TM., Whitaker JP., Sparkes R., Gill P., 1998.** Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Science International*, 91, 55–70.
- Dehnen-Schmutz K., Holdenrieder O., Jeger M.J., Pautasso M., 2010.** Structural change in the international horticultural industry : Some implications for plant health. *Scientia Horticulturae*, Volume 125, Issue 1, pages 1-15, ISSN 0304-4238. Doi: 10.1016/j.scienta.2010.02.017.
- Earl D.A., vonHoldt B.M., 2012.** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>, doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Edwards MC., Gibbs RA., 1994.** Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods and Applications*, 3, 65–75.
- Ellegren H., 2000.** Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, 16, 551–558.
- Ellegren H., 2004.** Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5, 435–445.
- Elnifro EM., Ashshi AM., Cooper RJ., Klapper PE., 2000.** Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 559–570.
- Eschen E., Douma J.C., Grégoire J.C., Mayer F., Rigaux L., Potting R.P.J., 2017.** A risk categorisation and analysis of the geographic and temporal dynamics of the European import of plants for planting. *Biol Invasions* 19:3243–3257. doi: 10.1007/s10530-017-1465-6.
- Evanno G., Regnaut S. and Goudet J., 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* (2005) 14, 2611–2620 doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Facon, B., Genton B.J., Shykoff J., Jarne P., Estoup A. and David P., 2006.** A general eco- evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 130-135.
- Falush D., Stephens M., and Pritchard J. K., 2003.** Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164:1567–1587
- Feldtrauer JF., Feldtrauer JJ., Brua C., 2009.** Premiers signalements en France de la Pyrale du buis *Diaphania perspectalis* (Walker, 1859), espèce exotique envahissante s’attaquant aux buis (Lepidoptera, Crambidae). *Bulletin de la Société entomologique de Mulhouse* 0373-4544.
- Galan M., Cosson JF., Aulagnier S. et al., 2003.** Cross-amplification tests of ungulate primers in roe deer (*Capreolus capreolus*) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes*, 3, 142–146.
- Gill P., 2001.** An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine*, 114, 204–210.
- Gninenko YI., Shiryayeva NV., Shurov VI., 2014.** The box tree moth – a New Invasive Pest in the Caucasia, Forests. *Карантин растений Наука и практика* 7:36-39.
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Le Ger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F. and Petit RJ., 2011.** Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11, 591–611 doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x.
- Haack R. A., Herard F., Sun J., Turgeon J. J., 2010.** Managing Invasive Populations of Asian Longhorned Beetle and Citrus Longhorned Beetle: A Worldwide Perspective. *Annual Review of Entomology*, 55, pp. 521-546.

- Jay F., 2011.** Méthodes bayésiennes en génétique des populations : relations entre structure génétique des populations et environnement. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2011. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00648601/document>.
- Kelkar YD., Strubczewski N., Hile SE. et al., 2010.** What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats. *Genome Biology and Evolution*, 2, 620–635.
- Klein E.K., Lavigne C., Gouyon P.H., 2006.** Mixing of propagules from discrete sources at long distance: comparing a dispersal tail to an exponential. *BMC Ecol.* 2006 Feb 20;6:3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504013>.
- Koumi P., Green HE., Hartley S. et al., 2004.** Evaluation and validation of the ABI 3700, ABI 3100, and the MegaBACE 1000 capillary array electrophoresis instruments for use with short tandem repeat microsatellite typing in a forensic environment. *Electrophoresis*, 25, 2227–2241.
- Krüger, E.O., 2008.** *Glyphodes perspectalis* (Walker, 1859) – neu für die Fauna Europas (Lepidoptera: Crambidae). *Entomologische Zeitschrift* 118: 81-83.
- Lederer T., Seidl S., Graham B., Betz P., 2000.** A new pentaplex PCR system for forensic casework analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 114, 87–92.
- Lesieur, V., Yart, A., Guilbon, S., Lorme, P., Auger-Rozenberg, MA., Roques, A., 2014.** The invasive *Leptoglossus* seed bug, a threat for commercial seed crops, but for conifer diversity? *Biol Invasions* 16:1833–1849.
- Liebold A.M., Brockerhoff E.G., Garrett L.J., Parke J.L. and Britton K.O., 2012.** Live plant imports: the major pathway for forest insect and pathogen invasions of the US. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 10: 135-143. doi:10.1890/110198
- Li YC., Korol AB., Fahima T., Beiles A., Nevo E., 2002.** Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11, 2453–2465.
- Ljungqvist M., Akesson M., Hansson B., 2010.** Do microsatellites reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? A comment on Vali *et al.* (2008). *Molecular Ecology*, 19, 851–855.
- Lombaert E., Guillemaud T., Cornuet J-M., Malausa T., Facon B., Estoup A., 2010.** Bridgehead Effect in the Worldwide Invasion of the Biocontrol Harlequin Ladybird. *PLoS ONE* 5(3): e9743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009743>.
- Mack R. N., et al., 2000.** Biotic invasions: Causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecological Applications*, 10(3), pp. 689-710.
- Martinez M., Germain JF., StreitoJC., 2014.** Actualités Entomologiques : Nouveaux Insectes Ravageurs Introduits En France Métropolitaine (Période Juillet 2005 À Juin 2014). Actes du Colloque AFPP « Ravageurs et insectes invasifs et émergents », Montpellier, oct. 2014.
- Maxwell A., Vettrano A.M., Eschen R. and Andjic V., 2014.** Chapter 35 : International Plant Trade and Biosecurity. *Horticulture : Plants for People and Places*, Volume 3, doi : 10.1007/978-94-017-8560-0_35.
- McKinney M. & Lockwood J., 1999.** Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends in Ecology and Evolution*, 14, pp. 450-453.
- Morin PA., Luikart G., Wayne RK., the SNP workshop group, 2004.** SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 208–216.
- Morin PA., McCarthy M., 2007.** Highly accurate SNP genotyping from historical and low-quality samples. *Molecular Ecology Notes*, 7, 937–946.
- Porras-Hurtado L, Ruiz Y, Santos C, Phillips C, Carracedo Á, Lareu MV., 2013.** An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. *Frontiers in Genetics*. 4:98. doi:10.3389/fgene.2013.00098.

- Pritchard J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945–959.
- Pritchard J.K., Wen X. and Falush D., 2009.** Documentation for Structure software : Version 2.3. University of Oxford, Software from <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>.
http://www.ccg.unam.mx/~vinalesa/tem09/docs/structure_doc.pdf
- Renshaw MA., Saillant E., Bradfield SC., Gold JR., 2006.** Microsatellite multiplex panels for genetic studies of three species of marine fishes: red drum (*Sciaenops ocellatus*), red snapper (*Lutjanus campechanus*), and cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 253, 731–735.
- Rodriguez C. F., Bécares E., Fernandez-Alaez M., Fernandez-Alaez, C., 2005.** Loss of diversity and degradation of wetlands as a result of introducing exotic crayfish. *Biological Invasions*, 7, pp. 75–85.
- Roques A., 2010a.** Taxonomy, time and geographic patterns. Chapter 2. In : Roques A *et al.* (Eds) Alien terrestrial arthropods of Europe. *BioRisk* 4(1): 11–26.
- Roques A., 2010b.** Alien forest insects in a warmer world and a globalised economy: impacts of changes in trade, tourism and climate on forest biosecurity. *New Zealand Journal of Forestry*, suppl 40: 77-94
- Roques A, Fan JT, Courtial B, et al., 2015.** Planting Sentinel European Trees in Eastern Asia as a Novel Method to Identify Potential Insect Pest Invaders. *PloS One* 10 : accessed June 2015.
- Roques A., Auger-Rozenberg MA., Blackburn T.M. et al. 2016.** Temporal and interspecific variation in rates of spread for insect species invading Europe during the last 200 years. *Biol Invasions* 18: 907. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1080-y>.
- Rousselet J., 2018.** Rôle du commerce ornemental dans l'introduction, l'établissement et la propagation des insectes invasifs : L'exemple de la pyrale du buis. *Gestion des Espèces Exotiques Envahissantes en milieu urbain*, Avoine, 14/06/2018.
- Sakai, A.N., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J. & With, K.A., 2001.** The population biology of invasive species. *Annual Review of Entomology*, 32, 305-332.
- Schlötterer C., 2000.** Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365–371.
- Schlötterer C., 2004.** The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nat. Rev. Genet.*, 5, 63–69.
- Seddon JM., Parker HG., Ostrander EA., Ellegren H., 2005.** SNPs in ecological and conservation studies: a test in the Scandinavian wolf population. *Molecular Ecology*, 14, 503–511.
- Su NY, 2013.** How to Become a Successful Invader ? *Florida Entomologist* 96:765–769.
- Tabone E. et al, 2015.** « Mieux connaître la pyrale du buis *Cydalima perspectalis* », *Phytoma*, n°685, juin-juillet 2015, pages 18-20.
- Toth G., Gaspari Z. & Jurka J., 2000.** Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.*, 10, 967–981.
- Vaes-Petignat, S., Nentwig, W., 2014.** Environmental and economic impact of alien terrestrial arthropods in Europe. *NeoBiota* 22:23–42.
- Väli Ü., Einarsson A., Waits L., Ellegren H., 2008.** To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Molecular Ecology*, 17, 3808–3817.
- Van Der Straten, M.J. et Muus, T.S.T., 2010.** The box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae), an invasive alien moth ruining box trees. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society*, 21: 106-112.
- Van Kleunen M., Essl F., Pergl J., Brundu G., Carboni M., Dullinger S. , Early R. , González-Moreno P. and al., 2018.** The changing role of ornamental horticulture in alien plant invasions. *Biol Rev*, 93: 1421-1437. doi:10.1111/brv.12402

- Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A., 2002.** A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics, Selection, Evolution : GSE*. 34(3):275-305. doi:10.1186/1297-9686-34-3-275.
- Wan, H., Haye, T., Kenis, M., Nacambo, S., Xu, H., Zhang, F. and Li, H. 2014.** Biology and natural enemies of *Cydalima perspectalis* in Asia: Is there biological control potential in Europe ? *J. Appl. Entomol.*, 138: 715–722. doi:10.1111/jen.12132.
- Weir B.S. and Cockerham C.C., 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *EvoU/ion* 38: 1358-1370.
- Widehem C., Cadic A., 2006.** L'horticulture ornementale française : Structures, acteurs et marchés. Broché édition INRA – 19 janvier.

Sites internet.

