

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

UR0633 ZOOLOGIE FORESTIÈRE – INRA VAL DE LOIRE

THÈSE présentée par :
Vincent LESIEUR

Date de soutenance prévue le : **23 juin 2014**

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

Discipline : Biologie Forestière

**Invasion de la punaise américaine *Leptoglossus occidentalis* en Europe.
une contribution à la compréhension des invasions fulgurantes**

THÈSE dirigée par :

M. Alain ROQUES

Directeur de Recherche, INRA d'Orléans

Co-encadrée par :

Mme Marie-Anne AUGER-ROZENBERG

Chargée de Recherche, INRA d'Orléans

RAPPORTEURS :

M. Andrea BATTISTI

Professeur, Université de Padoue, Italie

Mme Carole KERDELHUÉ

Directeur de Recherche, INRA-CBGP de Montpellier

JURY :

M. Andrea BATTISTI

Professeur, Université de Padoue, Italie

M. Thomas BOIVIN

Chargé de Recherche, INRA d'Avignon

Mme Manuela BRANCO

Professeur adjoint, Université de Lisbonne, Portugal

Mme Carole KERDELHUÉ

Directeur de Recherche, INRA-CBGP de Montpellier

M. François LIEUTIER

Professeur, Université d'Orléans

M. Alain ROQUES

Directeur de Recherche, INRA d'Orléans

Mme Marie-Anne AUGER-ROZENBERG

Chargée de Recherche, INRA d'Orléans

Remerciements

Ce projet de thèse a bénéficié d'un financement conjoint du Département EFPA (Écologie des Forêts, Prairies et milieux Aquatiques) de l'INRA, ainsi que du projet européen ISEFOR (Increasing Sustainability of European Forests: Modelling for Security Against Invasive Pests and Pathogens under Climate Change – collaborative project 245268). De même, je remercie le DSF (Département Santé des Forêts) qui a financé le projet Leptoglossus.

Merci à CAROLE KERDELHUÉ et ANDREA BATTISTI d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. *Merci* également à MANUELA BRANCO, THOMAS BOIVIN et FRANÇOIS LIEUTIER d'être examinateurs de ce travail. Je connais vos emplois du temps respectifs et je vous suis donc reconnaissant d'avoir consacré du temps à l'évaluation de mon manuscrit.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes encadrants ALAIN ROQUES et MARIE-ANNE AUGER-ROZENBERG. *Merci* ALAIN de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet passionnant. Je te remercie sincèrement pour la confiance que tu m'as accordée, mais aussi pour ta disponibilité (réponses à mes mails quelle que soit l'heure). Merci aussi pour ces petits moments du genre " Vincent y'a des collègues européens qui sont là aujourd'hui, tu viens présenter tes résultats dans 5 minutes ? " ou encore " Tu devais faire ta présentation mercredi, mais finalement tu la feras cet aprèm... ". Ces situations qui, pour toi étaient sans doute anodines mais qui m'ont procuré une bonne dose de stress, m'ont au final prouvé que j'en étais capable. Je dois t'avouer que ta capacité à faire un milliard de choses en un temps record me bluffe totalement ! J'ai peut-être une petite idée : as-tu découvert un nouvel espace-temps ? *Merci* MARIE-ANNE d'avoir été une encadrante bienveillante et compréhensive. Merci d'avoir géré tous ces petits tracass du quotidien du style " Je ne comprends pas j'ai que des codons stop ?! ". Je n'oublie pas non plus tes multiples encouragements ainsi que les discussions dans ton bureau et cette fameuse phrase " Vincent, tu veux toujours avoir l'histoire avec un grand H... "

Merci à JÉRÔME ROUSSELET pour tous tes conseils et discussions concernant mes résultats de génét ! Tes suggestions étaient à chaque fois pertinentes et tu as toujours pris du temps pour répondre à mes questions qui, elles, ne l'étaient pas toujours ! J'ai également apprécié les (nombreuses) histoires que tu as pu nous raconter, mais ma préférée reste " la mer de cotons-tiges... ". *Merci* à DANIEL SAUVARD de m'avoir initié aux joies des manèges de vol ! J'ai beaucoup appris de nos discussions devant ces pauvres petites bêtes obligées de voler, attachées à un morceau de cartonnette. Un grand merci également pour ton aide finale. *Merci* à ANNIE YART de m'avoir toujours soutenu dans les manips et de t'être occupée de mes petites Leptos chéries lorsque leur papa

les abandonnait. Tu étais là le jour où j'ai assisté à la naissance de mes premiers petits, je n'oublierai pas ce moment rempli d'émotion !! Je te confie l'élevage, mais je pars sans crainte car je sais qu'il est entre de bonnes mains ! *Merci* également à BRIGITTE FRÉROT je suis bien déçu de ne pas avoir mis la main sur cette fameuse phéromone d'agrégation ! *Merci* à MATTHIEU LAPARIE d'avoir répondu présent et de t'être pleinement investi lorsque je suis venu frapper à ta porte ! On va bien finir par aller la boire cette bière ! *Merci* à SYLVIE AUGUSTIN de m'avoir encouragé et de t'être toujours préoccupée de l'état d'avancement de mon travail. *Merci* à CARLOS LOPEZ-VAAMONDE pour tes encouragements et tes conseils. *Merci* à CHRISTELLE ROBINET tu as toujours répondu plus vite que ton ombre à mes questions parfois saugrenues ! Je n'oublierai pas que nous avons eu la chance tous les deux de survivre à quelque chose de potentiellement très dangereux ! C'est vrai ça ! On ne sait toujours pas ce qu'il y avait dans son sac... !!! *Merci* à BÉATRICE COURTIAL et à EMMANUELLE MAGNOUX d'avoir passé toutes les plaques au séquenceur et d'avoir toléré l'envoi de feuilles de route en Coréen. *Merci* à GÉRALDINE ROUX-MORABITO tu m'as donné la chance de participer au stage de Luc-sur-Mer, mais cette fois-ci du côté obscur de la force : "côté enseignant". Une aventure enrichissante qui m'a replongé quelques années auparavant...

Merci à AURELIEN SALLÉ d'avoir toujours gardé un œil bienveillant sur ton ancien stagiaire de M2. Merci pour ta disponibilité et tes conseils qui m'ont bien souvent sorti du pétrin ! Du puceron à la punaise... que de chemin parcouru !!! *Merci* à ÉRIC LOMBAERT et THOMAS GUILLEMAUD de m'avoir initié à l'ABC et merci surtout de ne pas avoir perdu patience ! Les moments passés au sein de BPI ont vraiment été très enrichissants. L'équipe m'a fait un super accueil et j'en profite pour remercier aussi SOPHIE, GÉRALD, THIBAUT, DIDIER et tous les autres qui y ont très largement contribué...

Merci à PATRICK " Papa " PINEAU pour ton aide aussi bien pour l'épluchage des cônes et le collage des " ptites graines " que pour toutes ces doses quotidiennes d'optimisme, ainsi que les phrases ô combien philosophiques dont toi seul à le secret... *Merci* à FRANCIS GOUSSARD tes compétences et ton expérience m'ont été d'une grande utilité lors des sorties terrains (surtout lorsqu'il fallait retrouver les hobos sous la grêle ou sous une pierre...) ! Je dois être franc avec toi, je n'ai malheureusement pas retenu le tiers du quart de ce que tu m'as raconté sur le Briançonnais... Je pense en revanche avoir retenu une chose importante "ce qui compte c'est de trouver les 3 cocottes dans le guide du Logis" ! *Merci* à JEAN-PAUL " Arthur " RAIMBAULT tu m'as enseigné l'art de l'analyse des graines : depuis l'épluchage des cônes en passant par le collage des graines, l'utilisation des RX et le développement des radios jusqu'à l'utilisation de la table lumineuse ! Tu as également souvent partagé avec moi ta poésie... *Merci* à JACQUES GARCIA tu as répondu présent à chaque fois que j'avais besoin ! Montage à l'échelle, posage de bonnettes, guidage sur le terrain !!! *Merci* à PHILLIPE

LORME sans toi l'épluchage des cônes n'aurait pas été le même ! *Merci* à ALEXIS BERNARD de m'avoir accompagné et aidé dans un petit périple briançonnais. *Merci* à RÉGIS PHÉLUT pour les coups de main informatiques. Merci pour l'installation (et la réinstallation) de GeneMapper. *Merci* à OLIVIER DENUX pour tous tes conseils et commentaires toujours pertinents. Désolé de t'avoir fait passer 3524 heures à prendre des photos de graines de conifères. Merci également de m'avoir transmis cette passion pour le langage des poules... Je n'oublierai pas non plus notre petite sortie au Salon de l'Agriculture (Grand Parc 2009, valeur sûre !). Un grand merci également pour ton soutien quotidien notamment lors de la rédaction ! *Merci* à CLAUDINE COURTIN pour ton aide apportée au labo, toujours prête à me donner un coup de main, à me donner des petits tuyaux bien utiles. Un grand merci également pour avoir partagé tous ces moments, toutes ces discussions lors des sessions "bio-mol" qui étaient ô combien enrichissantes et toujours sur des sujets sérieux... ou pas ! Merci d'avoir toujours été là pour m'écouter et d'avoir ri de mes bêtises ! *Merci* à MARIE MILLIER de m'avoir épargné de tous ces tracas administratifs. Tu as tout de suite su déceler en moi cette passion cachée (bien cachée, voire trop bien cachée ?) pour la "paperasse". Les documents ont parfois tardé à venir (visite médicale, frais de mission et j'en passe) mais au bout de 3 ans je crois que j'y arrive enfin !

Merci à mes collègues du 1^{er} étage ! *Merci* à CHARLES-ÉDOUARD IMBERT pour toutes ces "tranches de vie" : la remontée de la Corse ("ouais t'as raison on se met à ce café-là, comme ça on verra le bateau arriver..."), ce joli mail m'accusant de "rétention de données", la découverte de la pizzeria de Guillestre et de son patron quelque peu blagueur, le partage de publis des plus passionnantes, etc... Je n'oublie pas non plus tous les conseils que tu m'as donnés autour d'un café pour réaliser au mieux mes manips. *Merci* à JULIEN HARAN pour ces discussions "bio molleuses". Grâce à toi, je sais aussi maintenant que si je me retrouve seul au beau milieu de nulle part, je peux manger des feuilles d'orties sans me piquer !!! *Merci* à CAMILLE PÉRON toujours partante pour une discussion métaphysique ! *Merci* à MARINA CIMINERA de m'avoir fait (re)découvrir le Cacolac (sérieux, ça se vend encore ce machin-là ?). Merci pour l'aide que tu as pu m'apporter et grâce à toi, je ne vois plus les facteurs de la même manière. *Merci* à RODOLPHE ROUGERIE d'avoir partagé ton expérience et cette magnifique chanson du cuisinier suédois (j'ai déjà des armes pour me venger... attention au Hakuna matata !). *Merci* à MAGALLY TORRES-LEGUIZAMON tu n'as jamais rechigné à répondre à mes questions notamment sur les microsats ! *Merci* à FANNY MEYNIER et THOMAS BOURGEOIS, mes petits stagiaires. Au-delà de l'aide apportée, vous m'avez donné l'opportunité de changer de statut, de passer d'encadré à encadrant. J'espère ne pas vous avoir déçu et transmis ne serait-ce qu'un petit peu la joie de travailler avec ces bestioles !

*M*erci à FRANCK ROGEON aka "Professor Rogeon" ou encore "Franckiki" de m'avoir déniché des publis parfois en Hongrois, parfois en Coréen ou encore en Croate ! Merci pour tous ces petits coups de main du quotidien (gonflage des roues de vélo, reliage des manuscrits, etc...) et d'avoir toujours des histoires plus "loufs" les unes que les autres ! En revanche, je ne comprends toujours pas pourquoi tu ronchannes quand on te taquine sur ton appartenance aux SDARs. Si on regarde la signification de l'acronyme SDAR (Service d'Appui à la Recherche), elle te sied pourtant à merveille !

*M*erci à CHRISTIAN BLAZY ainsi qu'au GIE "Semences forestières améliorées" pour les collectes de cônes dans les vergers à graines. *M*erci à l'Unité d'Amélioration Génétique et Physiologique Forestière (INRA Orléans) de m'avoir gentiment prêté leurs arbres. *M*erci à JOËL GIRAUD et la mairie de L'Argentière-la-Bessée de mettre à la disposition de l'Unité un logement pour effectuer nos recherches dans la région Briançonnaise.

*M*erci à toutes les personnes qui ont collecté des punaises pour moi que ce soit à l'autre bout de la planète ou dans leur bureau à l'INRA !!! Grâce à vous j'ai eu du boulot !!! Un *M*erci tout particulier à WARD STRONG, sans toi le road trip américain n'aurait vraiment pas été le même ! Merci de nous avoir accueillis comme tu l'as fait, merci de t'être investi dans l'échantillonnage "Leptoglossien" de cette manière ! Merci également pour le tour en canoé sur le lac de Vernon, pour la magnifique rando jusqu'aux Twinn Lakes... Je n'oublie pas non plus NANCY GILLETTE qui nous a chaleureusement accueillis en Californie. *M*erci également à DMITRY MUSOLIN qui a toujours répondu à mes mails plus vite que l'éclair.

*M*erci à mes proches. Tout d'abord SOIZIC, HÉLOÏSE (LA HELO), NICOCO, BRIEUC et SIMON. Merci de ne pas avoir perdu patience lorsque je n'étais pas disponible, mais bon d'un autre côté, vous vous êtes bien vengés en vous moquant de mes pauvres petites Leptos accrochées à leur manège de vol. *M*erci également à JEAN-LUC, CATHY, CORALIE, PF (dédicace au rhum vieux...) et au p'tit PAULO pour avoir été compréhensifs surtout dans les derniers moments, il faut dire que vous commencez maintenant à être habitués ! Un merci spécial pour CORALIE, tu m'as toujours donné des tuyaux efficaces et tu n'as jamais rechigné à répondre à mes questions ou encore à me donner ton avis sur tel ou tel paragraphe. Et puis, l'aventure a un peu commencé grâce toi avec ce fameux stage de L3. *M*erci à SEB, DELPH, TÉ et TITOU, pour votre soutien malgré la distance. Promis, je vais venir vous voir ! Merci aussi SEB pour les photos. *M*erci à mes parents de m'avoir toujours soutenu et encouragé, et merci de vous être pleinement intéressés à toutes les thématiques développées au cours de ma thèse. Je suis sûr que maintenant pour vous les Leptos n'ont plus de secret ! J'espère que vous serez fiers de moi... *M*erci à Lucie. Je ne sais pas par quoi commencer tant il y a de choses à dire.

Cette thèse nous a permis de partager une superbe aventure : La Conquête de l'Ouest américain avec des moments épiques comme l'échantillonnage de punaises à l'aide d'un chariot de supermarché ! Ta patience et ton soutien indéfectible m'ont permis d'aller jusqu'au bout. Tu avais toujours les mots justes lorsque je te disais " Franchement ce que j'écris c'est de la ... ". Les remerciements que j'ai à t'adresser vont bien au-delà de cette thèse.

Je ne peux conclure ces remerciements sans avoir une pensée, émue, pour toutes ces punaises qui ont fait don de leur corps à cette thèse (bien souvent à leur insu, je dois le reconnaître). De là où vous êtes, je ne sais pas si vous êtes fières de moi mais sachez que sans ces sacrifices, l'aventure n'aurait pas été la même... ! De plus, je ne peux que saluer leur goût pour le voyage qui m'a permis de travailler sur un sujet des plus intéressants.

Sommaire

LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX ET ENCADRÉS.....	19
AVANT-PROPOS	21
INTRODUCTION	23
LES INVASIONS BIOLOGIQUES	
Contexte, définitions et enjeux	25
I. Invasions biologiques : changements récents et définitions	27
I.1 Histoire d'un phénomène en plein essor	27
I.1.a. Un phénomène naturel	27
I.1.b. Dispersion à longue distance sous influence humaine : un long passé	27
I.1.c. Amplification du processus : quand mondialisation rime avec invasion	28
I.2. Un phénomène qui fait débat : définitions et controverses	30
I.2.a. Divergences d'opinion, mauvaises interprétations et difficultés à trouver un consensus	30
I.2.b. Vers une définition neutre ?	31
I.3. Les insectes : une grande partie du problème	32
I.4. Invasion biologique : un processus séquentiel	34
I.4.a. L'introduction, le début d'une longue histoire	35
I.4.b. L'établissement : survivre et se reproduire	36
I.4.c. La prolifération : l'invasion stricto sensu	37
I.4.d. Beaucoup d'appelés mais peu d'élus	37
I.5. Prévention, éradication, contrôle : une lutte au quotidien	38
I.6. Impacts des espèces invasives	39
I.6.a. Rêve ou réalité ?	39
I.6.b. Impacts économiques : la source de tous les maux ?	41
I.6.c. Impacts écologiques et difficultés d'associer Economie et Ecologie	42

I.6.d. Impacts sanitaires : la santé mise à mal	43
I.7. Succès invasif : un succès multifactoriel	45
I.7.a. Des facteurs anthropiques, encore et toujours	45
I.7.b. Facteurs écologiques : préadaptation et plasticité, des caractéristiques essentielles	47
I.7.c. Quand la démographie s'en mêle	49
I.7.d. Facteurs génétiques : des combinaisons gagnantes	50
I.7.e. Un scénario " tête de pont " : vers une généralisation ?	52
I.8. Succès invasif : un succès à deux vitesses	53
II. Objectifs de la thèse	56
PRÉSENTATION DU MODÈLE BIOLOGIQUE <i>Leptoglossus occidentalis</i>	59
I. Distribution géographique	62
I.1. Amérique du Nord : zone d'origine et invasion primaire	62
I.2. Europe, Asie, Afrique du Nord vers une invasion globale ?	63
II. Biologie et écologie	65
II.1. Cycle biologique	65
II.2. Des habitudes alimentaires variées	66
II.3. ... Aux conséquences néfastes	68
II.4. Moyens de lutte et cortège parasitaire	70
 PARTIE I	
TRAÇAGE GÉNÉTIQUE DE L'ORIGINE DES POPULATIONS ENVAHISSANTES EN EUROPE.....	73
I. Introduction	75
II. Matériels et Méthodes	76
II.1. Échantillonnage	76
II.2. Choix des marqueurs	76
Article I	79
<i>Isolation and characterization of 11 polymorphic microsatellite markers in the highly invasive Western occidentalis (Heteroptera, Coreidae)</i>	
II.3. Méthodes d'analyse	82
III. Résultats	84

Article II	87
<i>Does fast invasion involve a complex story? The case study of European <i>Leptoglossus occidentalis</i> invasion</i>	
IV. Résultats complémentaires	121
 PARTIE II	
CARACTÉRISTIQUES BIOLOGIQUES DES POPULATIONS ENVAHISSANTES EN EUROPE.....	125
 CHAPITRE I	
Caractérisation des dégâts et Évaluation de l'impact en Europe	127
I. Introduction	129
II. Matériels et Méthodes	130
III. Résultat	130
Article III	133
<i>The invasive <i>Leptoglossus</i> seed bug, a threat for commercial seed crops, but for conifer diversity?</i>	
 CHAPITRE II	
Compétition pour les ressources cônes/graines entre le natif <i>Pissodes validirostris</i> et l'invasif <i>Leptoglossus occidentalis</i>	151
I. Introduction	153
II. Matériels et Méthodes	156
II.1. Insectes utilisés	156
II.2. Evaluation des relations <i>L. occidentalis</i> – <i>P. validirostris</i> en conditions semicontrôlées	156
II.3. Evaluation des relations <i>L. occidentalis</i> – <i>P. validirostris</i> en peuplements naturels	156
II.4. Analyses statistiques	158
III. Résultat	159
III.1. Evaluation des relations <i>L. occidentalis</i> – <i>P. validirostris</i> en conditions semicontrôlées	159
III.2. Evaluation des relations <i>L. occidentalis</i> – <i>P. validirostris</i> en peuplements naturels	160
IV. Discussion	164
 CHAPITRE III	
Analyse des capacités de vol de <i>Leptoglossus occidentalis</i>	171
I. Introduction	173
II. Matériels et Méthodes	175

II.1. Manège de vol et technique de fixation des insectes	175
II.2. Evaluation des capacités de vol tout au long de la vie (insectes d'élevage)	176
II.3. Evaluation des capacités de vol en fonction de la saison (insectes capturés)	176
II.4. Analyses statistiques	177
III. Résultat	177
III.1. Evaluation des capacités de vol tout au long de la vie (insectes d'élevage)	177
III.1.a. Âge d'accouplement et longévité	177
III.1.b. Distance totale parcourue cumulée (DC)	177
III.1.c. Structure du vol	178
III.1.d. Evolution de la distance totale parcourue par test (DP)	179
III.2. Evaluation des capacités de vol en fonction de la saison (insectes capturés)	180
IV. Discussion	181

CHAPITRE IV

Analyses préliminaires d'un facteur pouvant être impliqué dans les fluctuations de populations.....	187
I. Introduction	189
II. Matériels et Méthodes	190
II.1. Supercooling Point (SCP)	190
II.2. Survie hivernale	191
II.3. Analyses statistiques	192
III. Résultats	192
III.1. Supercooling Point (SCP)	192
II.2. Survie hivernale	193
IV. Discussion	197

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

203

I. Tête de pont, introductions multiples et dispersion : autant de facteurs clés pour permettre une invasion fulgurante.....	206
I.1. <i>Bridgehead</i> : vers une nouvelle conception des invasions ?	206
I.2. Et si une recombinaison génétique était le véritable scénario gagnant ?	207
I.3. Une forte capacité de dispersion est-elle nécessairementun facteur aggravant ?.....	209

II. Si l'on creuse un tant soit peu... Combien d'espèces exotiques d'insectes avec un impact économique ET écologique ?.....	210
II.1. Impacts économiques	210
II.2. Impacts écologiques	211
II.2.a. Sur la flore native	211
II.2.b. Sur la faune native	213
III. Conclusion.....	215
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 217

Liste des Figures

FIGURE 1	28
Évolution temporelle du nombre d'espèces d'arthropodes terrestres introduites par an en Europe	
FIGURE 2	29
Evolution annuelle du nombre d'études publiées sur les espèces exotiques ou invasives de 1980 à 2010	
FIGURE 3	35
Représentation schématique des différentes étapes d'une invasion biologique, des barrières à franchir et des stratégies de gestion associées à chaque étape	
FIGURE 4	43
Représentation schématique des effets (directs ou indirects) en cascade des insectes herbivores exotiques sur les processus et les interactions des écosystèmes forestiers du nord-est américain	
FIGURE 5	61
Punaise prédatrice des graines de conifères, <i>Leptoglossus occidentalis</i>	
FIGURE 6	62
Distribution Nord-américaine de <i>Leptoglossus occidentalis</i> : zone d'origine et zone d'invasion	
FIGURE 7	64
Distribution européenne de <i>Leptoglossus occidentalis</i>	
FIGURE 8	65
Cycle biologique de <i>Leptoglossus occidentalis</i>	
FIGURE 9	85
Scénario le plus probable de l'invasion de <i>Leptoglossus occidentalis</i> depuis l'Amérique du Nord vers l'Europe	
FIGURE 10	123
Arbre phylogénétique de quatre espèces du genre <i>Leptoglossus</i>	
FIGURE 11	131
Schéma bilan des principaux résultats de l'Article III	
FIGURE 12	160
Comparaison de l'impact des différents traitements sur le pourcentage moyen de graines pleines par cône	

FIGURE 13	161
Comparaison des pourcentages d'arbres infestés par <i>Pissodes validirostris</i> ou par <i>Leptoglossus occidentalis</i> dans deux peuplements alpins de <i>Pinus sylvestris</i> et <i>Pinus nigra</i>	
FIGURE 14	162
Comparaison des pourcentages de cônes présentant des dégâts de <i>Leptoglossus occidentalis</i> dans deux peuplements alpins de <i>Pinus sylvestris</i> et <i>Pinus nigra</i>	
FIGURE 15	163
Comparaison des pourcentages de cônes présentant des dégâts de <i>Pissodes validirostris</i> et/ou <i>Leptoglossus occidentalis</i> dans deux peuplements alpins de <i>Pinus sylvestris</i>	
FIGURE 16	163
Comparaison des pourcentages moyens de graines pleines par cône, sain ou attaqué par <i>Pissodes validirostris</i> et/ou <i>Leptoglossus occidentalis</i> dans deux peuplements alpins de <i>Pinus sylvestris</i>	
FIGURE 17	178
Distance totale parcourue cumulée (DC) sur l'ensemble des tests par des individus de <i>Leptoglossus occidentalis</i> testés en manèges de vol	
FIGURE 18	179
Distribution de la distance parcourue par vol chez les individus d'élevage de <i>Leptoglossus occidentalis</i> testés en manèges de vol	
FIGURE 19	179
Evolution de la distance totale parcourue (DP) par test en fonction de l'âge des individus de <i>Leptoglossus occidentalis</i> testés en manèges de vol	
FIGURE 20	181
Evolution de la distance totale parcourue (DP) par des individus de <i>Leptoglossus occidentalis</i> en fonction de la saison	
FIGURE 21	181
Evolution du poids des individus de <i>Leptoglossus occidentalis</i> en fonction de la saison	
FIGURE 22	194
Evolution temporelle de la survie automnale des larves de <i>Leptoglossus occidentalis</i> placées dans des conditions extérieures en relation avec les conditions climatiques	
FIGURE 23	195
Mortalité hivernale des adultes de <i>Leptoglossus occidentalis</i> placés dans des conditions d'hivernation différentes	

FIGURE 24	196
Evolution temporelle de la mortalité hivernale des adultes de <i>Leptoglossus occidentalis</i> placés dans des conditions d'hivernation différentes en relation avec les conditions climatiques	

Liste des Tableaux et Encadrés

TABLEAU 1	33
Guide du débat au sein de la communauté scientifique concernant les invasions biologiques : critiques et réfutations associées	
Tableau 2	55
Liste et principales caractéristiques des invasions fulgurantes d'insectes phytophages se développant sur ligneux introduits en Europe entre 1995 et 2010	
Tableau 3	157
Développement du charançon, <i>Pissodes validirostris</i> , en présence ou non d'un compétiteur, <i>Leptoglossus occidentalis</i> , selon différentes périodes d'accès au cône pour les deux espèces.	
Tableau 4	194
Comparaison du poids, des SCP moyens, minimaux et maximaux et corrélation entre SCP et poids pour différents stades physiologiques de <i>Leptoglossus occidentalis</i> .	
 ENCADRÉ 1	 67
Les différentes phases de développement des cônes chez les conifères	
ENCADRÉ 2	83
<i>Approximate Bayesian Computation</i> (ABC) et inférence des routes d'invasion : principe général et différentes étapes	

Avant-propos

Les dernières décennies représentent un tournant majeur concernant les mouvements d'espèces et plus particulièrement les introductions d'organismes au-delà de leurs zones d'origine. Le niveau actuel des introductions et des invasions biologiques en résultant n'a jamais été observé auparavant, tant en rythme qu'en ampleur. Les insectes correspondent au groupe le plus riche présent sur Terre avec plus d'un million d'espèces décrites. Il n'est donc pas étonnant que ces derniers occupent une place prépondérante au sein de ce phénomène aussi bien en nombre d'espèces impliquées que sur les impacts socio-économiques que peuvent engendrer de telles introductions. De plus, contrairement aux autres groupes, la balance penche désormais très nettement du côté des introductions non-intentionnelles.

Cette thèse s'insère pleinement dans ce contexte. Par conséquent, après quelques généralités, j'ai pris le parti et tenté tout au long de ce manuscrit d'illustrer au mieux cet aspect "entomologique" du phénomène, au risque de rester un peu trop centré sur un seul groupe. Cependant, je pense que ceci n'est pas un problème en soi car la diversité des cas observés, les différents modes de reproduction rencontrés et les stratégies démographiques retrouvées chez les insectes font de ces derniers des modèles de choix. De plus, la littérature impressionnante concernant des espèces d'insectes invasifs ainsi que la multidisciplinarité des études impliquées (aussi bien fondamentales qu'appliquées) apportent une vision assez générale des questions traitées au sein de la biologie de l'invasion dans son ensemble. Néanmoins, par souci de rigueur (et par curiosité), je ne me suis pas interdit d'aller piocher et regarder ce qu'il se passait chez d'autres groupes.

" La science des insectes n'est donc point aussi futile et aussi dénuée d'intérêt que le pensent des esprits superficiels. Humble et modeste, elle ne jouit pas, il est vrai, d'une brillante renommée; on a vu cependant qu'elle pouvait être utile à l'une de ses sœurs, la science de l'Archaeologie, qui jusqu'à ce jour avait fait peu de cas de ses services. "

P.A. Latreille, 1819

Introduction

LES INVASIONS BIOLOGIQUES

Contexte, définitions et enjeux

I. INVASIONS BIOLOGIQUES : CHANGEMENTS RÉCENTS ET DÉFINITIONS

I.1. Histoire d'un phénomène en plein essor

I.1.a. Un phénomène naturel

La dispersion des organismes représente l'une des conditions les plus importantes ayant permis le développement de la vie sur Terre mais aussi de générer la grande diversité spécifique rencontrée de nos jours (Brown & Sax 2004; Bowler & Benton 2005). La dispersion peut prendre différentes formes, elle peut en effet être active, faisant intervenir les capacités propres de chaque organisme (la marche ou le vol par exemple). Elle peut également être passive utilisant par exemple les courants marins (dispersion du plancton emporté aux grés des courants (McManus & Woodson 2012)) ou aériens (la dissémination des graines chez de nombreuses plantes (Nathan et al. 2011)) ou encore un vecteur comme moyen de locomotion (l'utilisation d'une autre espèce, notamment le transport de propagules marines ou terrestres *via* les oiseaux ou les mammifères (Green & Sanchez 2006; Magnússon et al. 2009)). Ces différents modes de dispersion naturelle (qu'ils soient combinés ou non) peuvent entraîner dans certains cas une dispersion sur de longues distances et donc une colonisation de nouveaux milieux; les îles océaniques, représentant des milieux isolés, en sont le parfait exemple (Fridriksson & Magnússon 1992; Magnússon et al. 2009). Cependant, les barrières biogéographiques telles que les océans, les montagnes ou encore les zones climatiques subdivisent l'espace terrestre. Ces " frontières " limitent alors les flux de gènes entre populations créant ainsi les conditions nécessaires à la spéciation. Les processus géologiques et/ou les changements climatiques peuvent être à l'origine des modifications naturelles des aires de répartition des espèces (Brown & Sax 2004), mais ces changements sont toutefois progressifs.

I.1.b. Dispersion à longue distance sous influence humaine : un long passé

L'Homme a réussi à surmonter ces différentes barrières conquérant ainsi la quasi-totalité du globe (Mellars 2006; Goebel et al. 2008). Ce processus a eu des conséquences importantes tant sur la modification des milieux que sur la répartition des espèces. En effet, il a su, au cours de l'Histoire, cultiver de nombreuses plantes et domestiquer bon nombre d'espèces animales. L'Homme ne voyage jamais seul et les mouvements de populations humaines sont bien souvent accompagnés des différentes espèces utilisées (ainsi que des parasites et pathogènes associés). En créant une certaine " perméabilité " des barrières biogéographiques et en assurant une connectivité des différents milieux, l'Homme a donc permis à de nombreuses espèces de ne plus être restreintes à leur aire

d'origine et leur a assuré une propagation dans de nouveaux habitats jusqu'alors inaccessibles. Le transport d'espèces au-delà de leur aire naturelle *via* les activités humaines n'est pas un phénomène récent comme l'illustre l'introduction des rats dans les îles méditerranéennes (di Castri 1989) ou encore celle du charançon du blé *Sitophilus granarius*, transporté au début de notre ère depuis l'Égypte vers différents pays bordant la Méditerranée (Levinson & Levinson 1994). Toutefois, des changements radicaux d'une toute autre ampleur, qualitative comme quantitative, sont intervenus au cours des dernières décennies.

I.1.c. Amplification du processus : quand mondialisation rime avec invasion

Le monde est entré dans une nouvelle phase avec une nette augmentation du rythme et de l'ampleur des introductions d'espèces hors de leur aire de répartition naturelle (Meyerson & Mooney 2007; Westphal et al. 2008; Hulme 2009; Roques 2010b). Par exemple, le nombre d'espèces introduites par an d'arthropodes terrestres a augmenté de façon exponentielle depuis le XVI^e siècle. Cependant, une accélération significative a été observée depuis la seconde moitié du XX^{ème} siècle, avec une moyenne de 22,0 espèces exotiques nouvellement signalées par an en Europe sur une période située entre 2000 et 2008 contre 10,9 sur la période 1950-1974, soit globalement un taux d'arrivée multiplié par deux en l'espace d'une trentaine d'année (Roques 2010b; FIGURE 1).

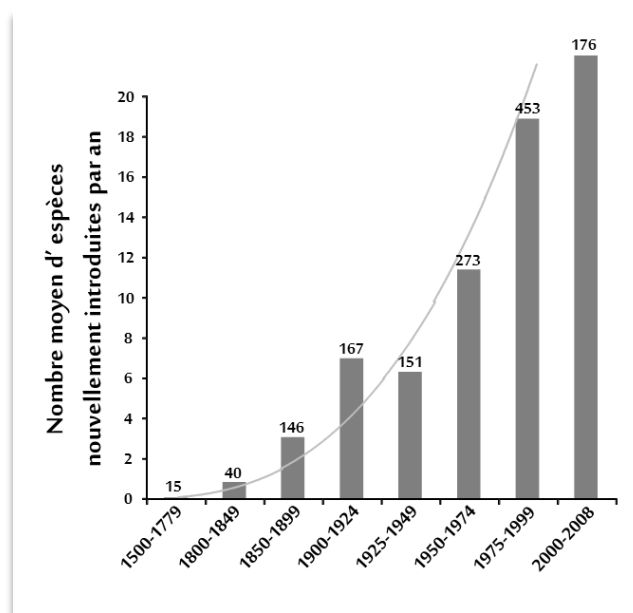


FIGURE 1. Évolution temporelle du nombre d'espèces d'arthropodes terrestres introduites par an en Europe (de 1500 à 2008).

La ligne indique une augmentation exponentielle ($r^2 = 0.965$). Figure modifiée d'après Roques 2010b.

Les changements socio-économiques opérés depuis l'avènement de l'ère de la Mondialisation (i.e. transport, commerce, technologies) ont facilité et intensifié la propagation d'espèces dans des milieux auxquels elles n'avaient jusqu'alors pas accès. En effet, il a été montré que l'augmentation constante du nombre d'espèces introduites était directement reliée à l'augmentation des échanges commerciaux (notamment le commerce des plantes) et des trafics internationaux de ces dernières décennies (Westphal et al. 2008; Floerl et al. 2009; Hulme 2009; Essl et al. 2011b). Ces changements quantitatifs s'accompagnent également de changements qualitatifs, le nombre d'introductions non-intentionnelles a lui aussi fait un bond en avant ces dernières années (relargage des eaux utilisées comme ballasts dans les navires, transport et plantation de plants infestés, etc.)

Face à cette augmentation sans précédent mais aussi et surtout pour répondre à certains effets néfastes de telles introductions, un réel effort a été mené pour augmenter les connaissances sur ces phénomènes qualifiés d'invasions biologiques. De plus, la prise de conscience du monde scientifique de l'intérêt que représentent de telles introductions tant sur le plan fondamental qu'appliqué dans des domaines comme l'Ecologie, l'Evolution ou la Biogéographie (Sax et al. 2005) a donné naissance à une nouvelle discipline la Biologie de l'invasion ou Ecologie de l'invasion. Cette prise de conscience a conduit à un essor important des études portant sur les invasions biologiques au cours des deux dernières décennies. En effet, comme illustré en FIGURE 2, les publications et livres universitaires sur le sujet ont connu une croissance explosive (Kühn et al. 2011; Richardson & Ricciardi 2013). Des revues entièrement consacrées au phénomène telles que *Biological Invasions* (Falk-Petersen et al. 2006) ou encore plus récemment *Neobiota* (Kühn et al. 2011) ont été créées pour répondre à cette explosion, participant ainsi à la "popularisation" du phénomène.

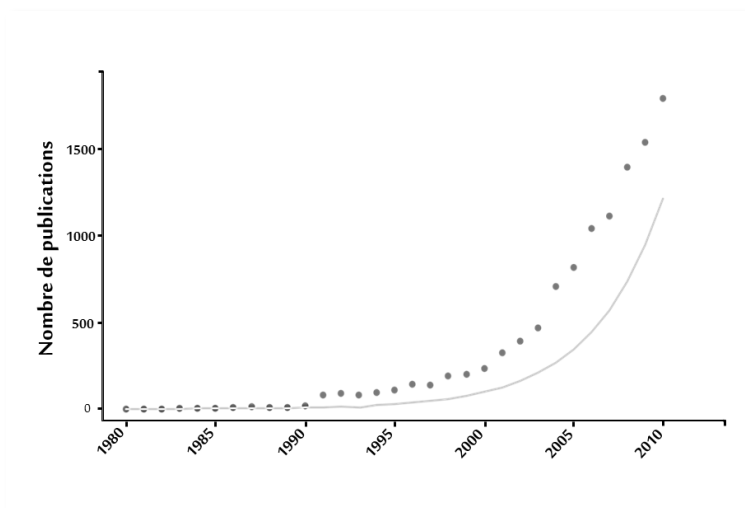


FIGURE 2. Evolution annuelle du nombre d'études publiées sur les espèces exotiques ou invasives de 1980 à 2010.

Les résultats ont été obtenus selon une recherche effectuée *via* la base de données Web of Science le 1er juillet 2011. La chaîne de recherche suivante a été utilisée : " alien plant " ou " alien animal " ou " alien species " ou " biological invasions " ou " plant invasions " ou " animal invasions " ou " invasive species ". La ligne indique une augmentation exponentielle ($r^2 = 0.96$, $p < 0,001$). Figure modifiée d'après Khün et al. 2011

Ces nombreux travaux ont permis de définir le phénomène d'invasion biologique et d'augmenter les connaissances sur de nombreux concepts associés tels que la colonisation d'un milieu, les variations démographiques ou encore les interactions interspécifiques.

I.2. Un phénomène qui fait débat : définitions et controverses

I.2.a. Divergences d'opinion, mauvaises interprétations et difficultés à trouver un consensus

Afin d'éviter toute confusion, il apparaît important de définir certains termes utilisés dans ce manuscrit. Comme vu précédemment, l'écologie de l'invasion regorge d'une littérature conséquente et l'apparition de cette " nouvelle science " a conduit à l'emploi d'une multiplicité de termes et expressions aux définitions plus ou moins précises ainsi qu'à l'utilisation de nombreux synonymes. Falk-Peterson et collaborateurs (2006) ont listé 145 concepts et définitions relatifs à la biologie de l'invasion et des organismes non-indigènes utilisés dans la littérature. Il peut donc paraître bien difficile de définir ce qu'est une invasion biologique tant la littérature abonde de définitions et de controverses. En effet, malgré l'impressionnante littérature générée dans ce domaine, la science de l'invasion fait l'objet de controverses au sein de la communauté scientifique occasionnant de nombreux débats (e.g. Brown & Sax (2004) et la réponse de Cassey et collaborateurs (2005) ou encore les échanges entre Keller & Springborn (2011) et Essl et collaborateurs (2011a); Gurevitch & Padilla (2004); Richardson & Ricciardi (2013)). Humair et collaborateurs (2014) ont identifié trois principaux facteurs à l'origine des controverses: (1) une opinion divergente sur les concepts de base, (2) un manque de données empiriques et des incertitudes scientifiques élevées en raison de la complexité des processus d'invasion, et (3) une estimation incertaine concernant l'évaluation des effets des espèces invasives tant sur les écosystèmes que sur leurs services associés. Ce dernier point est en effet très discuté parmi les experts (Richardson & Ricciardi 2013; cf. TABLEAU 1 et section I.6.a. Rêve ou réalité ?). L'impact écologique n'est pas contestable, il s'agit d'un fait (e.g. occupation spatiale du nouvel arrivant, consommation des ressources, etc.). En revanche, l'intensité des impacts est, elle, au cœur du débat.

Ainsi au vu de l'ampleur du phénomène et des impacts socio-économiques pouvant en résulter, les invasions biologiques correspondent à un réel problème sociétal. Les mesures prises par un pays pour lutter contre le phénomène peuvent être contrebalancées par les actions (ou l'inaction) des pays frontaliers. On ne peut donc négliger l'aspect politique tout comme l'éventuelle récupération par certains de différents termes et concepts utilisés et générés par la science de l'invasion (e.g. invasif, natif, indigène, ou encore impact des espèces exotiques, etc.). Cette dernière est, dans ce sens, parfois qualifiée par divers auteurs de xénophobe et raciste, arguant qu'elle prône l'éradication d'une espèce simplement parce que celle-ci provient d'un autre endroit (Brown & Sax 2004; Warren 2007). De nombreux biologistes/écologistes de l'invasion balaient cette critique en décrivant leur motivation centrée sur la prévention des dommages écologiques et économiques (pouvant être considérables dans certains cas) constituant, de ce fait, une base éthique convaincante pour la gestion des espèces introduites (Simberloff 2003; Richardson & Ricciardi 2013).

1.2.b. Vers une définition " neutre " ?

L'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) décrit les espèces envahissantes comme " des animaux, des plantes ou d'autres organismes introduits par l'Homme hors de leur aire de répartition naturelle, où ils s'établissent et se dispersent, générant un impact négatif sur l'écosystème local et les espèces " (http://www.issg.org/is_what_are_they.htm, consulté le 15.01.2014). Cette définition, assez restrictive, ne dissocie donc pas le caractère invasif d'une espèce et les nuisances que peut engendrer cette dernière. Certains auteurs proposent cependant que le terme " invasif " soit utilisé sans aucune inférence à l'impact potentiel sur l'environnement et/ou l'économie (Richardson et al. 2000; Falk-Petersen et al. 2006; Richardson et al. 2011; Simberloff et al. 2013). Les impacts occasionnés par les espèces invasives (cf. section I.6. Impacts des espèces invasives) sont parfois difficiles à quantifier notamment pour les impacts écologiques qui demandent de longues études et peuvent être perçus que plusieurs années après l'invasion (phénomènes de *Time lag* et *Invasion debt* (Essl et al. 2011b) abordés par la suite (cf. section I.6. Impacts des espèces invasives). La définition amorcée par Elton dès 1958 et reprise par Richardson et collaborateurs (2011) reste assez neutre concernant d'éventuels impacts et se fonde sur l'expansion à la fois démographique et spatiale. De plus, elle comprend une notion intéressante : ce processus se compose de plusieurs étapes successives. A ce titre, j'ai décidé de reprendre les définitions proposées par Richardson et collaborateurs (2011). Par conséquent, les différents termes utilisés dans ce manuscrit seront définis comme suit :

Espèce native (ou indigène) : Espèce ayant évolué dans une zone donnée ou arrivée au sein de cette zone par ses propres moyens (*via* une expansion naturelle) sans aucune intervention humaine (intentionnelle ou accidentelle).

Espèce introduite (ou exotique) : Espèce dont la présence dans une région est attribuable à une action humaine lui ayant permis de franchir les barrières géographiques bornant son aire naturelle.

Espèce invasive (ou envahissante) : Espèce exotique qui maintient des populations durablement (sur plusieurs cycles de vie) et dont les descendants, souvent produits en très grand nombre sont capables de se propager sur de longues distances pouvant être situées loin du site d'introduction.

I.3. Les insectes : une grande partie du problème

Afin d'avoir une meilleure vision des invasions biologiques et pour rester cohérent avec les avant-propos de cette thèse, il convient de se pencher sur la nature des invasifs. Ainsi, dans un but d'amélioration des connaissances des espèces exotiques en Europe, une étape importante a été réalisée par le projet DAISIE (2009). Les principaux objectifs de ce projet, unique à l'échelle d'un continent, étaient de développer un inventaire paneuropéen des espèces exotiques ou envahissantes, de décrire les patterns et les tendances des invasions biologiques en Europe. En novembre 2008, 10 771 espèces exotiques ont ainsi été enregistrées. Les plantes étaient les plus représentées avec 55% des taxons et les arthropodes terrestres correspondaient au deuxième groupe d'organismes introduits à hauteur de 23% (Hulme & Roy 2010). Des analyses ultérieures, intégrant une mise à jour et ne considérant seulement que les espèces dont l'origine était hors européenne, ont permis d'identifier 1590 espèces d'arthropodes terrestres, parmi lesquelles les insectes dominaient largement (87%) (Roques 2010b). Ces résultats, bien que concernant l'Europe, semblent pouvoir se généraliser comme le confirment les estimations réalisées aux Etats-Unis (Pimentel et al. 2005). De plus, l'inventaire des espèces invasives en Chine a montré que les insectes représentaient près de 20% des espèces considérées (Xu et al. 2012). Cependant, seules les espèces ayant un impact vérifié sur la biodiversité ou les activités économiques ont été considérées dans cette dernière étude, les chiffres pourraient donc être plus élevés.

TABLEAU 1. Guide du débat au sein de la communauté scientifique concernant les invasions biologiques : critiques et réfutations associées

Critiques	Réfutations (d'après Richardson & Ricciardi 2013)
Les invasions modernes n'ont rien de nouveau. L'ampleur et l'impact des invasions sont similaires à celles des enregistrements fossiles (relativement faibles) et ne méritent pas une préoccupation majeure et des actions concertées.	Le niveau, l'impact et l'évolution actuelle des invasions sont uniques. Sous l'influence humaine, les organismes se répandent plus vite, plus loin et en plus grand nombre et comme jamais auparavant. L'Homme a créé des voies de dispersion fondamentalement différentes des voies naturelles. Les modèles de dispersion (fondés sur la dispersion naturelle) n'expliquent pas les phénomènes de colonisation à longue distance confirmant ainsi le rôle de l'Homme.
Les impacts des espèces non indigènes sur la biodiversité et les écosystèmes sont exagérés.	Les jeux de données dans leur globalité indiquent clairement que les invasions sont une cause majeure d'extinction au niveau populationnel et spécifique. Des décennies de recherches expérimentales ont démontré la capacité des invasions à altérer les écosystèmes. L'impact des invasions est souvent masqué par une longue phase où, de nombreuses espèces affectées survivent comme " morts-vivants ".
L'augmentation des introductions d'espèces accroît la biodiversité (e.g. en ajoutant des espèces au pool local ou en générant de nouveaux taxons <i>via</i> l'hybridation).	Mettre l'accent sur la richesse des espèces est une approche trompeuse pour quantifier l'impact des invasions. L'évaluation de l'influence des invasions sur l'abondance et la répartition des espèces indigènes (et les conséquences de ces changements sur le fonctionnement des écosystèmes) est en revanche cruciale. L'hybridation est une force d'extinction contemporaine majeure, surtout si elle s'accompagne d'une homogénéisation de l'habitat, créant alors des extinctions <i>via</i> l'introggression, la " pollution génétique " et des interférences reproductrices.
Les impacts positifs (souhaitables) d'espèces introduites sont sous-estimés et sont au moins aussi importants que leurs effets négatifs (indésirables).	Les espèces introduites sont beaucoup plus susceptibles de causer des dommages écologiques et socio-économiques considérables (changements des processus écosystémiques) que le sont les espèces indigènes. En outre, bon nombre des impacts " positifs " attribués à des espèces introduites sont susceptibles d'être transitoires, alors que les impacts " négatifs " sont généralement permanents et souvent irréversibles.
La science de l'invasion est biaisée et xénophobe.	Les xénophobes, obsédés par l'éradication de tous les organismes non indigènes, opèrent en marge du mouvement de la conservation – comme ceux qui relient les efforts de gestion des espèces introduites à la xénophobie.
L'origine biogéographique d'une espèce n'a aucune incidence sur son impact. La dichotomie indigène/non indigène n'a pas de valeur scientifique. Ces facteurs ne devraient pas guider la gestion, la science de l'invasion n'a aucune justification.	Ignorer les origines biogéographiques comme médiateur de l'impact, c'est ignorer l'importance du contexte d'évolution des interactions entre espèces. Plus l'espèce introduite est " exotique " au milieu d'introduction, plus la probabilité qu'elle soit un perturbateur écologique est importante.

Les invertébrés sont en majorité introduits de manière accidentelle (Mack et al. 2000; DAISIE 2009). Près de 90% des insectes terrestres introduits en Europe l'ont été de manière non-intentionnelle. En effet, 75% des introductions étaient associées au transport d'une marchandise et 15% comme " *hitchhikers* ", c'est-à-dire introduits *via* le transport d'une marchandise sans aucune valeur biologique pour l'espèce introduite. Les 10% restants correspondent pour la plupart à des introductions liées à la lutte biologique (Rabitsch 2010; Roy et al. 2011).

Les autres groupes (animaux et plantes) ont été dans de nombreux cas introduits volontairement : les oiseaux essentiellement introduits pour la chasse ; les poissons pour la pêche et l'aquaculture ; les plantes dans un but ornemental, horticole ou encore pour l'agriculture (DAISIE 2009). Cependant, la tendance actuelle semble s'inverser et de nombreuses espèces introduites volontairement ont échappé au contrôle de l'Homme (e.g. les perruches, le raton-laveur, etc.). Les insectes ne dérogent pas à cette " règle ", certaines espèces introduites pour la lutte biologique en sont le parfait exemple (e.g. la coccinelle asiatique, *Harmonia axyridis*).

En Europe, Roques (2010b) a montré que la majeure partie des arthropodes exotiques ont une origine asiatique (26,7%) ou nord-américaine (21,9%). D'un point de vue taxonomique, les coléoptères, hémiptères et hyménoptères représentent à eux seuls environ 65% des espèces d'arthropodes terrestres exotiques (25%, 20% et 18,7% respectivement). En raison de la prédominance du commerce de plantes dans les mouvements d'espèces exotiques, le régime phytophage domine largement parmi les invertébrés exotiques (représentant environ la moitié des espèces). Les insectes (notamment phytophages) apparaissent donc comme des acteurs majeurs dans les invasions biologiques. Différents facteurs peuvent expliquer ce succès invasif et seront traités par la suite (cf. section I.7. Succès invasif : un succès multifactoriel). Néanmoins que ce soient chez les insectes ou tout autre organisme, il est possible de catégoriser le processus d'invasion en différentes phases successives.

I.4. Invasion biologique : un processus séquentiel

Comme évoqué lors de la définition d'une espèce invasive, l'espèce doit être introduite, persister et proliférer aussi bien spatialement que démographiquement. Par conséquent et malgré la controverse évoquée préalablement, un consensus semble se dégager et la communauté scientifique s'accorde pour décomposer le processus d'invasion en trois grandes étapes : (1) l'introduction, (2) l'établissement et (3) la prolifération (FIGURE 3). Chaque étape peut à son tour comprendre plusieurs sous-étapes (Richardson et al. 2000; Sakai et al. 2001; Allendorf & Lundquist 2003;

Lockwood et al. 2005; Blackburn et al. 2011) et le passage à l'étape suivante nécessite le franchissement de certaines barrières (Blackburn et al. 2011).

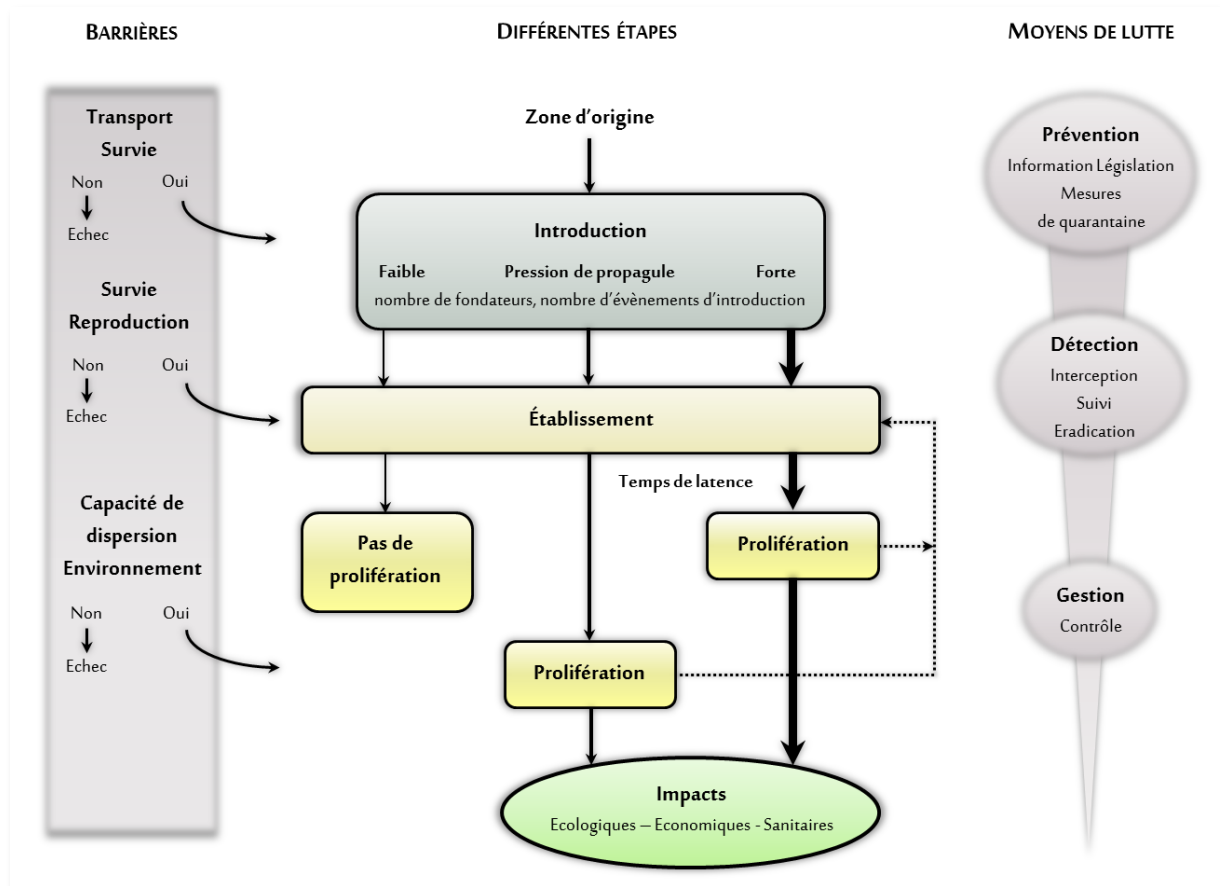


FIGURE 3. Représentation schématique des différentes étapes d'une invasion biologique, des barrières à franchir et des stratégies de gestion associées à chaque étape.

D'après Allendorf & Lundquist (2003), Blackburn et al. (2011) et Simberloff et al. (2013).

1.4.a. L'introduction, le début d'une longue histoire

Cette étape consiste au prélèvement d'individus (bien souvent de manière accidentelle) dans un milieu, au transport puis à l'introduction au sens strict de ces derniers (là encore de manière non intentionnelle dans de nombreux cas) dans un nouveau milieu situé hors de l'aire naturelle de distribution de l'espèce. Cette étape est généralement associée à des "goulots d'étranglement génétiques" puisqu'un nombre restreint d'individus est prélevé depuis la zone d'origine puis introduit dans une nouvelle zone et ne représente par conséquent qu'une partie de la diversité génétique présente dans l'aire native (Wares et al. 2005; Dlugosch & Parker 2008). On

parle alors d'effet fondateur et l'intensité de cette perte de diversité génétique pourra avoir des répercussions sur la suite du processus et le succès invasif de l'espèce introduite (cf. section I.7.d. Facteurs génétiques : des combinaisons gagnantes).

Il est difficile de dissocier cette étape de son caractère anthropique. En effet, le rôle fondamental joué par l'Homme dans l'introduction d'espèces (volontaire ou non) loin de leur aire d'origine n'est plus à prouver et fait l'objet d'un consensus. Même si cette étape peut paraître évidente, les individus doivent dans un premier temps être " transportés " (volontairement ou non) depuis leur zone d'origine, or toutes les espèces n'ont pas la même probabilité de l'être. Plus une espèce est associée aux activités humaines plus elle aura de chance d'être exportée hors de son aire native (Floerl et al. 2009; Hulme 2009; Rabitsch 2010). Dans un second temps, les individus doivent survivre au transport qui peut, dans certains cas, correspondre à des conditions de vie drastiques (e.g. longue durée, manque de nourriture, forte chaleur, etc.). La survie au transport constitue donc la condition *sine qua non* à l'introduction proprement dite.

I.4.b. L'établissement : survivre et se reproduire

Une fois les individus introduits dans un nouveau milieu, ils doivent être en mesure de survivre et de se reproduire afin de fonder une population viable sur le long terme. En d'autres termes, leur survie mais aussi la survie de leurs descendants sur de multiples générations après l'introduction sont essentielles pour qu'une espèce introduite puisse s'établir (Sakai et al. 2001; Blackburn et al. 2011). Les obstacles à surmonter pour les individus introduits ne sont donc plus de nature géographique mais écologique et démographique. En effet, les individus fondateurs doivent être capables de se développer dans un nouvel environnement avec lequel ils n'ont pas co-évolué. La capacité à s'établir peut résulter de facteurs associés à l'espèce introduite (par exemple une plasticité phénotypique), au lieu de l'introduction (par exemple, des conditions climatiques similaires à celles du milieu d'origine) ou à une interaction espèce introduite x lieu d'introduction mais aussi à des caractéristiques stochastiques (Blackburn et al. 2011; Fauvergue et al. 2012; Pyšek & Richardson 2010). Tout comme pour l'étape précédente, lors de l'établissement, les populations sont souvent difficiles à détecter car les individus peuvent être peu nombreux et spatialement cantonnés à des micro-habitats favorables (Roques 2010a).

Cette étape fait intervenir un nouveau concept : la pression de propagule. Cette mesure composite qui associe le nombre d'évènements d'introductions (nombre de propagule) et le nombre d'individus introduits à chaque introduction (taille de la propagule) (Lockwood et al. 2005) est souvent citée comme un élément décisif dans le succès à s'établir (Sakai et al. 2001; Allendorf & Lundquist 2003; Lockwood et al. 2005; Meyerson & Mooney 2007; Simberloff 2009;

Fauvergue et al. 2012). En effet, ces différents auteurs considèrent que plus la pression de propagule est forte plus les chances de s'établir seront accrues. Cependant, l'introduction du frelon asiatique en France témoigne que malgré une très faible pression de propagule (une seule femelle mais fécondée par plusieurs mâles), l'espèce s'est établie et a maintenant colonisé une grande partie du territoire ouest européen (Arca 2012).

I.4.c. La prolifération : l'invasion stricto sensu

Cette phase correspond à l'invasion proprement dite. La population initialement introduite s'est développée d'un point de vue démographique et va s'étendre spatialement et sera à l'origine de nouveaux foyers populationnels. Ainsi, une population en expansion sera confrontée à de multiples événements séquentiels d'établissement, dû aux nouvelles conditions environnementales rencontrées lors de la propagation (Blackburn et al. 2011). Les obstacles auxquels doit faire face la population envahissante sont maintenant d'ordre environnemental. Si l'environnement est hétérogène, la population envahissante devra donc s'adapter à la gamme de milieux rencontrés. Cependant, un retard (ou phase de latence) d'une durée plus ou moins longue peut dans certains cas être observé entre la phase d'établissement et la phase de prolifération (Mack et al. 2000; Allendorf & Lundquist 2003; Facon et al. 2006; Essl et al. 2011b). Lors de cette phase de latence, les populations introduites peuvent atteindre des habitats plus appropriés qui permettent une reproduction plus élevée. Cette croissance continue de la population entraîne alors une augmentation de la pression de la population sur les zones adjacentes et peut, dans certains cas, mener à de sérieux impacts sur l'écosystème. Une phase de latence prolongée entre l'établissement de certaines espèces et leur émergence comme invasifs peut être à l'origine d'un manque de décision de la part des pouvoirs publics. Les mesures adaptées pour contrôler, limiter la propagation de la population établie voire l'éradiquer ne sont alors pas prises en temps voulu (Mack et al. 2000; Rasplus 2010; Simberloff et al. 2013).

I.4.d. Beaucoup d'appelés mais peu d'élus

Ce processus séquentiel implique donc le passage de différentes étapes (plus précisément le passage de différents obstacles) et l'incapacité à surmonter ces différentes barrières entraînera l'échec de l'invasion. Dans ce sens, la *Tens rule* (la règle des Dizaines) a été formulée par Williamson & Fitter (1996) comme une règle de base pour déterminer le pourcentage d'espèce réussissant à passer chaque étape du processus d'invasion. Cette règle propose qu'environ 10% des espèces introduites parviendront à s'établir, et 10% des espèces établies deviendront invasives. En d'autres

termes, sur 100 espèces introduites, seule une d'entre elles deviendra invasive. Cette règle a été formulée à partir d'observations concernant des plantes terrestres invasives et ne semble pas généralisable (bien que souvent appliquée à de nombreux taxons, sans en évaluer la validité). En effet, il semblerait que cette règle sous-estime le succès invasif des insectes (Williamson & Fitter 1996; Lounibos 2002; Peacock & Worner 2008). Néanmoins, cette théorie formalise bien le risque d'échec d'une invasion à chacune des étapes du processus.

I.5. Prévention, éradication, contrôle : une lutte au quotidien

Comme le dit l'adage " Mieux vaut prévenir que guérir ! ". En effet, la prévention est jugée comme la mesure la plus " efficace ". Les différentes méthodes employées (e.g. mesures de quarantaine des marchandises, évaluation des risques, interceptions réalisées par les services phytosanitaires, etc.) ont pour but de limiter la pression de propagule et donc de diminuer les risques d'invasion (Pyšek & Richardson 2010; Simberloff et al. 2013). Même si les techniques se sont améliorées depuis une décennie, ce système est, cependant, loin d'être infaillible. De plus, pour pouvoir détecter d'éventuels " indésirables ", il faut savoir ce que l'on cherche ! Certaines espèces n'ont pas le statut de ravageur dans leurs zones d'origine et étaient, parfois même, totalement inconnues pour la science avant leur arrivée et l'explosion démographique dans la zone d'introduction. C'est notamment le cas de la mineuse du marronnier, *Cameraria ohridella*, ou du chermès des rameaux, *Dreyfusia nordmanniana* (Kenis et al. 2007). De plus, une comparaison des interceptions et des espèces établies en Europe révèle une forte disparité. La majorité des espèces invasives ne sont pas détectées alors que les groupes principalement interceptés ne participent que faiblement à l'entomofaune exotique (Kenis et al. 2007; Roques 2010a). Ainsi, on oppose maintenant à l'évaluation des risques liés aux espèces invasives, l'évaluation des risques liées aux voies d'introductions, jugée plus efficace (projet ISEFOR 2014).

L'éradication (i.e. l'élimination de la totalité de la population exotique au sein d'une unité de gestion (Richardson et al. 2011)) représente une méthode à l'efficacité variable (Gardener et al. 2010; Pluess et al. 2012; Tobin et al. 2014). Pour qu'elle soit efficace, elle doit être appliquée dans les toutes premières phases de l'invasion ce qui implique donc une détection précoce et des mesures d'intervention rapides (Mack et al. 2000; Allendorf & Lundquist 2003; Pyšek & Richardson 2010; Simberloff et al. 2013). Pluess et collaborateurs (2012) qui ont analysé le succès de 136 programmes d'éradication menés sur des invertébrés, des pathogènes ou des plantes, ont identifié que l'un des paramètres clé dans la réussite d'un plan d'éradication correspondait à l'étendue spatiale d'une infestation. L'éradication est bien plus efficace sur de petites surfaces,

lorsque les populations invasives ne sont pas encore pleinement établies, n'ont pas encore dispersé et peuvent être plus sujettes aux effets Allee (cf. section I.7.c. Quand la démographie s'en mêle). La détectabilité de l'espèce est aussi un facteur essentiel notamment à la fin d'un programme d'éradication car il détermine en grande partie l'absence apparente de l'organisme cible et donc la réussite ou non du projet (Tobin et al. 2014).

Néanmoins, l'éradication est jugée souvent trop coûteuse et/ou impossible et une fois les populations pleinement établies, la gestion à long terme correspond au seul moyen de lutte. L'acquisition de connaissances sur la biologie et l'écologie de l'espèce introduite à la fois dans la zone d'origine et dans la zone envahie peut dans ce cas être cruciale (Mack et al. 2000; Allendorf & Lundquist 2004; Rasplus 2010). Pour Pyšek & Richardson (2010), c'est l'impact d'une espèce qui détermine en grande partie si oui ou non elle sera étudiée. La " lutte engagée contre ces espèces " n'a pas d'autre objectif que de réduire la présence et l'abondance des organismes invasifs, en d'autres termes limiter les impacts néfastes de ces derniers.

I.6. Impacts des espèces invasives

I.6.a. Rêve ou réalité ?

Les invasions biologiques représentent une accélération des processus naturels (sélection, adaptation, changements évolutifs) et permettent de tester de nouvelles combinaisons qui ne pouvaient avoir lieu naturellement (e.g. hybridation entre des populations géographiquement isolées). A ce titre, les invasions peuvent donc être perçues par la communauté scientifique comme de réelles expériences grandeur nature permettant d'augmenter les connaissances et tester de nombreux concepts. Cependant, dans bien des cas, les invasions sont à l'origine d'effets néfastes de différentes natures : économique, écologique ou sanitaire. Néanmoins et comme entrevu dans la partie I.2 " Un phénomène qui fait débat : définitions et controverses ", les impacts des invasions biologiques font débat au sein de la communauté scientifique car ils peuvent être dépendants de la perception humaine. Les effets ont été étiquetés " bon " ou " mauvais " en fonction du service écosystémique considéré, l'effet d'une même espèce invasive peut donc être bon ou mauvais en fonction du contexte (Simberloff et al. 2013) et, dans ce sens, le point de vue économique est souvent bien différent du point de vue environnemental. Les impacts économiques sont plus facilement détectables et surtout plus rapidement signalés par les parties prenantes (Pyšek & Richardson 2010). Les impacts écologiques sont eux plus difficiles à déterminer et à quantifier, et sont souvent sous-estimés car jugés plus subtils et/ou pour être caractérisés demandent une étude intensive

généralement sur de longues durées (Simberloff et al. 2013). De plus, même des espèces considérées comme inoffensives peuvent avoir des répercussions écologiques importantes comme les chalcidiens des graines du genre *Megastigmus spp.* qui déplacent la faune native et diminuent le potentiel de régénération naturelle de la flore native (Auger-Rozenberg & Roques 2012). Néanmoins, de nombreux travaux concluent à un impact faible voire inexistant de diverses invasions. Dans ce sens, une étude récente sur la pertinence de telles conclusions et fondée sur des analyses post-hoc, suggère que les espèces introduites pour lesquelles les études d'impact ont des résultats statistiquement non significatifs (souvent interprétés comme " aucun impact ") peuvent cependant avoir des impacts importants non détectés en raison d'échantillons trop faibles (et donc d'un effet taille) (Davidson & Hewitt 2014). Les auteurs concluent également que le design expérimental et les analyses adoptés réduisent les erreurs de Type I alors que l'identification d'éventuels impacts requière un design expérimental et des analyses associées qui minimisent les erreurs de Type II¹.

De plus, Essl et collaborateurs (2011a) ont montré que de nombreuses espèces exotiques problématiques actuelles ne correspondent pas à des espèces arrivées récemment mais ont été introduites il y a plusieurs décennies. Par conséquent, les patterns actuels reflètent des patterns historiques plutôt que contemporains. Ce phénomène est appelé la dette de l'invasion – *Invasion debt*. Les conséquences des pratiques socio-économiques actuelles, du point de vue invasions biologiques (i.e. augmentation sans précédent du nombre d'espèces introduites), ne seront donc probablement perçues que dans plusieurs décennies.

Cependant, des décennies de recherche expérimentale ont tout de même démontré la capacité des invasions à altérer les écosystèmes, impacter l'économie ou encore avoir de lourdes répercussions sur la santé animale et humaine (Vilà et al. 2010; Richardson & Ricciardi 2013). Vilà et collaborateurs (2010) ont identifié que 13,8% et 24,2% des espèces d'invertébrés terrestres introduites en Europe ont occasionné (ou occasionnent encore) des impacts écologiques et économiques, ce qui correspond respectivement à 342 et 601 espèces. Concernant plus particulièrement les insectes, les impacts d'ordres économiques sont les mieux documentés en raison des nombreux nuisibles introduits en milieux agricole et forestier (Kenis & Branco 2010). Certaines études estiment qu'entre 30 et 45% des insectes ravageurs dans l'agriculture et la sylviculture dans le monde sont d'origine exotique (Pimentel 2002; Pimentel et al. 2005), alors qu'ils ne représentent qu'une infime partie de la faune entomologique.

¹ L'erreur de Type I (ou de " première espèce ") est l'erreur commise quand l'hypothèse nulle est rejetée, alors qu'elle est vraie. L'erreur de Type II (ou de " deuxième espèce ") est l'erreur commise quand l'hypothèse nulle est maintenue, alors qu'elle est fausse.

I.6.b. Impacts économiques : la source de tous les maux ?

Seule une partie des espèces introduites s'établira et deviendra invasive. Cette infime fraction, particulièrement lors d'introductions accidentelles, peut être à l'origine de pertes économiques conséquentes notamment en agriculture (Pimentel et al. 2005; Kenis & Branco 2010). Comme illustré par l'exemple suivant, les impacts peuvent être directs (perte de production) ou indirects (coûts relatifs aux moyens de lutte contre l'invasif). Ainsi l'introduction de *Diabrotica virgifera virgifera*, considéré comme le ravageur le plus important du maïs, dans le centre des États-Unis (zone correspondant aux principaux états producteurs de maïs) a un impact économique considérable. En effet, les coûts estimés dans les années 1980 des insecticides utilisés pour contrôler les dommages des larves aux racines, de la pulvérisation aérienne pour réduire les dommages des adultes aux épis, combinés aux pertes de récoltes approchaient le milliard de dollars par an (Krysan & Miller 1986). En Europe, d'importantes pertes liées à l'invasion de ce ravageur ont également été enregistrées en Serbie, Hongrie, Italie (Baufeld & Enzian 2005). De même, les producteurs européens de châtaignes ont vu leur production diminuée de 50 à 70% depuis l'introduction du cynips du châtaignier, *Dryocosmus kuriphilus* (Bosio et al. 2010).

Le milieu agricole fait l'objet d'attention particulière puisqu'il assure à lui seul une grande partie de la nourriture des populations humaines mais aussi du bétail. Cependant, le monde sylvicole n'est pas épargné par le phénomène des invasions (Pimentel et al. 2005; Brouckhoff et al. 2006; Roques 2010a; Aukema et al. 2010; Aukema et al. 2011). Les dégâts annuels liés aux insectes xylophages invasifs aux États-Unis ont été estimés à plus de 2,5 milliards de dollars (Aukema et al. 2011). En outre, de nombreux invasifs occasionnent de sérieux dommages aux plantes ornementales (e.g. *Anoplophora* spp. sur érables, saules, ormes et peupliers; *Agilus plannipenis* sur frênes ou encore *Rynchophorus ferrugineus* et *Paysandisia archon* sur palmiers) et peuvent être à l'origine de la mort de centaines d'arbres utilisés dans l'aménagement urbain (Haack et al. 2010; Kenis & Branco 2010; Aukema et al. 2011).

Cependant, bon nombre d'insectes introduits intentionnellement ont un impact positif sur l'économie comme par exemple l'introduction d'agents de lutte biologique pour le contrôle d'espèces nuisibles (Roy et al. 2011) ou encore l'introduction de pollinisateurs tels que *Apis mellifera* dans le but d'obtenir des rendements en miel plus élevés (Moritz et al. 2005) ou *Bombus terrestris dalmatinus* utilisés dans les serres pour améliorer la pollinisation (Ings et al. 2006; Inoue et al. 2008). Toutefois, les bénéfices engendrés par l'introduction de certaines espèces ne suffisent pas à équilibrer la balance face aux dépenses générées. De plus, les deux exemples cités

pour illustrer les bienfaits de certaines introductions peuvent également être cités comme contre-exemples pour leurs impacts écologiques (cf. paragraphe suivant).

1.6.c. Impacts écologiques et difficultés d'associer Economie et Ecologie

En effet, certaines introductions dites bénéfiques peuvent avoir des conséquences inattendues. Ainsi, la coccinelle asiatique, *Harmonia axyridis* introduite comme agent de lutte biologique contre les pucerons, représente aujourd'hui une espèce hautement invasive à l'échelle du globe puisque retrouvée en Amérique du Nord, en Europe mais aussi en Afrique du Sud et en Amérique du Sud (Koch 2003; Lombaert et al. 2010; Lombaert et al. 2011). Dans les régions envahies, un déclin des Coccinellidés indigènes est observé et directement lié à l'introduction d'*H. axyridis* qui constitue généralement un meilleur compétiteur mais aussi un prédateur intra-guille (Koch 2003; Brown et al. 2011).

Concernant les pollinisateurs, l'introduction au Japon de souches commerciales de bourdons terrestres, *Bombus terrestris*, est à l'origine d'extinctions locales de bourdons indigènes *Bombus hypocrita sapporoensis* via une compétition pour les sites de nidification (Inoue et al. 2008). Il faut également noter que les abeilles introduites, principalement l'abeille domestique *Apis mellifera* sont connues pour réduire la fitness de certaines espèces de plantes indigènes (mauvaise manipulation de la fleur, morphologie inadéquate) (Klein et al. 2007). De plus, l'introduction massive dans le nord-ouest européen de deux sous-espèces d'*A. mellifera* originaires du sud de l'Europe, *A. m. ligustica* et *A. m. carnica*, a provoqué d'importants flux de gènes et une introgression entre ces sous-espèces et l'abeille noire indigène, *A. m. mellifera*, dont les populations sont maintenant menacées (Kenis et al. 2009).

Au vue de ces différents exemples, Vitousek et collaborateurs (1997) considèrent que les invasions biologiques représentent la deuxième cause mondiale de perte de biodiversité après la destruction des habitats. Ainsi, l'introduction d'une nouvelle espèce représente une menace sur la faune et la flore native via des phénomènes de compétition, de prédation, d'hybridation mais aussi de dégradation des habitats. En effet, tout comme pour les impacts économiques, les impacts écologiques peuvent être directs ou indirects. Les invasions peuvent avoir des répercussions à plus grande échelle, c'est-à-dire sur le fonctionnement même d'un écosystème par des " effets cascade " (Gandhi & Herms 2010). Ces auteurs ont formalisé ce concept à partir d'invasions dans les forêts nord-américaines d'insectes phytophages tels que le puceron *Adelges tsugae*, le bombyx disparate *Lymantria dispar* ou encore des introductions plus récentes mais tout aussi désastreuses celles de l'agrile du frêne *A. plannipennis* et du scolyte *Xyleborus glabratus*. La défoliation et la mortalité des

arbres induites par ces insectes invasifs peuvent générer une cascade d'effets indirects sur les interactions écologiques comme une augmentation des débris végétaux qui aura à son tour une incidence sur les cycles biogéochimiques et l'accessibilité des ressources pouvant alors provoquer des changements de la diversité et de l'abondance d'espèces endémiques ou invasives. Une représentation schématique de cette interconnexion est illustrée à la FIGURE 4.

Comme vu précédemment la difficulté à estimer les impacts écologiques réside dans le fait que de telles estimations demandent bien souvent de longues études. Si les impacts écologiques des invasions apparaissent importants (notamment d'un point de vue éthique), les espèces invasives peuvent également représenter une menace pour la santé humaine.

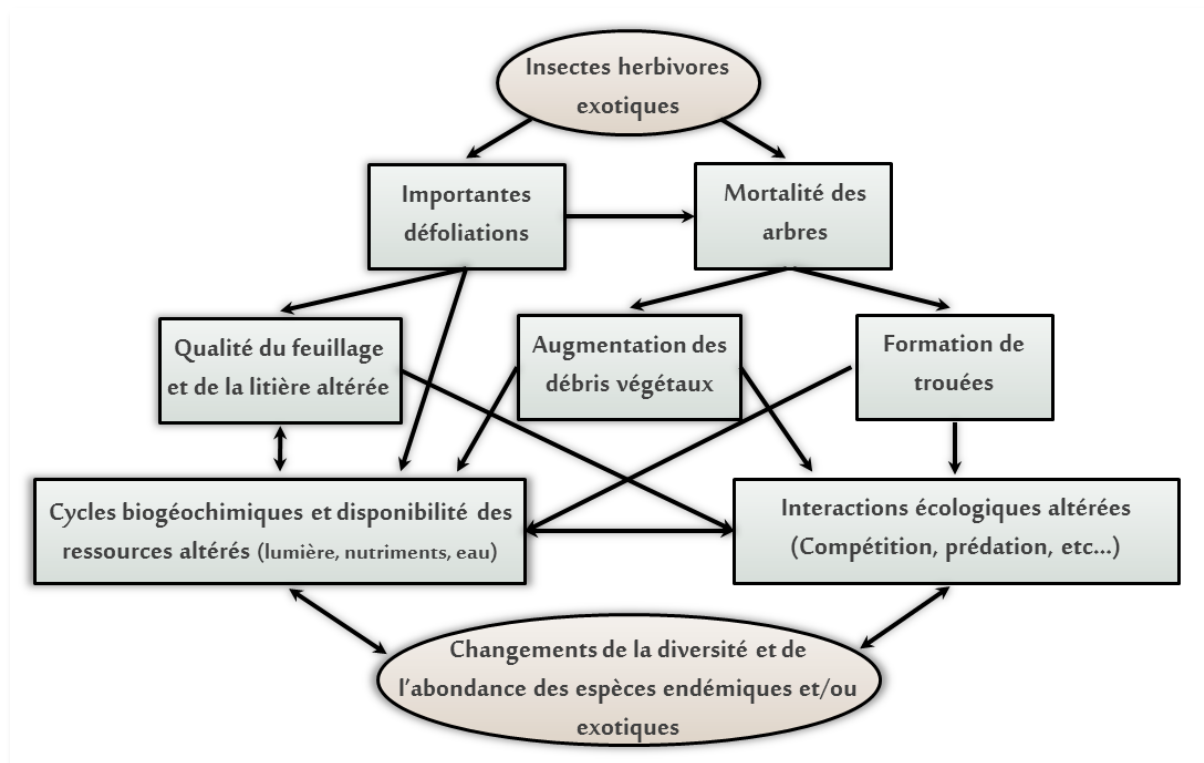


FIGURE 4. Représentation schématique des effets (directs ou indirects) en cascade des insectes herbivores exotiques sur les processus et les interactions des écosystèmes forestiers du nord-est américain.

Modifiée d'après Ghandhi & Herms 2010.

I.6.d. Impacts sanitaires : la santé mise à mal

La santé, humaine et animale, peut être affectée par de nombreux organismes invasifs *via*

des allergènes produits notamment par certaines plantes invasives comme l'ambroisie, *Ambrosia artemisiifolia*, ou le mimosa d'hiver, *Acacia dealbata* (Pyšek & Richardson 2010) ou directement par l'organisme lui-même (pathogènes, virus et bactéries) (Daszak et al. 2000; Fisher et al. 2012). Ces pathogènes sont souvent transmis par des arthropodes, en particulier les espèces détritivores et hématophages, eux-mêmes exotiques (Kenis & Branco 2010). C'est particulièrement le cas du moustique tigre, *Aedes albopictus*, vecteur naturel de divers virus et filaires dont les virus du Chikungunya, de la dengue ou encore de l'encéphalite japonaise, qui est maintenant présent dans plus de 80 pays répartis sur tous les continents (Lounibos et al. 2002; Juliano & Lounibos 2005). Les coûts relatifs au traitement des personnes touchées par les différentes maladies transmises par ce moustique mais aussi les pulvérisations d'insecticides pour limiter la propagation et les pullulations sont à l'origine de son classement par l'IUCN parmi les 100 espèces invasives les plus néfastes dans le monde.

L'introduction de pathogènes peut également impacter les productions agricoles et par conséquent avoir des répercussions sanitaires importantes. Ainsi au XIXe siècle, l'introduction du mildiou, *Phytophthora infestans*, a conduit à la Grande famine en Irlande provoquant la mort de milliers de personnes, la ruine économique du pays et la chute du gouvernement anglais (Fisher et al. 2012).

Les invasions biologiques peuvent aussi avoir un impact sur la santé animale. Ainsi, le déclin actuel observé chez les pollinisateurs et plus particulièrement chez l'abeille domestique pourrait s'expliquer, au moins en partie, par l'introduction de l'acarien *Varroa destructor*. Cet acarien originaire d'Extrême-Orient (Corée, Japon) (Solignac et al. 2005) a été introduit accidentellement sur la plupart des continents depuis les années 1950, période à laquelle un changement d'hôte se serait produit (passage d'*Apis cerana* à *A. mellifera*). Cet acarien est vecteur de nombreux virus pouvant entraîner la mort de la colonie (Chen et al. 2004; Gisder et al. 2009).

Bien que les différentes natures (économique, écologique et sanitaire) des impacts aient été traitées séparément dans ce manuscrit, l'impact d'une espèce invasive ne se limite généralement pas à l'une ou l'autre. Les cas évoqués précédemment (e.g. pollinisateurs, coccinelle asiatique, moustique tigre) sont de parfaits exemples illustrant les conséquences multiples qu'une seule et même espèce introduite peut engendrer. Dans ce sens, Vilà et collaborateurs (2010) indiquent que les impacts écologiques et économiques des espèces exotiques sont généralement étudiés séparément alors qu'ils sont susceptibles d'être fortement corrélés.

L'explosion des introductions d'espèces exotiques ces deux dernières décennies mais

aussi la " non décélération " du phénomène laissent présager que dans un futur plus ou moins proche de nouvelles menaces vont émerger. En effet, les incidences sur un écosystème et/ou sur l'économie ne sont souvent pas observables dès l'introduction de l'espèce et ce dû au temps de latence entre l'introduction et l'invasion *stricto sensu*. Il n'est donc pas à exclure que les espèces introduites et considérées aujourd'hui comme " inoffensive " ne deviendront pas les espèces problématiques de demain (i.e. *Invasion debt*). Certaines observations liées au phénomène d'invasion (i.e. variabilité de temps de latence, échec de l'invasion) soulèvent donc quelques questions fondamentales, notamment pourquoi certaines espèces ou plus précisément certaines populations sont capables de s'établir et de proliférer et d'autres non ? Comment expliquer la variabilité temporelle entre l'établissement et la prolifération observée entre différents invasifs ? Quels sont les facteurs impliqués dans les différentes réponses ? Sont-ils les mêmes pour les différentes espèces ? Les différents groupes ?

I.7. Succès invasif : un succès multifactoriel

Dans un contexte où les invasions sont de plus en plus fréquentes, comprendre les raisons du succès invasif est devenu un enjeu majeur de la Biologie de l'invasion. Les facteurs qui peuvent influencer la réussite ou non d'une invasion peuvent être de différentes natures : anthropique, écologique, démographique, génétique. Pour faciliter la lecture, ces quatre " grands types " de facteurs seront traités indépendamment, néanmoins, ils ne sont pas exclusifs. En effet, le succès invasif repose bien souvent sur une combinaison de différents facteurs. Même si le succès d'une invasion réside en partie sur des caractéristiques propres à l'espèce ou plus précisément à la population introduite ainsi qu'au milieu où l'introduction aura lieu, une part, non négligeable (voire essentielle), relève de la stochasticité du phénomène : être présent au bon endroit, au bon moment.

I.7.a. Des facteurs anthropiques, encore et toujours...

Nous avons vu précédemment que ces deux dernières décennies, l'augmentation des échanges internationaux (i.e. multiplication du tourisme et du commerce " longue distance ") a conduit à une explosion du nombre d'espèces introduites au-delà de leur aire de répartition naturelle, et par conséquent, à une augmentation du nombre d'invasions biologiques. En Europe, certaines introductions d'insectes correspondent à des actes délibérés souvent réalisés dans le cadre d'une lutte biologique (Rabitsch 2010; Roy et al. 2011). Cependant, la grande majorité des insectes sont introduits non intentionnellement *via* le transport de marchandises et surtout *via* le commerce de plantes horticoles et ornementales (Rabitsch 2010). Le charançon rouge des palmiers

Rhynchophorus ferrugineus dont l'invasion " méditerranéenne " est directement liée aux plantations de palmiers importés, en est un bon exemple (Roques 2010a). L'augmentation du commerce en provenance de Chine ces dernières années offre un nouveau point de départ (mais aussi un nouveau point d'accueil) ainsi que de nouvelles espèces au potentiel invasif. Cette augmentation contribue très certainement à l'origine asiatique de la majeure partie des arthropodes exotiques présents en Europe (Roques 2010b). Cette tendance est également confirmée aux États-Unis par l'augmentation du taux d'interceptions des insectes phytophages originaires de Chine et du Vietnam (Aukema et al. 2010). La multiplicité des vecteurs utilisés est étonnante, il serait inintéressant et impossible de tous les lister tant leur nature est variable et parfois insolite. L'introduction transcontinentale (Europe, Amérique du Nord, Afrique et Australie) du moustique tigre, *Aedes albopictus*, aurait pour origine la présence de larves dans l'eau contenue dans les pneus usagés ou les plantes ornementales (e.g. Lucky Bambou, *Dracaena* spp.) (Reiter 1998). Les " chips d'amidon " utilisées pour la protection des marchandises fragiles lors d'envois de colis peuvent également être prises pour cible (source de nourriture ou abri protecteur) par certains ravageurs des céréales stockées notamment les charançons *Sitophilus oryzae* ou *Tribolium castaneum*, ces derniers pourront ainsi être transportés sur de longues distances (Fraga et al. 2009).