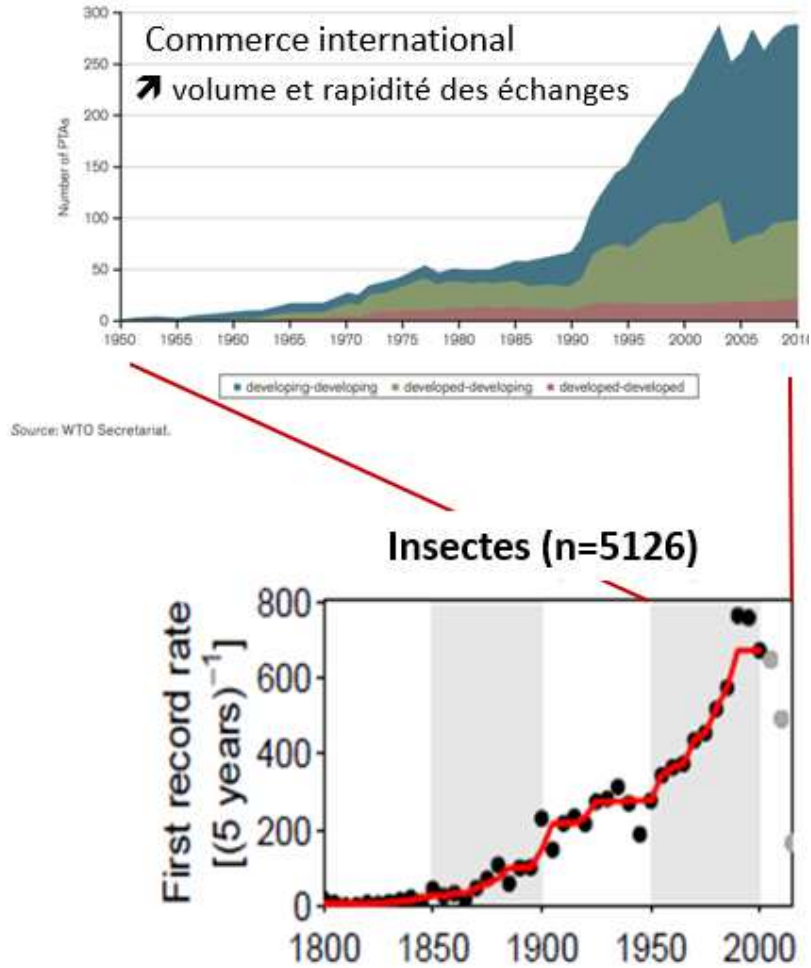
- Martin, J., Brinquin, A.** Mieux connaître et déclarer la pyrale du buis. Ephytia, en ligne : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/21252/Agiir-Mieux-connaître-et-declarer-la-pyrale-du-buis> [consulté le 13.02.18]
- Cabi : Invasive Species Compendium.** *Cydalima perspectalis* (box tree moth). En ligne : <https://www.cabi.org/isc/datasheet/118433> [consulté le 13.02.18]

Glossaire

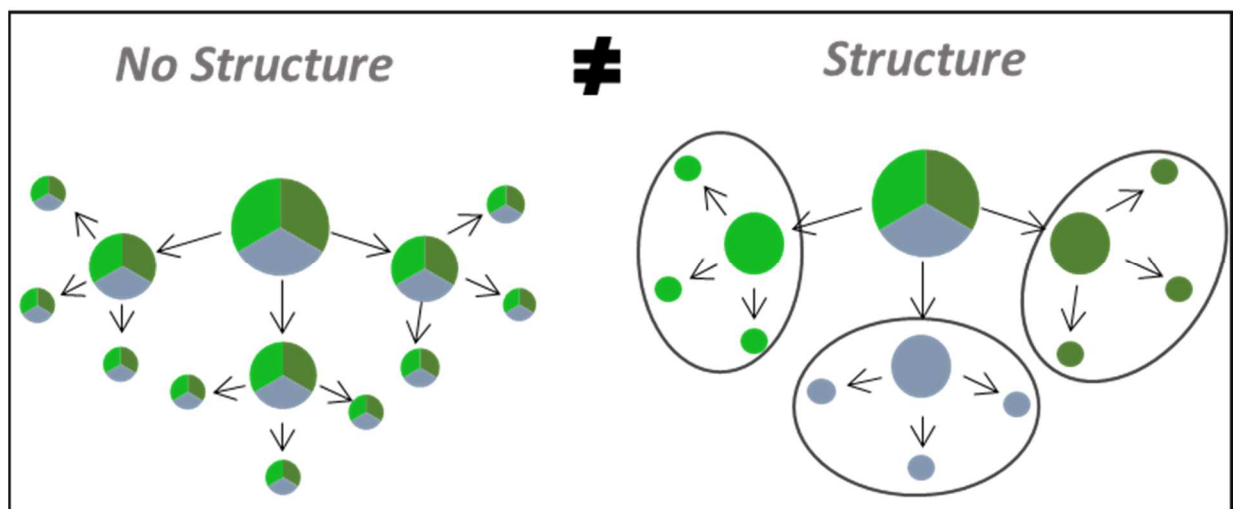
1. **Marqueurs moléculaires** : séquences codantes ou non, présentant un polymorphisme selon les individus. Ils renseignent sur le génotype d'un individu et ne sont pas modifiés par l'environnement. Les plus utilisés sont les marqueurs RFLP, RAPD, AFLP et les microsatellites. Grâce aux marqueurs génétiques, il devient possible d'établir l'empreinte génétique d'un individu, c'est-à-dire de décrire et définir des individus et des variétés en vue de leur inscription, de leur protection et de leur classification et/ou de mettre en évidence et suivre les gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt. (Gnis Pédagogie)
2. **Admixture** : pouvant être traduit de l'anglais par « mélange génétique », se produit lorsque deux populations, ou plus, isolées précédemment et génétiquement différenciées commencent à se croiser. Le mélange se traduit par l'introduction de nouvelles lignées génétiques dans une population. (Wikipédia)
3. **Marqueur AFLP** : C'est la combinaison enzyme de restriction/amorce qui permet de révéler le polymorphisme entre les individus. Celle-ci constitue le marqueur AFLP. Le locus mis en évidence dépend de la séquence du site de l'enzyme de restriction et des bases arbitraires. Il existe de très nombreuses combinaisons enzyme/amorce. En effet, on dispose d'une dizaine d'enzymes de restriction et il existe de très nombreuses amorces d'amplification par combinaisons de 3 bases débordantes. (Gnis Pédagogie)
4. **Homoplasie** : occurrence d'un caractère commun chez deux espèces, qui n'est pas le résultat d'une transmission de la part d'un ancêtre commun, contrairement à une homologie. (Futura Santé)
5. **Cluster** : en génétique, c'est un ensemble de gènes, minimum deux, qui dérivent d'un ancêtre commun et code pour une même protéine ou des protéines proches.
6. **Membership** : en anglais, correspond à la relation entre un membre d'un groupe et ce même groupe. Il pourrait donc être traduit par « affiliation » qui est l'action d'associer ou d'être associé à un groupe.

Annexes

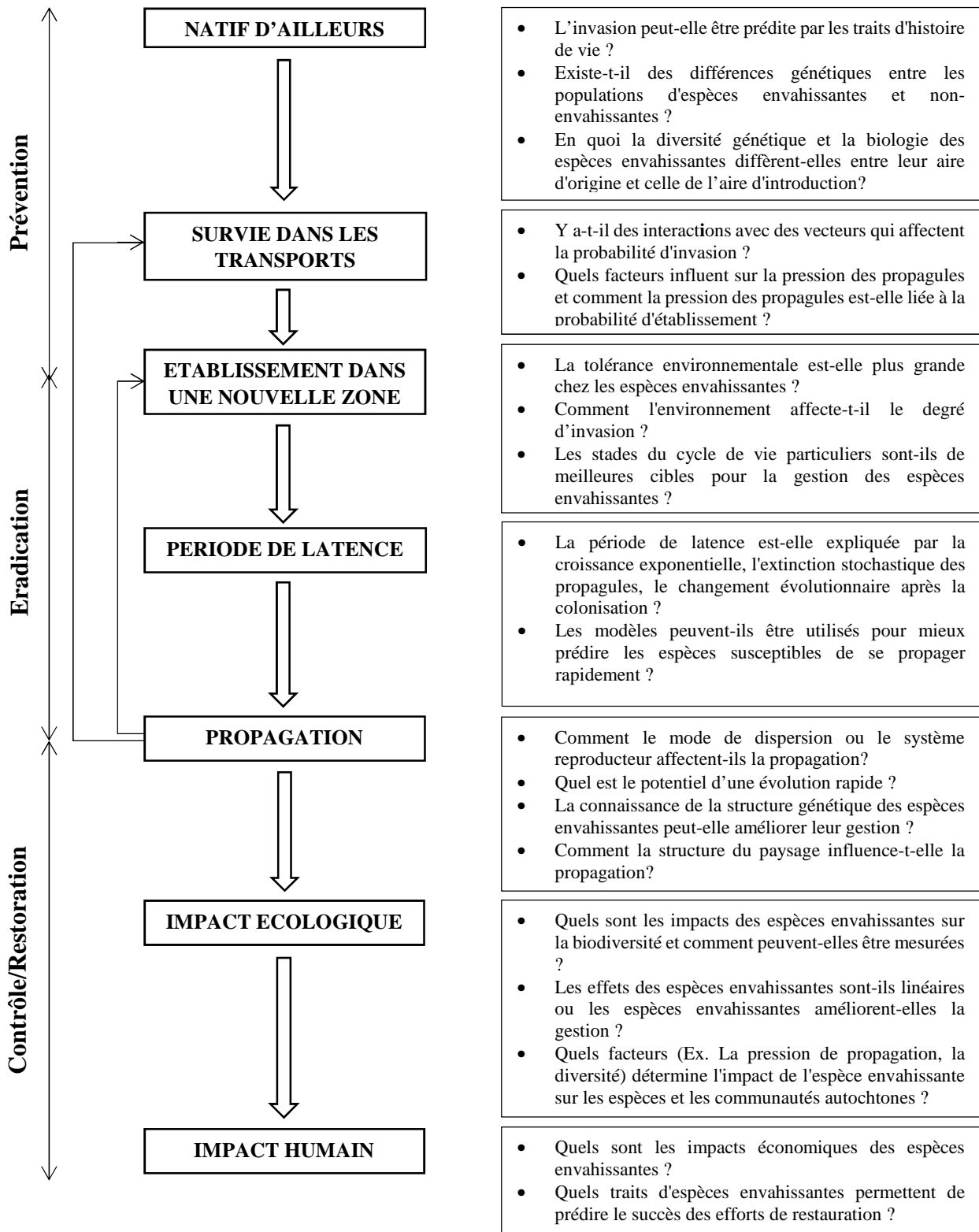
Annexe 1 : Graphiques présentant le développement du commerce international en comparaison avec les ratios d'introduction d'insectes en France (Rousselet, 2018).



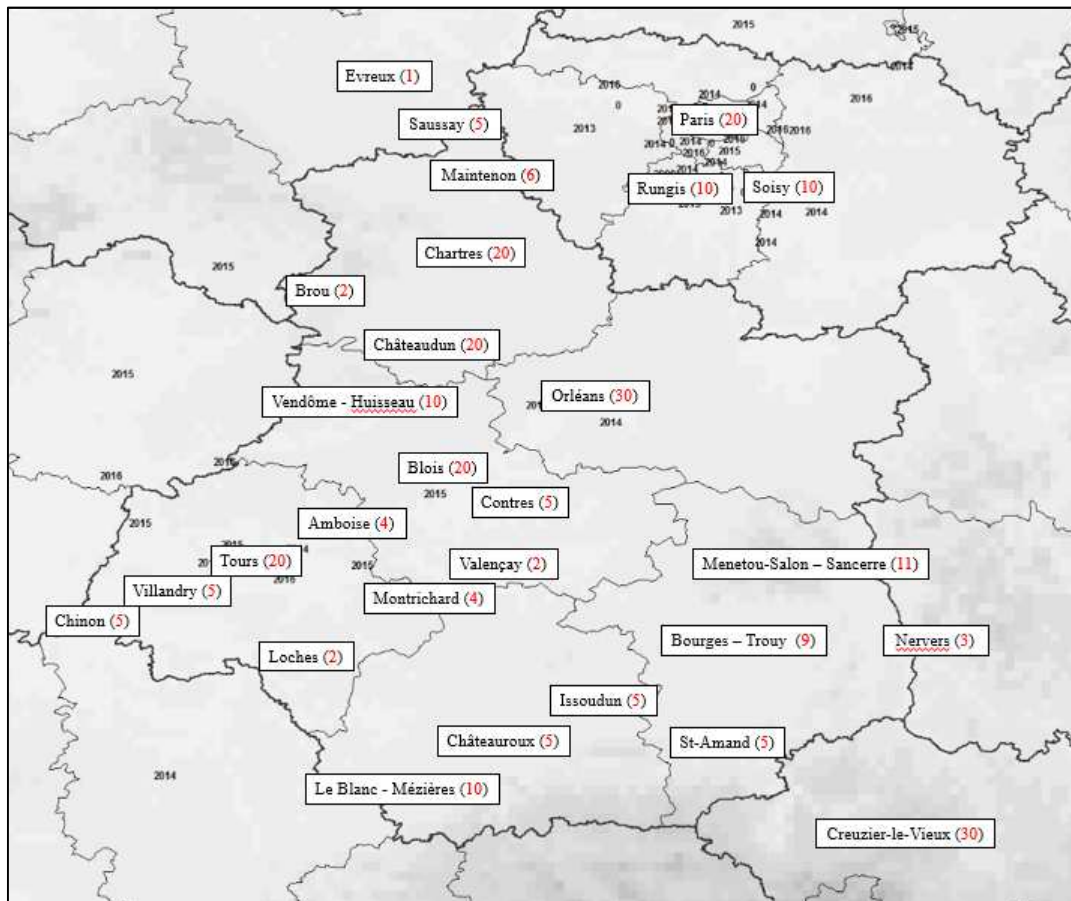
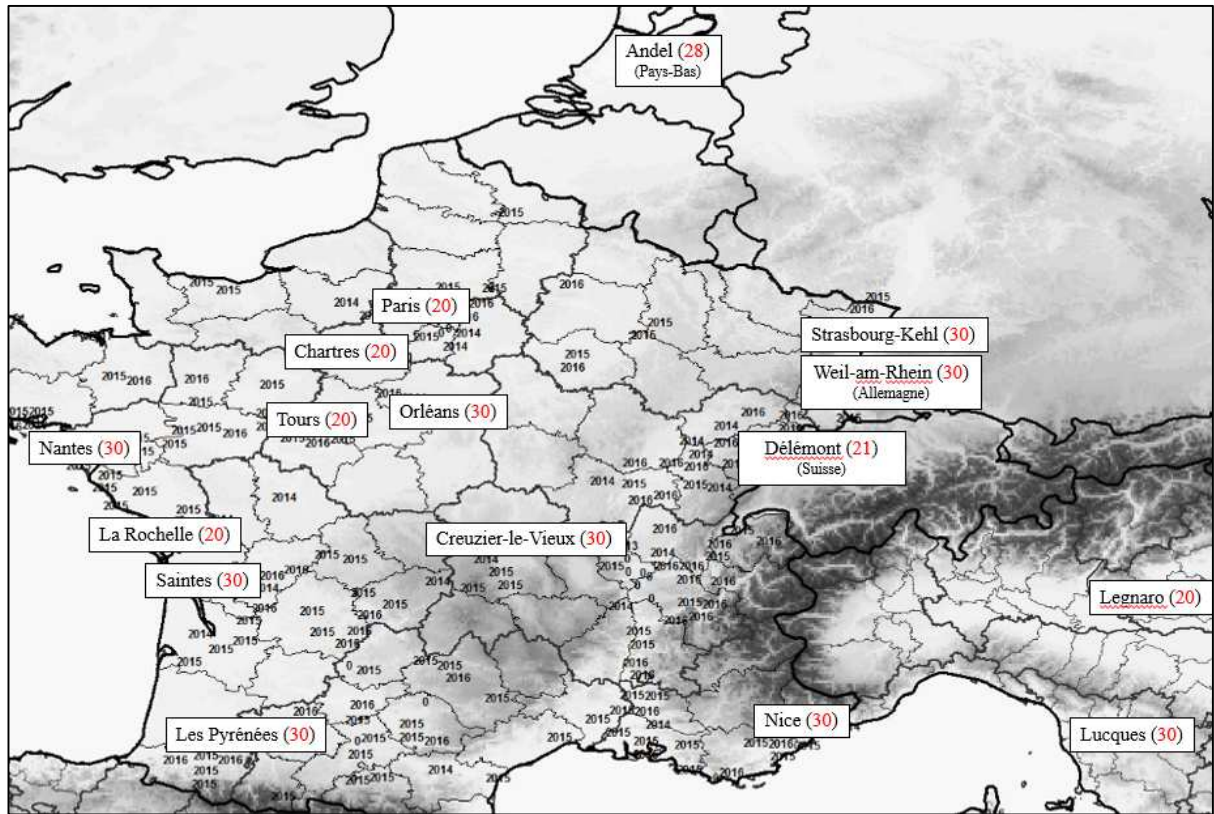
Annexe 2 : Exemple de ce qu'on attend dans l'étude (Rousselet, 2018).



Annexe 3 : Les différentes étapes dans le processus d'invasion et leur relation avec la gestion d'espèces envahissantes. Le transport, l'établissement et la propagation de nombreuses espèces envahissantes ainsi que leurs effets peuvent être caractérisés par une série d'étapes, chacune avec des questions qui peuvent être pertinentes pour la prévention, pour le contrôle et/ou pour la restauration.(traduit d'une illustration de Sakai, 2001)



Annexe 4 : Localisation des populations échantillonnées pour l'étude à l'échelle de la France et de la Région Centre. En rouge, l'effectif de la population.



Annexe 5 : Détails des Mix PCR.**Mix 1 : 58°C**

	1 puit	96 puits	[F*]	[F*]
Multiplex PCR Mix	5 µl	525 µl		
Q solution	1 µl	105 µl		
BTM 01 (10µM) 6-FAM	0,4 µl	42 µl	1/8	1/4 R 0,2 21
BTM 06 (10µM) NED	0,4 µl	42 µl	1/8	F 0,15 15,75
BTM 20 (10µM) VIC	0,4 µl	42 µl	1/4	F* 0,5 5,25
BTM 23 (10µM) 6-FAM	0,4 µl	42 µl	1/4	
BTM 27 (10µM) NED	0,4 µl	42 µl	1/4	1/8 R 0,2 21
BTM 36 (10µM) PET	0,4 µl	42 µl	1/4	F 0,175 18,375
RNAse	0,5 µl	52,5 µl		F* 0,025 2,625
ADN	1 µl			

Mix 2 : 59°C

	1 puit	96 puits	[F*]	[F*]
Multiplex PCR Mix	5 µl	525 µl		
Q solution	1 µl	105 µl		
BTM 09 (10µM) 6-FAM	0,4 µl	42 µl	1/4	1/4 R 0,2 21
BTM 13 (10µM) NED	0,3 µl	31,5 µl	1/8	F 0,15 15,75
BTM 15 (10µM) VIC	0,3 µl	31,5 µl	1/8	F* 0,5 5,25
BTM 22 (10µM) PET	0,3 µl	31,5 µl	1/8	
BTM 34 (10µM) 6-FAM	0,4 µl	42 µl	1/4	1/8 R 0,15 15,75
BTM 35 (10µM) NED	0,4 µl	42 µl	1/4	F 0,131 13,755
BTM 40 (10µM) VIC	0,4 µl	42 µl	1/4	F* 0,019 1,995
RNAse	0,5 µl	52,5 µl		
ADN	1 µl			

Mix 3 : 61°C

	1 puit	96 puits	[F*]	[F*]
Multiplex PCR Mix	5 µl	525 µl		
Q solution	1 µl	105 µl		
BTM 16 (4µM) 6-FAM	0,4 µl	42 µl	1/8	BTM 16 R 0,2 21
BTM 28 (4µM) VIC	0,4 µl	42 µl	1/4	F 0,15 15,75
H2O	0,5 µl	52,5 µl	1/4	F* 0,5 5,25
RNAse	0,5 µl	52,5 µl	1/4	
ADN	1 µl		1/4	BTM 28 R 0,2 21
				F 0,175 18,375
				F* 0,025 2,625

Annexe 6 : Résultats des Fis dans les populations \geq à 20 individus pour chaque marqueurs.