Les changements globaux et plus particulièrement le réchauffement climatique (EEA 2012) peut permettre aux insectes une augmentation du nombre de générations annuelles mais aussi l'établissement de certaines espèces avec une levée des seuils thermiques empêchant leur survie et développement (Musolin 2007; Roques 2010b; Kiritani 2013). En effet, les introductions d'espèces depuis des régions chaudes (tropicales ou subtropicales) vers des zones tempérées étaient, jusqu'à récemment, limitées par de trop courtes saisons propices au développement ne leur permettant pas de se reproduire et de s'établir (Walther et al. 2009). Les insectes sont des organismes poïkilothermes et leur développement est donc fortement dépendant des températures extérieures. L'établissement dans différentes régions d'Europe d'*Aedes albopictus*, originaire d'Asie tropicale illustre bien ce phénomène (ECDC 2009). Au regard des changements globaux, la perturbation des milieux engendrée par certaines pratiques agricoles, l'exploitation forestière ou encore le pâturage, est aussi mise en cause dans la réussite de certaines invasions (Sakai et al. 2001; Meyerson & Mooney 2007; Lopez-Vaamonde et al. 2010).

De plus, le temps de transport entre la zone d'origine et la zone d'introduction a significativement diminué avec la construction de navires plus grands mais aussi et surtout plus rapides. En outre, l'avènement du transport aérien permet de connecter n'importe quel point du globe et de le rejoindre en moins de 48h au lieu de plusieurs mois par bateau auparavant (Mouchet et al. 1995). Le temps de transport des marchandises et de leurs clandestins a par

conséquent été considérablement réduit, or un transit rapide augmente la probabilité qu'une espèce survive au transport et donc la probabilité de s'établir avec succès (Meyerson & Mooney 2007; Rabitsch 2010). Ces différentes avancées technologiques concernant la rapidité des transports sont à opposer aux lenteurs des décisions administratives. La bureaucratie exige bien souvent de nombreuses données pour "prendre au sérieux" certains problèmes liés aux introductions, or, l'acquisition de telles données peut prendre des mois voire des années. Au cours de cette période, l'espèce introduite peut s'installer, croître et se disperser et la période d'action efficace (parfois très courte) est alors dépassée (Allendorf & Lundquist 2003; Rasplus 2010). Plusieurs auteurs vont jusqu'à recommander la politique du "shoot first, ask questions later" (Ruesink et al. 1995; Simberloff dans Allendorf & Lundquist 2003).

Même si le rôle joué par l'Homme (notamment dans le transport) est indéniable, il n'explique pas à lui seul le succès invasif. Comme évoqué brièvement *via* la perturbation des milieux, certains facteurs directement liés au lieu de l'introduction vont favoriser ou non la réussite de l'invasion.

1.7.b. Facteurs écologiques : préadaptation et plasticité, des caractéristiques essentielles

Les conditions biotiques et abiotiques rencontrées dans le nouveau milieu ont clairement une influence sur la réussite d'une espèce à s'établir au sein de celui-ci. En effet, des conditions climatiques similaires mais aussi la présence d'hôtes appropriés et/ou acceptables auront une incidence drastique sur les capacités de survie des individus introduits. La plasticité phénotypique (i.e. la capacité d'un génotype à produire des phénotypes variables en fonction des conditions environnementales (Whitman & Agrawal 2009) serait une des composantes essentielles au succès invasif. En effet, elle représente une stratégie adaptative face aux variations de l'environnement, pouvant de ce fait faciliter l'établissement d'une espèce qui maintient ainsi une *fitness*² relativement élevée dans le nouvel environnement (Sakai et al. 2001; Richards et al. 2006; Ghalambor et al. 2007). A ce titre, des clines latitudinaux d'adaptations à différentes conditions climatiques ont été observés chez les populations invasives nord-américaines de *Drosophila subobscura* (Gilchrist et al. 2001). De même, la grande plasticité du comportement de ponte de la mouche méditerranéenne des fruits, *Ceratitis capitata*, est considérée comme une caractéristique clé dans la capacité de cet insecte à coloniser des habitats variés (Malacrida et al. 2007).

² La valeur sélective ou par abus de langage *fitness* (en anglais) correspond au nombre moyen d'individus dans une population qui contribuent génétiquement à la génération suivante (Wares et al. 2005).

De plus, de nombreux milieux, bien que géographiquement éloignés, proposent des conditions de vie similaires. Une espèce peut alors être considérée comme pré-adaptée à un milieu dans lequel elle n'a jusqu'alors jamais évolué. Un changement du régime de migration peut ainsi être parfois suffisant pour que l'espèce devienne invasive (Facon et al. 2006). La réussite de certaines invasions d'insectes européens en Amérique du Nord a été attribuée à la similarité taxonomique entre les espèces de plantes nord-américaines et européennes (Simberloff 1989). Ces observations ont conduit au développement d'une approche pour prédire la distribution potentielle d'une espèce invasive : la modélisation des niches écologiques (" ENM " Peterson 2003) fondée sur les besoins environnementaux des espèces dans leur zone d'origine. De telles études peuvent être très utiles notamment dans la prévention et la mise en place d'éventuelles mesures pour ralentir la propagation de l'invasif (Rasplus 2010; Robinet et al. 2012) comme pour l'agrile du frêne, *Agrilus planipennis*, en Amérique du nord (Prasad et al. 2010) ou encore le nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus* récemment introduit au Portugal et véhiculé d'arbre en arbre par les insectes du genre *Monochamus* (Robinet et al. 2011). La similarité des milieux est un élément clé dans la réussite de l'établissement d'une espèce introduite. Cependant, les activités anthropiques peuvent créer des conditions biotiques et abiotiques très contrastées et surtout très différentes des conditions naturelles. Ainsi, la colonisation de ces milieux fortement perturbés (e.g. bords de routes, plantations, etc.) dans la zone d'origine a largement contribué au succès invasif de la petite fourmi de feu, *Wasmannia auropunctata* (Foucaud et al. 2009) ou encore de la mineuse du marronnier *Cameraria orchidella* (Lopez-Vaamonde et al. 2010).

De nombreuses espèces introduites survivent dans le milieu d'introduction mais restent très localisées et " inoffensives " pendant de longues périodes (parfois plusieurs décennies) avant de proliférer rapidement démographiquement et spatialement. Les raisons de ce retard (et son arrêt brutal) restent parfois mystérieuses mais dans certains cas, l'élément déclencheur peut correspondre à un changement environnemental (e.g. changement des pratiques culturelles, ouverture du milieu, etc.) (Simberloff 2013).

L'absence ou le nombre réduit d'ennemis naturels (prédateurs, parasites ou pathogènes) ou encore leur non adaptation au nouvel arrivant (phénomène appelé *Enemy Release Hypothesis* (Liu & Stiling 2006; Facon et al. 2006)) peut expliquer en partie, la forte et parfois rapide croissance démographique observée une fois l'espèce établie. Dans ce sens, une étude menée sur 87 complexes insectes phytophages-parasitoïdes a montré que le taux de parasitisme était réduit chez les insectes invasifs comparé aux espèces indigènes (Cornell & Hawkins 1993). Ce relâchement de pression de prédation pourrait également être à l'origine des capacités compétitives plus importantes généralement observées chez les invasifs. Cette théorie, nommée EICA, *Evolution of Increased*

Competitive Ability (Blossey & Notzold 1995) bien que souvent contestée, propose que les populations introduites pourraient réallouer les ressources utilisées pour la défense contre les agresseurs vers les capacités compétitrices.

I.7.c. Quand la démographie s'en mêle

Les stratégies démographiques employées par les espèces introduites peuvent avoir un impact non négligeable sur le processus d'invasion et plus particulièrement dans sa réussite. Si les espèces adoptant une stratégie *r* (e.g. une utilisation d'habitat pionnier, une forte capacité de dispersion, un temps de génération court, un taux de fécondité élevé et un taux de croissance des populations élevé) peuvent être favorisées pour s'établir; il apparaît que la capacité à basculer entre une stratégie *r* et une stratégie *K* (e.g. un taux de fécondité faible, un faible taux de croissance des populations, une forte capacité de compétition) pourrait être une caractéristique importante pour le succès de l'invasion (Sakai et al. 2001). Plus exactement, les stratégies au niveau de la zone front et de la zone cœur pourront être différentes, la stratégie *r* serait sélectionnée dans la zone de front alors que la stratégie *K* serait favorable dans la zone cœur (Phillips et al. 2010). De plus, lors d'une expansion spatiale, des changements de certains traits densité-dépendants peuvent se produire et ce de manière rapide. Ainsi, il a été formulé que les capacités de dispersion étaient supérieures au niveau du front comparé à la zone cœur (Travis & Dytham 2002). C'est notamment le cas pour les populations invasives européennes d'*H. axyridis* qui montrent des capacités de dispersion plus importantes au niveau du front d'expansion qu'au niveau de la zone d'introduction (Lombaert et al. 2014).

En outre, le mode de reproduction peut avoir des répercussions sur les capacités invasives d'une espèce. La parthénogenèse chez les insectes leur permet d'exploiter rapidement une nouvelle ressource en évitant les contraintes liées à la recherche d'un partenaire et est souvent suspectée de promouvoir le succès invasif des insectes phytophages introduits en Amérique du nord (Niemela & Mattson 1996) ou encore des chalcidiens des graines du genre *Megastigmus* en France (Fabre et al. 2004; Auger-Rozenberg et al. 2012).

L'arrivée d'une espèce indigène ne s'accompagne pas toujours d'un établissement réussi et ceci est d'autant plus vrai si la population fondatrice est sujette à un fort effet Allee (corrélation positive entre le taux d'accroissement et la taille d'une population) (Liebhold & Tobin 2008). En effet, un faible nombre d'individus introduits peut entraîner dans certains cas une difficulté de

localisation du partenaire, une dépression de consanguinité³, un taux de prédation important ou encore un manque d'alimentation coopérative (e.g. certaines agrégations larvaires permettent une exploitation efficace de la ressource). Des études bibliographiques concernant les programmes de lutte biologique utilisant des parasitoïdes ont permis de déterminer l'existence d'une corrélation positive entre le nombre d'individus relâchés et la probabilité à s'établir (Hopper & Roush 1993). Si le nombre d'individus introduit peut donc être décisif, le nombre d'évènement d'introduction l'est tout autant ; les introductions multiples (connectées ou non d'un point de vue spatial et/ou temporel) peuvent par conséquent diminuer les effets Allee (Liebhold & Tobin 2008). De plus, il semble que ces introductions répétées soient monnaie courante, même dans le cas d'introductions non intentionnelles (Khamis et al. 2009; Zepeda-Paulo et al. 2010; Boubou et al. 2012). La chrysomèle des racines de maïs, *D. virgifera virgifera*, introduite à de multiples reprises en Europe (cinq introductions indépendantes identifiées depuis le Nord-Est américain) en est le parfait exemple (Miller et al. 2005; Ciosi et al. 2008). La pression de propagule qui intègre les deux facteurs énoncés préalablement (nombre d'individus introduits et nombre d'introductions) est apparue comme le facteur le plus important pour la réussite ou non d'une invasion. Une pression de propagule élevée conduit non seulement à une diminution de la stochasticité du phénomène mais également à une augmentation de la diversité génétique dans les zones d'introductions.

1.7.d. Facteurs génétiques : des combinaisons gagnantes

Lors d'introductions non intentionnelles, le nombre d'individus introduits peut être très faible (Zayed et al. 2007; Lye et al. 2011). A titre d'exemple, le nombre effectif de fondateurs à l'origine du foyer d'invasion Sud-américain de *Drosophila subobscura* a été estimée entre 4 et 12 individus (Pascual et al. 2007). Par conséquent, la variabilité génétique introduite dans le nouveau milieu est souvent réduite par rapport à la diversité présente dans la zone d'origine (Puillandre et al. 2008; Ciosi et al. 2008; Auger-Rozenberg et al. 2012). On qualifie ce phénomène d'effet de fondation résultant de goulot d'étranglement génétique. La dérive génétique engendrée par les effets de fondation, d'autant plus forte si les populations restent de petites tailles pendant plusieurs générations, peut avoir des conséquences importantes dans la population invasive. Elle peut entraîner des pertes d'allèles, une modification aléatoire des fréquences alléliques ou encore une forte différenciation spatiale liée à un phénomène appelé "surf génétique" (Excoffier et al. 2009). En d'autres termes, une mutation survenant au niveau du front ou certains

³ Diminution de la fitness des descendants issus de croisements entre individus apparentés. Elle est observée chez des individus consanguins uniquement lorsque des mutations délétères récessives se retrouvent à l'état homozygote (Fauvergue et al. 2012).

allèles présent à de faibles fréquences dans la population d'origine peuvent être propagés rapidement et atteindre des fréquences élevées conduisant ainsi à une forte différenciation génétique entre la zone cœur (pouvant correspondre dans ce cas à la zone d'introduction) et la zone front.

La baisse de diversité génétique théorique (et/ou observée) est à l'origine du paradoxe invasif suggéré par certains auteurs (Allendorf & Lundquist 2003; Frankham 2005). En effet, comment des populations invasives dont la diversité génétique est faible sont-elles capables de s'adapter à un nouvel environnement ? Même si de nombreuses populations introduites semblent avoir subi un goulot d'étranglement, la réduction de diversité génétique observée est parfois faible ou nulle (Lombaert et al. 2010; Lombaert et al. 2011). De plus, des goulots d'étranglement d'intensité faible ou modérée peuvent permettre aux invasifs de maintenir une fitness élevée *via* une purge des allèles délétères favorisant ainsi l'invasion (Facon et al. 2011). En effet, cette purge permettrait d'atténuer la dépression de consanguinité et aurait donc un rôle important dans les premières phases de l'invasion mais aussi au niveau du front d'expansion. Par ailleurs, la polyploïdie et le taux de mutations élevé souvent associés aux insectes parthénogénétiques peuvent fournir une variabilité génétique même au sein de petites populations (Aukema et al. 2010). La polyandrie (i.e. une femelle pouvant être fécondée par plusieurs mâles) peut également limiter la perte de diversité génétique liée au goulot d'étranglement génétique contribuant ainsi au succès invasif en Europe du frelon asiatique, *Vespa velutina* (Arca 2012).

De plus, les introductions multiples peuvent également augmenter la variabilité génétique dans la population invasive, en particulier lorsque plusieurs populations sources génétiquement différenciées sont impliquées. Ainsi, la diversité rencontrée dans la zone de contact (Nord de l'Italie) des deux principaux foyers d'introductions de *D. virgifera virgifera* est plus importante que celles observées dans les foyers parentaux génétiquement très différenciés (Bermond et al. 2012). Des mises en contact de populations géographiquement isolées dans leur zone d'origine et/ou génétiquement différenciées peuvent conduire à l'apparition de nouvelles combinaisons génétiques absentes de la zone d'origine pouvant faciliter l'invasion. Ainsi l'hybridation des populations envahissantes de coccinelle asiatique, *H. axyridis*, avec des populations utilisées comme bio-contrôle en Europe pourrait avoir favorisé le succès invasif des populations introduites en Europe, depuis l'Est américain, *via* l'acquisition d'allèles leur conférant une fitness élevée (Lombaert et al. 2010; Facon et al. 2011; Turgeon et al. 2011).

1.7.e. Un scénario " tête de pont " : vers une généralisation ?

Ce concept de *Bridgehead* (tête de pont) désigne le fait qu'une population invasive serve de source pour des invasions ultérieures. Ce concept, emprunté au lexique militaire, a été formalisé il n'y a que peu de temps *via* l'invasion globale d'*H. axyridis* (Lombaert et al. 2010). Dans ce cas, les populations invasives du Nord-Est américain ont servi de source pour les invasions qui se sont produites ultérieurement en Europe, en Amérique du Sud et en Afrique du Sud. Depuis sa formalisation, ce scénario a été identifié dans les invasions d'au moins cinq espèces différentes : la fourmi de feu, *Solenopsis invicta* (Ascunce et al. 2011), l'acarien rouge de la tomate, *Tetranychus evansi* (Boubou et al. 2012), l'escargot petit-gris, *Cornu aspersum aspersum* (Guiller et al. 2012), l'herbacée *Silene latifolia* (Keller et al. 2012) ou encore l'ascidie *Microcosmus squamiger* (Rius et al. 2012). De plus, ce scénario semble généralisable à de nombreuses études antérieures (Downie 2002; Grapputo et al. 2005; Miller et al. 2005; Puillandre et al. 2008; Torres-Leguizamon et al. 2011). Guillemaud et collaborateurs (2011) suggèrent que les ravageurs invasifs des cultures pourraient s'établir généralement *via* des populations tête de pont. L'une des raisons pouvant expliquer cette généralisation réside dans le fait que ce scénario pourrait être vu comme le plus parcimonieux d'un point de vue évolutif. En effet, les changements évolutifs liés à l'invasion n'auraient lieu qu'une seule fois (dans la population tête de pont) contrairement à de multiples changements lors d'invasions indépendantes provenant de différentes sources (Lombaert et al. 2010; Guillemaud et al. 2011). Pour pouvoir démontrer l'existence d'un tel scénario, Guillemaud et collaborateurs (2011) estiment qu'une bonne connaissance de la distribution géographique des espèces, aussi bien dans la zone d'origine que dans la zone envahie, ainsi qu'une connaissance des routes d'invasion sont nécessaires. Les caractéristiques de la zone primaire d'invasion peuvent également expliquer l'apparente généralisation d'un tel scénario. Si cette zone représente un carrefour commercial ou plus généralement une importante zone d'échanges (e.g. zone portuaire, aéroport, etc.) où le trafic est élevé et fortement connectée à d'autres régions, la probabilité de donner lieu à des invasions secondaires sera alors d'autant plus grande (Floerl et al. 2009).

Ce scénario *Bridgehead* démontre que la vision que l'on avait jusqu'à maintenant des invasions biologiques est un peu dépassée, à savoir que les populations sources pouvaient être souvent originaires de zones différentes des aires natives. Les introductions suivant un scénario " tête de pont " mettent également en avant l'importance du traçage de l'origine des populations invasives pour la compréhension du phénomène " invasion biologique ". Les progrès techniques et méthodologiques réalisés en génétique des populations, notamment le développement d'outils moléculaires pertinents, ont permis le traçage de l'origine des populations invasives (e.g. Miller et al. 2005; Lombaert et al. 2010; Ascunce et al. 2011) et par conséquent la mise en

évidence de voies d'introduction, parfois insoupçonnées. De plus, les analyses de génétique des populations permettent également de déterminer la composition génétique des populations invasives. De l'*admixture* entre des populations différenciées, pouvant refléter des introductions multiples, peut alors être décelée, là où les méthodes plus classiques (e.g. observations historiques, morphologiques, comportementales, etc.) ne permettaient pas de distinguer différents événements d'introductions. La reconstruction des routes d'invasion permet donc une meilleure compréhension des mécanismes évolutifs et environnementaux impliqués lors d'invasions (Estoup & Guillemaud 2010). Dès lors que la population source a été identifiée, il est alors possible de mettre en évidence d'éventuels changements phénotypiques ou des traits d'histoire de vie entre les populations invasives et leurs sources respectives (e.g. Keller & Taylor 2008; Turgeon et al. 2011). De plus, retracer les routes d'invasions offre des possibilités pour, à la fois, mettre en œuvre des stratégies afin d'éviter toute nouvelle introduction mais aussi des programmes de gestion appropriés (Estoup & Guillemaud 2010). Le traçage des voies d'introductions permet, par exemple dans le cadre d'un programme de lutte biologique contre un invasif, d'orienter les recherches dans la zone identifiée comme source pour sélectionner la souche la plus efficace pour l'introduction d'un prédateur ou d'un parasite.

I.8. Succès invasif : un succès à deux vitesses

Comme discuté précédemment *via* la phase de latence ou encore au travers de l'*Invasion debt*, la dynamique spatio-temporelle d'une invasion est variable. Ce phénomène peut être vu comme un phénomène "à deux vitesses". Certaines espèces vont proliférer démographiquement et spatialement mais vont cependant, rester relativement cantonnées à la zone d'introduction. D'autres (bien que n'étant pas les plus fréquentes) vont au contraire se propager à une vitesse fulgurante dans leur nouveau milieu colonisant parfois de vastes aires géographiques en un temps très court. Pour illustrer ce phénomène et introduire au mieux la problématique dans laquelle s'inscrit cette thèse, mais aussi parce que le régime phytophage prédomine parmi les espèces introduites (cf. section I.3. Les insectes : une grande partie du problème), j'ai listé les espèces d'insectes phytophages, se développant sur des ligneux, qui se sont propagées en Europe très rapidement sur de larges surfaces (i.e. taux de propagation arbitraire correspondant à plus d'un pays colonisé par an depuis la première détection). Ainsi, sur la base des 127 espèces identifiées comme introduites au cours de la période 1995–2010 (projet ISEFOR), seulement 8% des espèces (i.e. 10 espèces) répondaient à ce critère (TABLEAU 2). Ces espèces sont maintenant présentes sur de vastes étendues géographiques et n'ont probablement pas fini leur prolifération. Bien que cette démarche soit discutable (notion de "pays" plus ou moins vague ; surfaces des invasions calculées à partir de la

surface totale de chacun des pays où l'espèce a été détectée et ne reflétant très certainement pas la distribution réelle probablement mieux décrite par la distribution de leurs hôtes), cette approche illustre cependant bien ce phénomène d'invasions à très grande échelle sur une période de temps très courte. Néanmoins, au vu de ce tableau, aucun n'élément convergeant sur la réussite de ces différentes invasions ne semblent se dégager.

Pour comprendre quels pouvaient être les facteurs sous-jacents à la réussite d'une invasion si rapide et de si grande ampleur, j'ai par conséquent choisi de m'intéresser à l'une des espèces dont l'invasion européenne est considérable tant en termes de rapidité que de surface conquise, *Leptoglossus occidentalis* (TABLEAU 2).

TABLEAU 2. Liste et principales caractéristiques des invasions fulgurantes d'insectes phytophages se développant sur ligneux introduits en Europe entre 1995 et 2010. Une invasion fulgurante correspond ici à la colonisation de plus d'un pays par an. Modifié d'après ISEFOR 2014.

Ordre taxonomique	Famille	Espèce	Gamme d'hôtes en Europe	Zone d'origine	Pays de 1 ^{ère} obs.	Date de 1 ^{ère} obs.	Type de milieux	Impact	Nombre de pays envahis	Surface de l'invasion (x10 ⁶ km ²)
Hemiptera	Psyllidae	<i>Acizzia jamatonica</i>	<i>Albizzia julibrissima</i>	Asie de l'Ouest	Italie	2002	Plantes ornementales	Affecte la photosynthèse	11	1,95
Hymenoptera	Argidae	<i>Aproceros leucopoda</i>	<i>Ulmus</i>	Asie tempérée	Pologne	2003	Forêt	Affecte la photosynthèse	11	6,50
Hemiptera	Lygaeidae	<i>Belonochilus numenius</i>	Platanaceae (<i>Platanus</i>)	Amérique du Nord	France	2008	Plantes ornementales	Affecte la photosynthèse	6	1,58
Lepidoptera	Pyralidae	<i>Cydalima perspectalis</i>	<i>Buxus</i>	Asie	Allemagne	2007	Plantes ornementales	Affecte la photosynthèse	15	6,50
Hymenoptera	Cynipidae	<i>Dryocosmus kuriphilus</i>	<i>Castanea</i>	Asie Tempérée	Italie	2002	Forêt	Réduit la croissance, limite la production de graines	11	1,62
Hemiptera	Psyllidae	<i>Glycaspis brimblecombei</i>	<i>Eucalyptus</i>	Australie	Espagne	2007	Forêt, Plantes ornementales	Affecte la photosynthèse	7	1,60
Hymenoptera	Eulophidae	<i>Leptocybe invasa</i>	<i>Eucalyptus</i>	Asie australe	Portugal	2003	Forêt, Plantes ornementales	Réduit la croissance	9	1,80
Hemiptera	Coreidae	<i>Leptoglossus occidentalis</i>	Pinaceae, Cupressaceae	Amérique du Nord	Italie	1999	Forêt	Limite la production de graines	25	9,20
Hemiptera	Psyllidae	<i>Macrohomonotoma gladiata</i>	<i>Ficus</i>	Asie	Espagne	2009	Plantes ornementales	Affecte la photosynthèse	3	0,80
Diptera	Cecidomyiidae	<i>Obolodiplosis robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Amérique du Nord	Italie	2003	Plantes ornementales	Affecte la photosynthèse	25	8,00

II. OBJECTIFS DE LA THÈSE

Leptoglossus occidentalis, la punaise prédatrice des graines de conifères, est présente en Europe depuis la fin des années 1990 et a conquis une grande partie du territoire (voire la totalité). La question centrale de cette thèse est par conséquent, comment expliquer la fulgurance de cette invasion ? J'ai fait l'hypothèse que la vélocité de cette invasion pouvait être due à :

- Une invasion selon un scénario " tête de pont " combiné à des introductions multiples dans des parties géographiquement distantes du continent, en d'autres termes des introductions multiples depuis la zone d'invasion primaire (i.e. le Nord-Est américain)
- Une dispersion sur de longues distances comme passagers clandestins véhiculés notamment par containers, ces transports accidentels étant particulièrement liés au comportement grégaire et intrusif des adultes à l'automne
- Des capacités de compétition supérieures ; *Leptoglossus occidentalis* présente une importante polyphagie, une prise alimentaire ectophyte contrairement à de nombreux insectes partageant la même ressource (i.e. cônes et graines de conifères) et des capacités de vol élevées lui permettant de se déplacer au sein de son nouvel environnement ainsi que de contourner des conditions défavorables.

J'ai par conséquent décidé de tester ces différentes hypothèses par une approche multidisciplinaire. Il convenait dans un premier temps de retracer les routes d'invasions et de reconstruire l'histoire invasive européenne *via* une étude de génétique des populations. Dans un second temps, j'ai tenté de déterminer si la polyphagie observée dans la zone d'origine lui permettait de s'adapter aux nouveaux hôtes disponibles dans la zone d'introduction mais aussi d'évaluer les impacts potentiels de ce nouveau ravageur sur la production de graines. Les relations avec les espèces indigènes partageant la ressource ont ensuite été étudiées par des expérimentations en conditions contrôlées et des observations en champs. Enfin, les capacités de vol de l'insecte ont été estimées en utilisant des moulins de vol et en s'intéressant à différents facteurs pouvant influencer sur ces dernières.

Les différents travaux réalisés au cours de cette thèse ont été menées au sein de l'Unité de Recherche de Zoologie Forestière (URZF, INRA Orléans) bénéficiant ainsi de l'expérience de l'unité, impliquée depuis de nombreuses années dans les principaux programmes européens traitant des invasions biologiques tels que PRATIQUE, ALARM, DAISIE et plus récemment REPHRAME et ISEFOR

(projet co-financeur de cette thèse, ayant pour but de déterminer et d'accroître les connaissances sur les nouvelles menaces pesant sur les forêts européennes, menaces représentées par les espèces invasives et les changements climatiques).

La suite du manuscrit s'organise de la manière suivante : une revue de la littérature visant à présenter les connaissances précédemment acquises sur ce ravageur aussi bien dans la zone native que dans la(es) zone(s) d'introduction et nécessaire pour la compréhension d'une telle étude. Cet état de l'Art sera suivi de deux parties correspondant aux axes d'études. La première partie porte sur la caractérisation génétique des populations natives et invasives et s'articule autour de deux articles, l'un publié dans le journal *Conservation Genetics Resources*, l'autre en voie de soumission. La seconde partie s'intéressant aux caractéristiques biologiques et écologiques des populations invasives européennes, est constituée de quatre chapitres. Le premier correspond à un article publié dans la revue *Biological Invasions*. Les trois chapitres suivants sont, eux, plus exploratoires et sont ainsi présentés de manière plus académique. Enfin, une discussion générale ainsi que des perspectives qui résultent de ce travail seront intégrées dans une dernière partie de conclusion. Le matériel ainsi que les méthodes utilisées pour répondre à chaque objectif sont décrits dans chacun des chapitres.

PRÉSENTATION DU MODÈLE BIOLOGIQUE
Leptoglossus occidentalis

Le genre *Leptoglossus* Guérin-Ménéville compte plus d'une cinquantaine d'espèces largement distribuées dans les régions néarctique et néo-tropicale depuis le Sud du Canada, les États-Unis, le Mexique, les Antilles, l'Amérique Centrale jusqu'en Amérique du Sud incluant le Chili et l'Argentine (Heidemann 1910; Allen 1969; Packauskas & Schaefer 2001; Brailovsky & Barrera 2004). Seule une espèce, *Leptoglossus gonagra*, est retrouvée naturellement en dehors des continents américains, cette espèce étant signalée en Afrique, en Asie du Sud-Est, dans les Îles du Pacifique et en Australie.

Les adultes de *L. occidentalis* sont aisément reconnaissables à leur grande taille (2 cm de long en moyenne pour les femelles contre 1,6 cm pour les mâles), à la forme du tibia de leurs pattes postérieures élargi en une projection plate (d'où leur nom anglais de " *leaf-footed bug* ") et à leurs héli-élytres d'une couleur brun-rougeâtre à brun foncé possédant une ligne blanche transverse en zig-zag caractéristique. Même si les femelles ont une taille généralement plus importante que les mâles, il n'existe pas de dimorphisme sexuel clairement établie. L'examen (visuel) de l'appareil génital permet en revanche une identification rapide (FIGURE 5).

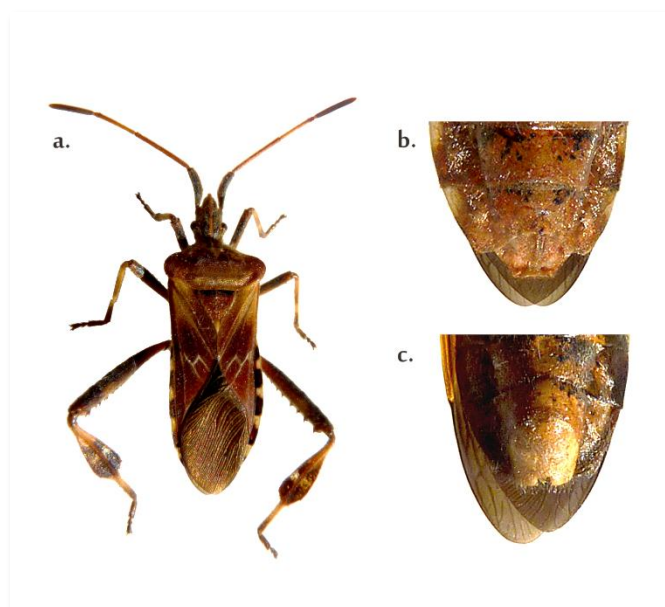


FIGURE 5. Punaise prédatrice des graines de conifères, *Leptoglossus occidentalis*.

a. Adulte en vue dorsale ; b-c. Dimorphisme sexuel, extrémité ventrale de l'abdomen (b. Femelle et c. Mâle).

I. DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

I.1. Amérique du Nord : zone d'origine et invasion primaire

La zone native de *L. occidentalis* s'étendrait sur toute la façade Ouest de l'Amérique du Nord au sens large (FIGURE 6), depuis les provinces canadiennes de Colombie Britannique et d'Alberta au Nord jusqu'à Veracruz au Mexique pour la limite Sud, le Colorado, le Wyoming et le Montana correspondant aux limites Est (Heidemann 1910; Koerber 1963; Hedlin et al. 1980; Cibrián Tovar et al. 1995; Zhu et al. 2013). Cependant, la répartition de l'espèce correspondrait plus exactement à la distribution de ses plantes hôtes, les Pinaceae. Néanmoins, cette vaste zone géographique représente des zones bioclimatiques variées et suggère donc que l'espèce présente une grande plasticité.

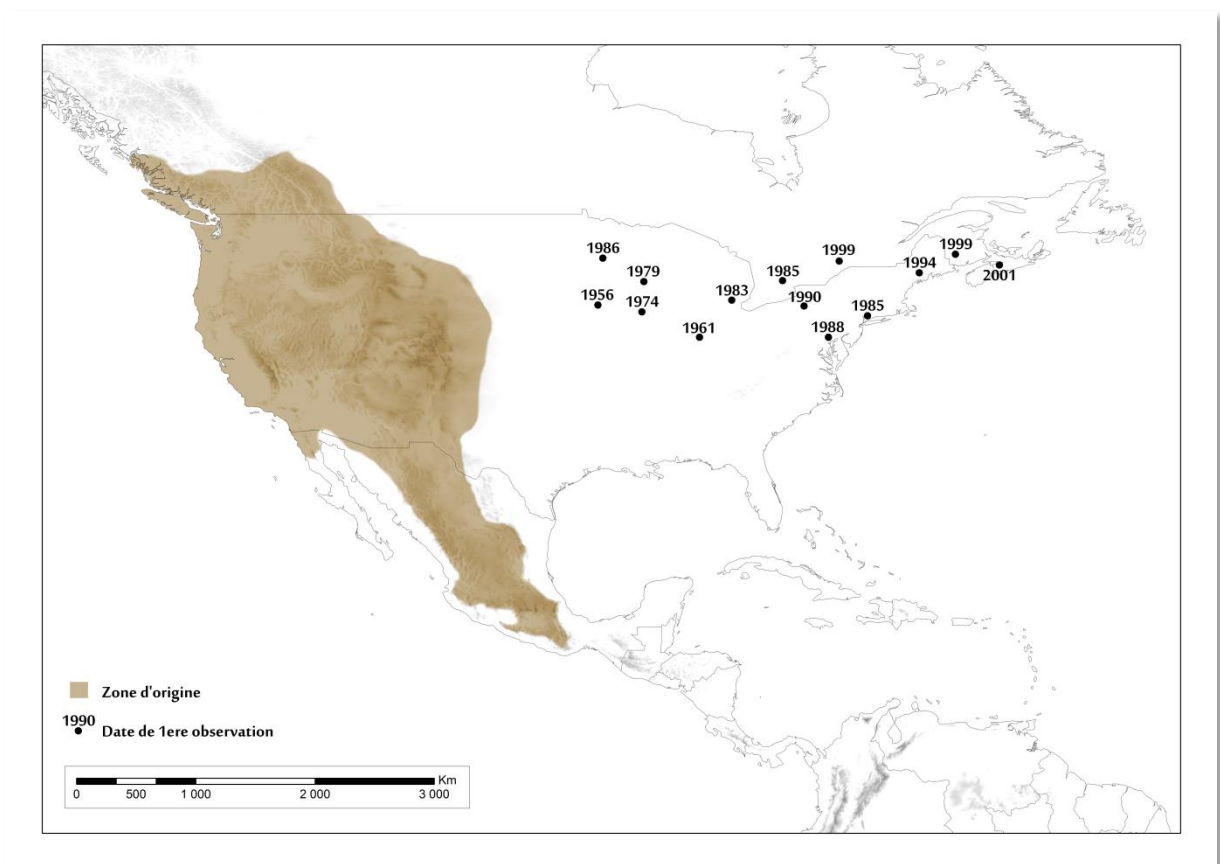


FIGURE 6. Distribution Nord-américaine de *Leptoglossus occidentalis* : zone d'origine et zone d'invasion.

Son expansion à l'Est a naturellement été limitée par les Grandes Plaines où les Pinaceae sont quasiment absents. Cependant au cours de la seconde moitié du XXe siècle, *L. occidentalis* est observée au-delà des Rocheuses, probablement introduite accidentellement par l'Homme (FIGURE 6).

L'espèce est pour la première fois signalée en Iowa en 1956 (Schaffner 1967), s'en suit alors une formidable progression dans tout le Nord-Est américain. Dans les années 1970, elle est découverte dans le Wisconsin et l'Illinois, elle atteint le Minnesota, le Michigan, l'Ontario et le Connecticut dans les années 1980. L'invasion se poursuit vers le Nord-Est américain dans les années 1990 et 2000 colonisant ainsi tous les états de la côte Est, le Connecticut (confirmation de la présence), la Pennsylvanie, New York, le Massachusetts, le New Hampshire et le Maine mais aussi les provinces canadiennes du New Brunswick et de la Nouvelle Écosse (McPherson et al. 1990; Marshall 1991; Gall 1992; Wheeler 1992; Ridge-O'Connor 2001; O'Shea et al. 2005).

I.2. Europe, Asie, Afrique du Nord vers une invasion globale ?

En Europe (FIGURE 7), l'espèce est pour la première fois observée dans le Nord de l'Italie, près de Vicenza dans le Veneto, en 1999 vraisemblablement arrivée par Venise et transportée *via* le commerce maritime (Bernardinelli & Zandigiacomo 2001; Taylor et al. 2001). Elle est ensuite très vite signalée en Lombardie et dans le Frioul mais également dans les Abruzzes, la région de Naples et même en Sicile dès 2002 (Bernardinelli & Zandigiacomo 2001; Taylor et al. 2001; Olivieri 2004; Villa et al. 2001; Maltese et al. 2009). L'espèce continue sa progression en Europe et est ainsi observée dans le Sud de la Suisse en 2002 et en Slovénie en 2003 (Gogala 2003). Cette même année marque également le premier signalement de l'espèce en Espagne, dans la région de Barcelone (Ribes & Escolà 2005). Cette nouvelle observation et la discontinuité avec les autres observations européennes interroge sur une nouvelle introduction ou une translocation d'individus depuis l'Italie. L'espèce poursuit sa colonisation en 2004 en Croatie (Tescari 2004) et en Hongrie (Harmat et al. 2006), en 2005 en Autriche (Rabitsch & Heiss 2005) et en Corse (Dusoulie et al. 2007), en 2006 dans le Sud de l'Allemagne (Werner 2006), en République Tchèque (Kment & Baňar 2008), en Serbie (Protić 2008) et dans le Sud de la France (Dusoulie et al. 2007), en 2007 en Slovaquie (Majzlan & Roháčová 2007) et en Pologne (Lis et al. 2008). Jusqu'alors absente du Nord-Ouest européen, l'espèce est détectée en 2007 au Royaume-Uni (Malumphy et al. 2008), aux Pays-Bas (Aukema et al. 2009), en Belgique (Aukema & Libeer 2007) et est également interceptée en France au Havre dans un container provenant de Pennsylvanie (Dusoulie et al. 2007). Ces nouvelles observations suggèrent une nouvelle introduction dans ces régions occidentales. L'invasion du continent européen se poursuit en 2008 en Espagne où elle est observée en différents points géographiquement éloignés (Pérez Valcárcel & Prieto Piloña 2010), en Bulgarie (Simov 2008), en Grèce (Petrakis 2011), et en Moldavie (Derjanschi 2010), en 2009 au Danemark et Norvège pour les observations nordiques (Mjøs et al. 2010), et en Roumanie (Ruicănescu 2009) et Turquie concernant l'expansion orientale (Fent & Kment 2011; Hizal 2012). Le Portugal, la Suède, l'Ukraine et la Sud-Est

de la Russie seront eux aussi touchés entre 2010 et 2012 (Sousa & Naves 2011; Gapon 2012; Lindelöw & Bergsten 2012). Ainsi en seulement 13 années, l'espèce a conquis la quasi-totalité du continent européen à l'exception du Nord-Est et de l'Irlande.

De plus, en parallèle à l'invasion européenne, des observations récentes en Asie (Japon) (Ishikawa & Kikuhara 2009), Chine (Zhu 2010), Corée du Sud (Ahn et al. 2013)) et en Afrique du Nord (Ben Jamaa et al. 2013) suggèrent que ce ravageur est maintenant devenu un " envahisseur mondial ".

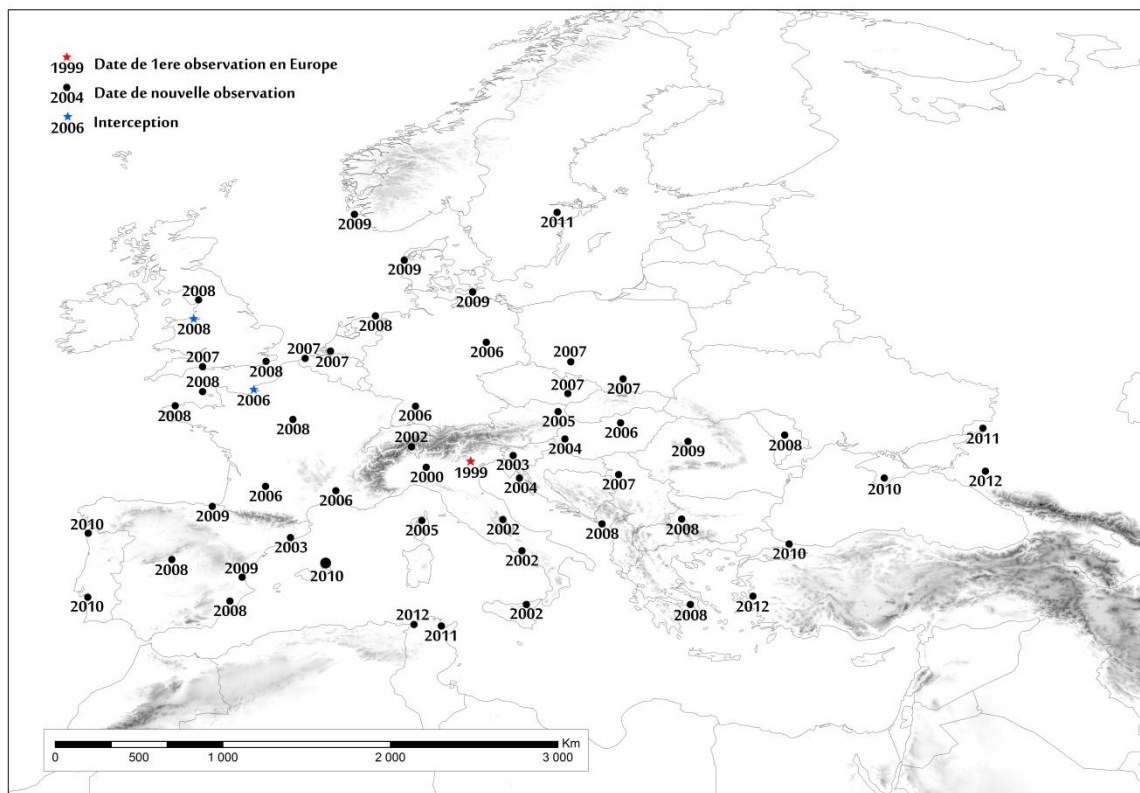


FIGURE 7. Distribution européenne de *Leptoglossus occidentalis*.

Aujourd'hui, les populations européennes sont bien installées comme en témoignent les observations nombreuses et répétées dans les sites infestés depuis les premières détections. Cependant, en Europe comme dans en Amérique du Nord (W. Strong, comm.pers), l'espèce montre une dynamique des populations chaotique (i.e. large fluctuation annuelle du niveau des populations en fonction des sites considérés) en différents points; Région orléanaise (pers. obs.), Sud-Est de la France (C. Blazy et A. Roques comm. pers), Italie (Tamburini et al. 2012). Les causes de ces fluctuations importantes sont, pour le moment, totalement ignorées.

II. BIOLOGIE ET ÉCOLOGIE

II.1. Cycle biologique

Le cycle biologique montre des différences notables en fonction des zones géographiques (FIGURE 8).

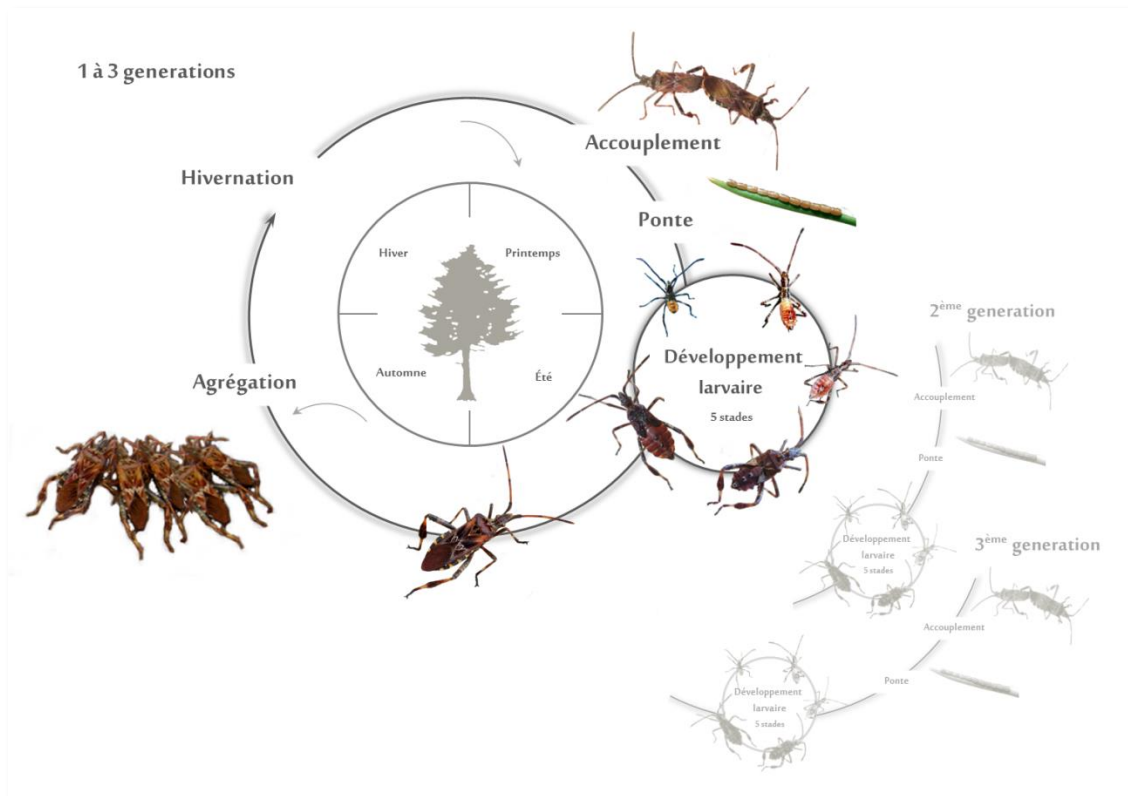


FIGURE 8. Cycle biologique de *Leptoglossus occidentalis*.

Initialement décrite comme univoltine en Californie du Nord et plus généralement dans sa zone d'origine (Koerber 1963; Hedlin et al. 1980), des observations plus récentes suggèrent qu'une seconde génération partielle pourrait exister en Colombie Britannique (Bates et al. 2002) alors que deux à trois générations par an sont observées au Mexique où tous les stades de développement sont présents tout au long de l'année (Cibrián Tovar et al. 1995). En Europe, de récentes études menées en Italie (Bernardinelli et al. 2006; Tamburini et al. 2012) et en Espagne (Más et al. 2013) ont montré l'existence de plusieurs générations annuelles (jusqu'à trois). Les adultes quittent leurs sites d'hivernation au printemps et la période d'accouplement commence à partir d'avril-mai et se

prolonge au cours de l'été. Les adultes (aussi bien mâle que femelle) peuvent s'accoupler à de nombreuses reprises (Koerber 1963). La femelle pond ses œufs semi-cylindriques par séries alignées de 3 à 20, généralement sur la face ventrale des aiguilles, pour un total moyen de 73-80 œufs par femelle (Cibrián Tovar et al. 1995; Bates & Borden 2005). Ces derniers éclosent 10 à 15 jours après la ponte. Le développement larvaire se compose de cinq stades (Koerber 1963). Les larves (ici appelées nymphes) ont un abdomen rouge au début du développement puis deviennent complètement brun foncé durant les derniers stades. Les nymphes se développent tout comme les adultes au détriment des graines de conifères. Bates et Borden (2005) ont établi des tables de survie de *L. occidentalis* sur *Pinus contorta* et ont montré une forte mortalité des jeunes nymphes (> à 80%) pour aboutir à un résultat final de 9,3% des œufs initiaux capables de donner un adulte. À l'automne, les adultes cherchent un site pour hiverner et peuvent se regrouper pour former, dans certains cas, d'importantes agrégations pouvant dépasser les 2000 individus (Blatt 1994). Il semble que ces rassemblements soient gouvernés par l'émission d'une phéromone produite par le mâle (Blatt & Borden 1996). Les sites d'hivernation sont variables, des cavités d'arbres, des nids, mais cette espèce présente également une forte affinité pour les structures créées par l'Homme telles que des empilements de bois, des containers, des hangars ou des habitations (Koerber 1963; Blatt 1994; Tamburini et al. 2012).

II.2. Des habitudes alimentaires variées ...

Adultes et nymphes se nourrissent en insérant leurs stylets buccaux à travers les tissus des cônes et cônes jusqu'aux graines (Bates et al. 2000; Strong et al. 2001; Bates et al. 2002) (cf. ENCADRÉ 1, pour plus de détails sur le développement des cônes), dont ils digèrent le contenu *via* l'action de toute une batterie d'enzymes salivaires (Bates et al. 2001; Lait et al. 2001). Bien que spécialisé dans l'exploitation des graines de conifères, l'insecte démontre une polyphagie importante et a été signalé sur de nombreuses espèces dans sa zone native. Aux USA et au Canada, ce ravageur s'attaque en particulier au Sapin de Douglas, *Pseudotsuga menziesii*, et aux pins indépendamment de leur section botanique, notamment *Pinus contorta*, *P. monticola*, *P. radiata*, *P. ponderosa* (Hedlin et al. 1980) mais aussi à la plupart des espèces de pins présentes au Mexique (Cibrián Tovar et al. 1995), zone correspondant à un *hotspot* de diversité pour le genre *Pinus* (Eckenwalder 2009). L'espèce a également été notée sur différents espèces du genre *Abies*, mais aussi *Larix*, *Picea*, *Tsuga* et de manière plus anecdotique sur *Pistacia* sp. (Rice et al. 1985). Au total, *L. occidentalis* compte plus d'une quarantaine d'espèces hôtes dans la zone d'origine.

Cette large gamme d'hôtes semble s'accroître davantage au regard des observations en Europe et des nouvelles essences natives européennes auxquelles la punaise est maintenant confrontée. En effet, l'espèce a été observée sur *Pinus halepensis*, *P. pinea*, *P. nigra*, *P. sylvestris*, *P. mugo*, *Pseudotsuga menziesii*, *Larix decidua* mais aussi *Picea*, *Abies*, *Cedrus* ou encore *Juniperus* (Villa et al. 2001; Maltese et al. 2009; Tamburini et al. 2012).

ENCADRÉ 1. Les différentes phases de développement des cônes chez les conifères.

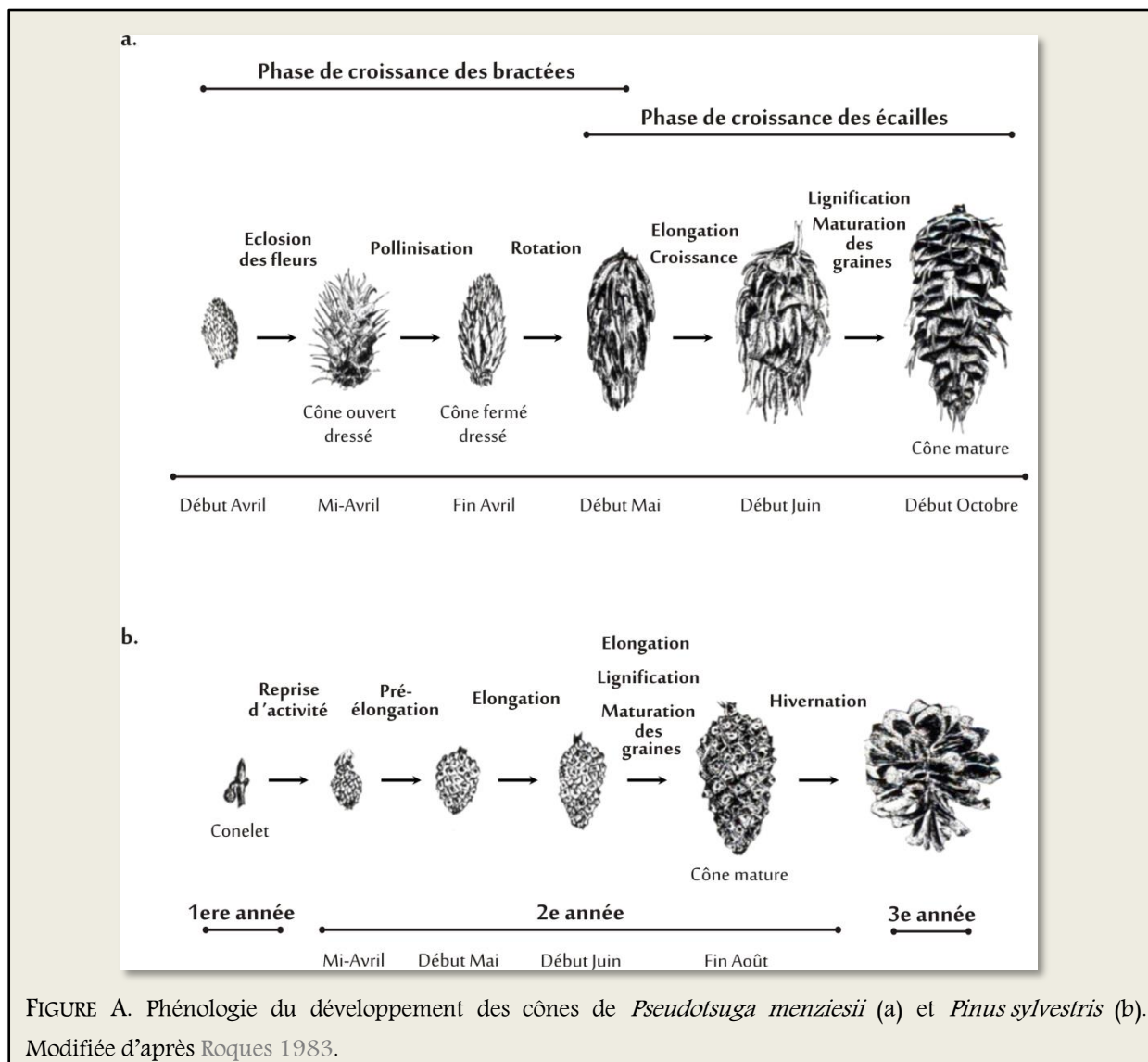
Chez la plupart des Gymnospermes, les cônes correspondent à l'évolution des inflorescences femelles. Ces dernières sont constituées par des écailles ovulifères insérées à l'aisselle des bractées (parfois soudées chez certaines essences). Si les écailles ovulifères deviennent charnues dans certains cas (i.e. genévriers), les écailles vont majoritairement se lignifier après la fécondation. Cette lignification des écailles entraîne alors la formation du cône typique.

En fonction des essences, le développement des cônes peut s'étaler dans le temps. On peut cependant distinguer les essences des genres *Abies*, *Larix*, *Picea* et *Pseudotsuga* chez qui tous les processus (i.e. croissance des bractées, pollinisation, croissance des écailles, formation des graines, lignification et maturité des graines) ont lieu la même année (FIGURE A), des essences du genre *Pinus*. En effet, chez les pins, notamment de la section *silvestris*, le développement des cônes et des graines s'étalent sur deux années. La première année (printemps) correspond à la transformation de l'inflorescence femelle en un conelet (on parle de cône de 1^{ère} année) et la pollinisation de celui-ci. Au printemps suivant, il y a aura une reprise d'activité et le conelet va alors entamer un processus d'elongation qui se poursuivra par une lignification. A l'automne le cône arborera une coloration brune (cône de 2^{ème} année), les graines seront alors matures et seront libérées au printemps suivant (FIGURE A).

Cependant pour certaines essences de pin (e.g. *Pinus pinaster* et *P. pinea*), la maturation du cône s'étendra sur trois années. De même, le genre *Cedrus*, quant à lui, a une phénologie particulière du développement de l'inflorescence femelle. Ainsi, le développement des cônes de *Cedrus atlantica* dure trois ans, les inflorescences femelles apparaissent en septembre de la première année et la désarticulation a lieu au cours des mois de novembre-décembre de la troisième année.

Aux différentes phases de développement, on peut associer des modifications biochimiques internes au cône. Les variations de la teneur en eau sont caractéristiques de l'évolution du développement du cône. En effet, la teneur en eau connaît une nette augmentation dès la reprise d'activité lors de la deuxième année de développement des cônes de *Pinus sylvestris* pour atteindre son maximum début juin avant le processus de lignification. Les concentrations de cellulose et hémicellulose sont inversement proportionnelles à la concentration en eau. Début juin correspond donc à la période où les réserves nutritives sont maximales. Elles seront ensuite transformées en matériaux cellulosiques afin de former le cloisonnement ainsi que les tissus des graines.

Le cône offre donc aux insectes un habitat particulier en évolution permanente (changement des caractéristiques physiques et chimiques tout en étant une simultanément une source directe ou indirecte de nourriture.



II.3. ... Aux conséquences néfastes

Cette espèce est considérée en Amérique du Nord comme l'un des principaux ravageurs des graines de conifères en vergers à graines⁴. Cependant, l'importance des dégâts semble varier selon les essences de conifères. Ainsi, la diminution de la proportion de graines pleines (i.e. graines saines et donc viables) de *Pseudotsuga menziesii* a été évaluée à 70% dans les vergers à graines de Colombie

⁴ Un verger à graines est défini par l'OCDE comme une plantation de clones ou de descendances sélectionnées, suffisamment isolée ou spécialement gérée pour que les pollinisations exogènes soient inexistantes ou faibles, conduite pour obtenir une production de graines fréquente, abondante et de récolte aisée. Les arbres constituant un verger sont issus de la sélection pour des caractères économiques importants (adaptation au milieu, vigueur, forme, etc.) qui se pollinisent librement ou par croisement artificiels. Ces vergers sont particulièrement utiles dans des programmes de reforestation (Philippe et al. 2006).

Britannique (Bates et al. 2000). Strong et collaborateurs (2001) ont établi que, sous bonnettes, le nombre de graines pleines par cône de *Pinus contorta* était réduit à un par une femelle et sa progéniture contre 28 pour le témoin. En revanche sur *Pinus albicaulis*, la diminution du nombre de graines pleines ne porterait selon les auteurs que sur 0.3–2.1% (Anderton & Jenkins 2001) à 27% (Kegley et al. 2001), comme sur *P. cembroides* au Mexique (30% selon Cibrian Tovar et al. 1995). Si les dégâts semblent variables selon l'espèce, ils varient également en fonction des stades de développement de la punaise ou plus particulièrement de la période d'alimentation. Ainsi, Strong (2006) en exposant des cônes de *P. contorta* tout au long de la saison, a montré que la prise alimentaire des femelles au printemps était le plus dommageable pour la production de graines viables. De plus, bien qu'adultes et nymphes soient majoritairement observés sur cônes, les conelets peuvent servir de source alternative de nourriture chez certaines essences lorsque les cônes de deuxième année viennent à manquer. Une telle prise alimentaire peut provoquer l'avortement du conelet et par conséquent avoir des répercussions importantes sur les rendements en graines de l'année suivante. Un avortement de 75% des conelets soumis à des punaises, avec une réduction de 47% du contenu en graines des survivants, est observé chez *P. monticola* mais les conelets de *P. contorta* ne sont quant à eux pas attaqués (Bates et al. 2002). Cependant, le taux d'avortement des conelets tombe à 10% quand des cônes de deuxième année de *P. monticola* sont disponibles.

Bates et collaborateurs (2000) qui ont caractérisé les dégâts par radiographie X sur graines de *Pseudotsuga menziesii*, montrent un évident progressif de celles-ci jusqu'à la production de graines totalement vides (Bates et al. 2001; Lait et al. 2001). Cette hydrolyse des réserves provoque une diminution drastique des capacités germinatives de la graine, seulement 14 à 18% des graines attaquées ont été capables de germer. Ces résultats sont à relier à la modélisation réalisée par Bates & Borden (2005) sur *Pinus contorta*. Les auteurs ont estimé qu'une densité hypothétique d'un individu par arbre conduirait à une perte de 310 graines (Bates & Borden 2005). Par conséquent, au vue de l'importante valeur marchande de telles graines (compris entre 500 et 5000 \$US / kg en fonction des espèces), les dégâts infligés par *Leptoglossus occidentalis* représentent un impact économique non négligeable dans la zone d'origine où les vergers à graines sont très largement impliqués dans les programmes de reforestation. Les différents travaux menés dans la zone d'origine se sont principalement concentrés sur la caractérisation des dégâts et l'évaluation de l'impact de ce ravageur en vergers à graines. En revanche, l'impact de ce prédateur de graines en peuplement naturel et donc, son impact sur la régénération naturelle n'a jamais été abordé.

En Europe, les conséquences économiques et écologiques de cette introduction pourraient être importantes. Roversi et collaborateurs (2011) ont estimé que depuis l'introduction de la punaise en Italie, la production de graines comestibles de *Pinus pinea* a très nettement diminué, les récoltes

de cônes de 2009 s'étant effondrées. Ces constatations semblent confirmé par les entreprises locales qui ont été contraintes d'arrêter l'exploitation, considérant que les récoltes n'étaient économiquement plus viables (Bracalini et al. 2013). Cependant en Europe, aucune étude précise d'impact quantitatif sur graines n'a pour le moment été menée aussi bien en verger à graines qu'en peuplement naturel (ce dernier point est également valable pour la zone d'origine). De même, aucun test de sensibilité comparative d'essences de conifères exposées aux mêmes insectes en conditions contrôlées n'a été réalisé aussi bien dans la zone native que dans la zone d'invasion.

De nombreuses lacunes persistent concernant l'évaluation des dégâts et, par conséquent, l'impact de cet insecte dans la zone d'introduction. Si l'impact de ce ravageur des graines peut être important, le limiter apparaît pour le moment difficile. L'insecte ayant apparemment échappé à ses prédateurs, aucune méthode de lutte efficace n'existe jusqu'à maintenant.

II.4. Moyens de lutte et cortège parasitaire

Le contrôle des populations dans la zone d'origine procède essentiellement de l'utilisation d'insecticides à large spectre (Rappaport et al. 1994; Strong et al. 2001). Les résultats sont variables mais la lutte chimique représente le seul moyen de contrôle "efficace" des populations (Strong 2006). Des piégeages utilisant l'attractivité du rayonnement infra-rouge pour les adultes ont récemment été réalisés à titre expérimental (Takács et al. 2009), cependant aucune technique de piégeage n'existe pour le moment.

Seuls quelques travaux ont considéré le spectre parasitaire, qui apparaît limité dans la zone d'origine. Trois espèces d'Hyménoptères ont été identifiées comme parasitoïdes des œufs, *Gryon pennsylvanicum* (Scelionidae), *Anastatus pearsalli* (Eupelmidae) et *Ooencyrtus johnsoni* (Encyrtidae) en Colombie-Britannique et Californie (Bates & Borden 2004; Maltese et al. 2012). Les auteurs ont montré dans leurs études que le taux de parasitisme des œufs pouvait atteindre 30%, avec *G. pennsylvanicum* comme espèce largement dominante. A ce titre, cette espèce fait l'objet de récentes études afin de déterminer l'efficacité et la pertinence d'une éventuelle introduction européenne en vue d'un contrôle biologique (Peverieri et al. 2012; Peverieri et al. 2013; Roversi et al. 2014). Une mouche tachinaire, *Trichopoda pennipes*, a aussi été observée parasitant des adultes dans la zone américaine envahie et plus exactement dans Connecticut (Ridge-O'Connor 2001). J'ai également pu observer au cours de cette thèse de manière assez sporadique des adultes parasités par une mouche tachinaire (œufs directement pondus sur l'insecte ou larves émergeant des adultes pour effectuer leurs pupes). Il semblerait qu'il s'agisse d'*Ectophasia crassipennis* mais de futures investigations doivent confirmer (ou non) cette identification. Même si les parasitoïdes natifs d'Europe, *Anastatus bifasciatus* et *Ooencyrtus pityocampae* ont été retrouvés parasitant certaines pontes de

L. occidentalis en Italie (Binazzi et al. 2013), il semble cependant que les parasites et parasitoïdes indigènes ne soient pas ou peu adaptés à ce nouvel arrivant. L'utilisation de champignons entomopathogènes, *Beauveria bassiana* et *Isaria fumosorosea*, récemment testés en Italie et en République Tchèque donnent néanmoins des résultats encourageants (Rumine & Barzanti 2008; Barta 2010).

Bien que considéré comme le principal ravageur des graines de conifères dans sa zone d'origine, de nombreuses lacunes concernant la biologie et l'écologie de *L. occidentalis* persistent. Ainsi l'impact de cette espèce sur la régénération naturelle des peuplements de conifères, les relations interspécifiques avec les insectes partageant la même ressource, les capacités de dispersion et les causes pouvant expliquer la dynamique particulière des populations de ce ravageur sont pour le moment ignorés ou mal connues. Pour comprendre les facteurs sous-jacents à cette fulgurante invasion et tenter de mettre au point un programme de gestion appropriée, il convient donc de (1) retracer l'origine des populations européennes et (2) de déterminer quelles sont les caractéristiques biologiques et écologiques de ces dernières permettant un tel succès invasif.

Partie I

Traçage génétique de l'origine des populations envahissantes en Europe

I. INTRODUCTION

L'objectif général de cette étude est de retracer les routes d'invasions de *Leptoglossus occidentalis* en Europe (i.e. le parcours géographique des propagules entre la zone source et la zone d'invasion). L'identification des routes d'invasion est essentielle pour aider à cerner la ou les zones sources des introductions. C'est également un point clé dans la conception de stratégies visant à prévenir toutes nouvelles introductions accidentelles, qui pourraient aboutir à l'apport de nouvelles ressources génétiques pouvant être à l'origine de changements évolutifs dans les populations invasives. Plus généralement, c'est une étape importante dans la compréhension des mécanismes évolutifs et environnementaux impliqués lors d'invasions.

De plus, la mise en place de programmes de gestion appropriés, tels que l'identification d'ennemis naturels dans la cadre d'une future lutte biologique, est alors facilitée (Estoup & Guillemaud 2010). De par la fulgurance de son invasion européenne, *L. occidentalis* peut correspondre à une espèce modèle en biologie de l'invasion permettant de définir, ou au moins d'aborder, les mécanismes pouvant être impliqués dans les invasions si rapides. Retracer les routes d'invasions de ce ravageur en Europe est, par conséquent, apparu comme essentiel pour comprendre, en partie, les raisons d'un tel succès invasif aussi bien dans le temps que dans l'espace.

L'histoire de l'invasion européenne de cet insecte semble complexe. En effet, la colonisation d'un territoire si vaste s'est faite en l'espace d'une dizaine d'années et pourrait s'expliquer par différents mécanismes liés aux activités anthropiques et à des caractéristiques propres à l'espèce. De multiples introductions sont soupçonnées en différents points du continent (Italie, Espagne, Nord de la France, Belgique, Royaume-Uni). De plus, cette propagation rapide peut également être due à de nombreuses translocations d'individus depuis les zones où les populations se sont établies, en lien avec les habitudes de l'insecte à entrer notamment dans les containers de transport de marchandises en automne. Enfin, les capacités de vol importantes de cette espèce ont pu faciliter la propagation sur le territoire européen. De tels événements peuvent conduire à une homogénéisation de la diversité génétique présente en Europe. Ces mouvements d'individus (naturels ou non) soulèvent par conséquent une question majeure : est-il encore possible d'identifier la (ou les) population(s) source(s) et de reconstruire l'histoire de l'invasion européenne de ce ravageur ?

Ainsi pour répondre à cette question et tenter de mieux appréhender la dynamique d'invasion de *L. occidentalis* en Europe, les objectifs spécifiques de cette étude sont donc :

- de caractériser la diversité génétique présente à la fois dans la zone d'origine mais aussi dans les zones envahie (Est de l'Amérique du Nord et Europe).
- de tracer l'origine des différentes populations européennes et ainsi déterminer si l'invasion

du continent procède d'une introduction unique ou d'introductions indépendantes.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. Échantillonnage

Afin d'avoir une vision complète de l'échantillonnage, qui correspond à une étape importante de cette étude, j'ai choisi d'apporter ci-dessous des compléments aux informations fournies dans les Article I et II, présentés dans cette partie.

L'échantillonnage des insectes a été réalisé dans les trois zones principales de distribution de *L. occidentalis* : la zone native (l'Ouest de l'Amérique du Nord), la zone d'invasion américaine (i.e. l'Est de l'Amérique du Nord) et l'Europe. J'ai pu réaliser moi-même la majeure partie de cet échantillonnage de la zone d'origine au cours de l'été 2011 grâce à l'aide précieuse de nombreux collègues nord-américains, notamment Ward Strong (Centre de Foresterie de Kalamalka, Colombie Britannique – Canada). L'échantillonnage de la zone mexicaine s'est avéré plus compliqué. En effet, malgré plusieurs contacts mexicains, seule une localité a pu être échantillonnée. L'analyse mitochondriale a en outre révélé que deux individus seulement sur les 10 analysés correspondaient à *L. occidentalis* (cf. Résultats complémentaires), bien que tous aient été morphologiquement identifiés dans un premier temps comme appartenant à l'espèce *L. occidentalis*. Concernant les populations introduites, bien qu'un effort important ait été entrepris dans la mise en place d'un réseau de contacts pour la recherche d'individus dans la zone Est de l'Amérique du Nord, je n'ai pu disposer que d'une cinquantaine d'individus seulement, provenant de sept localités différentes. En Europe, j'ai effectué directement une partie de l'échantillonnage qui a été complété par des échantillons prélevés par de nombreux collègues européens.

L'échantillonnage couvre donc bien la zone d'origine (excepté le Mexique) et la zone d'invasion européenne, en revanche celui-ci est un peu moins robuste dans l'Est américain.

II.2. Choix des marqueurs

Différentes méthodes peuvent être utilisées dans la reconstruction des routes d'invasion (Estoup & Guillemaud 2010) :

- Des méthodes directes, essentiellement basées sur des données géographiques et historiques comme les dates et lieux d'observation, qui ont souvent un pouvoir résolutif limité car elles sont généralement manquantes ou incomplètes.

- Des méthodes indirectes (détaillées ultérieurement), qui font appel à la génétique des populations et s'appuient sur l'utilisation de marqueurs moléculaires pour déterminer des patterns génétiques (inter- et intra-populationnels) permettant au final d'établir des liens de parentés entre populations. Ces méthodes se sont révélées particulièrement pertinentes pour reconstruire les routes d'invasion de nombreuses espèces et estimer les flux de gènes entre les différentes populations. Différents types de marqueurs moléculaires (mitochondriaux et nucléaires) peuvent être utilisés séparément ou simultanément (e.g. Valade et al. 2009; Auger-Rozenberg et al. 2012; Boissin et al. 2012). Pour mieux appréhender l'histoire de l'invasion européenne de *L. occidentalis*, nous avons adopté une approche multi-marqueurs apportant des informations différentes mais complémentaires. Cependant, aucune étude de génétique des populations de cet insecte n'ayant été effectuée avant la nôtre, nous avons choisi de développer et d'utiliser les outils nécessaires à une telle étude, en l'occurrence un marqueur mitochondrial et des microsatellites.

Souvent utilisé pour des analyses de phylogénie et de diversité génétique à grande échelle, l'ADN mitochondrial peut se révéler particulièrement informatif de par ses caractéristiques (haploïde, hérédité maternelle, pas ou peu de recombinaison, taux de mutation relativement élevé) pour retracer la généalogie des organismes introduits et comparer les niveaux et les patterns de diversité génétique dans les populations natives et introduites (Downie 2002). Une étude préliminaire, réalisée dans le cadre d'un stage de Master 2 avant mon arrivée au sein du laboratoire, avait permis de tester la variabilité et la pertinence de différents marqueurs mitochondriaux (Guilbon 2010). Un fragment du gène mitochondrial codant pour le cytochrome *b* (marqueur communément utilisé dans les études de phylogénie des hétéroptères) s'est révélé variable et pertinent pour notre étude, comme il l'avait été par exemple pour définir la zone source de populations invasives chez le lépidoptère ravageur de la pomme de terre, *Tecia solanivora* (Torres-Leguizamón et al. 2011).

Même à l'aube des nouvelles technologies (e.g. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) les marqueurs microsatellites restent des marqueurs informatifs pour des études de génétiques des populations. Ils sont donc largement utilisés en biologie de l'invasion notamment dans la reconstruction des routes d'invasion (cf. Estoup & Guillemaud 2010; Kirk et al. 2013). Les microsatellites sont des marqueurs nucléaires présents sur l'ensemble du génome, principalement dans les zones non codantes de l'ADN et correspondent à des répétitions d'un motif nucléotidique

(souvent 2 à 5 nucléotides). Ces marqueurs co-dominants à hérédité biparentale (i.e. un allèle du père et un allèle de la mère) sont très polymorphes et constituent donc des outils puissants pour estimer la diversité et la structure génétique à l'échelle de la population. Aucun marqueur microsatellite n'existait pour *L. occidentalis* ni même pour une espèce proche. Le développement de marqueurs spécifiques a donc constitué l'une des premières étapes de cette étude. Cette étape (choix des marqueurs et des amorces, mise au point des conditions PCR) a été réalisée à la fois par la société GenoScreen (France) mais aussi au sein du laboratoire sur la base d'un screening réalisé dans le cadre de l'AIP BioRessources EcoMicro (Malausa et al. 2011). Au final, 11 marqueurs polymorphes ont été identifiés et mis au point chez *L. occidentalis*.

Les résultats ont été publiés dans le journal *Conservation Genetics Resources* et correspondent à l'Article I.

Article I

Isolation and characterization of 11 polymorphic microsatellite markers in the highly invasive Western conifer seed bug, Leptoglossus occidentalis (Heteroptera, Coreidae).

Lesieur V., Courtial B., Roques A., Auger-Rozenberg M-A.
Conservation Genetics Resources (2014, 1-3)

Isolation and characterization of 11 polymorphic microsatellite markers in the highly invasive Western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera, Coreidae)

V. Lesieur · B. Courtial · A. Roques ·
M. A. Auger-Rozenberg

Received: 13 January 2014 / Accepted: 31 January 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Eleven polymorphic microsatellite markers were developed from enriched DNA libraries for the invasive Western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis*. The number of alleles ranged from 2 to 11 and observed heterozygosities from 0.038 to 0.933. Additional results of cross-species amplifications are reported for two congeneric species. This set of microsatellite markers, the first one available for *L. occidentalis*, enables further investigations of population structure of this species which represents a serious threat for European conifer regeneration.

Keywords Genetic diversity · Invasion · Microsatellites

The Western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera, Coreidae), was accidentally introduced in Europe and first reported in Italy in 1999 (Fent and Kment 2011). Then, the bug colonized most of Europe within just a decade (Fent and Kment 2011). Adults and nymphs feed on cones of a wide range of conifer species. Consequently, this introduction represents a risk not only for commercial seed crops but also for conifer ecosystems, impacting natural regeneration (Lesieur et al. 2014). The impact of *L. occidentalis* can also be enhanced through a newly established association between the alien insect and a native fungal pathogen, *Diplodia pinea* (Luchi et al. 2012). In order to set up an appropriate management program in Europe, microsatellites are needed to reveal the origin of newly established populations. We report here the isolation and characterization of 11 microsatellite loci useful for estimating genetic diversity in *L. occidentalis*.

Total genomic DNA was isolated from one pooled sample of individuals collected from four localities situated in France (Lavercaillère, Southwestern France and Serre-Ponçon, French Alps) and in the native range (two different sites in British Columbia, Canada). The extraction was then sent to GenoScreen, France (www.genoscreen.com). A total of 1 µg was used for the development of microsatellite libraries through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries, as described in Malausa et al. (2011). Among 907 sequences comprising a microsatellites motif, 298 primer sets were designed and a sub-group of 48 primers pairs was tested for amplification. Primer sets were discarded if they failed to amplify or led to multiple fragments. Then, 12 microsatellites loci were selected from validated ones for polymorphism study. PCR amplifications were performed in a volume of 25 µl containing 20 ng of template DNA, 1 U of Dream-Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific), 1.875 µl of 10× Dream Taq Green Buffer (including 20 mM of MgCl₂), 6 pmol of dNTPs, 0.5 µl of Bétaine and 10 pmol of each primer. The PCR cycling consisted of an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles : denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min.

Another set of 10 microsatellites was tested in our laboratory for subsequent PCR from which only two were polymorphic. Amplifications were performed in a 10 µl reaction volume containing 20 ng of template DNA, 0.5 U of Dream-Taq DNA Polymerase, 0.48 µl of 10× Dream Taq Green Buffer, 0.2 µl of Bétaine, 4 pmol of dNTPs and 8 pmol of each primer for MSLO07 and 4 pmol for MSLO15. The cycling conditions were the same than described previously except the primer annealing temperature (52 °C).

V. Lesieur (✉) · B. Courtial · A. Roques ·
M. A. Auger-Rozenberg
UR633, Zoologie Forestière, INRA, 45075 Orléans, France
e-mail: vincent.lesieur@orleans.inra.fr

Table 1 Microsatellite data and polymorphism characterization of the *Leptoglossus occidentalis* population from Lavercaintière

Locus	Primer sequences (5'–3')	Repeat motif	5' dye	Multiplex marker set	Size range	<i>N_A</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>
Lep04	F: GTGGCTTGCCTGTGTATAG R: TGACTCAGGAATAACAACAACACA	(GT) ₆	NED	1	118–122	3	0.038	0.446***
Lep05	F: GGGACGAATTTCCTAGAT R: GCGGGAGGTCTGACTTATGA	(AT) ₇	PET	1	128–134	3	0.226	0.495***
Lep07	F: TCTTCCTCATCTTCATCAGAATCA R: GGTGAAGTTAGCGCAGAGTCA	(TCA) ₇	NED	2	140–149	2	0.290	0.337
Lep16	F: GGAGATGTTCTCTGCCGT R: AGTATGATTTAAAGGCTGCATAGTA	(AC) ₉	VIC	2	162–198	8	0.839	0.829
Lep17	F: ACCCAGCTTCCGCTATTTAT R: TCGTAAAAACATACTCCACACA	(GT) ₉	VIC	1	114–118	3	0.452	0.564
Lep25	F: ACGAAAACGTTTGCTGTTTG R: AACATTCTTTAATCGTCGGCT	(AG) ₈	6FAM	2	99–107	3	0.484	0.524
Lep31	F: TAAAAATGTTTCTCTTTACTGCG R: CCAAATTTCTGTATGTTTGCTTG	(GT) ₈	6FAM	1	132–152	6	0.500	0.733***
Lep36	F: TGTACATAACAGAATGAGACATGCAC R: CATGAACACATCCTCTCGGA	(CA) ₁₃	PET	2	145–179	8	0.742	0.829
Lep43	F: CAATTTCAACAACCTCGGGA R: GTAGGATCCTGCGTGAGAGC	(GT) ₁₀	PET	1	207–255	11	0.933	0.872
MSLO07	F: TTCCTCAATATTAAGTTGGTTCTCTG R: TTACCCAGCAAGACAAACCC	(CA) ₁₄ (TA) ₄	6FAM	/	125–155	7	0.767	0.728
MSLO15	F: ACCAATTGGCATGAAGTCCT R: GCTTCATGGGCTAGTGAGGT	(CT) ₁₀ (CA) ₈	6FAM	/	204–234	3	0.467	0.495
Mean						5.182	0.522	0.647
SD						2.960	0.276	0.194

N_A: number of alleles; *H_O*: observed heterozygosity; *H_E*: expected heterozygosity; values in bold indicate significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium

*** $P < 0.01$; ** $0.01 < P < 0.05$; * $0.05 < P < 0.1$

Consequently, 11 markers were selected and tested on 30 individuals obtained from a seed orchard located at Lavercaintière. Fragments were run on an ABI 3500 Genetic Analyzer using GeneScan™—600 LIZ® Size Standard, and sized with GeneMapper® v4.1 software (Life Technologies—Applied Biosystems).

Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), expected and observed heterozygosity and linkage disequilibrium were calculated using ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al. 2005). The existence of null alleles was tested using MICROCHECKER (<http://www.microchecker.hull.ac.uk/>).

The number of alleles ranged from 2 to 11 and the expected heterozygosity from 0.337 to 0.872 (Table 1). Significant departures from HWE in the direction of

heterozygote deficiency were detected for three loci (Lep04, Lep05 and Lep31) probably due to the presence of null alleles (detected in Lep 04 and Lep05) or sampling biases. There was no case of linkage disequilibrium among loci after applying sequential Bonferroni corrections for multiple tests. Cross-species amplifications were performed in two North American congeneric species, *L. phyllopus* and *L. corculus*; a highly polyphagous pest of various angiosperms and a pine seed pest, respectively. Three loci failed to amplify in *L. corculus* and only one (Lep04) in *L. phyllopus* (Table 2). With regards to *L. occidentalis*, these loci are promising for further analyses intended to study the dispersal patterns and the invasion routes of this highly invasive pest now discovered in Asia.

Table 2 Cross-species amplification results for *Leptoglossus* spp

Species	Tested individuals	Locus										
		Lep04	Lep05	Lep07	Lep16	Lep17	Lep25	Lep31	Lep36	Lep43	MSLO07	MSLO15
<i>L. corculus</i>	4	0	128 (2)	146	0	108 (1)	101–119	132–144	0	294–298	125–175	204–206
<i>L. phyllopus</i>	4	0	128	137–146	136–216	108–110	103–129	132–142	137–147 (3)	304–322	125–175	210–234 (3)

Numbers refer to the size (bp) of the PCR products. 0 refers to unsuccessful amplifications. When partial amplification, number of amplified individuals are within brackets

Acknowledgments We greatly acknowledge support from the European FP7 projects ISEFOR (*Increasing Sustainability of European Forests: Modelling for Security Against Invasive Pests and Pathogens under Climate Change*—collaborative project no. 245268) and QBOL (*Development of a new diagnostic tool using DNA bar-coding to identify quarantine organisms in support of plant health*” no. 226482, KBBE-2008-1-4-01), the COST Action PERMIT (*Pathway Evaluation and pest Risk Management In Transport-FP1002-181110-06882*), and a grant from the French Ministry of Agriculture, Food, Fisheries, Rural Affairs and Spatial Planning (Agreement no. E 01/09). The Titanium pyrosequencing was funded by the grant AIP BioRessources EcoMicro from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). We gratefully thank Magally Torres-Leguizamon and Géraldine Roux-Morabito for their helpful advices and Ward Strong, Christian Blazy, Paula Mitchell and Alex Mangini for their help in collecting insect samples.

References

- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform* 1:47–50
- Fent M, Kment P (2011) First record of the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Turkey. *North West J Zool* 7(1):72–80. doi:111106
- Lesieur V, Yart A, Guilbon S, Lorme P, Auger-Rozenberg M-A, Roques A (2014) The invasive *Leptoglossus* seed bug, a threat for commercial seed crops, but for conifer diversity? *Biol Inv*:1–17. doi:10.1007/s10530-013-0630-9
- Luchi N, Mancini V, Feducci M, Santini A, Capretti P (2012) *Leptoglossus occidentalis* and *Diplodia pinea*: a new insect-fungus association in Mediterranean forests. *Forest Pathol* 42(3):246–251. doi:10.1111/j.1439-0329.2011.00750.x
- Malausa T, Gilles A, Meglec E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Delye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Le Corre V, Lung-Escarmant B, Male PJG, Ferreira S, Martin JF (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Mol Ecol Resour* 11(4):638–644. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.02992.x

II.3. Méthodes d'analyses

Pour répondre à nos objectifs, nous avons utilisé différents types de méthodes. Dans un premier temps, des méthodes dites " classiques " ont été utilisées. Ces méthodes sont fondées sur des divergences de séquences ou de fréquences alléliques (réseau d'haplotypes, construction d'arbre phylogénétique à partir de matrices de distances génétiques entre les populations, calcul de F_{ST} entre populations) ou encore permettent des regroupements d'individus sur la base de calculs de vraisemblance *via* des modèles bayésiens (utilisation du logiciel STRUCTURE (Pritchard et al. 2000)). Ces méthodes couramment utilisées présentent néanmoins quelques désavantages (Estoup & Guillemaud 2010). En effet, elles ne prennent pas en compte la stochasticité de l'histoire démographique et génétique (la dérive) qui affecte pourtant la composition génétique de la population envahissante (e.g. distorsion des fréquences alléliques). De plus, les méthodes classiques ne fournissent aucun support statistique permettant de comparer différents scénarios et donc d'estimer la confiance à accorder à chacun des résultats. En outre, ces méthodes s'appuient sur un échantillonnage considéré comme exhaustif ce qui est généralement faux notamment lorsque les zones d'origine sont vastes ou mal définies.