Population	Réel	% val. >	% val. <	% val. =	Résultats pour le locus : BTM27				
Résultats pour le locus : BTM01					-----				
Résultats pour le locus : BTM06					-----				
Nice	0.18310	8.2600	73.3400	18.4000	Nice	-0.01512	46.4000	37.3400	16.2600
Strasbourg	0.26761	1.7800	74.0400	24.1800	Strasbourg	0.11333	10.2000	80.5800	9.2200
Saintes	0.47032	0.2400	98.6000	1.1600	Saintes	0.11585	9.0400	82.0800	8.8800
LaRoche	0.70079	0.0000	99.2800	0.7200	LaRoche	-0.09306	67.1200	14.2600	18.6200
Legnaro	0.39683	0.8800	87.4400	11.6800	Legnaro	0.47843	0.0000	99.8600	0.1400
Paris	-0.10323	42.8200	15.6200	41.5600	Paris	0.02397	31.2600	47.4400	21.3000
Creuzier	0.56716	0.0400	99.4400	0.5200	Creuzier	0.06725	17.0000	69.9800	13.0200
Orleans	0.45794	0.1200	98.3200	1.5600	Orleans	0.17730	2.2200	94.7800	3.0000
Nantes	0.66667	0.0000	99.9400	0.0600	Nantes	-0.04426	57.3000	25.6600	17.0400
Chartres	-0.22941	69.3000	5.4800	25.2200	Chartres	-0.01493	42.0000	35.6000	22.4000
Tours	0.63196	0.0400	99.7600	0.2000	Tours	-0.04348	50.2800	25.8200	23.9000
Blois	-0.48437	95.6000	0.3000	4.1000	Blois	0.02256	32.5600	44.3400	23.1000
Pyrenees	0.33638	1.2200	93.2800	5.5000	Pyrenees	0.05882	21.5200	63.7600	14.7200
Lucques	0.47409	0.1400	98.7200	1.1400	Lucques	0.09831	14.1200	74.7600	11.1200
WeilAmRhein	0.39222	0.5200	95.8600	3.6200	WeilAmRhein	-0.10807	83.7200	5.9800	10.3000
Andel	0.28760	2.9600	88.0200	9.0200	Andel	0.13233	9.7400	81.6200	8.6400
Délémont	-0.04712	39.6800	23.7400	36.5800	Délémont	0.32151	0.4600	97.9400	1.6000
Résultats pour le locus : BTM20					-----				
Nice	-0.01458	45.5600	35.1200	19.3200	Nice	-0.27373	99.6400	0.0200	0.3400
Strasbourg	0.08396	18.1600	70.0400	11.8000	Strasbourg	-0.19749	91.7600	3.1200	5.1200
Saintes	0.04578	20.8800	63.0000	16.1200	Saintes	0.00254	38.9600	42.8000	18.2400
LaRoche	-0.10833	68.4400	11.5800	19.9800	LaRoche	-0.12685	78.9000	6.7800	14.3200
Legnaro	0.06338	21.0600	60.0600	18.8800	Legnaro	0.05316	23.7400	57.5400	18.7200
Paris	-0.14286	76.6000	11.0600	12.3400	Paris	-0.25000	87.2000	5.3200	7.4800
Creuzier	0.19364	2.7400	92.3400	4.9200	Creuzier	-0.13321	79.3200	9.9200	10.7600
Orleans	0.22795	0.4400	98.8000	0.7600	Orleans	0.09233	12.6200	76.3200	11.0600
Nantes	0.20203	0.9000	97.5000	1.6000	Nantes	0.34463	0.0600	99.5400	0.4000
Chartres	-0.10949	71.9000	11.2600	16.8400	Chartres	-0.00352	38.1400	39.6000	22.2600
Tours	-0.14742	86.4000	3.0800	10.5200	Tours	-0.24364	94.7600	1.3000	3.9400
Blois	-0.01230	42.5000	36.9200	20.5800	Blois	-0.47648	99.9800	0.0000	0.0200
Pyrenees	-0.33893	99.8200	0.0000	0.1800	Pyrenees	-0.16345	93.7400	1.7400	4.5200
Lucques	-0.04627	57.8200	24.5800	17.6000	Lucques	0.24121	1.3400	96.7400	1.9200
WeilAmRhein	0.07873	11.0800	77.6600	11.2600	WeilAmRhein	0.04491	23.7200	60.8600	15.4200
Andel	0.14784	3.4600	90.9800	5.5600	Andel	-0.03197	50.6800	32.8200	16.5000
Délémont	0.13846	6.9600	83.7600	9.2800	Délémont	0.20763	4.0000	90.3000	5.7000
Résultats pour le locus : BTM23					-----				
Nice	-0.10204	74.8000	11.7000	13.5000	Nice	0.21289	3.0200	92.8200	4.1600
Strasbourg	0.13072	10.6200	81.1000	8.2800	Strasbourg	0.33054	0.5800	98.5200	0.9000
Saintes	-0.06098	63.2600	20.1000	16.6400	Saintes	0.06185	23.1400	61.1200	15.7400
LaRoche	0.13636	10.2800	78.1800	11.5400	LaRoche	0.05725	25.9400	55.7800	18.2800
Legnaro	0.14793	8.2200	81.8000	9.9800	Legnaro	-0.02703	46.2800	31.7400	21.9800
Paris	0.10287	12.3400	73.3600	14.3000	Paris	0.20419	6.9400	81.8200	11.2400
Creuzier	0.24618	0.6800	98.3000	1.0200	Creuzier	0.04094	27.1600	57.6400	15.2000
Orleans	-0.12840	85.3200	6.5400	8.1400	Orleans	-0.03571	52.9200	30.4800	16.6000
Nantes	0.21148	1.5800	96.1000	2.3200	Nantes	-0.08967	71.2600	14.4800	14.2600
Chartres	-0.26667	95.9000	0.6800	3.4200	Chartres	-0.04467	51.1200	26.8000	22.0800
Tours	0.21281	4.1600	89.2800	6.5600	Tours	0.03390	30.9200	49.0200	20.0600
Blois	-0.21277	84.9800	6.4800	8.5400	Blois	-0.04015	49.4000	30.7800	19.8200
Pyrenees	-0.31597	99.5600	0.1400	0.3000	Pyrenees	0.11557	10.2800	79.7000	10.0200
Lucques	-0.02458	49.0200	34.1800	16.8000	Lucques	-0.05990	57.7400	23.8800	18.3800
WeilAmRhein	-0.00150	40.6400	42.1000	17.2600	WeilAmRhein	0.08019	20.6000	66.2200	13.1800
Andel	0.09434	13.6000	73.0400	13.3600	Andel	-0.14259	85.5200	5.9200	8.5600
Délémont	0.15408	6.1600	84.7600	9.0800	Délémont	-0.07865	56.0400	18.1800	25.7800
Résultats pour le locus : BTM36					-----				
Nice	-0.27373	99.6400	0.0200	0.3400	Nice	0.10024	17.8200	55.4400	26.7400
Strasbourg	-0.19749	91.7600	3.1200	5.1200	Strasbourg	-0.23404	81.5800	4.7200	13.7000
Saintes	0.00254	38.9600	42.8000	18.2400	Saintes	0.23684	3.4800	77.7200	18.8000
LaRoche	-0.12685	78.9000	6.7800	14.3200					
Legnaro	0.05316	23.7400	57.5400	18.7200					
Paris	-0.25000	87.2000	5.3200	7.4800					
Creuzier	-0.13321	79.3200	9.9200	10.7600					
Orleans	0.09233	12.6200	76.3200	11.0600					
Nantes	0.34463	0.0600	99.5400	0.4000					
Chartres	-0.00352	38.1400	39.6000	22.2600					
Tours	-0.24364	94.7600	1.3000	3.9400					
Blois	-0.47648	99.9800	0.0000	0.0200					
Pyrenees	-0.16345	93.7400	1.7400	4.5200					
Lucques	0.24121	1.3400	96.7400	1.9200					
WeilAmRhein	0.04491	23.7200	60.8600	15.4200					
Andel	-0.03197	50.6800	32.8200	16.5000					
Délémont	0.20763	4.0000	90.3000	5.7000					
Résultats pour le locus : BTM09					-----				
Nice	0.21289	3.0200	92.8200	4.1600	Nice	0.10024	17.8200	55.4400	26.7400
Strasbourg	0.33054	0.5800	98.5200	0.9000	Strasbourg	-0.23404	81.5800	4.7200	13.7000
Saintes	0.06185	23.1400	61.1200	15.7400	Saintes	0.23684	3.4800	77.7200	18.8000
LaRoche	0.05725	25.9400	55.7800	18.2800					
Legnaro	-0.02703	46.2800	31.7400	21.9800					
Paris	0.20419	6.9400	81.8200	11.2400					
Creuzier	0.04094	27.1600	57.6400	15.2000					
Orleans	-0.03571	52.9200	30.4800	16.6000					
Nantes	-0.08967	71.2600	14.4800	14.2600					
Chartres	-0.04467	51.1200	26.8000	22.0800					
Tours	0.03390	30.9200	49.0200	20.0600					
Blois	-0.04015	49.4000	30.7800	19.8200					
Pyrenees	0.11557	10.2800	79.7000	10.0200					
Lucques	-0.05990	57.7400	23.8800	18.3800					
WeilAmRhein	0.08019	20.6000	66.2200	13.1800					
Andel	-0.14259	85.5200	5.9200	8.5600					
Délémont	-0.07865	56.0400	18.1800	25.7800					
Résultats pour le locus : BTM13					-----				
Nice	0.10024	17.8200	55.4400	26.7400	Nice	0.10024	17.8200	55.4400	26.7400
Strasbourg	-0.23404	81.5800	4.7200	13.7000	Strasbourg	-0.23404	81.5800	4.7200	13.7000
Saintes	0.23684	3.4800	77.7200	18.8000	Saintes	0.23684	3.4800	77.7200	18.8000

Legnaro	0.08800	12.9000	42.2200	44.8800
Creuzier	-0.09434	52.3600	17.8600	29.7800
Orleans	0.00000	0.0000	0.0000	100.0000
Nantes	0.32781	1.0800	90.5000	8.4200
Chartres	0.02206	21.5000	32.1400	46.3600
Tours	0.00000	0.0000	0.0000	100.0000
Blois	0.00000	0.0000	0.0000	100.0000
Pyrenees	0.36029	0.5600	83.4400	16.0000
Lucques	-0.01754	1.6000	0.0000	98.4000
WeilAmRhein	0.37968	0.6600	95.2200	4.1200
Andel	0.28634	2.0000	81.8600	16.1400
Délémont	0.21569	6.9800	70.4800	22.5400

Résultats pour le locus : BTM15

Nice	0.39222	0.3800	94.8200	4.8000
Strasbourg	0.42978	0.6200	98.6800	0.7000
Saintes	0.68132	0.0000	99.9600	0.0400
LaRoche	0.88690	0.0000	100.0000	0.0000
Legnaro	0.08276	15.3000	55.8800	28.8200
Paris	-0.02703	2.2800	0.0000	97.7200
Creuzier	-0.00578	31.8000	31.6000	36.6000
Orleans	0.68984	0.0200	99.9800	0.0000
Nantes	0.83821	0.0000	100.0000	0.0000
Chartres	0.78161	0.0000	98.9800	1.0200
Tours	0.56154	0.3000	99.1000	0.6000
Blois	0.57207	0.0200	99.9400	0.0400
Pyrenees	0.42517	0.1000	99.7800	0.1200
Lucques	0.11854	14.0000	66.5000	19.5000
WeilAmRhein	0.71981	0.0000	99.6800	0.3200
Andel	0.74342	0.0000	100.0000	0.0000
Délémont	0.46667	0.1000	85.3800	14.5200

Résultats pour le locus : BTM22

Nice	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Strasbourg	0.85901	0.0000	100.0000	0.0000
Saintes	1.00000	0.0000	99.9800	0.0200
LaRoche	1.00000	0.0000	99.9800	0.0200
Legnaro	0.90256	0.0000	100.0000	0.0000
Paris	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Creuzier	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Orleans	0.85464	0.0000	100.0000	0.0000
Nantes	0.36123	0.9200	90.1400	8.9400
Chartres	1.00000	0.0000	99.7800	0.2200
Tours	1.00000	0.0000	97.2400	2.7600
Blois	-0.00000	0.0000	0.0000	100.0000
Pyrenees	1.00000	0.0000	98.3200	1.6800
Lucques	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
WeilAmRhein	0.57468	0.0000	99.9600	0.0400
Andel	0.63014	0.0000	99.9200	0.0800
Délémont	0.57778	0.0000	98.6000	1.4000

Résultats pour le locus : BTM34

Délémont	-0.03030	2.8200	0.0000	97.1800
----------	----------	--------	--------	---------

Résultats pour le locus : BTM35

Nice	0.00000	0.0000	0.0000	100.0000
Strasbourg	-0.20554	77.8600	6.1400	16.0000
Saintes	0.00000	0.0000	0.0000	100.0000
Paris	0.48649	0.2600	95.1200	4.6200
Orleans	0.65882	0.0000	94.4000	5.6000

Nantes	0.47748	0.1000	90.4600	9.4400
Chartres	0.00000	0.0000	0.0000	100.0000
WeilAmRhein	0.37093	0.7400	97.7000	1.5600
Andel	-0.05882	11.4000	0.0000	88.6000
Délémont	0.72350	0.0000	99.8800	0.1200

Résultats pour le locus : BTM40

Nice	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Strasbourg	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Saintes	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
LaRoche	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Legnaro	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Paris	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Creuzier	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Orleans	0.44102	0.0000	99.9800	0.0200
Nantes	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Chartres	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Tours	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Blois	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Pyrenees	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Lucques	0.27367	1.1600	96.1600	2.6800
WeilAmRhein	-0.01556	46.1800	37.6400	16.1800
Andel	0.23324	1.8200	94.4800	3.7000
Délémont	0.31288	2.5800	91.1600	6.2600

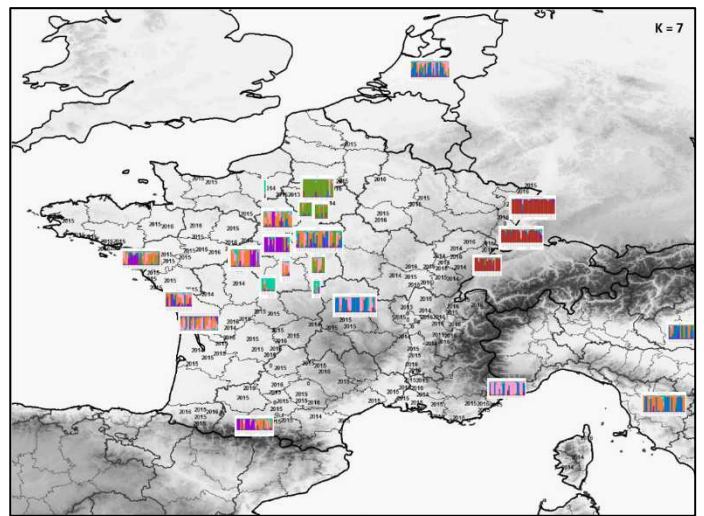
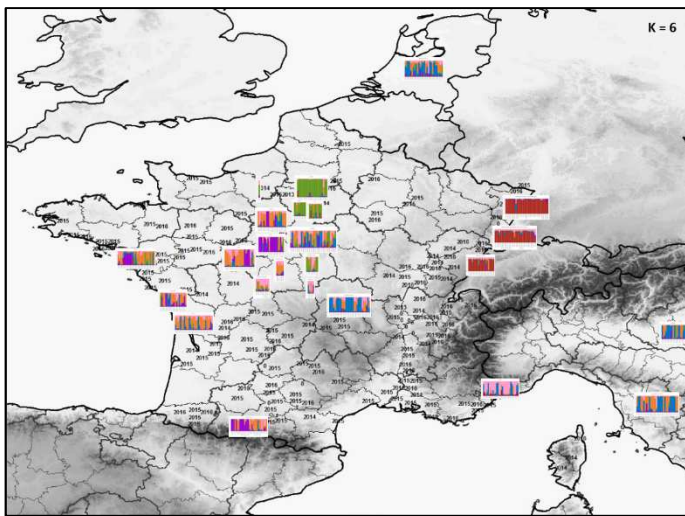
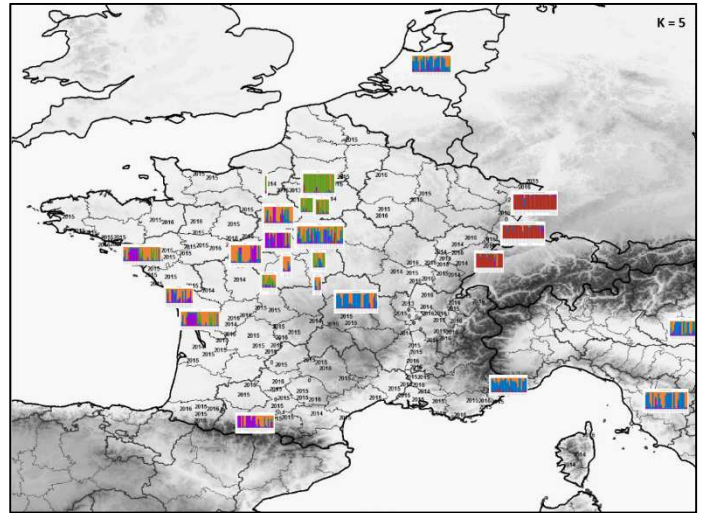
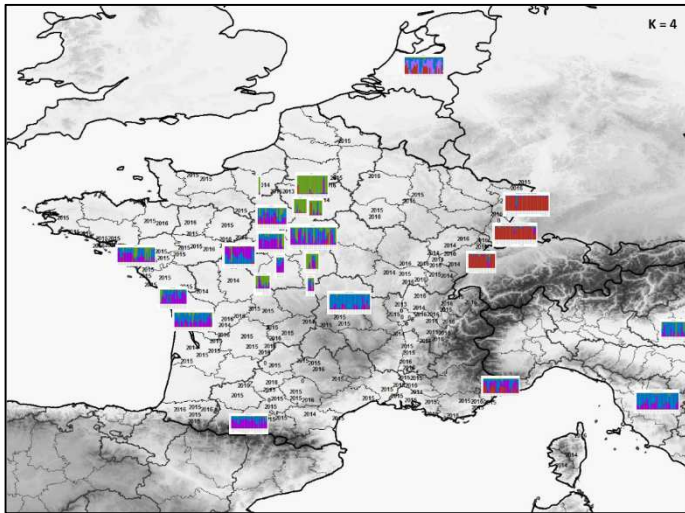
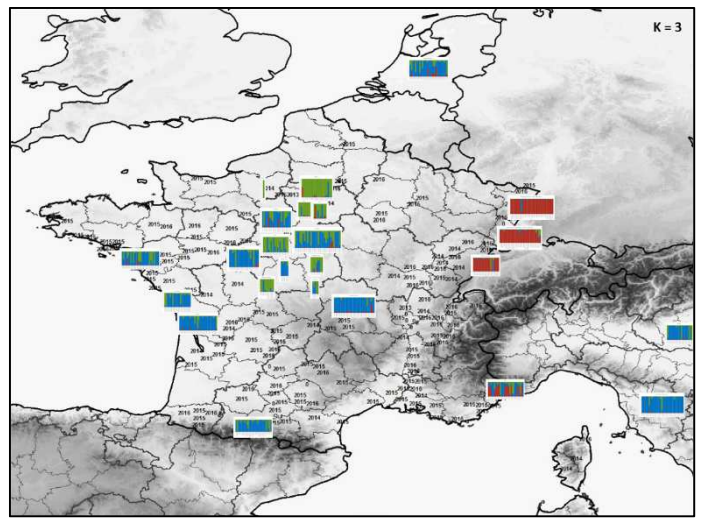
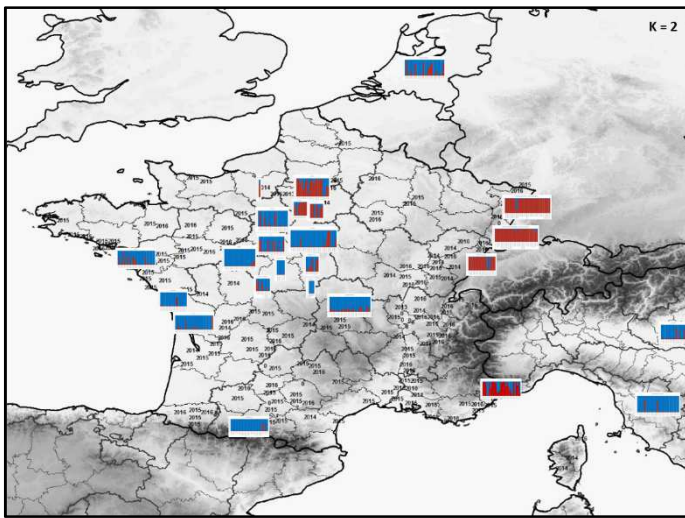
Résultats pour le locus : BTM16

Nice	0.53226	0.0400	98.2200	1.7400
Strasbourg	0.52145	0.0400	98.7400	1.2200
Saintes	0.35823	0.3800	98.4800	1.1400
LaRoche	0.24000	3.0000	64.9400	32.0600
Legnaro	0.44767	0.2400	98.5800	1.1800
Paris	0.17347	8.6200	78.8400	12.5400
Creuzier	-0.20615	87.2000	0.0000	12.8000
Orleans	-0.20833	68.5400	0.0000	31.4600
Nantes	0.58333	0.0400	99.9000	0.0600
Chartres	0.52050	0.1200	99.1600	0.7200
Tours	0.14124	10.6200	74.5800	14.8000
Blois	-0.08271	56.6000	26.2000	17.2000
Pyrenees	0.19862	5.6600	78.1800	16.1600
Lucques	0.03916	22.7400	39.1200	38.1400
WeilAmRhein	0.17044	6.0800	85.9200	8.0000
Andel	0.21024	4.6400	84.7600	10.6000
Délémont	0.41463	0.8000	92.4200	6.7800