Dans un deuxième temps et au vu de ces différentes remarques, une méthode plus récemment développée, l'*Approximate Bayesian Computation*, ABC, (Beaumont et al. 2002) a été utilisée (cf. ENCADRÉ 2, pour plus de précisions sur la méthode). Cette approche bayésienne est bien adaptée aux modèles historiques et démographiques complexes liés aux invasions biologiques, dans lesquels des événements tels que des goulots d'étranglement, des introductions multiples et/ou de l'*admixture* génétique sont suspectés (Estoup & Guillemaud 2010; Guillemaud et al. 2010). Outre l'information génétique, cette méthode permet d'inclure des données historiques et démographiques dans la construction de différents scénarios d'invasion. Elle présente également d'autres avantages, notamment le fait de pouvoir intégrer dans l'analyse des populations non-échantillonnées dans le cas d'échantillonnage non exhaustifs mais aussi d'obtenir une probabilité relative à chacun des scénarios testés et d'en évaluer ensuite la confiance *via* des analyses d'erreur de type I et de type II. En outre, des programmes récemment développés tels que DIYABC (Cornuet et al. 2010) permettent d'intégrer dans la même analyse des données mitochondriales combinées à des données microsatellites. Néanmoins, comme toute méthode, elle présente aussi quelques inconvénients notamment liés à sa nature Bayésienne qui implique que la distribution des paramètres utilisés soit définie *a priori* et un choix restreint du nombre de modèles à tester (Templeton 2009, 2010).

ENCADRÉ 2. *Approximate Bayesian Computation* (ABC) et inférence des routes d'invasion : principe général et différentes étapes

La méthode ABC peut être utilisée pour calculer les probabilités relatives de différents scénarios en compétition à partir d'un ensemble de scénarios et donc de choisir le scénario le plus probable (Estoup & Guillemaud 2010). En effet, les méthodes Bayésiennes rendent possible le choix d'un modèle et/ou l'estimation d'un paramètre sous un modèle donné à partir de données observées. Ainsi, à partir d'un jeu de données observées D (e.g. des génotypes multilocus individuels), on pourra rechercher la distribution *a posteriori* d'un paramètre (ou un modèle) θ . La probabilité d'observer les données D selon le paramètre (ou le modèle) θ correspond à la vraisemblance de θ . Cependant, lorsque les modèles sont trop complexes, l'estimation de la vraisemblance est parfois impossible. Cette estimation est alors remplacée par une approximation *via* l'utilisation de statistiques résumées et la simulation de données. La vraisemblance est alors remplacée par une distance entre les données observées et des données simulées selon différents sets de paramètres, et les données sont, elles, remplacées par des statistiques qui les résument.

L'ABC, qui correspond à l'une de ces méthodes d'approximation de la vraisemblance, permet de gérer de grands jeux de données comme par exemple des centaines individus génotypés à plusieurs loci (Beaumont 2010; Bertorelle et al. 2010; Csillery et al. 2010; Guillemaud et al. 2010).

La méthode ABC peut se décomposer en une succession de différentes étapes (chacune d'elle pouvant à son tour se diviser en sous-étapes) :

1. Définition des scénarios à tester.

Les différents modèles (scénarios) identifiés d'introduction sont formalisés et les données historiques et démographiques sont alors incorporées.

Le choix des populations peut être important et la ou les populations non échantillonnées peuvent et doivent être intégrées aux modèles. L'écriture des scénarios se fait en incorporant dans un premier temps les événements (divergence, hybridation intra-spécifique, changement de la taille efficace) les plus récents puis en remontant dans le passé. La définition des priors consiste à assigner des valeurs ou des lois de distributions *a priori* pour les différents paramètres utilisés dans les modèles : paramètres historiques (dates de première observation, dates de divergence ou d'hybridation), démographiques (taille efficace des différentes populations, taille de la population soumise à un goulot d'étranglement génétique et durée de ce goulot d'étranglement) et génétiques (taux de mutation et modèle de mutation pour chaque type de marqueurs utilisés). Le temps est ici mesuré en nombre de générations.

2. Choix des statistiques résumées et simulation de données génétiques.

La méthode ABC est basée sur la comparaison de jeux de données observées et simulées. Cette étape consiste donc à simuler des données génétiques pour chaque scénario formulé dans l'étape précédente à partir des lois définies *a priori*. Chaque jeu de données est alors résumé par des statistiques choisies par l'opérateur. Ces statistiques permettent de décrire au mieux les variations génétiques inter- et intra-populationnelles (nombre moyen d'allèles par locus, hétérozygotie moyenne attendue, F_{ST} , vraisemblance d'assignation, etc.)

3. Rejet des jeux de données les moins informatifs.

Ce rejet s'effectue sur la base de calcul des distances euclidiennes entre les statistiques simulées et observées. Les données simulées s'éloignant trop des données observées sont alors rejetées.

4. Sélection du scénario le plus probable.

Pour chaque scénario, une probabilité *a posteriori* est calculée *via* une régression logistique sur les jeux de données simulés qui ont été conservés. Le scénario possédant alors la probabilité la plus élevée sera ainsi sélectionné. Une fois le scénario sélectionné, il est ensuite possible d'estimer la distribution *a posteriori* des différents paramètres.

5. " Contrôle qualité ".

Cette dernière étape correspond à l'évaluation de la confiance dans le scénario sélectionné mais

aussi de la confiance dans les paramètres estimés.

Pour ce faire, les erreurs de type I et II sont alors calculées. L'erreur de type I correspond à la probabilité d'écarter un scénario alors qu'il est vrai et l'erreur de type II est la probabilité de sélectionner un scénario alors qu'il est faux. L'évaluation de la confiance dans les paramètres estimés peut être réalisée par une comparaison de données observées et de données simulées à partir de valeurs de paramètres provenant des distributions *a posteriori* du scénario sélectionné.

III. RÉSULTATS

Les principaux résultats de cette étude sur la caractérisation de la diversité génétique de la punaise des graines dans sa zone d'origine montrent tout d'abord une forte diversité génétique associée à une faible structuration génétique. Dans les zones d'invasion (Est de l'Amérique du Nord et Europe) en comparaison avec la zone d'origine, on observe une baisse significative de la diversité génétique, ce qui dénote l'existence de goulots d'étranglement génétique dans les populations invasives. Cette perte apparente de diversité n'a cependant pas été un frein à l'invasion de cet insecte tant dans la zone Est américaine qu'en Europe.

De plus, cette étude démontre clairement une invasion de type " tête de pont ", c'est-à-dire que la population invasive de l'Est de l'Amérique du Nord a servi de source pour l'invasion européenne. De multiples introductions indépendantes en Europe depuis la zone d'invasion américaine ont en outre été confirmées. En effet, nos résultats indiquent une introduction dans le Nord de l'Italie en accord avec les données historiques, cette zone correspondant aux premières observations européennes. A ce premier évènement s'ajoute une deuxième introduction depuis l'Est américain dans la région de Barcelone dont les individus fondateurs étaient jusqu'alors suspectés provenir d'Italie. Une partie des résultats, moins robustes et donc à prendre avec précaution, suggère également que des introductions supplémentaires depuis l'Est de l'Amérique du Nord ont eu lieu dans d'autres régions d'Espagne et du Nord de l'Europe. Néanmoins, la zone d'origine n'est jamais directement impliquée et toutes les analyses pointent l'Est de l'Amérique du Nord comme zone source (FIGURE 9).

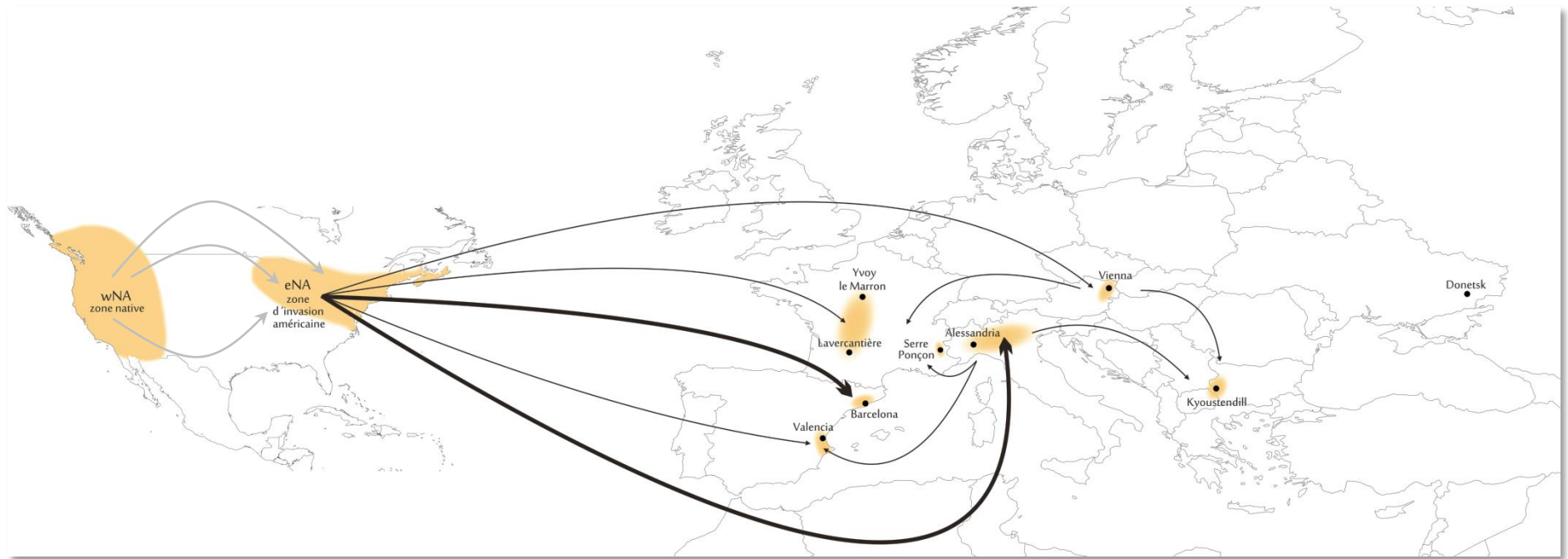


FIGURE 9. Scénario le plus probable de l'invasion de *Leptoglossus occidentalis* depuis l'Amérique du Nord vers l'Europe.

Les flèches indiquent les mouvements les plus probables (traits épais : résultats les plus robustes, traits fins : résultats moins soutenus).

De plus, des mouvements d'individus à grande échelle au sein du continent sont également mis en évidence sans que l'on puisse discriminer entre dispersion naturelle ou transport par l'Homme. Par conséquent, cette étude, synthétisée sur la FIGURE 9, confirme que l'invasion fulgurante du continent européen de ce ravageur des graines de conifères correspond à une histoire complexe mêlant introductions indépendantes dans des zones géographiquement distantes depuis la zone d'invasion américaine et forte capacité de dispersion.

Ces résultats sont présentés dans l'Article II et seront prochainement soumis dans le journal *Molecular Ecology*.

Article II

*Does fast invasion involve a complex story? The case study of European *Leptoglossus occidentalis* invasion.*

Lesieur V., Lombaert E., Guillemaud T., Courtial B., Strong W., Roques A. and Auger Rozenberg M-A.
En préparation

Does fast invasion involve a complex story? The case study of European *Leptoglossus occidentalis* invasion

V. Lesieur^{1*}, E. Lombaert², T. Guillemaud², B. Courtial¹, W. Strong³, A. Roques¹, M. A. Auger-Rozenberg¹

¹ INRA UR633 Zoologie Forestière, 2163 avenue de la pomme de pin, CS 40001 Ardon, 45075 Orléans cedex 2, France

² INRA, UMR 1301 IBSV (INRA/Université de Nice Sophia Antipolis/CNRS), 400 Route des Chappes, BP 167-06903 Sophia Antipolis cedex, France

³ BC Ministry of Forests, Lands, and Mines, Kalamalka Forestry Centre, 3401 Reservoir Rd, Vernon, BC V1B 2C7, Canada

* Corresponding author: V. Lesieur

INRA UR633 Zoologie Forestière, 2163 avenue de la pomme de pin, CS 40001 Ardon, 45075 Orléans cedex 2, France

E-mail address: vincent.lesieur@orleans.inra.fr

Fax: (33) 0238417879

Running title. A complex story for a fast invasion

Abstract

Retracing the routes of invasions and determining the population source of invaded species is a major concern to understand biological invasions, but it is methodologically challenging. The Western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis*, native from western North America (wNA), was first introduced in eastern North America (eNA) and then in Europe. In the latter, multiple introductions from eNA combined with many translocations of individuals from established populations and high flight capacity are strongly suspected. These different mechanisms might lead to a homogenization of genetic diversity. Consequently, this situation raises a question: is it still possible to reconstruct invasion history and decipher the origin of introduced populations? In this study, we used a multi-marker strategy (mtDNA and microsatellites) combined with approximate Bayesian computation analyses to track the origin of European populations and determine if this rapid invasion proceeds from one or multiple introductions. We confirmed that several independent introductions were involved in the European invasion. Moreover, all of our analyses showed a stronger genetic affinity of European invasive samples with the eNA populations than with those of the native range, which clearly indicates a bridgehead from this area. Results also shed light on

movements of individuals within Europe by their own capacities or by anthropogenic activities which enhanced the rapid spread of this invasive pest. This study illustrates the complexity of a rapid invasion and confirms that bridgehead and multiple introductions have serious implications for the success of invasion.

Keywords. Approximate Bayesian Computation, microsatellite, mitochondrial DNA, multiple introductions, source population, Western conifer seed bug

Introduction

The intensification of global trade and human mobility in the last decades led to a constant increase of introductions of exotic alien species beyond their native ranges (Hulme 2009; Westphal *et al.* 2008). This is especially true of terrestrial invertebrates and more particularly insects that can be introduced intentionally (e.g. for biological control) but at present mostly accidentally (Brockerhoff *et al.* 2006; Gandhi & Herms 2010; Roques 2010). Among introduced alien species, only a few can become established and reach high demographic levels. However, these species have been widely recognized as responsible of severe economic, ecological and public health damages (Aukema *et al.* 2011; Juliano & Lounibos 2005; Kenis *et al.* 2009; Kenis & Branco 2010). The recent worldwide invasion of Harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, or that of the Asian emerald ash borer, *Agrilus planipennis*, in North America illustrated well the problem (Gandhi & Herms 2010; Koch 2003). Due to the potential threat that exotic insects represent, retracing the routes of invasions and determining the source of introduced populations is an important step to establish suitable management programs such as the identification of natural enemies or the development of strategies for preventing new accidental propagations from the identified source population (Estoup & Guillemaud 2010).

The Western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera, Coreidae) is widely distributed in western North America (wNA), its native range, from British Columbia to Mexico and from the pacific coast to Colorado. In the middle of the 1950s, the species was accidentally introduced in eastern North America (eNA) with a first observation in Iowa (Schaffner 1967). Since then, it has spread eastward to reach the Atlantic coast in the 1990s (Gall 1992; McPherson *et al.* 1990; Ridge-O'Connor 2001). In Europe, the species was first reported in northern Italy in 1999 (Bernardinelli & Zandigiacomo 2001; Taylor *et al.* 2001). It expanded its range very quickly and colonized all of Europe, from Norway to Sicily and from Portugal to Southwest of Russia (Dusoulier *et al.* 2007; Fent & Kment 2011; Gapon 2012; Malumphy *et al.* 2008). Moreover, recent observations in Asia (Ahn *et al.* 2013; Ishikawa & Kikuhara 2009; Zhu 2010) and northern Africa (Ben Jamaa *et al.* 2013) highlight that the bug is now becoming a highly successful worldwide invader.

Different means of propagation could underlie its very fast invasion. In addition to the first Italian outbreak, several independent introductions are highly suspected and have potentially occurred in Spain (Pérez Valcárcel & Prieto Piloña 2010; Ribes & Escolà 2005), France (Dusoulier *et al.* 2007), Belgium (Aukema & Libeer 2007) and/or Great Britain (Malumphy *et al.* 2008). Indeed, diverse observations occurred near important harbor areas (i.e. Venezia, Barcelona, Le Havre, Ostende or Weymouth), it is most likely that the propagules have been transported as hitchhikers by ship in containers (Dusoulier *et al.* 2007). In this line, different interceptions of adults suggest that the introduction pathway could be related to timber shipments (e.g. timber logs or wood panels) from the USA (Dusoulier *et al.* 2007; Malumphy *et al.* 2008) and the habits of the bug to aggregate inside man-made structures in the fall to seek shelter for overwintering. Moreover, individuals (eggs, nymphs or adults) may also have been brought from established populations *via* their host plants with for instance the commercial Christmas tree trade or translocations of ornamental trees (Gall 1992; Gapon 2012). Furthermore, adults are considered as strong fliers (Koerber 1963; Malumphy *et al.* 2008; Ridge-O'Connor 2001). These high flight capacities may, partly, explain the fast progress of the bug within the continent. Therefore, the current geographic distribution of *L. occidentalis* in Europe is possibly the result of several independent introductions and/or of human-mediated long-distance translocations within the continent, combined with natural dispersal, but the implication of such mechanisms is yet to be understood.

This polyphagous insect is considered as one of the major pest of conifer seeds in North American seed orchards. Both adults and immature nymphs consume individual seeds in developing and mature cones, leading to a significant decrease in seed yield (Bates *et al.* 2000; Lesieur *et al.* 2014b; Strong 2006). Beyond the economic side, bug damage could be considered as a serious threat for natural regeneration (Lesieur *et al.* 2014b; Tamburini *et al.* 2012). Consequently, previous studies focused on the characterization of bug damage and the estimation of its impact on seed yield, especially on seed orchards. However, there has been no investigation of the population genetic structure and genetic diversity in native range and little is known about the situation in introduced areas (Gallego *et al.* 2013).

In Europe, the bug is now presents along a continuous east-west axis of ca. 4000 km, thereby covering a wide geographical area. The colonization of Europe occurred within very short time frames, indeed in just a decade it has spread over vast territories of Europe. The strong suspicions of many translocations of individuals within Europe, combined with high capacities of natural dispersal might allow important gene flow between populations and thus lead to a homogenization of genetic diversity. In this line and looking at the current distribution, attempting to trace the origin of European populations and to decipher the invasion history could be a difficult challenge. Moreover, the stochasticity of demographic and genetic events associated with biological invasions may produce complex genetic signals (Guillemaud *et al.* 2010). Founder events which

occurred during the introduction often result in a significant loss of genetic diversity in invasive populations compared to native ones (Dlugosch & Parker 2008). Furthermore, multiple introductions increase the probability of genetic admixture between differentiated populations leading to novel genetic combinations in invaded area, not found in the native range. Consequently, the invasion of Europe by *L. occidentalis* raises an important question: in case of such an introduction (i.e. independent introductions combined with high dispersal capacities), is it still possible to identify the source population of introduced individuals and reconstruct the invasion history? To answer this question, we used in this study a multi-marker strategy. Molecular markers, both mitochondrial and nuclear ones, constitute powerful tools to characterize population genetic structure and diversity and have been widely used to precise the origin of invasive populations (Estoup & Guillemaud 2010; Kirk *et al.* 2013). Moreover, we combined traditional population genetic analyses and approximate Bayesian computation (ABC) analyses (Beaumont *et al.* 2002) for deciphering the European invasion of *L. occidentalis*. This method offers opportunities to test different demographic scenarios and to estimate the most probable scenarios within a model-based statistical framework (Guillemaud *et al.* 2010). Recent studies using ABC have successfully reconstructed the invasion history of various species (e.g. Auger-Rozenberg *et al.* 2012; Lombaert *et al.* 2010; Miller *et al.* 2005; Zepeda-Paulo *et al.* 2010).

Thus, the present study addresses the following objectives (i) to characterize genetic structure and diversity in native and invaded areas, (ii) to identify the most likely source population for European populations and thus, to determine if European invasion proceeded from one or multiple independent introductions. For this purpose, we used sequences of mitochondrial cytochrome *b* gene and microsatellites markers and we analyzed individuals collected in North America and in Europe.

Materials & Methods

Collection sites, bug sampling and DNA extraction

Adults and/or nymphs were sampled across native and invaded areas (Table 1). The sampling covered well the native range (wNA) with 16 localities and Europe where 34 sites were sampled (for details see Table 1). However, only 7 sites were sampled in eNA due to fluctuations of population densities and the resulting difficulty to obtain specimens. Between 2009 and 2013, we sampled a total of 656 *L. occidentalis* specimens in seed orchards, ornamental trees or natural conifer stands but also in man-made buildings where adults seek sheltered places to overwinter in the fall. All samples were stored in absolute 96% ethanol at -20°C. We obtained DNA from muscle tissue of the bug's hind femur using NucleoSpin Tissue XS kit (Macherey-Nagel, Germany) following the

manufacturer's instructions. DNA was eluted in 30 µl of the elution solution and stored at -20°C. The concentration of the eluted DNA was about 20 ng/µl.

Molecular analyses of mitochondrial DNA

DNA protocols. Mitochondrial cytochrome *b* gene (*Cytb*) was amplified in 254 individuals *via* PCR using the general insect primer pair CP1 (5'-GATGATGAAATTTTGGATC-3' (Harry *et al.* 1998)) and CB2 (5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3' (Jermiin & Crozier 1994)). Reactions were carried out in 25 µl total volumes containing 1x the reaction buffer provided with polymerase (Sigma), 2.5 mM MgCl₂, 1 µM of each primer, 10 mM dNTPs mix, 1 unit of RedTaq DNA polymerase (Sigma) and ~50 ng template DNA. PCR was performed with an initial denaturation step at 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 94°C-45 s, 46°C-45 s, 72°C-90 s, followed by a final extension at 72°C for 5 min. All PCR products were purified using NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel, Germany), and directly sequenced with the amplification primers. Sequencing was performed using the BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, France) and carried out with an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). All sequences were obtained in the forward and reverse directions, assembled into consensus contigs using CodonCode Aligner (www.codoncode.com) and then aligned using CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) implemented in CodonCode.

Data analyses. Analyses were performed for all populations for which at least three individuals had been sequenced. Gene diversity H_d was calculated using Arlequin v 3.11 (Excoffier *et al.* 2005). Allelic richness r was computed using the rarefaction method proposed by Petit *et al.* (1998) with Contrib (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/Contrib>). Statistical parsimony network was computed with TCS v 1.21 (Clement *et al.* 2000). To solve the few network ambiguities that occurred, we used topological, geographical and frequency criteria (Crandall & Templeton 1993). Analysis of molecular variance (AMOVA; (Excoffier *et al.* 1992)) was used to partition the molecular variance into different hierarchical levels using Arlequin. Samples were grouped according to the three main regions: wNA versus eNA versus Europe. The significance of the variance components was tested with 1,000 permutations. To better characterize the native area, occurrence of a significant geographic structure was assessed by testing if G_{ST} (coefficient of genetic variation over all populations) was significantly smaller than N_{ST} (equivalent coefficient taking into account the similarities between haplotypes) by the use of 1,000 permutations in the program Permut (see Pons & Petit 1996). We also used Arlequin to estimate F_{ST} values between all pairs of wNA populations. Then, we tested isolation by distance (IbD), a correlation between genetic distance

(pairwise $F_{ST} / (1 - F_{ST})$) and logarithm of spatial distances (Rousset 1997), with a Mantel test implemented in Genepop 4.2.1 (Rousset 2008). We used 1,000 permutations to assess significance.

Molecular analyses of microsatellite markers

DNA protocols. Eleven microsatellite markers developed by Lesieur *et al.* (2014a) were used to genotype a subsample of 506 individuals (Table 1). PCR amplifications were performed following the protocol described in Lesieur *et al.* (2014a). PCR products were run in an ABI 3500 Genetic Analyzer using the size standard GeneScan-600 LIZ (Applied Biosystems). Alleles were scored with GeneMapper v 4.1 (Applied Biosystems).

Data analyses. Allelic richness with the rarefaction method (AR), observed and expected heterozygosity (H_o and H_e) were estimated using FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2002). We also calculated inbreeding coefficients (F_{IS}) with Genepop 4.2.1 (Rousset 2008). Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and linkage equilibrium between pairs of loci were tested with Genepop. Sequential Bonferroni corrections (Rice 1989) for multiple comparisons were applied for both tests.

FreeNA (Chapuis & Estoup 2007) was used to estimate the null allele frequencies for each locus in each population according to the Expectation Maximization algorithm described by Dempster *et al.* (1977). The FreeNA software was also used to calculate F_{ST} values with the excluding null allele correction method. Pairwise differentiation was evaluated using Fisher's exact tests implemented in Genepop. We used the sequential Bonferroni correction to correct for the multiplicity of comparisons. Pairwise Cavalli-Sforza and Edwards' chord distance measures (1967), using the genotype data set corrected for null alleles were calculated in Population 1.2.32 software (Langella 1999). The resulting distance matrix was used to build a population-based neighbour-joining (NJ) tree. The consistency of the nodes was evaluated by carrying out 1000 bootstrap replicates over loci. The NJ tree was visualized with TreeView (Page 1996).

To explore the population structure within the whole dataset, we used the Bayesian clustering approach implemented in Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000). An admixture model with correlated allele frequencies was used and simulations were run with sampling location as prior because in situations of low levels of genetic divergence or a limited number of loci, this model allows a more accurate detection of genetic structure (Hubisz *et al.* 2009). The burn-in period of each run was set to 200,000 followed by 1,000,000 MCMC iterations. We performed 20 independent runs for each value of K ranging from 1 to 10. We assessed the uppermost level of population structure by using the ΔK method (Evanno *et al.* 2005) implemented in Structure Harvester (Earl & Vonholdt 2012). The graphical display of genetic structure was produced with Distruct (Rosenberg 2004).

In the native area, as described for the mitochondrial data, we tested isolation by distance (IbD), a correlation between genetic distance (pairwise $F_{ST} / (1 - F_{ST})$) and logarithm of spatial distances, with a Mantel test implemented in Genepop. We used 1000 permutations to assess significance.

Modelling invasion scenarios using mitochondrial and microsatellite data

An Approximate Bayesian Computation (ABC) approach was performed using the software DIYABC 2.0 (Cornuet *et al.* 2014) with both mitochondrial and microsatellite markers to determine possible introduction routes of *L. occidentalis* into Europe. For sake of simplicity and based on the low genetic structure observed across the native range (see Results), only one population was considered to be representative of this area (Missoula displaying the lowest mean pairwise F_{ST}).

We performed sequential ABC analyses of invasion scenarios taking into account successive outbreaks in Europe in their order of first observation date. The sampling in eNA (only two genotyped samples) could give us a limited representation of the genetic diversity in this invaded area and thus, some invasive source populations could have been missed. Consequently, an unsampled invasive eNA source population was included as a putative origin of European populations. We first examined the origin of Italian sample, Northern Italy corresponding to the first place where *L. occidentalis* was observed in Europe. We considered the native wNA population, an unsampled eNA invasive population or an admixture between them as potential sources, thereby defining three scenarios. The second analysis was performed to decipher the origin of Barcelona's population that corresponded to the second European observation. This analysis took into account the scenario that had the highest significant probability value in the first analysis. There were three potential sources population: the native wNA, an unsampled eNA invasive population and the Italian outbreak. Consequently, considering the potential admixture between the different sources, six scenarios were compared. The subsequent analysis of the Vienna outbreak was constructed on the results of the two first, and thus included 10 competing scenarios. The last analyses dealt with invasion histories of French, Valencian and Bulgarian populations. Regarding the date of first detection (each of them comprised between 2007 and 2009) (Table 2), we hypothesized that one could not be a potential source of the other. The results of the Vienna's ABC analysis were not convincing (see Results section and Table 5), however, we based the analyses of French, Valencian and Bulgarian samples on the scenario that had the highest significant probability value. Moreover for these samples, based on Structure results and the NJ Tree, it seems unlikely that the wNA sample is the source population. Consequently, in order to reduce the number of competing scenarios, and thus, to reduce the computation analysis, we excluded the wNA sample from these analyses. We finally included 10 competing scenarios for French, Valencian and Bulgarian samples.

The ABC analyses were performed using parameter values drawn from the prior distributions described in Table 2. For each competing scenarios, we simulated 10^6 data sets to build a reference table for the two first analyses and 5×10^5 data sets for the others because of the larger number of scenarios. The same priors were used for every analysis. The microsatellites markers were assumed to follow a Generalized Stepwise Mutation model (GSM) (Estoup *et al.* 2002). Considering each population and each population pair, we used the following summary statistics: the mean number of alleles per locus, the mean expected heterozygosity and the mean allelic size variance. We also used the mean Garza–Williamson’s M index, the pairwise F_{ST} values, the mean individual assignment likelihoods of population i being assigned to population j and the maximum likelihood estimate of admixture proportion. The mtDNA gene is assumed to follow the Kimura 2 Parameters model (Kimura 1980). For each population and each population pair, we used as summary statistics the number of haplotypes and the number of segregating sites. We also used the mean number of pairwise differences, the variance of pairwise differences and the pairwise F_{ST} .

To estimate the posterior probabilities (with 95% confidence intervals) of the competing scenarios, we used a polychotomous logistic regression on the 1% of simulated data sets closest to the observed data set (Cornuet *et al.* 2008). The scenario showing the highest posterior probability and non-overlapping 95% confidence intervals was considered as the most likely scenario. However, when overlapping confidence intervals were observed, we repeated the estimation of posterior probabilities with the competing scenarios displaying an overlap. An additional set of analyses to compute type I and II errors in the selection of scenarios was performed. For this we simulated 100 datasets from known competing scenarios with parameter values drawn from the prior distributions in order to assess the capacity of the method to select the true scenario. For each competing scenario, we estimated the posterior probabilities as described previously. Type I error corresponds to the proportion of simulations in which the true scenario is not selected. Type II error is the proportion of simulations in which the scenario considered is selected but is not the true one.

Posterior distributions of some demographic parameters for each selected scenario were estimated using a local linear regression on the 5000 simulated data sets (1%) closest to our real data (Beaumont *et al.* 2002).

Results

Mitochondrial DNA

DNA from 254 individuals of *L. occidentalis* from the 57 North American and European population samples was amplified and sequenced. The final alignment of the Cyt**b** sequences comprised 662 bp. Fifty four different haplotypes were identified and named H1 to H54 (Fig. 1).

They are available from GenBank under accession numbers **X – X**. No insertion or deletion was present and all the haplotypes gave clear, unambiguous sequence chromatograms and no indicator of pseudogenes was observed (see Zhang & Hewitt 1996).

In wNA, the maximum divergence between haplotypes was nine mutation steps while haplotypes found within eNA and Europe differed by five and four mutation steps, respectively. Haplotypes present in populations from the same site differed by no more than seven mutations in wNA and the highest divergence within population was five mutations steps in eNA and four in Europe. The geographic distribution of the haplotypes is shown on Fig. 1. Among these 54 haplotypes, we found 48 haplotypes in the native range (wNA), 47 were exclusively present in this area and the haplotype H1 was the most common haplotype. Only one haplotype (H20) was shared by the three main regions (i.e. wNA, eNA and Europe). We found five haplotypes in eNA and four in Europe. The two haplotypes that were shared in both invasive areas were also the most common haplotypes (H20 and H51) in these areas. In Europe, we found one private haplotype and haplotype H23, present in five sampling sites, is only observed once in wNA.

Haplotype diversity was higher in wNA than in the two other regions (Table 1). AMOVA analysis revealed that most of the genetic variations were due to differences between individuals within populations (81.25 %) (Table S1, Supporting information). However, a substantial percentage of the variation (13.97 %) was explained by differences among the three main regions (wNA, eNA and Europe) and among populations within region (4.78 %).

In the native range, no significant phylogeographic structure was observed; G_{ST} (0.039) and N_{ST} (0.035) did not differ significantly. We found a weak but significant IbD signal (Mantel test $r^2 = 0.17$, $P = 0.008$), but when the Mexican samples were removed, no significant pattern of IbD was found anymore (Mantel test $r^2 = 0.061$, $P = 0.054$).

Microsatellites data

After sequential Bonferroni corrections, only seven cases of significant linkage disequilibrium were found in the 1045 pairwise tests carried out and a given pair of loci was never in significant LD more than two times. The 11 microsatellite markers were thus considered independent.

We found a total of 242 alleles and 130 of them were observed exclusively in wNA whereas only five in invasive populations; four in eNA and one in Europe. Allelic richness was larger in samples from wNA than in invasive samples and eNA samples showed a highest allelic richness than European ones (Table 1). Expected heterozygosity ranged from 0.628 to 0.671 for wNA s and from 0.487 to 0.623 for invasive populations (Table 1). Significant heterozygote deficiencies and significant positive F_{IS} values were observed in all populations (Table 3). Moreover, four

microsatellite loci (Lep04, Lep05, Lep31, Lep36) had a mean estimated proportion of null alleles above 8 % while the others never exceeded 5 %. Therefore, data analyses were repeated without these markers. Significant heterozygote deficiencies were still observed in all native samples but only in two invasive samples (Serre-Ponçon and Vienna) after these loci had been removed.

The pairwise F_{ST} values estimated using the excluding null allele correction (Table 3) were very closed to the ones obtained when using the conventional method. In wNA, despite locations relatively distant from each other (up to 1800 km) pairwise F_{ST} estimates were low, ranging from -0.003 to 0.025. Pairwise genetic differentiation between eNA and wNA samples was larger with F_{ST} comprised between 0.027 and 0.082. European samples showed a higher level of genetic differentiation with American samples. Considering the European and the entire North American populations, each European sample has the lowest F_{ST} values with eNA populations and particularly with Pittston (comprised between 0.029 and 0.065). Overall, the highest F_{ST} value was observed between the two Spanish samples, Barcelona and Valencia (0.141).

The NJ tree constructed from Cavalli-Sforza and Edward's chord distances showed a split between two groups: (i) the wNA populations and (ii) all invasive populations, suggesting that European samples are more closely related to eNA samples than wNA samples (Fig. 2). Limitation of the analysis of genetic differentiation to the seven loci with a low proportion of null alleles produced qualitatively similar results.

When considering the whole data set, results of the Structure clustering suggest a number of clusters of $K = 2$ in all runs, corresponding to wNA vs. European populations and samples from eNA are more closely linked to European samples (Fig. 3). This result was in agreement with those suggested by the NJ tree. When only considering the invaded areas (eNA and Europe), the ΔK method of Evanno *et al.* (2005) suggested that the uppermost level of population structure was $K = 2$, one cluster formed by the eastern European samples while the other one grouped eNA, Spanish and Italian samples. French population showed sign of admixture between the two clusters. However, among the three French samples, individuals of the two most western samples (i.e. Yvoy-le-Marron and Lavercantière) had high probability of clustering with the eastern European group (assignment probability around 70%) while individuals of French alpin sample (Serre Ponçon) had assignment probabilities around 50% for both clusters. Increasing the number of clusters to $K = 3$, population of Barcelona was clearly differentiated from the rest forming a homogeneous and distinct cluster. Interestingly, when assuming $K = 4$, Structure suggested that individuals from Valencia formed a new cluster. When the wNA samples were analyzed separately, no particular structure could be identified. Restriction of the Bayesian clustering analysis to the seven loci with low proportion of null alleles had no qualitative effect on the results obtained and the use of other Structure models (with or without correlated allele frequencies or sampling location information) gave similar results (data not shown).

The isolation by distance correlation was non-significant in the native wNA area (eight samples: $r^2 = 0.060$; $P = 0.824$).

Modelling invasion scenarios using mitochondrial and microsatellite data

The two first ABC analyses which took into account the outbreaks of Northern Italy and Barcelona clearly indicated that these populations originated from two independent introductions from eNA (Table 5). The choice of the scenario involving an unsampled invasive population in eNA was supported for both analyses by high posterior probabilities (0.79 and 0.84 respectively) and moderate type I errors and low type II errors (Table 5). Estimates of the effective numbers of founders for the outbreaks of Alessandria and Barcelona obtained with the respective ABC analyses were 32 (95% CI = [4; 274]) and 65 (95% CI = [5; 528]).

The subsequent results were less clear-cut. When testing the origin of Vienna sample the selected scenario (an origin from an unsampled invasive eNA population) showed a weak posterior probability (0.31) and 95% confidence interval overlapping with four different scenarios (Table 5). This was true even when the analysis was repeated with the competing scenarios displaying an overlap only. This made it impossible to distinguish between the different scenarios. However, we assumed that this scenario could be the most likely one and the subsequent analyses were performed considering the unsampled eNA population as the origin of Vienna's population.

When considering French samples, the most likely scenario for Serre-Ponçon's population was an admixture from Italian and eastern European populations while Yvoy-le-Marron and Lavercaillère corresponded to an admixture between individuals from the unsampled population and eastern European cluster (Table 5). For the latter, all previous analyses showed that these two populations are genetically close and thus may correspond to two replicates of the same cluster. Although the type I errors were high, the same result was obtained for the two populations and gives consistency to the selected scenario. An admixture between the unsampled eNA population and individuals from Northern Italy was selected when considering the Valencian population and no 95% confidence interval overlap was observed. For the Bulgarian sample, it was impossible to distinguish between two scenarios (scenarios displaying a confidence interval overlap even after a second analysis). Both scenarios indicated an Austrian origin admixed with either the unsampled eNA or Italian population. However, the scenario involving an admixture between the Austrian population and individuals from Northern Italy was the scenario with the highest probability. For each selected scenario involving an admixture, the posterior distribution of admixture rates was estimated and reported in Table S2 (Supporting information).

Discussion

The North American situation

Across its native range, *L. occidentalis* exhibited a high genetic diversity but a weak genetic structuration with no sign of *IbD*. We observed a high number of mtDNA haplotypes, as observed in others heteropteran species (de la Rua *et al.* 2011; Xu *et al.* 2014; Zhou *et al.* 2012). This high level of haplotype diversity observed in *L. occidentalis* was confirmed by the nuclear markers which presented a high number of private alleles and an elevated allelic richness. All these indicators of high genetic diversity often characterize native populations (Auger-Rozenberg *et al.* 2012; Ciosi *et al.* 2008; Zepeda-Paulo *et al.* 2010).

We sampled seed-bugs from almost the entire assumed native range (Koerber 1963; Zhu *et al.* 2013), corresponding to a large geographic range (i.e. the western North America). Despite this relative important sampling effort (16 populations for mtDNA data set and eight for microsatellites), a low level of genetic differentiation was detected. Therefore, *L. occidentalis* presents a largely homogeneous population through its entire native area. In fact, the distribution of the *Cytb* haplotypes, the weak F_{ST} values between populations (mean value = 0.008) and the single genetic cluster observed with Structure suggest that gene flows occur between all populations, although geographically distant. A similar pattern was also reported in *Lygus hesperus*, another highly polyphagous heteropteran pest widely distributed in western North America (Zhou *et al.* 2012). The authors concluded that the bug is a good disperser, as we can note for *L. occidentalis* which shows great flight capacities (Malumphy *et al.* 2008). Moreover, we can also hypothesize that long human-mediated transports – the way of introductions in eNA and Europe – occur within wNA. Such a translocation of individuals is probably enhanced by the existence of an important economic corridor between Vancouver, Seattle, Portland, San Francisco and Los Angeles (Rodrigue *et al.* 2013) coupled with the habits of *L. occidentalis* coming into human-made structures and commercial containers for overwintering, sometimes in large aggregations (Blatt 1994; Gall 1992; Malumphy *et al.* 2008). Furthermore, the mtDNA data and microsatellite results were congruent, suggesting a similar pattern of dispersion.

Both mitochondrial and microsatellites data show a significantly lower level of genetic diversity in eNA samples than in wNA populations, reflecting a bottleneck. It is well recognized that invasive populations are frequently characterized by a loss of genetic diversity due to the introduction of a small number of individuals (Dlugosch & Parker 2008). Due to a limited representation of the genetic diversity in the invaded eNA, further studies with a better sampling are required to ensure a fine-scale analysis of the genetic diversity in this region. However, populations largely fluctuate depending on years, especially in eNA and *L. occidentalis* seems to be present in this

area at low densities, making it difficult to detect. Moreover, the weak differentiation observed in native samples makes it difficult to identify precisely the potential source of invasion from western to eastern America (Wares *et al.* 2005). Accordingly, among the two most common haplotypes detected in eNA populations, only one (H20) is observed in wNA and this one is relatively widespread across the native range. Despite a good representation of the native range, the haplotype H51, the second majoritarian haplotype of eNA area was not found in wNA. It is unlikely that the occurrence of this haplotype is due to mutation process given the short time of divergence between introduced bugs and native ones. Rather, it may result from genetic drift which may have favoured a rare haplotype in invaded area lost or not detected in native range.

A bridgehead scenario for European invasion

We unambiguously demonstrate that European invasion proceeded from multiple introductions, originated independently from eNA. The mitochondrial data were consistent with this hypothesis since the two most common haplotypes observed in Europe are the same than those found in eNA samples. This assumption was also supported by the monophyletic relationships of European and eNA samples on NJ tree. Moreover, to better characterize the origin and to reconstruct the history of European invasion, we performed several ABC analyses in which we included an unsampled population. It is most likely that this unsampled population is distributed in eNA. Consequently, we fixed as priors the dates of the first observation within eNA (i.e. 1956 (Schaffner 1967)) and the corresponding number of generations since this observation. The results highlight multiple independent introductions in Europe from the unsampled eNA population; the first one in Northern Italy and the second one in Catalonia (Spain). The results of ABC analysis for these two populations were supported by high posterior probabilities and the 95% CI of the most likely scenario never overlapped with those of other competing scenarios. Our ABC analyses point also additional introductions from eNA with possible admixture with European established populations (see below). Therefore, all of our analyses showed a stronger genetic affinity of the European invasive samples with the eNA samples rather than with those of native range. These results suggest that the eNA acted as a bridgehead for European invasion. The *invasive bridgehead effect* is defined as the phenomenon in which one particular invasive population serves as a source for subsequent invasions (Lombaert *et al.* 2010). Although the concept was recently formalized with the worldwide invasive Harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, it is potentially a common phenomenon (e.g. Ascunce *et al.* 2011; Boubou *et al.* 2012; Miller *et al.* 2005).