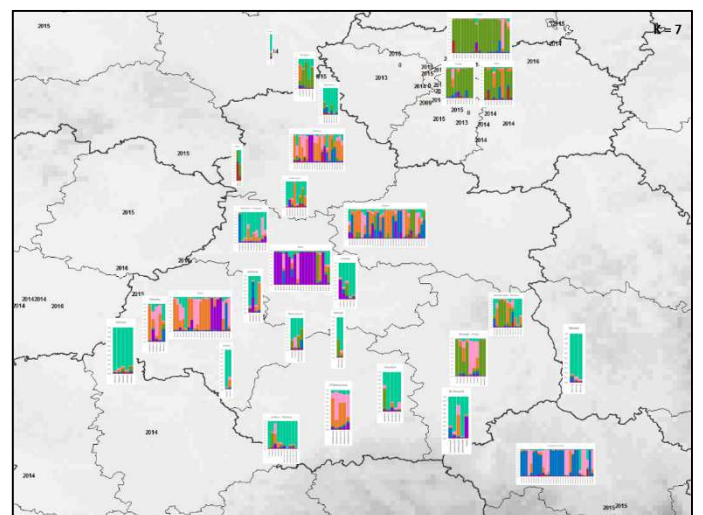
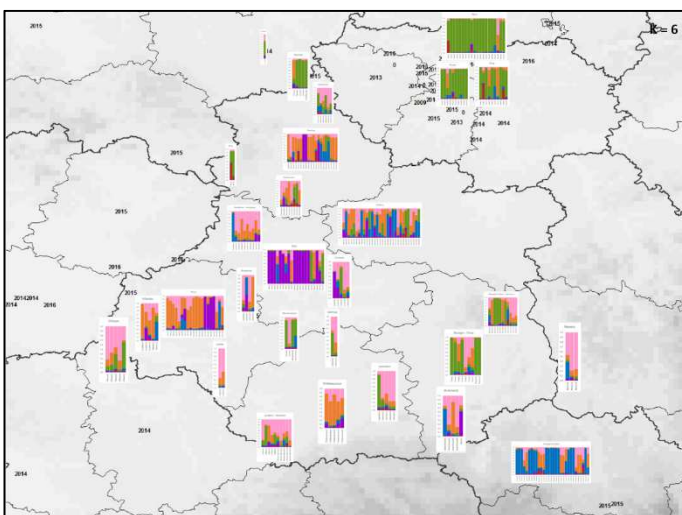
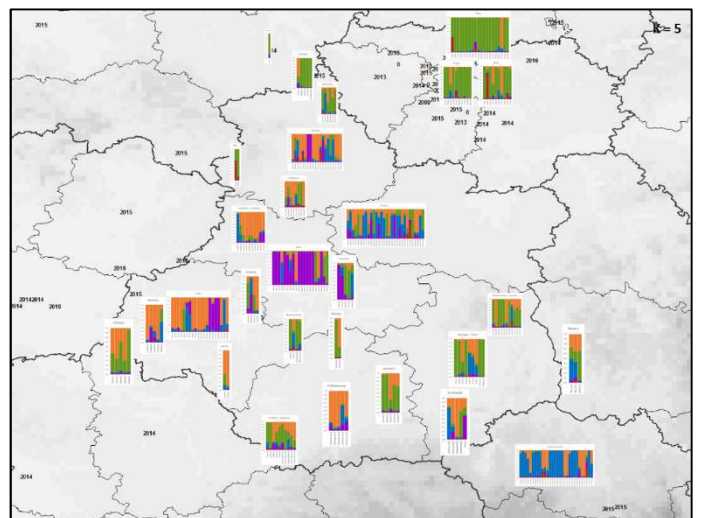
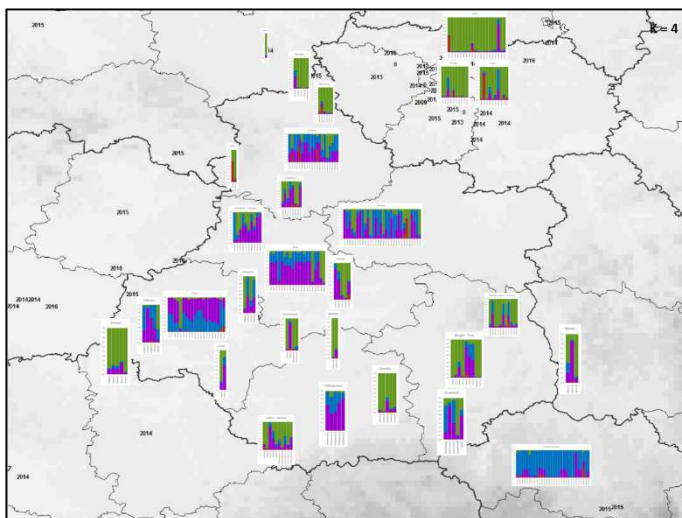
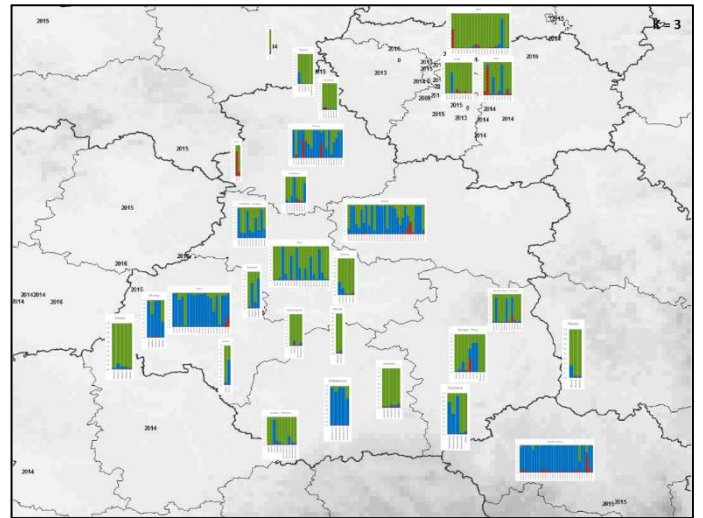
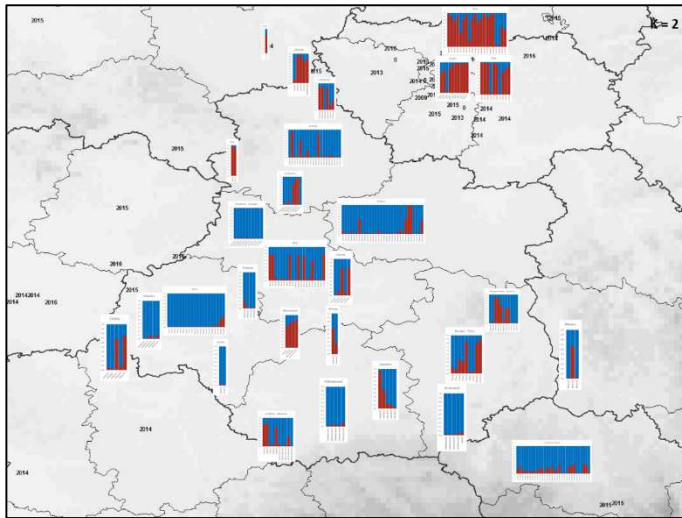
Résultats pour le locus : BTM28

Strasbourg	0.28153	2.4400	88.6600	8.9000
Saintes	0.15122	5.5800	59.3000	35.1200
LaRoche	-0.01333	2.6600	0.0000	97.3400
Legnaro	0.15929	7.1800	52.1800	40.6400
Paris	-0.10145	35.8000	0.0000	64.2000
Creuzier	-0.07407	17.1400	0.0000	82.8600
Orleans	0.19556	5.1600	86.9600	7.8800
Nantes	-0.04036	10.4400	0.0000	89.5600
Chartres	0.00000	0.0000	0.0000	100.0000
Tours	-0.03636	7.9000	0.0000	92.1000
Blois	-0.02703	1.9000	0.0000	98.1000
Pyrenees	-0.09434	24.5400	0.0000	75.4600
Lucques	0.04745	20.8200	47.3200	31.8600
WeilAmRhein	-0.06033	52.7000	33.0600	14.2400
Andel	-0.04348	11.2400	0.0000	88.7600
Délémont	0.47917	0.3400	97.8800	1.7800

Annexe 7a : Cartographie des résultats de Structure à l'échelle de la France.



Annexe 7b : Cartographie des résultats de Structure à l'échelle de la Région Centre.



Université de Picardie Jules Verne
Direction de l'Orientation
et de l'Insertion Professionnelle
Le Corail - Chemin du Thil 80025 Amiens cedex 1
Tél : 03 22 82 79 36
bioip@u-picardie.fr



Année universitaire : 2017-2018

CONVENTION DE STAGE
(stage effectué dans le cadre de la formation initiale et en France)

Vu la loi n°2014-788 du 10 juillet 2014 tendant au développement, à l'encadrement des stages et à l'amélioration du statut des stagiaires,
Vu le décret n°2014-1420 du 27 novembre 2014 relatif à l'encadrement des périodes de formation en milieu professionnel,
Vu le code de l'éducation, notamment ses articles L. 124-1 à L. 124-20 et D 124-1 à D 124-9,
Vu l'arrêté du 29 décembre 2014,
Vu le code du travail,
Vu le code de la Sécurité sociale

La présente convention intervient entre :

l'Université de Picardie Jules Verne, représentée par son Président Monsieur Mohammed BENLAHSEN, ci-après désignée « l'université »

et

l'organisme d'accueil INRA - INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
Adresse : 2163, avenue de la Pomme de Pin CS 40001 Ardon 45075 ORLEANS CEDEX, FRANCE
Tél : 0238417800
représenté par Madame BEAUMONT Catherine
ci-après désigné « l'organisme d'accueil »

et

Mademoiselle VIOT CAROLINE
Adresse personnelle : 54 RUE DE LA REPUBLIQUE 80000 AMIENS (80021), FRANCE
Tél : 06 38 66 96 47 / Mail : caroline.viot@etud.u-picardie.fr
Inscrit(e) en (intitulé complet de la formation) : MASTER Ecosystèmes, agrosystèmes, Développement durable, Ecologie, Agroécologie, Biodiversité, 2ème année
Volume horaire annuel de la formation : au minimum de 200 heures.

Article 1 – OBJET DE LA CONVENTION

La présente convention règle les rapports de l'organisme d'accueil avec l'Université et le stagiaire.

Article 2 - PROJET PÉDAGOGIQUE ET CONTENU DU STAGE

2-1 Projet, objectifs et finalités du stage

Le stage correspond à une période temporaire de mise en situation en milieu professionnel au cours de laquelle l'étudiant acquiert des compétences professionnelles et met en œuvre les acquis de sa formation en vue d'obtenir un diplôme ou une certification et de favoriser son insertion professionnelle. Le stagiaire se voit confier une ou des missions conformes au projet pédagogique défini par son établissement d'enseignement et approuvées par l'organisme d'accueil.

Le volume pédagogique annuel de la formation est de 200 heures au minimum par année d'enseignement hors période de stage. Le programme du stage est établi par le tuteur de stage dans l'organisme d'accueil et par l'enseignant référent au sein de l'université et en fonction du programme général suivi par l'étudiant et de sa spécialisation.
Nombre d'ECTS délivrés pour le stage (le cas échéant) : 30.

2-2 Mission du stage, activités et compétences

La mission du stage est la suivante : **Rôle du commerce ornemental dans l'invasion fulgurante de la pyrale du buis : traçage génétique des populations colonisant la Région Centre Val de Loire.**

Elle est portée à la connaissance du stagiaire qui l'accepte.

Les activités confiées au stagiaire en fonction des objectifs de la formation sont définies ci-après : - Comprendre les patrons et les voies de colonisation de la pyrale du buis à l'échelle de la Région Centre Val de Loire. -- Hypothèse d'introductions multiples. -- Etude de la structuration génétiques des populations de la Région et traçage génétique de leur origine. -- Manipulations, acquisition de données : extraction d'ADN et traçage génétique à l'aide de microsatellites. -- Analyses des données et recherches bibliographiques.

Les compétences à acquérir ou à développer sont celles attendues par un étudiant inscrit en MASTER Ecosystèmes, agrosystèmes, Développement durable, Ecologie, Agroécologie, Biodiversité, 2ème année.