Our data confirm previous suspicions on multiple introductions from eNA which were highly suspected as reflected by the two interceptions directly related to timber shipments from the USA (Dusoulie *et al.* 2007; Malumphy *et al.* 2008) with a Pennsylvanian origin of the shipment for

the French interception (J. C. Streito, comm. pers.). These results are also congruent with the first insights into genetic diversity in Spain which suggested the U.S. Atlantic coast as a possible source for European populations (Gallego *et al.* 2013). However, Gallego *et al.* (2013) hypothesized from mtDNA analysis that Barcelona's outbreak could be originate from the original Italian introduction with a subsequent natural spread passing through the Pyrenees. The largest sampling as well as the nuclear markers used in our study told a different story. We clearly demonstrate that these two bursts correspond to independent introductions from eNA.

History of European invasion: a complex story

With our study, it emerges that European invasion seems to be a complex scenario involving several independent introductions and spread from established populations. However, there are still some obscure issues. Concerning the Austrian sample, we could not conclude precisely about the origin of this population. Rabitsch & Heiss (2005) which reported the first Austrian observations (i.e. 2005) suggested that these populations were the results of natural spread from Northern Italy and Slovenia. The NJ tree results but also the slightly lower allelic richness and genetic diversity in the sample of Vienna compared to its possible Italian source are in agreement with this hypothesis. Nonetheless, we observed with Structure that the two samples belong to different clusters with no sign of admixture. This clustering pattern could be the result of stochastic processes involving genetic drift rather than other introduction from eNA (Dlugosch & Parker 2008; Wares *et al.* 2005). Moreover, the ABC results were ambiguous and no competing scenario could be clearly selected. The scenario with the highest probability is the one that represents an unsampled origin and consequently, pinpoints another introduction event from eNA. However, it was impossible to distinguish between three other scenarios comprising admixture scenarios where eNA, Northern Italy and Catalonia were involved. We cannot conclude if Austrian population proceeded from an independent introduction from eNA and/or from spread (natural or not) from European populations.

A certain level of admixture was observed in the three French samples (see Structure Results). Regarding our ABC results, the signature of admixture of the sample of Serre-Ponçon involves northern Italy and the cluster found in eastern Europe whereas the scenario with the highest probability for the two western populations (Yvoy le Marron and Lavercantière) implicates an admixture between eNA and the eastern European cluster. This latter result indicates another introduction event and is congruent with the available historical data which suggest at least one introduction (if not more) in North of Europe (Aukema & Libeer 2007; Dusoulier *et al.* 2007; Malumphy *et al.* 2008). The alpine population of Serre-Ponçon is more linked with the Italian sample and confirmed, partly, previous study which hypothesized natural spread from Italy (Dusoulier *et al.* 2007). Therefore, introduction from eNA and the natural spread of the bug and/or

human translocations from established European populations could explain the genetic pattern observed in France.

We highlight a surprising situation in Spain with two independent introductions and no apparent gene flow between invaded areas. Historical data based on first detections and the monitoring of Spanish spread hypothesized multiple introductions with a possible one in South of the country (Pérez Valcárcel & Prieto Piloña 2010). Our ABC analyses are consistent with this hypothesis and clearly show that the Valencian population corresponds to a mixture of Northern Italian and unsampled eNA populations. Again, this might be explained by the affinity of the bug to move within cargos. The port of Valencia is the largest seaport in the Mediterranean Sea basin and Italy and the USA are among the major importing countries (Valenciaport 2011). Moreover, gene flow between the two Spanish populations appears to be limited suggested by a relatively high F_{ST} value (0.141) and the clustering approach for invasive populations when considering $K = 4$. Additionally, the different scenarios involving Barcelona as a potential source for the colonists that founded the Valencian population are not supported by our ABC analysis. Barcelona (with a first observation in 2003 (Ribes & Escolà 2005)) and Valencia (where the bug was detected later, i.e. around 2009 (Pérez Valcárcel & Prieto Piloña 2010)) are separated by a distance of ca. 300 km. The bugs were not detected in border provinces in the South of Barcelona before 2009. Future investigations are thus required to determine if the genetic differentiation and the apparent limited gene flow will be maintained in time and if it is the case, to identify the occurrence of a hypothetical natural barrier, as suggested by a lower level of suitability of the Ebro Valley (Zhu *et al.* 2013).

Even if ABC method is a powerful tool to reconstruct the invasion history of invasive species, it might also present some limitations. The very fast invasion of Europe (just a decade) and the intensity of trading and travelling, combined with the affinity of the bug to man-made structure raise the opportunities for inadvertent invasions, leading to more and more complex invasion scenarios. Consequently, we cannot exclude that more complex scenarios were not tested in this study. Moreover, DIYABC software assumes that there is no migration between the invasive populations (Cornuet *et al.* 2014). Lesieur *et al.* (2014b) suggest that massive migrations at rather long-distance owing to strong flight capability of adults occur and could partly explain population dynamics observed in some European places. The sampled European localities are not geographically discreet; accordingly migration between populations could be an important parameter, also suggested by the weak geographic structure in the native range. This highlights the challenge that tracing the invasion at very fine-scale represents especially for invasive species showing high dispersal capacities such as *L. occidentalis*.

Factors influencing the success of this fast invasion?

The propagule pressure, taking into account the number of introduction events (propagule number) and the number of individuals in each introduction (propagule size), is recognized as a consistent factor explaining colonization success (see Simberloff 2009). Increasing the propagule pressure raises the probability of a successful establishment and thus a subsequent invasion. In this context, multiple introductions have been identified as one of the reason underlying the successful establishment of several invasive species (Dlugosch & Parker 2008; Miller *et al.* 2005; Zepeda-Paulo *et al.* 2010). Our results provide another example of multiple introduction events. Moreover, regarding the invasive success of eNA population, this particular population could be considered as pre-adapted for further invasions. Multiple genetic shifts are required for multiple introductions from different sources whereas a bridgehead scenario implies only one evolutionary change occurring in the bridgehead population, facilitating subsequent invasions (Lombaert *et al.* 2010). Additionally, a large number of founders increases the probability of a successful invasion despite several examples of successful establishment from a small number of individuals (Lye *et al.* 2011; Pascual *et al.* 2007; Zayed *et al.* 2007). The number of effective founders for the outbreaks of Alessandria and Barcelona (the most supported ABC results) are estimated to 32 (CI 4; 274) and 65 (CI 5; 528) respectively. Although the confidence intervals of the two different estimations are large, these values are congruent with the numbers of insects found in aggregation sites varying from less than a dozen to several hundred individuals in North America (Blatt 1994) as well as in Europe (V. Lesieur pers. obs.). Although invasive North American and European samples of *L. occidentalis* displayed a lower genetic diversity compared to wNA samples, they show a relatively high diversity. These results suggest that the intensity of bottleneck observed in European samples as well as in eNA populations seems to have been moderate. Such bottlenecks of intermediate intensity could also facilitate invasions by purging deleterious mutations underlying inbreeding depression, as observed in *H. axyridis* (Facon *et al.* 2011). European expansion of *L. occidentalis* (and undoubtedly the North American one) was enhanced by human activity. Nevertheless, environmental factors and biological traits of the species have promoted its invasive success. Most parts of Europe constitute a suitable habitat for the bug (Zhu *et al.* 2013). Moreover, its high fecundity (Bates & Borden 2005), its strong flight capability allowing adults to counterbalance the patchy distribution of conifer stands observed in some areas and its capacity of exploiting most of native European conifers (Lesieur *et al.* 2014b; Tamburini *et al.* 2012) might be contributed to invasive success of this species. Additionally, in Europe, the bug apparently escaped from its natural enemies such as *Gryon pennsylvanicum* considered as the main natural enemy in the native range (Bates & Borden 2004) allowing a rapid and unregulated population growth (enemy-release hypothesis see Liu & Stiling 2006).

Conclusions

With our study, we show that European invasion of *L. occidentalis* proceeded from multiple independent introductions combined with spread from established populations. We highlight at least two independent introductions and although less robust results were obtained, additional introductions in Spain, France and Austria are suggested. However, even if other introductions took place in Europe, they would originate from the American invasive range (i.e. eNA) which reinforces one of our main results; eNA acted as a bridgehead for European invasion. Limiting the spread in Europe is too late since the bug is found everywhere within the Old Continent. Nevertheless, our study may usefully inform the deployment of detection methods (especially in the harbor areas) designed to limit the spread to new areas such as South Africa, South America or New-Zealand which appear suitable for other *Leptoglossus* invasions (Zhu *et al.* 2013). This study also suggests that Europe should not be ignored in terms of invasion source for subsequent invasions and raises the following question: could European populations act as a bridgehead for latter invasions?

Acknowledgements

We are indebted to C. Carvalho and N. Gillette (Institute of Forest Genetics, Placerville, USA), N. Wihelmi (Washington Department of Natural Resources, USA), B. Slonecker and S. Cook (University of Idaho, USA), K. Gibson and A. Gannon (Montana Department of Natural Resources and Conservation, USA), J. Egan, S. Kegley, T. Steel and B. Steed (USDA Forest Service, USA), W. Cranshaw (Colorado State University, USA), R. Campos (Universidad Autonoma Chapingo), H. Russell (Michigan State University, USA), J. Hahn (University of Minnesota, USA), S. Passoa (APHIS – USDA, Ohio State University, USA), C. Sclar and B. Landhuis (Longwood Gardens Inc., USA), O. Lonsdale (Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Canada), J. Sweeney (Natural Resources Canada Canadian Forest Service, Canada), M. Giroux (Insectarium de Montreal, Canada), C. Briet (Vivarmor, France), C. Brua (Société Alsacienne d'Entomologie, France), C. Blazy (ONF, France), E. de Sousa (National Institute of Biological Resources, Portugal), M. Á. Gómez de Dios (Agencia de Medio Ambiente y Agua de Andalucía, Spain), Antonio Muñoz Risueño (Spain), G. Sanchez Peña (ICP Forest, Spain), S. Chiesa (Italy), A. Battisti (University of Padova, Italy), C. Stauffer (University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria), N. Simov (National Museum of Natural History, Sofia, Bulgaria), M. Düzbastilar (University of Izmir, Turkey), G. Popov and A. Gubin (Donetsk Botanical Garden, Ukraine) and D. Musolin (University of Saint Petersburg, Russia) which provided bug samples. We greatly acknowledge support from the European projects ISEFOR (*Increasing Sustainability of European Forests: Modelling for Security Against Invasive Pests and Pathogens under Climate Change* – collaborative project 245268), Cost action PERMIT (*Pathway*

Evaluation and pest Risk Management In Transport) and the French Ministry of Agriculture, Food, Fisheries, Rural Affairs and Spatial Planning (convention DGFAR 01/09). We gratefully thank C. Bertheau (University of Franche-Comté, France) and J. Rousselet (INRA, Orléans) for their helpful advices. We are grateful to T. Bourgeois and C. Courtin for technical assistance.

Author Contributions. Conceived and designed the experiments: VL, AR, MAAR. Performed the sampling: VL, WS, AR. Performed the experiments: VL, BC. Analyzed the data: VL, EL, TG, MAAR. Wrote the paper: VL, EL, TG, WS, AR, MAAR.

References

- Ahn SJ, Son D, Choo HY, Park CG (2013) The first record on *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) in Korea, a potential pest of the pinaceous tree species. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **16**, 281–284.
- Ascunce MS, Yang CC, Oakey J, *et al.* (2011) Global Invasion History of the Fire Ant *Solenopsis invicta*. *Science* **331**, 1066–1068.
- Auger-Rozenberg MA, Boivin T, Magnoux E, *et al.* (2012) Inferences on population history of a seed chalcid wasp: invasion success despite a severe founder effect from an unexpected source population. *Molecular Ecology* **21**, 6086–6103.
- Aukema B, Libeer R (2007) Eerste waarneming van *Leptoglossus occidentalis* in België (Heteroptera: Coreidae). *Bulletin van de Koninklijke Belgische Vereniging voor Entomologie* **143**, 92–93.
- Aukema JE, Leung B, Kovacs K, *et al.* (2011) Economic impacts of non-native forest insects in the continental United States. *PLoS ONE* **6**, e24587.
- Bates SL, Borden JH (2004) Parasitoids of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) in British Columbia. *Journal of the Entomological Society of British Columbia* **101**, 143–144.
- Bates SL, Borden JH (2005) Life table for *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) and prediction of damage in lodgepole pine seed orchards. *Agricultural and Forest Entomology* **7**, 145–151.
- Bates SL, Borden JH, Savoie A, *et al.* (2000) Impact of feeding by *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) on the major storage reserves of mature Douglas-fir (Pinaceae) seeds. *Canadian Entomologist* **132**, 91–102.
- Beaumont MA, Zhang WY, Balding DJ (2002) Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics* **162**, 2025–2035.
- Ben Jamaa ML, Mejri M, Naves P, Sousa E (2013) Detection of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera: Coreidae) in Tunisia. *African Entomology* **21**, 165–167.
- Bernardinelli I, Zandigiacomo P (2001) *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera, Coreidae): a conifer seed bug recently found in northern Italy. *Journal of Forest Science* **47**, 56–58.

- Blatt SE (1994) An unusually large aggregation of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae), in a man-made structure. *Journal of the Entomological Society of British Columbia* **91**, 71–72.
- Boubou A, Migeon A, Roderick GK, *et al.* (2012) Test of colonisation scenarios reveals complex invasion history of the red tomato spider mite *Tetranychus evansi*. *PLoS ONE* **7**, e35601.
- Brockerhoff EG, Liebhold AM, Jactel H (2006) The ecology of forest insect invasions and advances in their management. *Canadian Journal of Forest Research* **36**, 263–268.
- Cavalli-Sforza LL, Edward AWF (1967) Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* **19**, 233–257.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 621–631.
- Ciosi M, Miller NJ, Kim KS, *et al.* (2008) Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity. *Molecular Ecology* **17**, 3614–3627.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657–1687.
- Cornuet JM, Pudlo P, Veyssier J, *et al.* (2014) DIYABC v2.0: a software to make Approximate Bayesian Computation inferences about population history using Single Nucleotide Polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics* **30**, 1187–1189.
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, *et al.* (2008) Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics* **24**, 2713–2719.
- Crandall KA, Templeton AR (1993) Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* **134**, 959–969.
- de la Rua N, Stevens L, Dorn PL (2011) High genetic diversity in a single population of *Triatoma sanguisuga* (LeConte, 1855) inferred from two mitochondrial markers: Cytochrome b and 16S ribosomal DNA. *Infection Genetics and Evolution* **11**, 671–677.
- Dempster A, Laird M, Rubin D (1977) Maximum likelihood from incomplete data *via* the EM algorithm. *Journal of the Royal statistical Society* **39**, 1–38.
- Dlugosch KM, Parker IM (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* **17**, 431–449.
- Dusoulier F, Lupoli R, Aberlenc HP, Streito JC (2007) L'invasion orientale de *Leptoglossus occidentalis* en France: bilan de son extension biogéographique en 2007 (Hemiptera Coreidae). *L'Entomologiste* **63**, 303–308.
- Earl DA, Vonholdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359–361.
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology* **19**, 4113–4130.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* **11**, 1591–1604.

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611–2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* **1**, 47–50.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among DNA Haplotypes – Application to Human Mitochondrial-DNA Restriction Data. *Genetics* **131**, 479–491.
- Facon B, Hufbauer RA, Tayeh A, *et al.* (2011) Inbreeding depression is purged in the invasive insect *Harmonia axyridis*. *Current Biology* **21**, 424–427.
- Fent M, Kment P (2011) First record of the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Turkey. *North-Western Journal of Zoology* **7**, 72–80.
- Gall WK (1992) Further eastern range extension and host records for *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae): well-documented dispersal of a household nuisance. *Great Lakes Entomologist* **25**, 159–171.
- Gallego D, Más H, Gonzáles-Rosa E, Sánchez-García FJ (2013) Primeros resultados sobre el origen de las poblaciones de *Leptoglossus occidentalis*. In: 6e Congreso Forestal Español, Sociedad Española de Ciencias Forestales–Montes: Servicios y desarrollo rural, 10–14/06/2013, Vitoria-Gasteiz. 6CFE01–408: 10 p.
- Gandhi KJK, Herms DA (2010) North American arthropods at risk due to widespread *Fraxinus* mortality caused by the Alien Emerald ash borer. *Biological Invasions* **12**, 1839–1846.
- Gapon DA (2012) First Records of the Western Conifer Seed Bug *Leptoglossus occidentalis* Heid. (Heteroptera, Coreidae) from Russia and Ukraine, Regularities in Its Distribution and Possibilities of Its Range Expansion in the Palaearctic Region. *Entomological Review* **93**, 174–181.
- Goudet J (2002) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Updated from Goudet (1995). Available from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> [consulté le 28/04/2014]
- Guillemaud T, Beaumont MA, Ciosi M, Cornuet JM, Estoup A (2010) Inferring introduction routes of invasive species using approximate Bayesian computation on microsatellite data. *Heredity* **104**, 88–99.
- Harry M, Solignac M, Lachaise D (1998) Molecular evidence for parallel evolution of adaptative syndromes in fig-breeding *Lissocephala* (Drosophilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9**, 542–551.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1322–1332.
- Hulme PE (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology* **46**, 10–18.
- Ishikawa T, Kikuhara Y (2009) *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae), a presumable recent invader to Japan. *Japanese Journal of Entomology* **12**, 115–116.

- Jermiin LS, Crozier RH (1994) The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: Sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution* **38**, 282–294.
- Juliano SA, Lounibos LP (2005) Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. *Ecology Letters* **8**, 558–574.
- Kenis M, Auger-Rozenberg MA, Roques A, *et al.* (2009) Ecological effects of invasive alien insects. *Biological Invasions* **11**, 21–45.
- Kenis M, Branco M (2010) Impact of alien terrestrial arthropods in Europe. In: Roques A, Kenis M, Lees D *et al.* (eds) Alien terrestrial arthropods of Europe, vol 4(1). Pensoft, Sofia, BGR **5**, 51–71.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111–120.
- Kirk H, Dorn S, Mazzi D (2013) Molecular genetics and genomics generate new insights into invertebrate pest invasions. *Evolutionary Applications* **6**, 842–856.
- Koch RL (2003) The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science* **3**, 1–13.
- Koerber TW (1963) *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera, Coreidae), a Newly Discovered Pest of Coniferous Seed. *Annals of the Entomological Society of America* **56**, 229–234.
- Langella O (1999) Populations Ver. 1.2.31. a population genetic software. Available from: <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/> [consulté le 28/04/2014]
- Lesieur V, Courtial B, Roques A, Auger-Rozenberg MA (2014a) Isolation and characterization of 11 polymorphic microsatellite markers in the highly invasive Western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera, Coreidae). *Conservation Genetics Resources*, 1–3.
- Lesieur V, Yart A, Guillon S, *et al.* (2014b) The invasive *Leptoglossus* seed bug, a threat for commercial seed crops, but for conifer diversity? *Biological Invasions*, 1–17.
- Liu H, Stiling P (2006) Testing the enemy release hypothesis: a review and meta-analysis. *Biological Invasions* **8**, 1535–1545.
- Lombaert E, Guillemaud T, Cornuet J-M, *et al.* (2010) Bridgehead Effect in the Worldwide Invasion of the Biocontrol Harlequin Ladybird. *PLoS ONE* **5**, e9743
- Lye GC, Lepais O, Goulson D (2011) Reconstructing demographic events from population genetic data: the introduction of bumblebees to New Zealand. *Molecular Ecology* **20**, 2888–2900.
- Malumphy C, Botting J, Bantock T, Reid S (2008) Influx of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Coreidae) in England. *Het News* **2**, 7–9.
- McPherson JE, Packauskas RJ, Taylor SJ, O'Brien MF (1990) Eastern range extension of *Leptoglossus occidentalis* with a key to *Leptoglossus* species of America north of Mexico (Heteroptera: Coreidae). *Great Lakes Entomologist* **23**, 99–104.
- Miller N, Estoup A, Toepfer S, *et al.* (2005) Multiple transatlantic introductions of the western corn rootworm. *Science (Washington)* **310**, 992.
- Page RDC (1996) Tree view: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bioinformatics* **12**, 357–358.

- Pascual M, Chapuis MP, Mestres F, *et al.* (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology* **16**, 3069–3083.
- Pérez Valcárcel J, Prieto Piloña F (2010) La contribución de registros fotográficos en internet para estudios faunísticos: el caso de la expansión iberoibalear de la especie invasora *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera, Coreidae). *Arquivos Entomoloxicos* **4**, 45–52.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12**, 844–855.
- Pons O, Petit RJ (1996) Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* **144**, 1237–1245.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959.
- Rabitsch W, Heiss E (2005) *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910, eine amerikanische Adventivart auch in Österreich aufgefunden (Heteroptera: Coreidae). *Berichte des naturwissenschaftlich-medizinischen Verein Innsbruck* **92**, 131–135.
- Ribes J, Escolà O (2005) *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910, Hemípter neàrtic trobat a Catalunya (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae) (*Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910, a Nearctic bug (Hemiptera, Heteroptera, Coreidae) found in Catalonia, Spain). *Sessio Conjuncta d'Entomologia ICHN-SCL* **13**, 47–50.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223–226.
- Ridge-O'Connor GE (2001) Distribution of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) in Connecticut and parasitism by a tachinid fly, *Trichopoda pennipes* (F.) (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* **103**, 364–366.
- Rodrigue JP, Slack B, Blank S (2013) Transport Corridors in North America. In: *The Geography of Transport Systems*, third Edition. Routledge: London, New-York, **2(1)**, 42–87.
- Roques A (2010) Taxonomy, time and geographic patterns. In: Roques A, Kenis M, Lees D *et al.* (eds) *Alien terrestrial arthropods of Europe*, vol **4(1)**. Pensoft, Sofia, BGR, **2**, 11–26.
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* **4**, 137–138.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219–1228.
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103–106.
- Schaffner JC (1967) The occurrence of *Theognis occidentalis* in the midwestern United States (Hemiptera; Coreidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **40**, 141–142.
- Simberloff D (2009) The Role of Propagule Pressure in Biological Invasions. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* vol **40**, 81–102.
- Simov N (2008) Western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera: Coreidae) already in Bulgaria. *Historia naturalis bulgarica* **19**, 179–180.

- Strong WB (2006) Seasonal changes in seed reduction in lodgepole pine cones caused by feeding of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae). *Canadian Entomologist* **138**, 888–896.
- Tamburini M, Maresi G, Salvadori C, *et al.* (2012) Adaptation of the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* to Trentino, an alpine region (Italy). *Bulletin of Insectology* **65**, 161–170.
- Taylor SJ, Tescari G, Villa M (2001) A nearctic pest of pinaceae accidentally introduced into Europe. *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera : Coreidae) in northern Italy. *Entomological News* **112**, 101–103.
- Valenciaport, Autoridad Portuaria de Valencia, (2011) Statistical Yearbook 2011, Port Authority of Valencia, 144 p.
- Wares JP, Hughes AR, Grosberg RK (2005) Mechanisms that drives evolutionary change: insights from species introductions and invasions. In: Sax DF, Stachowicz JJ, Gaines SD (eds), *Species Invasions: Insights into Ecology, Evolution and Biogeography*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, pp 229–257.
- Westphal MI, Browne M, MacKinnon K, Noble I (2008) The link between international trade and the global distribution of invasive alien species. *Biological Invasions* **10**, 391–398.
- Xu JW, Fonseca DM, Hamilton GC, Hoelmer KA, Nielsen AL (2014) Tracing the origin of US brown marmorated stink bugs, *Halyomorpha halys*. *Biological Invasions* **16**, 153–166.
- Zayed A, Constantin SA, Packer L (2007) Successful Biological Invasion despite a Severe Genetic Load. *PLoS ONE* **2**, e 868.
- Zepeda-Paulo FA, Simon JC, Ramirez CC, *et al.* (2010) The invasion route for an insect pest species: the tobacco aphid in the New World. *Molecular Ecology* **19**, 4738–4752.
- Zhang DX, Hewitt GM (1996) Nuclear integrations: Challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 247–251.
- Zhou CQ, Kandemir I, Walsh DB, Zalom FG, Lavine LC (2012) Identification of *Lygus hesperus* by DNA Barcoding Reveals Insignificant Levels of Genetic Structure among Distant and Habitat Diverse Populations. *PLoS ONE* **7**, 34528.
- Zhu G-P, Rédei D, Kment P, Bu W-J (2013) Effect of geographic background and equilibrium state on niche model transferability: predicting areas of invasion of *Leptoglossus occidentalis*. *Biological Invasions*, 1–13.
- Zhu WB (2010) Exotic coreid bugs introduced into China. In: proceeding of the 4th meeting of the International Heteropterist's Society. Nankai University, Tianjin, China, July 12–17, 2010. Nankai University, Tianjin, p.71

Figures and Tables

FIGURE 1. Geographic distribution of *Leptoglossus occidentalis* mitochondrial haplotypes in (A) North America, (B) Europe and (C) haplotype network. Single haplotype or haplotype found in a single site are represented in white.

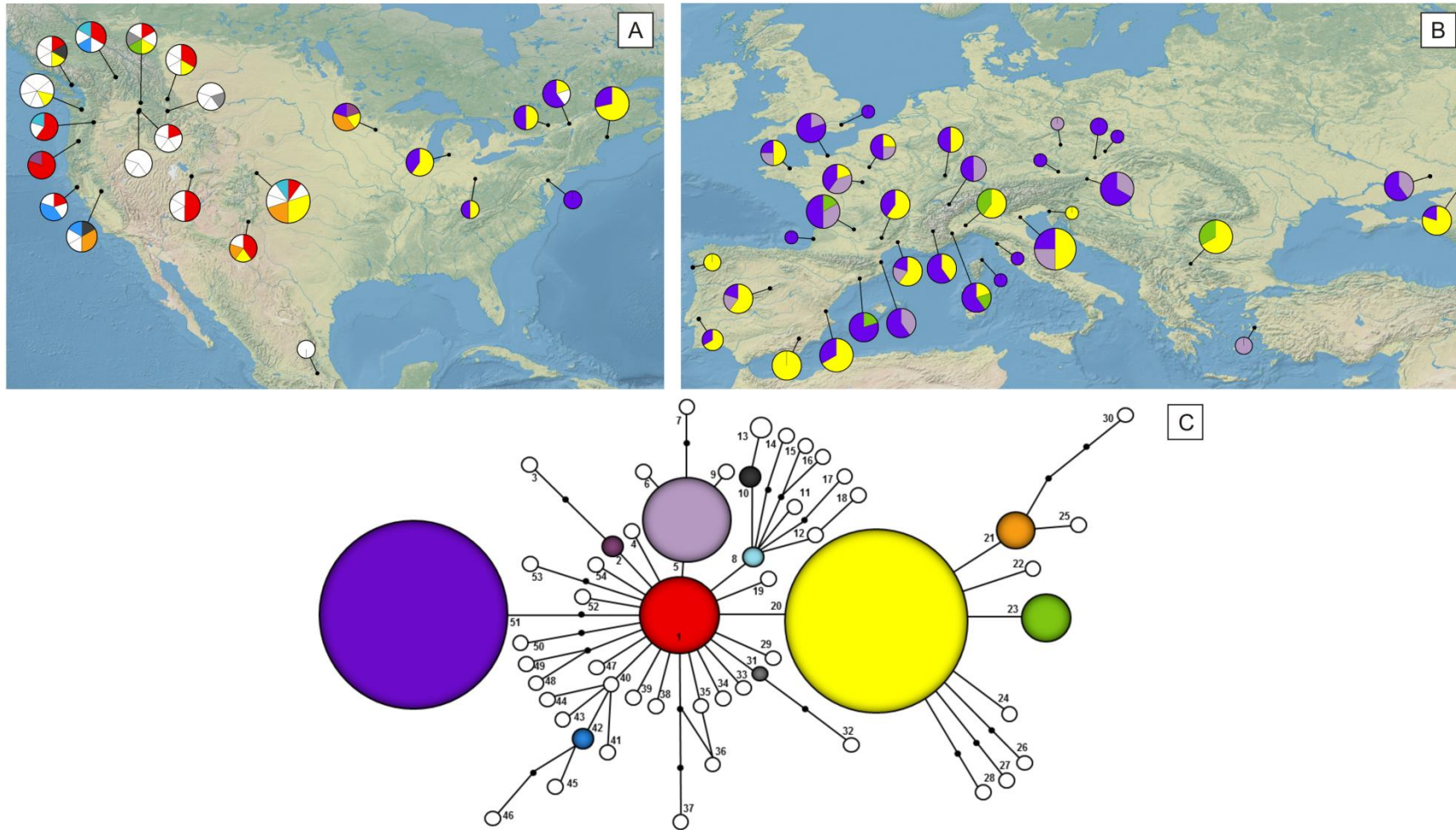


FIGURE 2. Neighbour-joining tree based on the chord distance of Cavalli-Sforza & Edwards (1967) the sampled populations of *Leptoglossus occidentalis*. Bootstrap values indicated at each node corresponded to percentages support calculated over 1,000 iterations (only values >30% are shown).

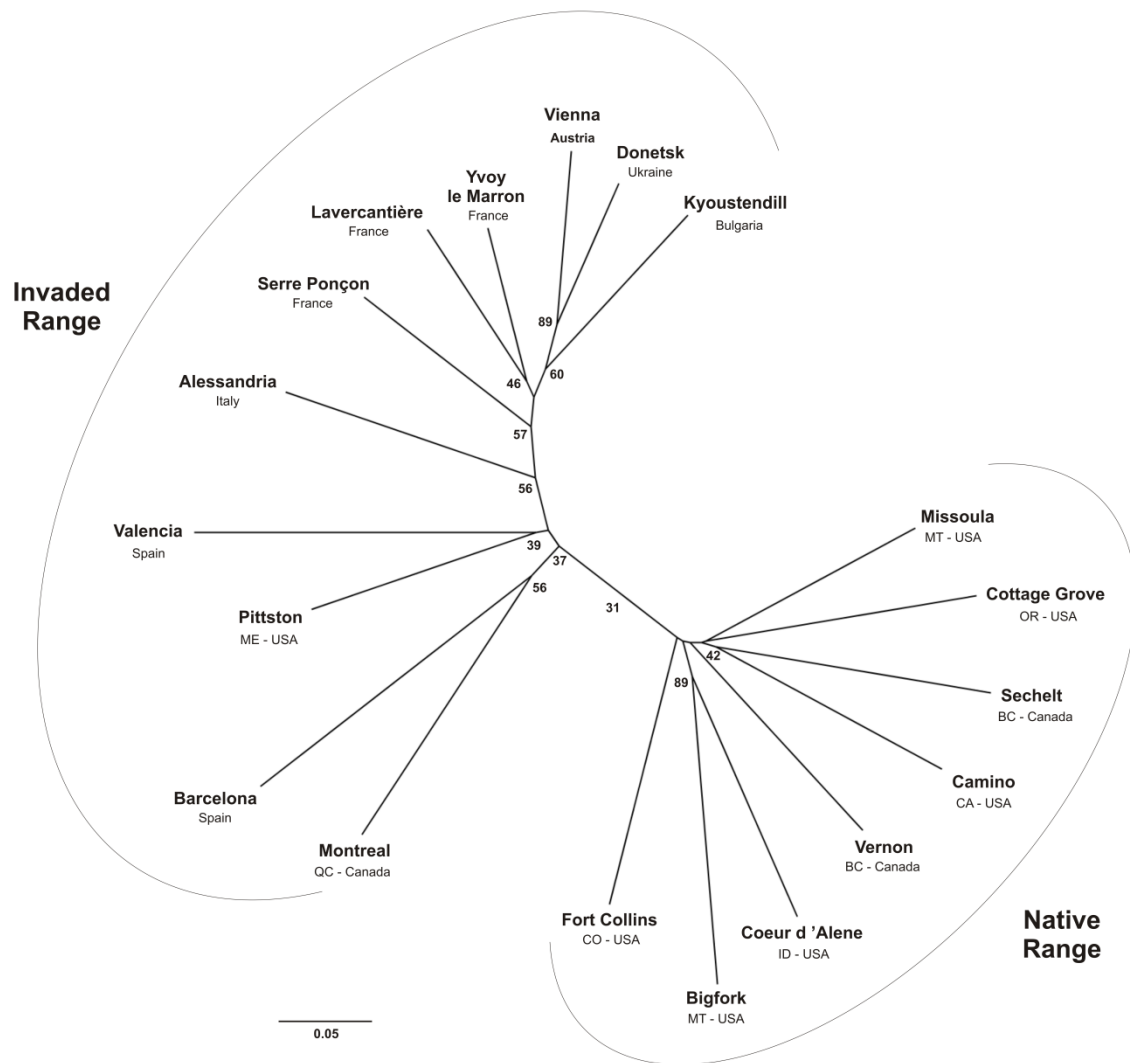


FIGURE 3. Graphical representation of population genetic structure estimated by Bayesian clustering approach implemented in Structure software. Regions are indicated above the plots whereas sampling localities and countries are indicated below. Each individual is represented by a vertical line and each color corresponds to a different cluster. (A) Assignment of the 506 individuals (whole data set) to $K = 2$ and $K = 3$ (B) Assignment of the invaded populations (288 individuals) to $K = 2$; $K = 3$ and $K = 4$). * indicates optimal number of clusters estimated with ΔK method of Evanno *et al.* (2005).

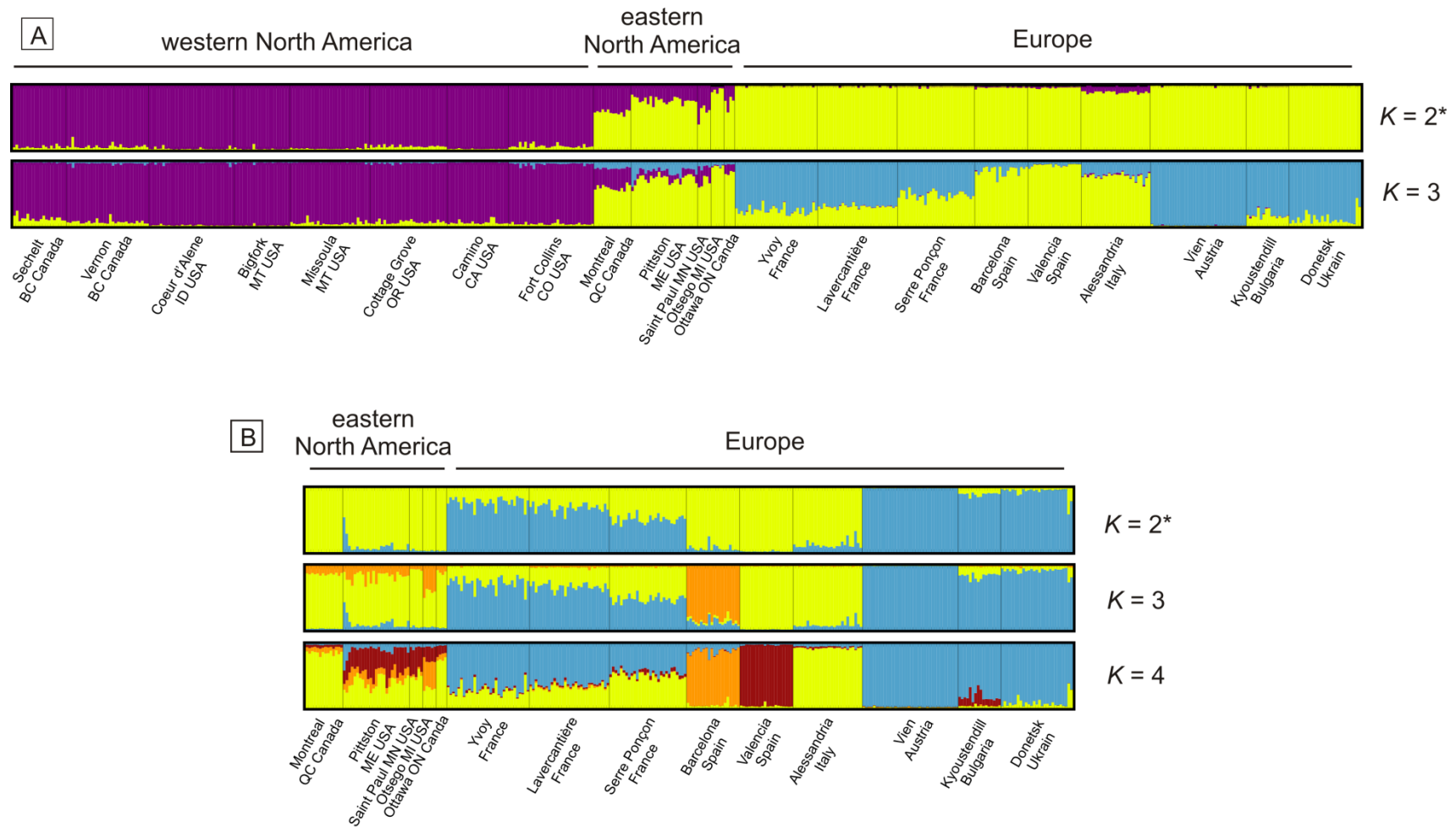


TABLE 1. Sampling details and summary statistics of the sampled *Leptoglossus occidentalis* populations used in this study.

Region	Locality	Code	Coordinates		Year of collection	mtDNA			microsatellites				
			Latitude	Longitude		<i>N</i>	<i>Hd</i>	<i>r</i>	<i>N</i>	<i>AR</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F_{IS}</i>
western	Sechelt, BC, Canada	Sech	49.472933	-123.750368	2011	6	1.000 ± 0.096	2.000	20	7.193	0.564	0.648	0.155*
North	Vernon, BC, Canada	Vern	50.255069	-119.292145	2011	6	0.933 ± 0.122	1.800	31	7.615	0.607	0.668	0.107*
America	Olympia, WA, USA	-	46.992513	-122.740421	2011/2012	7	1.000 ± 0.076	2.000	-				
(wNA)	Moscow, ID, USA	-	46.732387	-117.000165	2011	5	0.900 ± 0.161	1.700	-				
	Potlach, ID, USA	-	46.926355	-116.916347	2011	5	1.000 ± 0.126	2.000	-				
	Cœur d'Alene, ID, USA	Coda	47.672091	-116.778866	2012	6	1.000 ± 0.096	2.000	32	7.259	0.511	0.653	0.232*
	Bigfork, MT, USA	Bifo	48.055259	-114.074262	2012	6	0.933 ± 0.122	1.800	21	7.521	0.502	0.628	0.224*
	Missoula, MT, USA	Miss	46.832601	-114.069318	2011	5	1.000 ± 0.126	2.000	30	8.054	0.564	0.671	0.175*
	Hood River, OR, USA	-	45.695006	-121.524514	2011	5	0.700 ± 0.214	1.200	-				
	Cottage Grove, OR, USA	Cott	43.797623	-123.059525	2011	5	0.400 ± 0.237	0.600	29	7.112	0.585	0.655	0.124*
	Ukiah, CA, USA	-	39.150171	-123.207783	2011	5	0.900 ± 0.161	1.700	-				
	Camino, CA, USA	Cami	38.741848	-120.746723	2012	6	0.933 ± 0.122	1.800	23	7.731	0.535	0.63	0.172*
	Provo, UT, USA	-	40.252742	-111.647293	2013	6	0.800 ± 0.172	1.450	-				
	Fort Collins, CO, USA	Foco	40.574718	-105.084829	2011	10	0.911 ± 0.077	2.000	32	8.035	0.563	0.657	0.159*
	Santa Fe, NM, USA	-	35.675314	-105.935366	2013	5	0.900 ± 0.161	1.700	-				
	Santiago de Anaya, Mexico	-	20.383077	-98.963615	2011	2			-				
					total	90	0.935 ± 0.019	16.629 [25]	218	7.565	0.554	0.651	0.169
eastern	Saint Paul, MN, USA	-	44.953703	-93.089958	2011	5	0.900 ± 0.161	2.000	5†				
North	Otsego, MI, USA	-	42.435467	-85.695658	2011	5	0.600 ± 0.176	0.900	5†				
America	Colombus, OH, USA	-	39.997389	-83.043978	2011	2			-				
(eNA)	Ottawa, ON, Canada	-	45.411563	-75.698241	2011	4	0.667 ± 0.204	1.000	4†				
	Montreal, QC, Canada	Mont	45.562487	-73.563325	2011	5	0.700 ± 0.218	1.200	14	5.532	0.519	0.54	0.075*
	Pittston, ME, USA	Pitt	44.221667	-69.755556	2011	7	0.536 ± 0.123	0.714	25	5.12	0.524	0.568	0.099*
	Kenett Square, PA, USA	-	39.846777	-75.711603	2011	2			-				

					total	30	0.639 ± 0.052	4.000 [25]	53	5.326	0.521	0.554	0.087
Europe	Maidstone, United Kingdom	-	51.278685	0.521897	2010	1			-				
	Luc sur Mer, France	-	49.317766	-0.355681	2012	5	0.400 ± 0.237	0.600	-				
	Saint Brieu, France	-	48.512085	-2.75631	2010/2011	4	0.833 ± 0.222	1.500	-				
	Brétigny sur Orge, France	-	48.587345	2.296880	2011	4	0.833 ± 0.222	1.500	-				
	Yvoy le Marron, France	Yvoy	47.632271	1.853664	2012	5	0.800 ± 0.164	1.400	31	4.695	0.508	0.623	0.202*
	Buhl, France	-	48.067240	7.099244	2010/2011	4	0.667 ± 0.204	1.000	-				
	Sion, Switzerland	-	46.226197	7.362539	2010	4	0.667 ± 0.204	1.000	-				
	Lit-et Mixe, France	-	44.033876	-1.258325	2009	2			-				
	Lavercantière, France	Lave	44.637437	1.317838	2011	7	0.667 ± 0.160	1.250	30	4.694	0.547	0.606	0.114*
	Islas Cies, Spain	-	42.230526	-8.904476	2012	2			-				
	Coruche, Portugal	-	38.960545	-8.527051	2012	3	0.667 ± 0.314	1.000	-				
	Segovia, Spain	-	40.902123	-4.007290	2012	5	0.700 ± 0.218	1.200	-				
	Almeria, Spain	-	37.711821	-2.172337	2012	5	0.000	0.000	-				
	Valencia, Spain	Vale	39.447367	-0.462580	2012	6	0.533 ± 0.172	0.800	20	3.821	0.486	0.491	0.036*
	Barcelona, Spain	Barc	41.520014	1.687327	2012	5	0.400 ± 0.237	0.600	20	3.614	0.385	0.487	0.233*
	Argeles sur Mer, France	-	42.566552	3.044035	2012	5	0.600 ± 0.175	0.900	-				
	Millau, France	-	44.100575	3.077801	2011	5	0.600 ± 0.175	0.900	-				
	Fontanès, France	-	43.829514	4.096884	2011	5	0.700 ± 0.218	1.200	-				
	Serre-Ponçon, France	Sepo	44.522716	6.331657	2011	5	0.600 ± 0.175	0.900	29	4.618	0.468	0.571	0.198*
	Cuneo, Italy	-	44.388799	7.547111	2011	5	0.700 ± 0.218	1.200	-				
	Alessandria, Italy	Ales	44.897352	8.406111	2011	5	0.600 ± 0.175	0.900	26	4.635	0.531	0.603	0.139*
	Bastia, France	-	42.699724	9.447017	2012	1			-				
	Pisa, Italy	-	43.722839	10.401689	2009	1			-				
	Padova, Italy	-	45.409538	11.876554	2010/2011	8	0.714 ± 0.123	1.214	-				
	Brje, Slovenia	-	45.784625	13.717780	2009	1			-				
	Prague, Czech Republic	-	50.012619	14.435832	2009	1			-				
	Olomouc, Czech Republic	-	49.588294	17.261793	2009	1			-				

Brno, Czech Republic	-	49.197508	16.610796	2009	2			-					
Vienna, Austria	Vien	47.838770	16.110660	2011	6	0.533 ± 0.172	0.800	36	3.754	0.519	0.579	0.118*	
Linz, Austria	-	48.301726	14.285188	2010	1			-					
Kyoustendill, Bulgaria	Kyou	42.458586	22.688239	2011	7	0.667 ± 0.16	0.800	16	4.088	0.473	0.558	0.185*	
Izmir, Turkey	-	38.399352	26.740800	2012	2			-					
Donetsk, Ukraine	Done	48.008679	37.884133	2012	6	0.733 ± 0.155	0.900	27					
Rostov, Russia	-	47.217561	39.698426	2012	5	0.400 ± 0.237	0.600	-	4.233	0.469	0.57	0.196*	
total					134	0.664 ± 0.020	2.820 [25]	235	4.239	0.487	0.565	0.158	

N: number of *L. occidentalis* individuals analyzed, † indicates individuals only used in Structure analysis, *Hd*: haplotype diversity and its standard deviation; *r*: allelic richness after rarefaction (rarefaction size was 3 while for estimations between the three main regions rarefaction size was 25 and is indicated in brackets), *AR*: allelic richness corrected for sample size (12), *Ho* and *He* observed heterozygosity and expected heterozygosity, *F_{IS}*: inbreeding coefficient, * HWE test is significant after sequential Bonferroni corrections.

TABLE 2. Prior distribution of parameters used for modelling the different scenarios of the European invasion of *Leptoglossus occidentalis*.

Parameters	Interpretation	Distribution	
N_i	Effective population size	Log-uniform	[1000; 100000]
t_{Uns}	Time to introduction event based on first observation in eNA (Schaffner 1967)	Uniform	[77; 82]
t_{Pitt}	Time to introduction event for Pittston (eNA) based on first observation (Ridge-O'Connor 2001)	Uniform	[25; 30]
t_{Ales}	Time to introduction event for Alessandria (Northern Italy) based on first observation (Taylor <i>et al.</i> 2001)	Uniform	[18; 23]
t_{Barc}	Time to introduction event for Barcelona (Spain) based on first observation (Ribes & Escolà 2005)	Uniform	[12; 17]
t_{Vien}	Time to introduction event for Vienna (Austria) based on first observation (Rabitsch & Heiss 2005)	Uniform	[9; 14]
t_{Sepo}	Time to introduction event for Serre-Ponçon (France) based on first observation (Dusoulier <i>et al.</i> 2007)	Uniform	[6; 11]
t_{Yvoy}	Time to introduction event for Yvoy le Marron (France) based on first observation (A. Roques comm. pers.)	Uniform	[4; 9]
t_{Lave}	Time to introduction event for Laverantière (France) based on first observation (A. Roques comm. pers.)	Uniform	[4; 9]
t_{Kyou}	Time to introduction event for Kyoustendill (Bulgaria) based on first observation (Simov 2008)	Uniform	[4; 9]
t_{Vale}	Time to introduction event for Valencia (Spain) based on first observation (Pérez Valcárcel & Prieto Piloña 2010)	Uniform	[4; 9]
db_i	Duration of bottleneck	Uniform	[0; 10]
Nb_i	Effective number of founders during an introduction step	Log-uniform	[2; 1000]
ar	Admixture rate for scenarios with admixture	Uniform	[0.1; 0.9]
mean μ_{seq}	Mean mutation rate for mitochondrial marker	Uniform	$[10^{-8}; 10^{-6}]$
mean μ_{mic}	Mean mutation rate for microsatellite markers	Uniform	$[10^{-5}; 10^{-3}]$
mean P	Mean parameter of the geometric distribution	Uniform	[0.1; 0.3]
mean μ_{SNI}	Mean single nucleotide insertion/deletion rate	Uniform	$[10^{-8}; 10^{-4}]$

Time parameters (including duration of bottleneck) are translated into numbers of generations assuming 1.5 generation per year. The following conditions were used in the different analyses $t_{Uns} > t_{Pitt} > t_{Ales} > t_{Barc} \geq t_{Vien} \geq t_{Sepo}$, t_{Yvoy} , t_{Lave} , t_{Kyou} and t_{Vale} . A Generalized Stepwise Mutation model (GSM) was used for microsatellites with a mean mutation rate (mean μ_{mic}), a mean parameter of the geometric distribution (mean P) of the length in number of repeats of mutation events. Each locus had a possible range of 40 contiguous allelic states and the mean insertion or deletion of single nucleotide mean μ_{SNI} . Mitochondrial marker was assumed to follow a Kimura-2-Parameters model with a mean mutation rate (mean μ_{seq}). The fixed boundaries of each prior are shown within brackets.

TABLE 3. Pairwise F_{ST} estimates between the different sampled populations of *Leptoglossus occidentalis*.

	western North America (wNA)								eastern North America (eNA)		Europe								
Populations	Sech	Vern	Coda	Bifo	Miss	Cott	Cami	Foco	Mont	Pitt	Yvoy	Lave	Sepo	Barc	Vale	Ales	Vien	Kyou	Done
Sech	-																		
Vern	0.001	-																	
Coda	0.025	0.017	-																
Bifo	0.016	0.007	0.013	-															
Miss	0.002	-0.002	0.013	0.002	-														
Cott	-0.003	0.002	0.020	0.017	0.004	-													
Cami	0.002	0.002	0.020	0.008	-0.002	0.004	-												
Foco	0.001	0.001	0.024	0.015	0.006	0.003	0.010	-											
Mont	0.064	0.050	0.082	0.071	0.047	0.059	0.058	0.050	-										
Pitt	0.032	0.027	0.054	0.043	0.032	0.034	0.036	0.034	0.039	-									
Yvoy	0.071	0.057	0.080	0.079	0.068	0.068	0.078	0.065	0.076	0.035	-								
Lave	0.071	0.060	0.090	0.080	0.071	0.072	0.079	0.066	0.079	0.030	0.004	-							
Sepo	0.051	0.043	0.053	0.057	0.051	0.048	0.057	0.047	0.073	0.029	0.014	0.018	-						
Barc	0.093	0.089	0.110	0.116	0.093	0.096	0.105	0.079	0.089	0.061	0.104	0.086	0.070	-					
Vale	0.098	0.084	0.114	0.100	0.092	0.097	0.104	0.097	0.128	0.035	0.090	0.094	0.091	0.141	-				
Ales	0.061	0.049	0.078	0.065	0.055	0.064	0.063	0.063	0.072	0.034	0.040	0.034	0.036	0.100	0.075	-			
Vien	0.095	0.080	0.099	0.090	0.089	0.088	0.099	0.078	0.090	0.061	0.018	0.023	0.036	0.114	0.130	0.082	-		
Kyou	0.098	0.083	0.087	0.097	0.091	0.091	0.104	0.082	0.098	0.065	0.030	0.037	0.035	0.112	0.124	0.084	0.019	-	
Done	0.096	0.078	0.089	0.085	0.085	0.090	0.098	0.083	0.100	0.059	0.014	0.025	0.028	0.124	0.098	0.059	0.013	0.007	-

Non-significant pairwise differentiation tests after sequential Bonferroni correction are shown in bold typeface.

TABLE 5. Confidence in scenario choice obtained from the sequential ABC analyses attempting to decipher the European invasion of *Leptoglossus occidentalis*.

Population considered	Number of competing scenarios	Selected scenarios	Posterior Probability [95% CI]	Error for scenario choice	
				Type I	Type II
Alessandria	3	Introduction from an unsampled eNA population	0.79 [0.74;0.85]	0.21	0.15
Barcelona	6	Introduction from an unsampled eNA population	0.84 [0.79;0.88]	0.51	0.09
Vienna	10	Introduction from an unsampled eNA population †	0.31 [0.20;0.42]*	0.63	0.06
Serre-Ponçon	10	Admixuture: Alessandria + Vienna	0.55 [0.45;0.65]	0.60	0.06
Yvoy	10	Admixuture: unsampled eNA population + Vienna	0.57 [0.49;0.66]	0.82	0.04
Lavercantière	10	Admixuture: unsampled eNA population + Vienna	0.68 [0.53;0.82]*	0.82	0.05
Valencia	10	Admixuture: unsampled eNA population + Alessandria	0.60 [0.50;0.70]	0.75	0.04
Kyoustendill	10	Admixuture: Alessandria + Vienna †	0.52 [0.35;0.68]*	0.60	0.05

† selected scenarios but with a 95% confidence interval overlap even when the analysis was repeated only with the competing scenarios displaying an overlap. * new posterior probabilities of scenarios after a second ABC analysis due to 95% confidence interval overlap. Type I error corresponds to the proportion of simulations in which the true scenario is not selected. Type II error is the proportion of simulations in which the scenario considered is selected but is not the true one.

Supplementary material

TABLE S1. Analysis of molecular variance (AMOVA) of *Leptoglossus occidentalis* populations from the three main regions wNA, eNA and Europe.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Pvalue
Among regions	2	28.491	0.17452 Va	13.97	< 0.001
Among populations within regions	54	69.002	0.05974 Vb	4.78	0.008
Within populations	197	199.932	1.01488 Vc	81.25	< 0.001

The significance of the variance components was tested with 1,000 permutations; d.f. = degrees of freedom.

TABLE S2. Posterior parameter estimates of admixture rates for each selected scenario with admixture.

Population considered	Selected scenario		Posterior estimates of admixture rates (ar)				
			Mean	Median	Mode	Quantile 2.5%	Quantile 97.5%
Serre Ponçon	Admixuture: Alessandria + Vienna	ar_{Ales}	0.43	0.42	0.43	0.13	0.82
Yvoy le Marron	Admixuture: unsampled eNA population + Vienna	ar_{Uns}	0.32	0.27	0.16	0.11	0.79
Lavercantière	Admixuture: unsampled eNA population + Vienna	ar_{Uns}	0.40	0.37	0.32	0.11	0.83
Valencia	Admixuture: unsampled eNA population + Alessandria	ar_{Uns}	0.56	0.58	0.57	0.15	0.88
Kyoustendill	Admixuture: Alessandria + Vienna	ar_{Ales}	0.30	0.24	0.22	0.11	0.65

Admixture rates (ar) are expressed as proportions. Each posterior distribution of admixture rates was estimated using a local linear regression based on the 5,000 simulated data sets closest to our real data.

IV. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Comme mentionné en préambule (cf. section II.1), la collecte et l'analyse de certains individus mexicains ont mis en évidence l'existence d'une espèce ou sous-espèce, encore non décrite qui se rajouterait donc aux autres espèces associées aux Pinaceae actuellement connues, à savoir *L. occidentalis* et *L. corculus*.

Au niveau mondial, le genre *Leptoglossus* Guérin-Ménéville 1831 compte 53 espèces décrites (Heidemann 1910; Allen 1969; Brailovsky & Barrera 1998; Packauskas & Schaefer 2001; Brailovsky & Barrera 2004). Bien que les informations sur la biologie et par conséquent sur les plantes hôtes ne soient pas disponibles pour certaines espèces, la majorité d'entre elles sont associées aux Angiospermes et seulement quatre ont été observées sur Gymnospermes :

- *L. clypealis*, est communément observée sur *Juniperus spp.*, mais ses autres plantes hôtes correspondent à des Angiospermes (Mitchell 2000).
- *L. oppositus*, extrêmement polyphage, a été collectée sur pin blanc, *Pinus strobus* et cyprès chauve, *Taxodium distichum*, et sur de nombreux Angiospermes répartis dans 20 familles et 27 genres (Mitchell & Wheeler 2008).
- *L. occidentalis*, bien qu'observée sur *Pistacia spp.*, est associée plus généralement aux Pinaceae.
- *L. corculus* semble strictement inféodée aux pins (Heidlin et al. 1980).

Au Mexique, 16 espèces du genre *Leptoglossus* sont connues (Cibrian-Tovar 1995; Brailovsky & Barrera 1998; Packauskas & Schaefer 2001; Brailovsky & Barrera 2004). Parmi les quatre espèces observées sur Gymnospermes et citées précédemment, seules trois d'entre elles (*L. clypealis*, *L. occidentalis* et *L. oppositus*) y sont présentes et *L. corculus* n'a jamais été observée à ce jour dans ce pays (H. Brailovsky comm. pers.).

Néanmoins, les individus mexicains utilisés dans notre étude (soit sept larves de différents stades et seulement trois adultes) ont tous été collectés sur *Pinus cembroides* dans la localité de Santiago de Anaya dans l'Etat de l'Hidalgo (environ 100 km au Nord de Mexico), ce qui laissait supposer leur appartenance à l'espèce *L. occidentalis*, seule espèce mentionnée sur le genre *Pinus* dans la littérature. Les analyses génétiques, effectuées sur une patte de chaque spécimen (permettant donc de revenir à une étude morphologique *a posteriori*) ont montré que seuls une larve et un adulte correspondaient réellement à des *L. occidentalis*. Les stades larvaires ne permettent pas l'utilisation des clés de détermination pour valider un nom d'espèce (Allen 1969; McPherson et al. 1990;

Brailovsky & Barrera 2004). Nous avons ainsi procédé à une observation plus fine des adultes :

- Un premier examen morphologique des habitus permet d'écarter *L. clypealis* et *L. oppositus*. En effet, le tylus pointu caractéristique de *L. clypealis* est absent chez les adultes non-identifiés et l'extension foliacée de la patte postérieure s'avère lancéolée contrairement à *L. oppositus* dont la dilatation extérieure est profondément échancrée.

- *L. occidentalis* et *L. corculus* étant deux espèces aux habitus très proches, ce critère n'a pas permis de distinguer ces individus. Nous avons donc utilisé des outils moléculaires pour clarifier leur statut taxonomique. Cependant, des examens morphologiques plus poussés et notamment l'utilisation de critères sexuels (genitalia mâle et femelle) seraient à rechercher sur des spécimens en meilleur état de conservation.

En parallèle à mes études de génétique des populations, j'ai donc entrepris une analyse phylogénétique préliminaire sur les individus qui étaient à ma disposition. Nous avons pu obtenir des spécimens de *L. corculus* ainsi que de *L. phyllopus*, espèce très polyphage et présente uniquement sur Angiospermes. Le fragment du gène mitochondrial (cytochrome *b*) a été séquencé pour quatre individus de chacune de ces deux espèces. Aux séquences obtenues, ont été ajoutées les séquences des différents haplotypes mexicains et des haplotypes "caractéristiques" de *L. occidentalis* (haplotypes majoritaires dans la zone d'origine et dans les zones d'invasions). Ces séquences ont alors été alignées avec Clustal W intégré au logiciel CodonCode (www.codoncode.com). Un arbre phylogénétique a ensuite été construit *via* la méthode de Neighbor-Joining (NJ) avec une distance de Kimura à 2-paramètres à l'aide du logiciel Mega 5.2 (Tamura et al. 2011). L'arbre a été enraciné avec la séquence de *Riptortus pedestris* (Heteroptera, Alydidae) obtenue *via* Genbank (n° d'accension EU427344). La robustesse des branches a été évaluée par bootstraps (1000 itérations).

L'analyse mitochondriale révèle que seuls deux individus mexicains (H9 et H18) correspondent à *L. occidentalis*, les autres spécimens mexicains (HM1 à 4) formant un groupe monophylétique clairement séparé (FIGURE 10). Ce groupe monophylétique ne correspond pas non plus aux séquences de *L. corculus* (Hcor1 et 2). Les résultats confirment en revanche les données de la littérature, c'est-à-dire la proximité génétique de *L. occidentalis* et *L. corculus*.

Malgré l'importance économique de différentes espèces du genre *Leptoglossus* (e.g. *L. phyllopus*, *L. gonagra*, *L. occidentalis*) (Mitchell 2000), certaines d'entre elles sont encore mal connues, voire non décrites. Aucune phylogénie n'a pour le moment été réalisée pour ce groupe, et nos résultats sont donc à considérer comme préliminaires et incomplets. Ils suggèrent l'existence d'une espèce cryptique (inconnue pour la Science) et soulignent clairement un manque de connaissance de ce groupe. En effet, d'autres espèces également présentes au Mexique semblent mal

connues. Brailovsky et Berrara (2004) décrivent par exemple *L. cretalis* comme morphologiquement très proche de *L. occidentalis* et de *L. corculus*. Cependant, la biologie et les plantes hôtes de *L. cretalis* restent totalement ignorées du monde scientifique (H. Brailovsky comm. pers.). Cette espèce n'a pour le moment été observée que dans l'Etat de Veracruz, état frontalier du site de collecte des spécimens mexicains de notre étude.

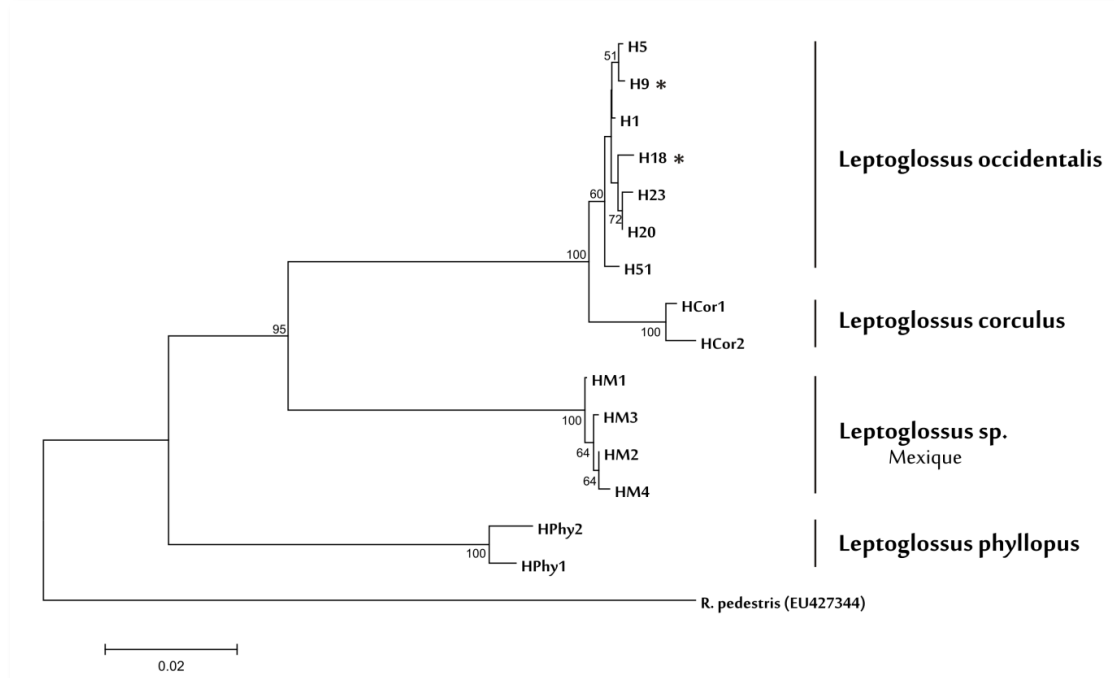


FIGURE 10. Arbre phylogénétique de quatre espèces du genre *Leptoglossus*.

Cet arbre a été obtenu à partir des séquences du gène mitochondrial cytochrome *b* (méthode de Neighbor-Joining / distance de Kimura à 2 paramètres). Les nombres sur l'arbre représentent les valeurs en pourcentage du bootstrap (supérieures à 50%) calculées après 1000 répétitions. La longueur des branches est proportionnelle à la distance génétique. L'astérisque représente les deux individus mexicains de *L. occidentalis* (correspondant à deux haplotypes différents).

Il est actuellement impossible de conclure sur l'identification précise de nos spécimens mexicains, hormis qu'ils appartiennent au genre *Leptoglossus* et vivent en sympatrie avec *L. occidentalis* dont ils partagent, au moins en partie, les mêmes plantes hôtes (e.g. *Pinus cembroides*). Une étude complémentaire combinant morphologie et analyse génétique et intégrant un plus grand nombre d'espèces et d'individus permettrait certainement de statuer sur l'identification de cette espèce cryptique. Seule *L. occidentalis* possède le statut de ravageur des graines de conifères au Mexique (Cibrian-Tovar 1995), ce qui peut expliquer en partie le manque de donnée sur les autres espèces. Cette sympatrie pourrait fournir un nouveau modèle d'étude et apporter des possibilités intéressantes pour tester les interactions potentielles, la répartition des ressources alimentaires et le maintien ou non de l'isolement reproducteur entre ces espèces proches.

Partie II

Caractéristiques biologiques des populations envahissantes en Europe

Chapitre I

Caractérisation des dégâts et Évaluation de l'impact en Europe

I. INTRODUCTION

La polyphagie de *Leptoglossus occidentalis* observée dans son aire d'origine, c'est-à-dire la capacité à utiliser une grande variété d'espèces comme plantes hôtes, a sans nul doute été l'une des clés du succès invasif de ce ravageur des graines de conifères en Europe. L'espèce a été observée sur différentes essences natives européennes mais aussi sur des espèces exotiques comme *Pseudotsuga menziesii*. Bien que des préférences clonales aient été mises en évidence dans les vergers de *Pseudotsuga menziesii* et de *Pinus contorta* en Colombie Britannique (Blatt & Borden, 1998), aucun test de sensibilité comparative d'essences de conifères exposées aux mêmes insectes en conditions contrôlées n'a encore été mené aussi bien dans la zone d'origine que dans la zone d'invasion.

De même, si l'espèce est soupçonnée d'avoir provoqué une sévère diminution de la production de graines consommables de *Pinus pinea* en Italie, aucune estimation des dégâts imputables à *L. occidentalis* n'a pour le moment été réalisée. De manière générale, aucune estimation quantitative des dégâts en plantations mais aussi en peuplements naturels n'a été menée en Europe. Ce dernier point n'est pas non plus documenté dans la zone d'origine de ce ravageur où les travaux se sont concentrés sur l'impact de *L. occidentalis* en vergers à graines. Par conséquent, aucune étude n'a porté sur l'impact potentiel de ce ravageur sur la production de graines en milieu naturel, en d'autres termes si *L. occidentalis* diminuait de manière significative le " stock de graines disponibles " pour la régénération naturelle.

L'évaluation des dégâts en vergers en Amérique du Nord a été facilitée par le développement d'une typologie des dégâts engendrés à la graine par la prise alimentaire de la punaise. Cette typologie a été développée en utilisant la radiographie X sur des graines *Pseudotsuga menziesii* soumises à *Leptoglossus occidentalis* (Bates et al. 2000). Aucun outil similaire n'existe pour les essences européennes les plus utilisées en reforestation en Europe centrale et occidentale.

Les objectifs spécifiques de cette première étude étaient donc :

- D'établir une typologie des dégâts pour ces principales essences et de tester l'impact de la prise alimentaire sur les capacités de germination de la graine
- De déterminer si *L. occidentalis* diminue de manière significative le rendement en graines
- D'évaluer l'impact de ce nouveau ravageur en vergers à graines mais aussi en peuplements naturels

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Des expérimentations en laboratoire et sur le terrain ont été combinées afin de caractériser les dégâts. Dans un premier temps, les dégâts ont été identifiés sur graines, *via* une expérience où des graines de différentes essences (six espèces au total) préalablement identifiées par radiographie comme saines et indemnes de toute attaque, ont été soumises à des punaises sur une période de 15 jours, et radiographiées tous les deux jours afin de suivre précisément l'évolution des dégâts dans le temps. Cette expérience a permis de développer une typologie des dégâts comparable aux travaux réalisés dans la zone d'origine. Dans un second temps, des tests de germination ont été effectués pour chaque essence utilisée et pour chaque catégorie de dégât déterminée précédemment. En parallèle, une expérimentation d'ensachage de cônes (*Pinus nigra* et *P. sylvestris*) menée en pépinière, a confirmé les résultats mis en évidence au laboratoire sur graines et a permis d'estimer l'impact de *L. occidentalis* sur la production de graine.

Ces différentes expériences ont servi de base pour évaluer l'intensité des dégâts engendrés par la punaise en vergers à graines et en peuplements naturels. Les vergers correspondaient aux vergers à graines mis en place par le Ministère de l'Agriculture dans les années 1970 dans le département du Lot. Un verger de *Pseudotsuga menziesii* (site de Lavercantière), régulièrement suivi depuis plus de 20 ans pour les attaques du chalcidien des graines, *Megastigmus spermatrophus*, a été particulièrement surveillé depuis 2008 (date où les premiers individus de *L. occidentalis* ont été décelés (C. Blazy et A. Roques comm. pers.)). Les autres parcelles suivies ont été sélectionnées pour les différentes espèces qu'elles représentaient, afin d'avoir une couverture assez large des essences utilisées en reforestation. Les peuplements naturels correspondaient aux peuplements de pins (*P. nigra* et *P. sylvestris*) situés à Saint Crépin (lieu-dit le Merdanel) et Serre-Ponçon (Hautes Alpes). Le choix de ces peuplements s'est effectué sur la base d'observations, les populations de punaises semblaient bien établies et ce depuis 2007, date de la première observation (Dusoulier et al. 2007 et A. Roques comm. pers.). La méthode employée était la même pour les vergers et peuplements naturels ; des cônes mûres (i.e. cônes de 2^e année pour *P. sylvestris* et *P. nigra* et cônes de l'année pour les autres espèces) ont été collectés tous les ans à l'automne et le suivi a été réalisé sur une période de trois années consécutives (2010 à 2012).

III. RÉSULTATS

Les expérimentations de laboratoires et d'ensachage de cônes tout comme l'évaluation des dégâts en vergers et peuplements naturels confirment bien la polyphagie de l'insecte, mais aussi et surtout que les espèces natives de conifères les plus importantes (pins, mélèze, épicéa, sapin) peuvent

être largement exploitées par *L. occidentalis*. Aucune réelle préférence alimentaire n'a été dégagée au travers de ces différentes expériences. Cette plasticité a très probablement facilité l'établissement et la propagation de cet invasif au sein du continent, lui permettant de contourner un des obstacles environnementaux ; la présence d'essences hôtes avec lesquelles il n'avait pas co-évolué.

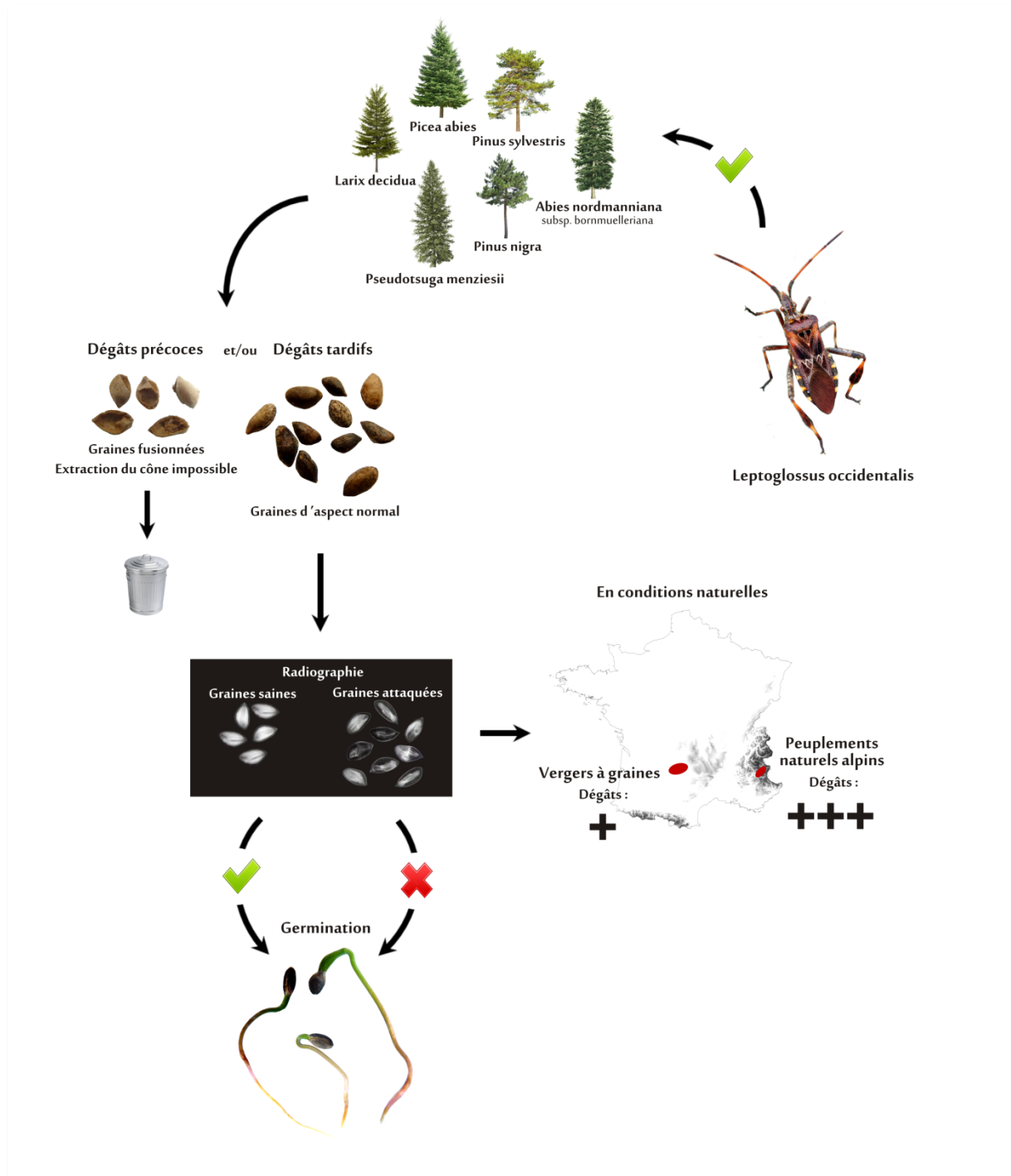


FIGURE 11. Schéma bilan des principaux résultats de l'Article III.

D'un point de vue appliqué, la typologie des dégâts mise en place pour six essences couramment utilisées en Europe en reforestation, constitue un véritable outil pour estimer la qualité sanitaire des graines produites. Les estimations de dégâts en vergers, réalisées sur la base de cette typologie, n'ont jamais dépassé les 25% de la production initiale mais représentent tout de même un impact économique potentiellement important au vu du prix de vente de telles graines, jusqu'à 2000 € / kg pour des graines de *Pseudotsuga menziesii* (ONF 2013). En revanche, les dégâts dans les peuplements alpins, bien que variables d'une année sur l'autre et d'un site à l'autre, peuvent être considérables (jusqu'à 70% de destruction de la production de graines). Ces résultats représentent la première estimation des dégâts en plantations artificielles depuis l'arrivée de l'insecte en Europe mais aussi la première estimation de l'impact potentiel sur la régénération en milieux naturels que ce soit dans la zone d'origine ou dans la zone envahie. Ces résultats sont également à mettre en lien avec l'évaluation des capacités de germination des graines endommagées par l'insecte. En effet, un simple dégât léger (i.e. inférieur au tiers du contenu initial de la graine) réduit drastiquement les capacités de germination et ce pour la majorité des essences testées.

Cette étude confirme donc le fait que *L. occidentalis* représente une réelle menace d'un point de vue économique et écologique en Europe et suggère que ce nouveau ravageur doit être pris en considération dans les futures stratégies forestières.

Ces résultats synthétisés FIGURE 11 ont donné lieu à un article publié dans la revue *Biological Invasions* et correspondant à l'Article III.

Article III

The invasive Leptoglossus seed bug, a threat for commercial seed crops, but for conifer diversity?

Lesieur V., Yart A., Guilbon S., Lorme P., Auger-Rozenberg M-A., Roques A.
Biological Invasions (2014, 1-17)

Biol Invasions
DOI 10.1007/s10530-013-0630-9

ORIGINAL PAPER

The invasive *Leptoglossus* seed bug, a threat for commercial seed crops, but for conifer diversity?

Vincent Lesieur · Annie Yart · Sophie Guilbon ·
Philippe Lorme · Marie-Anne Auger-Rozenberg ·
Alain Roques

Received: 2 August 2013 / Accepted: 21 December 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Among the recent introductions of alien insects in Europe, the polyphagous western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera; Coreidae) can seriously be regarded as a major threat for all the European conifer forests. In the current study combining laboratory and field experimentations, we characterized first bug damage by developing specific damage categories on seeds of different conifer species by the use of X-ray. Secondly, we investigated the impact of the invasive bug on key conifer species used for afforestation in Western and Central Europe. For this purpose, we performed germination tests on predated seeds which revealed that even light damage (consumption of <1/3 of the whole seed content) strongly reduced the germination capability of the seed. We also compared the impact of feeding on the proportion of filled seeds. Second year cones of *Pinus sylvestris* and *Pinus nigra* have been enclosed and offered to different life stages (nymphs and adults) and the results showed a significant reduction of filled seeds whatever the life stage. In field, we annually surveyed the bug seed damage for

six different conifer species planted in southwestern French seed orchards. Taking into account the economic value of improved seeds in seed orchards, economic impact of bug damage was important although never exceeded 25 %. Two natural or semi-natural alpine pine stands were also surveyed and appeared to be highly affected by the bug (up to 70 % of damaged seeds). Therefore, bug damage could also be considered as a serious threat for seed production in natural stands.

Keywords Cone and seed insects · Germination · *Leptoglossus occidentalis* · *Megastigmus* spp. · Natural stands · Seed orchards

Introduction

The arrival and establishment of non-native species exponentially increased during the recent decades with the Era of Globalization (Meyerson and Mooney 2007; Hulme 2009). Forests are not spared by this phenomenon, as it is shown by the recent invasion of the Asian emerald ash borer, *Agrilus planipennis*, in North America, or that of the Asian chestnut gall-maker, *Dryocosmus kuriphilus*, in Europe, both species causing significant economic and ecological damage to forested ecosystems and landscape trees (Gandhi and Herms 2010; Bosio et al. 2010). In Europe, almost 1,600 alien exotic arthropod species

Marie-Anne Auger-Rozenberg and Alain Roques have contributed equally to this work.

V. Lesieur (✉) · A. Yart · S. Guilbon ·
P. Lorme · M.-A. Auger-Rozenberg · A. Roques
INRA UR633 Zoologie Forestière, 2163 avenue de la
pomme de pin, CS 40001 Ardon, 45075 Orléans Cedex 2,
France
e-mail: vincent.lesieur@orleans.inra.fr

Published online: 04 January 2014

 Springer

have already established and a number of them are affecting woody plants (Roques 2010). Among them, a true bug, the Western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera, Coreidae), may be considered as a serious threat for conifer seeds for both commercial seed crops (Roversi et al. 2011; Bracalini et al. 2013) and natural regeneration of forests (Tamburini et al. 2012).

Leptoglossus occidentalis is native of western North America, its original range being considered to extend from British Columbia to Mexico in latitude and from the Pacific Coast to Colorado in longitude (Koerber 1963; Cibrián-Tovar et al. 1995; Blatt and Borden 1996). Since 1956, the species was introduced accidentally in Iowa (Schaffner 1967), and then spread eastward to reach the East coast in the 1990s (McPherson et al. 1990; Gall 1992; Ridge-O'Connor 2001). After that, it was introduced to Europe, where it was first observed in 1999 in Northern Italy (Taylor et al. 2001; Bernardinelli and Zandigiacomo 2001). It further expanded its range very quickly, and within just a decade, the species has colonized a large part of the continent, from Norway to Sicily and from Portugal to Turkey (Fent and Kment 2011). Recently, the bug was found for the first time in Russia and Ukraine (Gapon 2012) as well as in Eastern Asia (Ahn et al. 2013). It is likely that the present bug distribution in Europe has resulted from a combination of several separate introductions, followed by natural dispersal of the introduced populations, but also probably long-distance translocations through human activities (transport of eggs, nymphs or adults as hitchhikers) (Gall 1992; Malumphy et al. 2008).

Leptoglossus occidentalis exhibits polyphagous habits in its native American range where it has been observed to feed on cones of a large number of conifer species. Although the bug seems to prefer pine species (*Pinus* spp.) and Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*), it has also been recorded on firs (*Abies* spp.), spruces (*Picea* spp.), larches (*Larix* spp.) and hemlocks (*Tsuga* spp.). In the invaded European regions, scattered observations tended to indicate a large host range, including native pine species such as *Pinus sylvestris*, *P. nigra*, *P. halepensis*, *P. pinea* but also *Picea abies*, *Larix decidua*, *Abies* spp., and *Juniperus* spp. in addition to introduced exotic conifers (*Cedrus* spp., *Pseudotsuga menziesii*) (Taylor et al. 2001; Fent and Kment 2011; Tamburini et al. 2012). Nevertheless, no

trials have yet been carried out to screen the comparative susceptibility of European conifers.

Although capable of feeding occasionally on conifer foliage (Gall 1992; Tamburini et al. 2012), *L. occidentalis* is predominantly related to cones. Both adults and immature nymphs consume individual seeds in developing and mature cones. The insects insert their mouth stylets through the cone tissues directly to the seeds into which they suck the lipid and protein content (Bates et al. 2001). Thus, attacked mature cones do not show any external damage symptoms unlike these of many other cone pests (Strong et al. 2001). In Canada, Bates et al. (2000) therefore developed an X-ray methodology in order to be capable of assigning to bug specific damage patterns observed in Douglas-fir seeds. This technique also allowed to quantify different levels of bug damage on seed content. However, such a characterization of seed damage is still lacking to detect and evaluate bug impact in European conifers. Bug feeding on early stages of cone development before the seeds develop seems also highly detrimental. When affecting 1st year cones, it is susceptible to result in an overall abortion, and thus a total loss of the potential seed yield (Bates et al. 2002b). Early feeding by *L. occidentalis* before the seed coat has hardened was also observed in North America to generate so called “fused” seeds, which are flattened and fused with the supporting cone scale (Bates et al. 2000; Strong et al. 2001). It is assumed that bug feeding alters the physiological process by which the seed coat separates from the ovuliferous scale.

Overall, these impacts result in a significant decrease in seed yield (Bates et al. 2002a). This species is thus regarded as a major economic pest in the seed orchards designed to produce genetically-superior tree seeds in the native American range (Schowalter and Sexton 1990; Bates et al. 2000; Strong et al. 2001). In the invaded European range, this alien species is also considered responsible for a significant decrease of the crop size of stone pine (*Pinus pinea*) seeds that are used for human consumption in Italy (Roversi et al. 2011; Bracalini et al. 2013). However, a precise quantification of the decrease in seed yield following the bug arrival remains to be carried out in most European regions and conifer species, as well as its possible variations with the different steps of the colonization process.

Is conifer diversity at risk?

Although the bug is considered as a pest in commercial seed orchards, little is known about its impact on the natural regeneration of conifer forests in the native North American range as well as in the invaded Europe. In Mexico, bug damage was recently reported to be quite low in stands of Engelman pine, *Pinus engelmannii* (Bustamante-Garcia et al. 2012). The situation in Europe could be totally different because the alien bug and European conifers did not coevolve, and the introduced bug populations apparently escaped from natural enemies (enemy-release hypothesis; (Liu and Stiling 2006)). Tamburini et al. (2012) thus suggested that this invasive species could strongly affect alpine forest ecosystems where it appears to be well established. This impact can also be enhanced through a newly-established association between the alien insect and a native fungal pathogen of conifers, *Diplodia pinea* (Luchi et al. 2012).

Therefore, we intended (1) to test whether the invasive *Leptoglossus occidentalis* is significantly decreasing seed yield and affecting germination potential in a similar way in key conifer species used for afforestation in Western and Central Europe, and, (2) to look at possible differences in bug damage between commercial seed orchards and natural stands.

Materials and methods

All the experiments under controlled conditions were performed in laboratory and in tree nurseries at INRA Orléans (France; 47°49'N; 01°54'E, elevation: 110 m) with insects from a strain reared at our laboratory. The seed bugs were originally collected in the Orléans region in September 2009 and periodically augmented with seed bugs collected in the same area, in order to avoid consanguinity. A fraction of the strain was maintained in a climate chamber under the following conditions: 20 °C with 60 % RH and 16:8 h light/dark cycle. This rearing device allowed us to obtain three bug generations per year and to lead to the availability of insects for the whole duration of the bug damage category experiment (see below). Moreover, some insects were installed in an outdoor shelter, mimicking, as much as possible, natural conditions (that is mainly one to two generations per year) and were used in all other feeding bioassays. For that, sexed bugs were let to overwinter outdoors within screened cages (0.5 × 0.5 × 1 m), each containing males or females

with extra seeds (pines and Douglas-fir seeds) and Douglas-fir seedlings.