Article 3 - MODALITÉS DU STAGE**3-1 Statut du stagiaire**

Le stagiaire, pendant la durée de son stage dans l'organisme d'accueil, conserve son statut d'étudiant.

3-2 Dates, durée et temps de présence

La durée du stage s'évalue en fonction du temps de présence du stagiaire au sein de l'organisme d'accueil (1 jour = 7heures, 1 mois = 22 jours).

Les dates du stage sont fixées : du **15 janvier 2018** au **13 juillet 2018**,
représentant une durée totale effective de : **6 mois**

Le stagiaire sera présent **Tous les jours ouvrables**.

(préciser la fréquence - Ex : tous les jours, 1 semaine sur 2, tous les lundis et jeudis, du ... au ... et du ... au ...).

Un avenant à la convention pourra être établi en cas de modification des modalités de stage faite à la demande de l'organisme d'accueil et du stagiaire.

La durée cumulée des périodes de stage ne peut dépasser six mois par année d'enseignement.

La date de fin de stage ne peut être postérieure au 30 septembre de l'année en cours. Si tel était le cas, le stagiaire doit se réinscrire à l'université et une nouvelle convention doit être établie.

3-3 Horaires et conditions particulières

La durée hebdomadaire de présence du stagiaire dans l'organisme d'accueil suit les règles applicables aux salariés de l'organisme, elle sera de : **35 heures**.

Lorsque le stage implique des conditions de travail particulières (travail de nuit, dimanche ou jours fériés, etc...) la nature et la durée de ces obligations doivent être spécifiées précisément ci-dessous :

Non renseigné

3-4 Lieu de stage

Le stage se déroulera dans les locaux de l'organisme d'accueil à l'adresse suivante :
2163, avenue de la Pomme de Pin CS 40001 Ardon 45075 ORLEANS CEDEX, FRANCE
dans le service suivant : **INRA URZF dirigé par AUGER-ROZENBERG Marie-Anne**

3-5 Accueil et encadrement

Le stagiaire est suivi régulièrement par l'enseignant référent désigné par l'université qui s'assure du bon déroulement du stage et du respect des stipulations de la convention : (nom, prénom) **Mademoiselle Prevost Genevieve**

L'organisme d'accueil nomme un tuteur de stage chargé de l'accueil et de l'accompagnement du stagiaire et garant du respect des stipulations pédagogiques de la convention : (nom, prénom) **Monsieur ROUSSELET Jérôme**

Article 4 - GRATIFICATION – AVANTAGES EN NATURE – REMBOURSEMENT DE FRAIS

4-1 Lorsque la durée du stage au sein d'une même entreprise, administration publique, assemblée parlementaire, assemblée consultative, association, ou tout autre organisme d'accueil sur le territoire français, est supérieur à deux mois consécutifs (44 jours ou 308 heures), ou, au cours d'une même année universitaire, à deux mois consécutifs ou non, le stage fait l'objet d'une gratification versée mensuellement avec effet rétroactif au 1er mois.

La durée du stage s'apprécie compte-tenu de la présente convention et des éventuels avenants ayant pour effet de la prolonger.

La gratification est fixée par convention de branche ou accord professionnel, ou à défaut à 15% du plafond horaire de la sécurité sociale défini en application de l'article L 241-3 du code de la sécurité sociale.

La gratification due par une administration, un établissement public ou tout organisme de droit public ne peut être cumulée avec une rémunération versée par ce même organisme d'accueil au cours de la période concernée. Le montant de cette gratification ne peut excéder le montant minimum légal.

4-2 Lorsque la durée du stage est inférieure ou égale à deux mois, sur le territoire français, l'organisme d'accueil peut décider de verser une gratification.

4-3 Montant de la gratification versée mensuellement en euros : **554 € euros/mois**

Le montant légal s'élève à de 3.60 euros de l'heure.

En cas de versement forfaitaire, une régularisation interviendra en fin de stage en fonction du nombre d'heures réellement effectuées. La gratification est due sans préjudice du remboursement des frais engagés par le stagiaire pour effectuer son stage et des avantages offerts, le cas échéant, pour la restauration, l'hébergement et le transport.

En cas d'interruption ou d'arrêt de la présente convention, le montant de la gratification due au stagiaire est proratisé en fonction de la durée du stage effectué.

4-4 Dans les organismes de droit privé, le stagiaire bénéficie des protections et droits mentionnés aux articles L 1121-1, L 1152-1 et L 1153-1 du code du travail.

Il accède au restaurant d'entreprise ou aux titres-restaurant prévus à l'article L3262-1 du code du travail, à la prise en charge des frais de transport prévue à l'article L 3261-2 du même code et aux activités sociales et culturelles mentionnées à l'article L2323-83 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés.

Liste des avantages accordés : **Néant**

4-5 Dans les organismes de droit public, les trajets effectués par le stagiaire entre son domicile et son lieu de stage sont pris en charge dans les conditions fixées par le décret 2010-676 du 21 juin 2010 instituant une prise en charge partielle du prix des titres d'abonnement correspondant aux déplacements effectués par les agents publics entre leur résidence habituelle et leur lieu de travail. Le stagiaire accueilli dans un organisme de droit public et qui effectue une mission dans ce cadre, bénéficie de la prise en charge de ses frais de déplacement temporaire selon la réglementation en vigueur. Est considéré comme résidence administrative le lieu du stage indiqué dans la présente convention.

Liste des avantages accordés : **Accès à un restaurant d'entreprise (payant)**

Article 5 - PROTECTION SOCIALE

Pendant la durée du stage, le stagiaire reste affilié à son système de sécurité sociale antérieur. Tous les stagiaires bénéficient d'une protection contre les risques accidents du travail et maladies professionnelles. Ils sont rattachés au régime général de la Sécurité Sociale.

Le paiement des cotisations accidents du travail et maladies professionnelles auprès de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie (CPAM) est assuré obligatoirement par l'Université ou le rectorat de l'académie en l'absence de gratification ou lorsque la gratification est égale ou inférieure à 15% du plafond horaire de la sécurité sociale. C'est la CPAM du lieu du domicile du stagiaire qui est compétente en matière d'accident du travail.

5-1 Gratification inférieure ou égale à 15% du plafond horaire de la sécurité sociale : la gratification de stage n'est pas soumise à cotisation sociale.

Le stagiaire bénéficie de la législation sur les accidents de travail au titre du régime étudiant de l'article L 412-8-2 du code de la Sécurité Sociale.

En cas d'accident survenant au stagiaire, soit au cours des activités dans l'organisme d'accueil, soit au cours du trajet, soit sur les lieux rendus utiles pour les besoins de son stage, l'organisme d'accueil envoie la déclaration à la CPAM en mentionnant l'Université de Picardie Jules Verne comme employeur, avec copie à l'université (n° de SIRET de l'Université Picardie Jules Verne : 19801344300017).

5-2 Gratification supérieure à 15% du plafond horaire de la sécurité sociale : les cotisations sociales sont calculées sur le différentiel entre le montant de la gratification et 15% du plafond horaire de la Sécurité Sociale.

Le stagiaire bénéficie de la couverture légale en application des dispositions des articles L 411-1 et suivants du code de la Sécurité Sociale. En cas d'accident survenant au stagiaire, soit au cours des activités dans l'organisme d'accueil, soit au cours du trajet, soit sur des lieux rendus utiles pour les besoins de son stage, l'organisme d'accueil, employeur, effectue toutes les démarches nécessaires auprès de la CPAM et informe l'université dans les meilleurs délais.

Article 6 - RESPONSABILITE CIVILE ET ASSURANCES

L'organisme d'accueil et le stagiaire déclarent être garantis au titre de la responsabilité civile.

Compagnie d'assurance du stagiaire : **Allianz N° 36541246**

Quelle que soit la nature du stage, le stagiaire s'engage à se couvrir par un contrat individuel d'assurance accident.

Lorsque l'organisme d'accueil met un véhicule à la disposition du stagiaire, il lui incombe de vérifier préalablement que la police d'assurance du véhicule couvre son utilisation par un stagiaire.

Lorsque dans le cadre de son stage, le stagiaire utilise son propre véhicule ou un véhicule prêté par un tiers, il déclare expressément à l'assureur dudit véhicule cette utilisation et le cas échéant, s'acquitter de la prime afférente.

Article 7 - REGLEMENT INTERIEUR ET DISCIPLINE

Durant son stage, le stagiaire est soumis à la discipline et aux clauses du règlement intérieur qui lui sont applicables et qui sont portées à sa connaissance avant le début du stage, notamment en ce qui concerne les horaires, et les règles d'hygiène et de sécurité en vigueur dans l'organisme d'accueil. Toute sanction disciplinaire ne peut être décidée que par l'université. L'organisme d'accueil informe l'université des manquements et lui fournit le cas échéant les éléments constitutifs.

En cas de manquement particulièrement grave à la discipline, l'organisme d'accueil se réserve le droit de mettre fin au stage tout en respectant les dispositions détaillées à l'article 9.

Article 8 – AUTORISATIONS D'ABSENCE ET CONGES

En France (sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises ou dans des organismes de droit public), en cas de grossesse, de paternité ou d'adoption, le stagiaire bénéficie de congés et d'autorisations d'absence d'une durée équivalente à celle prévue pour les salariés aux articles L.1225-16 à L.1225-28, L.1225-35, L.1225-37, L.1225-48 du code du travail.

Pour les stages dont la durée est supérieure à deux mois et dans la limite de la durée maximale de 6 mois, des congés ou autorisations d'absence sont possibles.

Nombres de jours de congés autorisés : un jour par mois à partir du 3ème mois, avec effet au 1er mois du stage.

Les autorisations d'absence doivent être prévues si possible dès l'établissement de la convention ou demandés au plus tard deux semaines avant l'absence (cf le formulaire obligatoire disponible sur la plateforme « stages / emplois »).

Article 9 - INTERRUPTION, PROLONGATION ET RUPTURE

Lorsque le stagiaire interrompt son stage pour un motif lié à la maladie, à un accident, à la grossesse, à la paternité, à l'adoption ou, en accord avec l'établissement, en cas de non-respect des stipulations pédagogiques de la convention ou en cas de rupture de la convention à l'initiative de l'organisme d'accueil, l'UPJV valide la période de stage, même s'il n'a pas atteint la durée prévue dans le cursus, ou propose au stagiaire une modalité alternative de validation de sa formation. En cas d'accord des parties à la convention, un report de la fin du stage, en tout ou partie, est également possible par la rédaction d'un avenant.

Pour toute autre interruption temporaire du stage (absence injustifiée...), l'organisme d'accueil avertit l'université par courrier. En cas d'accord des parties à la convention, un report de la fin du stage est possible afin de permettre la réalisation de la durée totale du stage prévue initialement. Ce report fera l'objet d'un avenant à la convention de stage.

Un avenant à la convention de stage pourra être établi en cas de prolongation du stage sur demande conjointe de l'organisme d'accueil et du stagiaire, dans le respect de la durée maximale fixée par la loi (6 mois) et de l'échéance du 30 septembre.

Toute difficulté survenue dans le déroulement du stage devra être portée à la connaissance de tous les intéressés afin d'être résolue au plus vite.

En cas de volonté d'une des trois parties (organisme d'accueil, université, stagiaire) d'arrêter définitivement le stage, celle-ci devra immédiatement en informer les deux autres parties par écrit. Les raisons invoquées seront examinées en étroite concertation. La décision définitive d'arrêt du stage ne sera prise qu'à l'issue de cette phase de concertation. Un avenant de rupture sera établi.

Article 10 - DEVOIR DE RESERVE ET CONFIDENTIALITÉ

Le devoir de réserve est de rigueur absolue et apprécié par l'organisme d'accueil compte-tenu de ses spécificités. Le stagiaire prend donc l'engagement de n'utiliser en aucun cas les informations recueillies ou obtenues, aux fins de publication ou de communication à des tiers, sans accord préalable de l'organisme d'accueil, y compris le rapport de stage. Cet engagement vaudra non seulement pour la durée du stage mais également après son expiration. Le stagiaire s'engage à ne conserver, emporter, ou prendre copie d'aucun document ou logiciel, de quelque nature que ce soit, appartenant à l'organisme d'accueil, sauf accord de ce dernier.

Dans le cadre de la confidentialité des informations contenues dans le rapport, l'organisme d'accueil peut demander une restriction de la diffusion du rapport, voire le retrait de certains éléments confidentiels.

Les personnes amenées à en connaître sont contraintes par le secret professionnel à n'utiliser ni ne divulguer les informations du rapport.

Article 11 - PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

Conformément au code de la propriété intellectuelle, si le travail du stagiaire donne lieu à la création d'une œuvre protégée par le droit d'auteur ou la propriété industrielle (y compris un logiciel), si l'organisme d'accueil souhaite l'utiliser et que le stagiaire en est d'accord, un contrat devra être signé entre le stagiaire (auteur) et l'organisme d'accueil.

Devront notamment être précisés l'étendue des droits cédés, l'éventuelle exclusivité, la destination, les supports utilisés et la durée de la cession, ainsi que, le cas échéant, le montant de la rémunération due au stagiaire au titre de la cession. Cette clause s'applique quel que soit le statut de l'organisme d'accueil.

Article 12 - RECRUTEMENT

S'il advenait qu'un contrat de travail prenant effet avant la date de fin du stage soit signé avec l'organisme d'accueil, la présente convention deviendrait caduque ; le stagiaire ne relèverait plus de la responsabilité de l'université. Cette dernière devrait impérativement en être avertie avant la signature du contrat de travail.

Article 13 - FIN DE STAGE – RAPPORT - EVALUATION – DELAI DE CARENCE

À l'issue du stage, l'organisme d'accueil délivre au stagiaire une attestation de stage dont le modèle figure en annexe. Il remplit également une fiche d'évaluation de l'activité du stagiaire qu'il retourne à l'université.

Le stagiaire doit remettre un rapport de stage à l'enseignant référent ainsi qu'à l'organisme d'accueil.

Par ailleurs, il saisit sur la Plateforme « stages / emplois » le formulaire dans lequel il évalue la qualité de l'accueil dont il a bénéficié au sein de l'organisme d'accueil.

Ce document d'évaluation n'est pas pris en compte dans son évaluation ou dans l'obtention du diplôme ou de la certification.

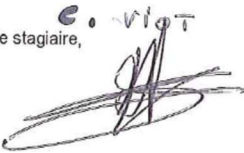
Le tuteur de stage de l'organisme d'accueil ou tout autre membre de cet organisme appelé à se rendre à l'université dans le cadre de la préparation, du déroulement et de la validation du stage, ne peut prétendre à une quelconque prise en charge ou indemnisation de la part de l'université.

L'accueil successif de stagiaires, au titre de conventions de stage différentes, pour effectuer des stages dans un même poste, n'est possible qu'à l'expiration d'un délai de carence égal au tiers de la durée du stage précédent. Cette disposition n'est pas applicable lorsque ce stage précédent a été interrompu avant son terme à l'initiative du stagiaire.

Article 14 - DROIT APPLICABLE – TRIBUNAUX COMPETENTS

La présente convention est régie exclusivement par le droit français. Tout litige non résolu par voie amiable sera soumis à la compétence de la juridiction française compétente.

Fait à Amiens, le 24 octobre 2017

Le stagiaire,


Le Représentant de l'organisme,
 (signature et tampon)
 C. BEAUMONT

La Directrice Adjointe
 des Services d'Appui à la Recherche
 N. POUVREAU

Annexe à la convention :

- Attestation de fin de stage à renseigner par l'organisme d'accueil

Le Président
 Mohammed BENLAHSEN

La Directrice de la DOIP

Virginie CLÉMENT-STRINATI



NOM DE L'ETUDIANT : Caroline VIOT

NOM ETABLISSEMENT : INRA - INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

CATEGORIE DE L'ETABLISSEMENT : EPST
SIRET : 180070039 00839 **APE :** 7279Z
ADRESSE PRINCIPALE : 2163, avenue de la Pomme de Pin CS 40001 Ardon
 45075 ORLEANS CEDEX
ADRESSE LIEU DE STAGE (si autre) : INRA URZF (même adresse)

Nom prénom du Président de Centre (directeur) : BEAUMONT Catherine qui représente l'INRA

Téléphone : 02.38.41.78.00
Mail : catherine.beaumont@inra.fr

Nom prénom du Directeur de l'Unité URZF : AUGER-ROZENBERG Marie-Anne

Téléphone : 02.38.41.78.56
Mail : marie-anne.auger-rozenberg@inra.fr

Nom-prénom du maître de stage : ROUSSELET Jérôme

Téléphone : 02.38.41.48.48
Mail : jerome.rousselet@inra.fr

Date du stage : du 15 janvier 2018 au 13/07/2018

Sujet du stage : « Rôle du commerce ornemental dans l'invasion fulgurante de la pyrale du buis: traçage génétique des populations colonisant la Région Centre Val de Loire »

Tâches : Pas de travail les samedis dimanches ni jours fériés... et aucun travail en horaires de nuit. Semaine du lundi au vendredi de 9h à 17h sur 35h00

Informations complémentaires : Restaurant d'entreprise sur place (payant), gratification de stage conformément à la législation.



REPUBLIQUE FRANCAISE

DECISION DE GRATIFICATION

LE PRESIDENT DE L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE,

- Vu la note de service n° 2016-12 du 12 Février 2016 relative aux stagiaires,
- Vu la convention de stage en date du conclue entre , l'INRA du Centre de recherche Val de Loire et Madame VIOT Caroline

DECIDE**Article 1**

Une gratification est accordée à Madame VIOT Caroline matricule 171158R selon les modalités définies par la note de service du 12 février 2016, pendant le stage qu'elle effectue à l'unité du Centre de recherche Val de Loire du 15/01/18 au 13/07/18 dans le cadre de la convention susvisée.

Article 2

Le montant mensuel de la gratification est calculé selon le temps de présence effective du stagiaire sur la base d'un taux horaire égal à 15% de la valeur du plafond horaire de Sécurité Sociale soit 3.75 € (valeur au 1er janvier 2018).

Imputations budgétaires

Date de début / Date de fin : 15/01/18 / 13/07/18

Destination/Entité de rattachement : A1EFPA EFPA

Nature budgétaire : DB00

Code contrat/partenaire : 32000733 K000000055


Origine du financement : RPC

Type source : 141

Projet :

Fait à Ardon
le 09/01/2018Pour le Président de l'Institut National de la
Recherche Agronomique,Destinataires :

- Dossier
- Agence comptable Secondaire VdeL
- Intéressé(e)
- M. le Directeur de l'unité URZF
- Contrat



Christine RÉTY
Responsable RH - Val de Loire

Conformément à la réglementation en vigueur vous avez la possibilité, si vous le désirez, dans le délai de deux mois, à compter de la date de notification de la présente décision, soit de vous pourvoir contre celle-ci devant la juridiction compétente, soit de former préalablement à toute action en justice un recours gracieux ou hiérarchique.
Dans ce cas vous disposeriez pour vous pourvoir devant la juridiction compétente, d'un délai de deux mois commençant à courir, en cas de lettre rejetant votre recours, à la date de réception de cette lettre, en cas de non réponse à votre recours pendant deux mois, à la date d'expiration du deuxième mois.

Resume

Depuis son premier signalement en 2008 à Weil-am-Rhein en Allemagne, la pyrale du buis *Cydalima perspectalis*, n'a pas cessé de se propager dans toute l'Europe et notamment en France qu'elle a presque totalement colonisé en 10 ans. Arrivant d'Asie et plus précisément de Chine grâce au commerce ornementale du buis, elle a su user de ses capacités de vol pour se disperser rapidement. Ceci couplé à une multiple introduction en France venant de Chine et des pays voisin, créant des populations dites « tête de pont », et un commerce du buis florissant leur servant de disperseur passif, l'invasion de *C. perspectalis* est devenu fulgurante.

Cette étude est consacrée à la compréhension des voies d'invasions de la pyrale du buis à travers la variabilité génétique. Des marqueurs microsatellites ont été utilisés pour cela. Les résultats obtenus ont permis d'observer une structuration génétique des populations en France par rapport aux primo-foyers cités dans la littérature reflétant l'invasion de *C. perspectalis* jusqu'en Région Centre. La présence de plusieurs *clusters* bien distincts reflète le phénomène d'introduction multiple. Mais aussi, la présence d'*admixture* entre les différents *clusters*, ont aussi montré une migration évidente qui lorsqu'elle n'était pas cohérente (effet « Patchwork ») a permis de déterminer le rôle important du commerce du buis dans ce processus d'invasion en servant de transporteur accidentel.

Mots-clés : *Cydalima perspectalis*, Pyrale, invasion, génétique, Microsatellite, commerce, buis.

Abstract

Since its first report in 2008 in Weil-am-Rhein in Germany, the box tree moth *Cydalima perspectalis*, has not stopped spreading throughout Europe and especially in France that it has almost completely colonized in 10 years. Coming from Asia and more precisely from China thanks to the ornamental boxwood trade, it was able to use its flying abilities to spread quickly. This coupled with a multiple introduction into France from China and neighbouring countries, creating so-called « bridgehead » populations, and a flourishing boxwood trade serving as a passive disperser, the invasion of *C. perspectalis* has become fast.

This study is devoted to understanding the invasion pathways of box tree moth through genetic variability. Microsatellite markers were used for this. The obtained results made it possible to observe a genetic structuring of the populations in France compared to the primo-foyers cited in the literature reflecting the invasion of *C. perspectalis* up to the Région Centre. The presence of several distinct clusters reflects the phenomenon of multiple introductions. But also the presence of admixture between the different clusters, also showed an obvious migration which when it was not coherent (Patchwork effect) made it possible to determine the important role of the boxwood trade in this invasion process by serving as accidental transporter.

Keywords: *Cydalima perspectalis*, Moth, invasion, genetics, Microsatellite, trade, boxwood.