Bug damage categories on seeds of native and introduced exotic conifer species

A total of six conifer species (five European and one north-American) were used in this experiment but, because of limitations in seed availability, we conducted the tests at different times according to the studied species. All the seeds corresponded from the year's crop and were obtained from orchards belonging to the French National Forestry Office (ONF). Seeds were first radiographed using an X-ray apparatus (HP Faxitron—43855[®]) and X-ray sensitive films (Kodak[®] 'Industrex M'), following the procedures described in Roques and Skrzypczynska (2003). The empty seeds and these showing chalcid larvae were discarded. Only the seeds showing a fully filled content (megagametophyte and embryo) were kept.

The first series of experiments was conducted with seeds of four conifer species randomly exposed to feeding by adult bugs in spring 2010. In the one hand, we used simultaneously three European species (*Pinus sylvestris*, *Pinus nigra*, and *Abies nordmanniana* subsp. *bornmuelleriana*). In the other hand, we compared seed feeding of the two former European pines with Douglas-fir seeds (*Pseudotsuga menziesii*) which is one of the preferred host in its native area, and also considered as one of the most important exotic species planted in Europe for afforestation. Ten seeds per conifer species were separately fixed at 1 cm-intervals on a polystyrene support and were exposed to a single adult bug in a plastic box (12 cm × 12 cm × 6.5 cm) for a 15-days period. Each treatment was replicated 10 times for each sex. Every two days the seeds, still on their polystyrene support, were submitted to X-raying in order to survey the development of individual damage. Adult preferences for seed species was estimated by counting the total number of predated seeds according to bug sex at the end of both experiments.

An additional experiment was carried out in 2011 to define bug damage category in two additional European conifer species, *Larix decidua* and *Picea abies*. A total of 200 filled seeds were selected per species using X-ray such as above. The seed batch was offered to bug predation in a gauze cage (0.5 × 0.5 × 1 m) including approximately 20 adults. To be capable of

comparing the results with these obtained in the previous test, the experiment was also repeated on both pine species and Douglas-fir. After a 15-days exposure, all seeds were placed on an adhesive paper sheet and X-rayed to assess the final damage.

Following the methodology developed by Bates et al. (2000), the damaged parts of the megagametophyte and/or of the embryo were visually categorized on radiographs at each 2-days survey, and the size of the damaged area was estimated with regard of the initial seed volume. Taking into account the larger number of tree species, we decided to define a supplementary category corresponding to very light damage compared to bug damage categories developed by Bates et al. (2000). In each conifer species, different damage categories were then tentatively defined, gradually increasing in damage extent: (1) no apparent damage (fully filled seed), (2) light damage (less than 1/3 of the whole seed content consumed), (3) moderate damage (consumption between 1/3 and 1/2), (4) important damage (consumption between 1/2 and 2/3), (5) severe damage (more than 2/3 of seed consumed). Finally, in order to check whether weighting can also constitute a method to assess seed damage, the seed weight was compared between the damage categories defined by radiography in each species. We also included empty seeds discarded at the beginning of experience in order to compare naturally aborted seeds with those suffering severe damage. Depending on availability, 8–85 seeds per damage category and per species were weighted using an analytical balance (Mettler Toledo DeltaRange AG204).

Effect of bug predation on seed germination

The seeds obtained from the experiment conducted in 2011 (see above) and classified according to the five different damage categories were tested for the germination potential. The germination tests were based on the ISTA procedures for each species (International Seed Testing Association 1999). Seeds were placed on Whatman filter paper maintained continuously moistened with sterilized water in Petri dishes (100 × 15), under controlled conditions (20 °C, 16:8 L:D, 60 % RH). Seeds were considered germinated when the radicle protruded of 2 mm at least. Germination percentage per damage category

was calculated after 28 days following the transfer under germinative conditions.

Impact of seed bug feeding on 1st year cone development and seed yield of 2nd year cones

Feeding bioassays were performed on 1st year cones and 2nd year cones of *P. sylvestris* and *P. nigra* planted in nurseries at INRA Orléans, with bugs from the outdoor rearing. Ten trees of each species were randomly selected. 1st year cones and 2nd year cones were enclosed in mesh insect-exclusion bags on 12–13 April 2011 before the emergence of the overwintering adult bugs. It also aimed at preventing any damage by other cone pests. In *P. sylvestris*, each bag contained one 2nd year cone and one to ten 1st year cones whilst it only included one 2nd year cone in *P. nigra* because this species showed quite low flowering in 2010. Each bag was randomly assigned to one of the following five treatments: A—one male bug, B—one virgin female, C—one mated female, D—three 2nd-instar nymphs, and E—control without bugs. The adults were introduced on 31 May and removed on 15 June 2011 whilst the nymphs were let in bags from 29 June to 15 July 2011. Ten replicates using ten different trees were used per treatment and per pine species except for the couples male/*P. sylvestris* and mated female/*P. nigra* (nine replicates), and control/*P. sylvestris* (eight replicates).

To obtain mated females, several couples of bugs were formed and placed into individual plastic boxes (12 × 12 × 6.5 cm) with fresh branches and seeds. Once the mating observed, females were transferred into bags two–three days after the observation. In treatment C (mated female), all the eggs laid by the female and the resulting nymphs were removed at the end of the experimentation to prevent any damage not caused by the tested individual.

The bags were inspected after one week. Any dead or missing individuals were replaced, which corresponded to only three adults and four nymphs during the whole experiment. At the end of each 15-days period, all seed bugs were removed and the cages resealed until harvest. First year cone survival was checked in September 2011 when cones were harvested. Cones were air-dried at 35 °C for 48 h. All their scales were finally removed by hand to release the seeds. The seeds were then X-rayed as above in order to assign their content to the previously defined

Is conifer diversity at risk?

damage categories. Fused seeds (i.e. seeds that could not be removed from the seed scale as described by Bates et al. (2000) and Strong et al. (2001)) were considered as fully-damaged seeds. To compute the proportion of damaged seeds, we assumed that the bugs only feed on filled seeds but not on empty ones because no information is known. Thus, this proportion was calculated as the ratio of bug-damaged seeds on the number of seeds considered as initially available for insect feeding (i.e. filled seeds plus bug-damaged seeds).

Comparative assessment of seed bug impact in seed orchards and alpine stands

Seed orchards

Bug impact was assessed in several seed orchards located at three different nearby sites in southwestern France (Table 1), where *Leptoglossus occidentalis* was first observed by late autumn 2008 (Roques, unpublished observations). The orchards were selected based on their conifer species content: four different species were surveyed at Lavercaillère (*Pseudotsuga menziesii*, *Pinus sylvestris*, *P. nigra* and *Larix decidua*), and two species in the two other localities, *P. menziesii* and *Picea abies* at Calviac, and *P. menziesii* and *Abies nordmanniana* subsp. *bornmuelleriana* at Sousceyrac. All the orchards were surveyed for seed damage from 2010 to 2012, except the Douglas-fir plantation of Lavercaillère which was surveyed from 2008 to 2012. Depending on the crop, ten to 50 cones were randomly collected in each plantation. The collections were carried out at seed maturity, the period being different according to the conifer species biology (Douglas-fir: mid-August; fir: September; pines: October; larch: September). Only those showing no damage by other cone and seed insects, such as *Dioryctria* coneworms (Lepidoptera, Pyralidae), *Cydia* tortricids (Lepidoptera, Tortricidae), and cone weevils (*Pissodes validirostris*, Coleoptera, Curculionidae) (Roques et al. 1983), were analyzed. For two species present at Lavercaillère, *P. sylvestris* and *P. menziesii* respectively, the total number of cones was annually measured in order to relate insect damage with the yearly fluctuations in cone crop size. Cone crop rating corresponded to: 0 = no cone per tree; 1 = light crop (1–49 cones per tree); 2 = medium crop (50–199 cones per tree);

3 = important crop (200–499 cones per tree); 4 = heavy crop (more than 500 cones per tree).

Cones were dried and individually shaken to extract the seeds. The extractable seeds were placed on an adhesive paper sheet to be X-rayed cone by cone. A total of ca. 49,000 seeds were processed. The number and percentages of empty, filled, insect-damaged seeds were counted per cone. For each seed, bug damage was assigned to one of the damage categories defined above per conifer species. The total percentage of seeds damaged by bugs was calculated as above. In these orchards, insect damage could include seeds infested by larvae of different species of *Megastigmus* seed chalcids in fir, larch, and Douglas-fir. The chalcid infested seeds were identified by X-rays and the percentage of *Megastigmus*-infested seeds was calculated following Auger-Rozenberg and Roques (2012), considering that bugs and chalcids do not attack simultaneously a seed.

Alpine stands

Two mixed pine stands located in southern French Alps (Merdanel and Serre-Ponçon, Table 1) were surveyed for seed bug damage from 2010 to 2012. Both stands were aged of ca. 50 years and consisted of native *Pinus sylvestris* trees growing together with *P. nigra* trees issued from natural regeneration of initially planted seedlings. In each stand, ten trees per species were randomly selected and five 2nd-year cones were collected per tree by September, when the seeds were mature. Seeds were extracted and analyzed for bug damage as in seed orchards. A total of ca. 16,000 seeds were X-rayed. Bug damage was categorized and measured as in seed orchards.

Statistical analysis

All variables were checked for their homoscedasticity (Levene test) and normal distribution (Shapiro–Wilk test). Data not fitting a normal distribution after transformation were analyzed using nonparametric tests.

Weights of the seeds from the different damage categories were $\sqrt{x}$ transformed to ensure normality, and then submitted to one-way ANOVA. Means were separated by Tukey–Kramer honestly significant difference (HSD) multiple comparison test. Kruskal–Wallis test was performed to test for seed bug

Table 1 Variation in the sanitary status of seed crops on selected French seed orchards and alpine stands from 2010 to 2012

Type of sampled site	Location	Species	Total number of seeds examined			Mean number of seeds per cone			% Empty			% Fully available ^a		
			2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012
Seed Orchards	Calviac	<i>Picea abies</i>	8730	–	1,461	178.16	–	48.7	29.99	–	59.81	70.01	–	40.19
	44°54' N; 2° 3' E	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	2,614	1,023	–	52.28	34.10	–	39.29	41.75	–	60.71	58.25	–
	Souceyrac	<i>Abies bornmülleriana</i>	7,618	6,459	2,493	253.93	229.47	249.30	40.08	86.01	71.64	59.92	13.99	28.36
	44°51' N; 2° 6' E	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	2,329	912	–	46.58	30.40	–	36.69	32.57	–	63.31	67.43	–
	Laverantière	<i>Larix decidua</i>	2,631	768	1,960	52.62	38.40	39.20	88.39	93.15	82.74	11.61	6.85	17.26
Alpine stands	44°37' N; 1°20' E	<i>Pinus nigra</i>	1,260	779	1,085	25.20	21.69	36.17	52.27	20.32	18.90	47.73	79.68	81.10
		<i>Pinus sylvestris</i>	989	306	824	19.78	9.87	27.47	45.45	24.70	44.86	54.55	75.30	55.14
		<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1,626	1,647	1,144	31.62	32.94	22.88	65.99	43.22	80.90	34.01	56.78	19.10
	Merdanel	<i>Pinus nigra</i>	1,838	2,273	2,130	36.76	45.31	43.36	50.19	33.04	37.21	49.81	66.96	62.79
	44°41' N; 6°37' E	<i>Pinus sylvestris</i>	1,193	825	934	23.86	16.50	21.55	28.78	45.83	51.68	50.19	33.04	37.21
	Serre Ponçon	<i>Pinus nigra</i>	606	1,783	1,385	24.56	35.66	27.70	53.87	24.06	55.30	46.13	75.94	44.7
	44°31' N; 6°20' E	<i>Pinus sylvestris</i>	931	885	1,073	18.62	17.35	21.46	39.82	55.00	71.24	53.87	45.00	55.3
Type of sampled site	Location	Species	% Filled			Insect damage			% Chalcid ^c					
			2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012			
Seed Orchards	Calviac	<i>Picea abies</i>	69.21	–	19.17	1.10	–	1.08	0.00	–	0.00	–	0.00	
	44°54' N; 2° 3' E	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	57.13	54.13	–	2.93	4.52	–	3.37	3.94	–	–	–	
	Souceyrac	<i>Abies bornmülleriana</i>	58.15	9.06	26.25	1.17	2.68	1.20	2.90	22.71	2.15	–	–	
	44°51' N; 2° 6' E	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	60.28	64.51	–	3.73	2.41	–	0.77	1.04	–	–	–	
	Laverantière	<i>Larix decidua</i>	11.12	1.85	16.99	6.30	0.00	1.39	0.00	0.00	0.00	–	–	
Alpine stands	44°37' N; 1°20' E	<i>Pinus nigra</i>	40.48	67.51	78.62	14.10	15.75	3.18	NA	NA	NA	NA	NA	
		<i>Pinus sylvestris</i>	50.94	63.72	51.69	9.38	15.66	6.15	NA	NA	NA	NA	NA	
		<i>Pseudotsuga menziesii</i>	21.27	51.76	8.91	25.73	3.59	6.02	14.98	7.39	31.48	–	–	
	Merdanel	<i>Pinus nigra</i>	48.90	57.70	57.45	2.04	14.27	8.92	NA	NA	NA	NA	NA	
	44°41' N; 6°37' E	<i>Pinus sylvestris</i>	67.94	23.80	40.05	4.80	53.55	19.05	NA	NA	NA	NA	NA	
	Serre Ponçon	<i>Pinus nigra</i>	23.86	17.71	23.65	43.68	77.36	44.18	NA	NA	NA	NA	NA	

Is conifer diversity at risk?

Table 1 continued

Type of sampled site	Location	Species	Insect damage					
			% Filled			% Bug ^b		
			2010	2011	2012	2010	2011	2012
	44°31' N; 6°20' E	<i>Pinus sylvestris</i>	46.59	10.87	12.48	24.23	70.11	33.55
						NA	NA	NA

^a Mean % of fully available seeds per cone was calculated as the number of seeds considered as available for insect development (i.e. filled-seeds plus insect damaged seeds) on the total number of seeds

^b Mean % of bug damage was calculated as the ratio of bug damaged seeds on the number of seeds considered as available for insect development (i.e. filled-seed plus insect-damaged seeds)

^c Mean % of chalcid infestation was calculated as the ratio of chalcid-infested seeds on the number of seeds considered as available for insect development (i.e. filled-seed plus insect-damaged seeds)

NA: No *Megastigmus* species is known to infest seeds of *P. nigra* and *P. sylvestris*

preferences among conifer species, followed, when significant, by multiple comparisons using Mann–Whitney test with Bonferroni–Holm correction.

To evaluate the effect of the different damage categories on germination, germination rates were compared using pairwise Fisher's exact tests with Bonferroni–Holm correction.

The mean percentages of aborted 1st year cones, and these of filled, empty and bug- damaged seeds obtained from the bagging experiments were analyzed using Kruskal–Wallis tests followed, when significant, by Mann–Whitney test with Bonferroni–Holm correction. The same statistics were applied to compare the percentages of filled, empty and damaged seeds observed in seed orchards and natural stands. Kruskal–Wallis tests were applied in order to test for differences between years, sites and conifer species, except for alpine stands where Mann–Whitney tests were used to test for difference between conifer species. The relationships between the percentage of seed damage by bugs and the yearly variations in cone crop size were tested using correlation analysis in the two plantations where the crop size could be measured. The following variables were tested (1) size of the year's cone crop (N); (2) size of the cone crop in the previous year ($N - 1$); and, (3) change in cone crop from one year to the next. In the Douglas-fir plantation of Lavercantière, where *Megastigmus spermatrophus* was susceptible to affect largely the seed yield, the same correlation analysis was applied to the chalcid damage in order to compare bug and chalcid damage, and their annual variations with regard to crop fluctuations.

The significance level, α , was set at 5 % in all statistical analyses. Statistical analyses were performed with R software (R Development Core Team 2008).

Results

Bug damage categories on seeds of native and introduced exotic conifer species

We established bug damage categories for the six considered conifers species (Fig. 1). In each species, radiographic interpretations allowed to rank bug damage to initially filled seeds into the five categories previously defined. No completely empty seed,

without shrinkled remainings of embryo or megagametophyte, was observed. For light damage, in most of cases, only megagametophyte was affected but not the embryo. Moreover, dissections of seeds sustaining light, moderate, important or severe damage supported the radiographic interpretations, internal tissues showing progressive depletions proportional to the damage level. Seed damage categories followed the same trends and were relatively similar in all conifer species (Fig. 1).

In all species, filled seeds were heavier, on the average, than bug-damaged seeds (Table 2). However, they significantly differentiated from those showing light damage only in *Pinus sylvestris*, *Pseudotsuga menziesii* and *Picea abies*. Seed mean weight decreased along with the importance of the consumption of the seed content. However, the decrease in mean weight did not fully correspond to the radiographic categories. Some of these categories did not differ significantly in weight in *Pseudotsuga* (severe

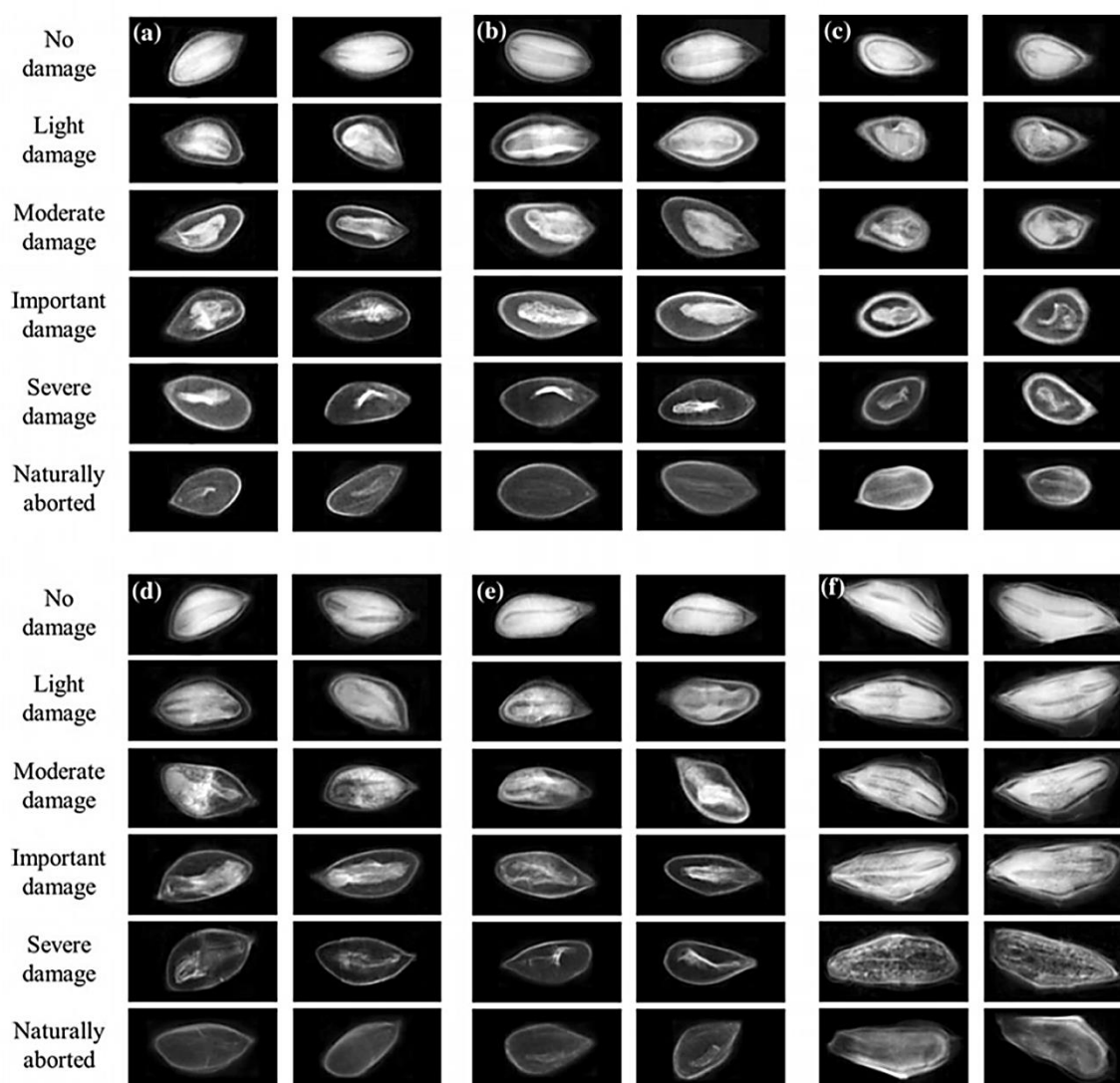


Fig. 1 *Leptoglossus occidentalis* damage categories on seeds established for the six following conifer species: **a** *Pinus sylvestris*, **b** *Pinus nigra*, **c** *Larix decidua*, **d** *Pseudotsuga menziesii*, **e** *Picea abies* and **f** *Abies bornmulleriana*

Is conifer diversity at risk?

vs. empty), *P. sylvestris* (important vs. severe), *P. nigra* (severe vs. empty) and *Picea* (moderate vs. important). In *Abies* and *Larix*, seed weight appeared to discriminate only seeds without any damage and with light damage from the others.

Figure 2 shows the radiographic monitoring of the development of bug damage over a 15-days period of feeding allowance and the mean numbers of seeds per species damaged by bugs at the end of the experimentation were presented in Fig. 3. When *Pseudotsuga* seeds were offered besides pine seeds, females consumed more seeds of *Pseudotsuga* during the first 5 days than seeds of *Pinus sylvestris* with an intermediate position for seeds of *P. nigra* ($H = 6.578$, $df = 2$, $P = 0.037$; $H = 9.386$, $df = 2$, $P = 0.009$; respectively for the first and the second record). However, no difference between seed species was observed later ($P > 0.05$ in all cases). Seeds of *P. menziesii* were less selected by males than these of pines over the 15-days period of feeding ($P < 0.05$ in all cases) except at the 9th day of feeding where no significant difference was observed ($H = 5.406$, $df = 2$, $P = 0.067$). When *Abies* seeds were offered besides pine seeds, no difference in bug damage was observed both for males and females throughout the experimentation.

Effect of bug predation on seed germination

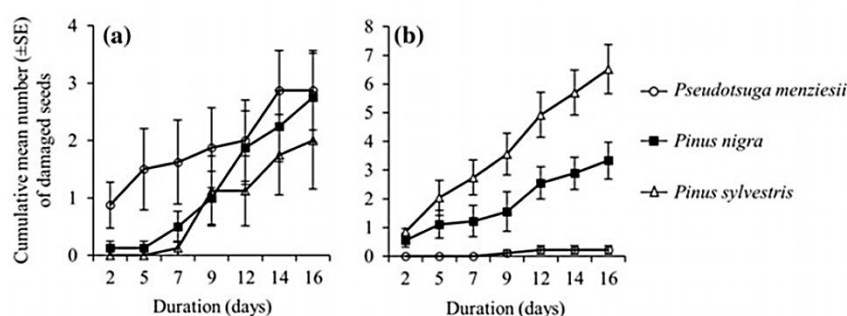
Abies seeds did not germinate at all whatever the damage category, even the seeds without damage. In the other conifers, seeds with more than half of the content consumed (i.e., severe and important damage categories) did not germinate except in *Pinus nigra* where such seeds showed a germination rate of 2.5 % (Fig. 4). Germination rates of seeds sustaining moderate damage were very low (comprised between 0.0 and 3.0 %) except in *Larix decidua* (23.1 %). These rates were significantly lower than these resulting of seeds showing light damage in *P. abies* (Fisher exact test, $P = 0.029$), *P. menziesii* (Fisher exact test, $P = 0.004$) and *P. sylvestris* (Fisher exact test, $P < 0.001$) but not in *P. nigra* (Fisher exact test, $P = 0.128$) and *L. decidua* (Fisher exact test, $P = 0.078$). With regard to filled seeds, light damage significantly decreased seed germination by 7 times in *P. nigra* (Fisher exact test, $P < 0.001$), by 3 times in *P. sylvestris* (Fisher exact test, $P < 0.001$), and by 3.5 times in *P. abies* (Fisher exact test, $P < 0.001$) but this was not observed in *P. menziesii* (Fisher exact test, $P = 0.421$) and *L. decidua* (Fisher exact test, $P = 0.121$).

Table 2 Mean weight of mature seeds exposed to feeding by *Leptoglossus occidentalis* sorted by radiographic damage categories

Species	No damage	Light	Moderate	Important	Severe	Empty
<i>Abies bornmülleriana</i>	99.46 a	99.65 a	80.70 ab	69.19 b	69.49 b	64.11 b
<i>Pinus sylvestris</i>	8.22 a	6.02 b	4.50 c	3.55 d	3.01 d	2.41 e
<i>Pinus nigra</i>	16.16 a	13.87 a	9.16 b	8.66 bc	7.25 cd	6.26 d
<i>Larix decidua</i>	9.67 a	8.08 ab	7.20 b	6.84 b	6.70 b	6.57 b
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	12.25 a	10.17 b	8.28 c	5.94 d	4.56 e	5.11 e
<i>Picea abies</i>	9.09 a	6.79 b	5.05 c	4.49 c	3.67 d	2.67 e

Means followed by different letters within lines indicate a significant difference ($P < 0.05$, Tukey–Kramer HSD test)

Fig. 2 Radiographic monitoring of the damage development in seeds offered to individual *Leptoglossus occidentalis* according to sex over a 15 days period of feeding allowance. a female and b male



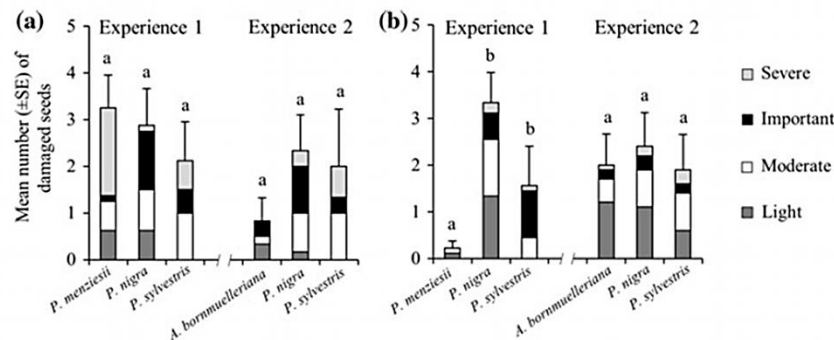
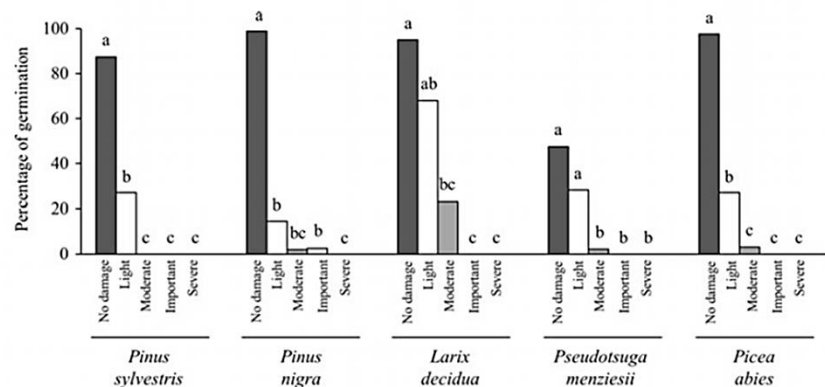


Fig. 3 Mean number ($\pm$ SE) of seeds per host species damaged by *Leptoglossus occidentalis* for each sex: **a** female and **b** male. Seeds were offered to individual bugs over a 15-days period according to two different groups of host species (experience 1 and experience 2). Different letters within an experience

indicate significant differences between the proportions of damaged seeds per host species, not considering the levels of damage after Kruskal–Wallis tests followed by Mann–Whitney test with Bonferroni–Holm correction

Fig. 4 Percentage of germinated seeds according to radiographic damage categories for key conifer species used for afforestation in Western and Central Europe. Different letters within a species indicate significant differences ($P < 0.05$, Fisher's exact test)



Impact of seed bug feeding on 1st year cone development and seed yield of 2nd year cones

First year cones of *Pinus sylvestris* exposed to *L. occidentalis* (adults or nymphs) did not abort significantly more than those in control bags without bugs ($H = 6.686$, $df = 4$; $P = 0.153$). However, the percentage of abortion in the bags where adults were introduced (ca. 25 %) tended (but not significantly) to be higher, compared to those observed in nymph and control treatments (respectively 3.0 and 8.3 %).

The percentage of filled seeds was significantly lower in 2nd year cones exposed to bugs than in control ones for both *P. sylvestris* ($H = 30.403$, $df = 4$, $P < 0.001$) and *P. nigra* ($H = 26.938$, $df = 4$, $P < 0.001$) (Fig. 5). In *P. sylvestris*, cones exposed to feeding by mated females presented the

lowest percentage of filled seeds (only 0.3 %) although not statistically different from those submitted to males and virgin females. In *P. nigra*, there was no significant difference between the bug treatments, the percentage of filled seeds ranging from 1.3 to 8.2 % whereas it reached ca. 60 % in controls. The percentages of empty seeds were not significantly different between treatments both for *P. sylvestris* ($H = 12.379$, $df = 4$, $P = 0.055$) and for *P. nigra* ($H = 4.529$, $df = 4$, $P = 0.339$) (Fig. 5). The percentages of damaged seeds differed significantly among mature cones offered to bugs and control ones in *P. sylvestris* ($H = 28.378$, $df = 4$, $P < 0.001$) as well as in *P. nigra* ($H = 27.272$, $df = 4$, $P < 0.001$). No damaged seeds were observed in control cones in *P. sylvestris* but fused seeds were observed in these of *P. nigra* (6.2 %). The percentage of damaged seeds

Is conifer diversity at risk?

reached ca. 99 % in cones of *P. sylvestris* offered to mated females. This value was significantly higher than in cones offered to nymphs, whereas virgin females and males resulted in intermediate values (Fig. 5). No significant difference was observed in *P. nigra*. However the bug treatments induced different types of damage to the seeds (Fig. 5). In both species, cones exposed to adult feeding contained a majority of fused seeds whereas the percentage of fused seeds was low in the cones exposed to nymphs. Consequently, for both pine species and regarding only the extractable seeds (i.e. not taking into account fused seeds), the proportions of damaged seeds were quite low (1–31 %) except for nymphs where the mean values were approximately 50 % (data not shown).

Comparative assessment of seed bug impact in seed orchards and alpine stands

Seed orchards

Seed bug damage was observed in all of the surveyed seed orchards, and affected all conifer species except *Larix decidua* in 2011 where most flowers were quite not pollinated (<2 % of the seeds available for bug consumption) (Table 1). However, bug damage was rather limited in the seeds orchards of Calviac and Sousceyrac, with less than 5 % of the available seeds consumed whatever the conifer species. By contrast, at Lavercantière, bug damage decreased by up to 25.7 % the potential seed yield in the Douglas-fir plantation in 2010, and by more than 15 % these of *Pinus nigra* and *P. sylvestris* in 2011 (Table 1). At this site, *L. decidua* was less damaged ($H = 50.060$, $df = 3$, $P < 0.001$) than the 3 other conifers. However, larch offered only a few filled seeds to bug feeding, considering that empty seeds represented 82.7–93.2 % of the total seeds. No bug preference could be drawn between the 3 other species ($H = 4.013$, $df = 2$, $P = 0.134$). When the four conifer species were pooled together, the highest percentages of bug damage were observed in 2010 ($H = 33.280$, $df = 2$, $P < 0.001$) while the percentages observed in 2011 and 2012 were not statistically different. Bug damage appeared either to be stable from 2010 to 2012 at Calviac and Sousceyrac or to decrease during the same period at Lavercantière

in *Pinus nigra* (Table 1). In the Douglas-fir plantation of Lavercantière, bug damage largely fluctuated over the 4 years following the insect arrival by late 2008. After a sharp increase during the first 2 years of presence, it largely decreased in 2011 and 2012 (Fig. 6).

Concerning *Abies*, the combined attack of bugs and both exotic and native fir chalcids, *Megastigmus rafni* and *M. suspectus* respectively, affected more than 25 % of the available seeds, resulting in a very low seed yield in 2011 (Table 1). In Douglas-fir, the combined attack of the alien *M. spermotrophus* and bugs resulted in a total percentage of damaged seeds fewer than 10 % at Calviac and Sousceyrac (Table 1). However, their combined damage reached 40 % in 2010 and 37 % in 2012 at Lavercantière (Fig. 5).

Yearly variations in the percentage of bug-damaged seeds were not correlated with any of the crop variables recorded in the plantation of *P. sylvestris* (Table 3). In the Douglas-fir plantation of Lavercantière, the percentage of bug-damaged seeds was positively correlated with the change in cone crop size from one year to the next (Pearson $r^2 = 0.894$, $P = 0.041$) (Table 3). In this plantation, no correlation was observed between the percentages of *M. spermotrophus* damaged seeds and any of the crop variables. By contrast, seed chalcid damage was negatively correlated to bug damage observed the year before (Pearson $r^2 = -0.963$, $P = 0.037$) (Table 4).

Alpine stands

Several bugs were observed every year feeding on mature cones of *P. nigra* and *P. sylvestris* at both sites. In both tree species, the percentages of filled and empty seeds largely varied from year to year and the highest percentages of bug-damaged seeds were observed at Serre-Ponçon ($U = 63.697$, $P < 0.001$) (Table 1). In this stand, *P. nigra* seeds were more damaged (77.36 % in 2011) than those of *P. sylvestris* ($U = 11,473.5$, $P = 0.005$) whereas the last species was preferred at Merdanel ($U = 8,587.5$, $P < 0.001$).

The additive effects of bug damage and empty seeds led to a dramatic decrease in potential seed yield of both pine species at Serre-Ponçon, where filled seed

to be released finally represented only 10–30 % of the initial seeds.

Discussion

Laboratory and bagging experiences confirmed the polyphagous status of *L. occidentalis*. Seeds of native European species (i.e. pine, larch, spruce and fir) could be exploited by the bugs as well as these of the exotic Douglas-fir. Using radiography, a five-level damage category has been experimentally defined on seeds of six of the most important conifer species used for afforestation in Western and Central Europe. Field observations confirmed that the damage patterns detected at the laboratory are similar to these noticed in seeds fed upon within mature cones. However, characterizing the status of empty seeds remained a problem because radiographic interpretations do not allow a clear differentiation between seeds sustaining severe bug damage and empty seeds which have naturally aborted because of a lack of pollination, fertilization problems or any other reasons not linked to insects (Schowalter and Sexton 1990). This could probably led to underestimate bug damage. Empty seeds represented ca. 40 % in *P. sylvestris* and 30 % in *P. nigra* of the seeds at the end of the 15-days long experiment but it cannot be excluded that their proportion may increase with a longer exposure of cones to bugs as it is the case over the field season until seeds are released. Nevertheless, this five-level damage category constitutes a tool to survey the seed quality in commercial crops, the more as densitometry does not provide so reliable results, especially in case of light damage.

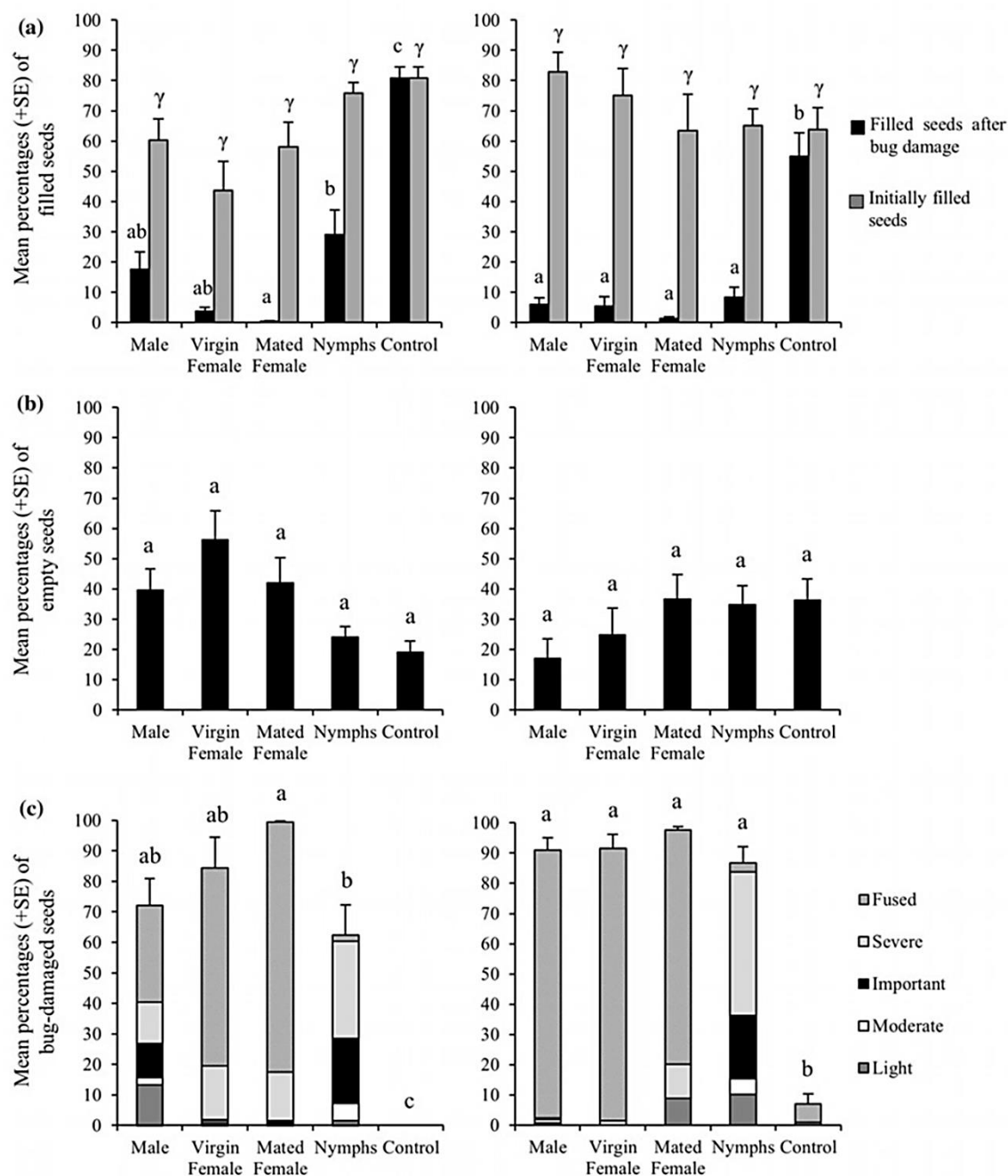
Tamburini et al. (2012) suggested that this invasive bug can affect natural regeneration in alpine forest ecosystems. Our survey of the development of *Leptoglossus* damage over 3 years in two pine stands of the French Alps tended to confirm this assumption. The bug was first observed at the southern location, Serre-Ponçon, by October 2007 (Dusoulier et al. 2007), i.e. 3 years before the survey. At this place, bug damage dramatically decreased by more than 70 % the potential seed yield for natural regeneration in both *Pinus nigra* and *P. sylvestris* in 2011, and damage fluctuated between 24.2 and 44.2 % the other years. The other site was less impacted but seed damage in *P. sylvestris* nevertheless reached approximately 53.5 %

Fig. 5 Comparison of the impact of *Leptoglossus occidentalis* on the final seed content of 2nd year cones of two pine species: *Pinus sylvestris* (left), *P. nigra* (right). Vertical axes represent mean percentages (+SE) of a filled seeds, b empty seeds and c bug-damaged seeds respectively. For each histogram, five treatments are compared: control, nymphs and adults with different reproductive status (fed individually on cones for 15-days period in late spring). Different letters (latin and greek) indicate significant differences between treatments within each species after Kruskal–Wallis tests followed by Mann–Whitney test with Bonferroni–Holm correction. Specifically, for a filled seeds histograms: Latin letters indicate significant differences after bug damage whereas Greek letter indicates non-significant difference before bug damage. For c bug damage seeds, statistical tests were made on the proportions of damaged seeds per species, not considering the levels of damage

in 2011. These results must be related to these regarding the germination capability of damaged seeds. In Canada, Bates et al. (2001) noticed that only 14 % of partially-filled seeds following bug damage were capable to germinate in Douglas-fir. Even a light damage (less than 1/3 of the whole content consumed) was here proved to reduce significantly germination by at least 70 % in both pine species as well as in native spruce. Moreover, when more than 1/3 of the internal content was consumed, the major part of the seeds (>95 %) were not capable of germinating. Furthermore, bug damage has been probably underestimated during this survey. Indeed, because of the sampling volume to be treated, cones were only dried and shaken to extract seeds but not completely dissected to check fused seeds possibly induced by adult feeding early in the season, and no survey of possible 1st year cone abortion was realized. Therefore, bug damage must be considered as a major threat for natural regeneration in these pine stands at least.

In North America, bug damage ranged from <5 to 40 % in different surveys (Pasek and Dix 1988; Schowalter 1994; Cibrián-Tovar et al. 1995; Blatt and Borden 1996; Kegley et al. 2001). In our seed orchard survey, bug damage never exceeded 25 % while in natural stands the percentages of bug damaged seeds could be very high. Nonetheless, damage appeared to be variable from one site to another. Site-related factors such as local climatic conditions could influence bug population (Schowalter et al. 1985; Tamburini et al. 2012). However, the 2-years survey of three sites of *P. menziesii* showed a “site effect” in 2010 but not in 2011 and suggested more a “year effect”. Although the relative abundance of bugs at each site

Is conifer diversity at risk?



was not available, the intensity of bug damage seemed to be more dependent on the variation in population density.

The low mortality observed in the bagging experiment as well as the large seed consumption within

cones showed that both *P. nigra* and *P. sylvestris* constitute an adequate food source for adults and nymphs. Moreover, natural damage by *Leptoglossus* was observed in all of the six conifer species exploited in the seed orchards of Southwestern France. These

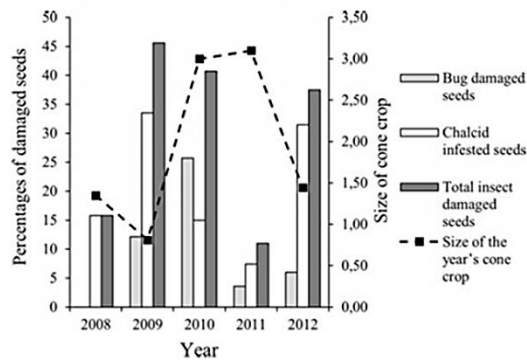


Fig. 6 Comparative annual fluctuation in seed damage by bugs and chalcids with regard to the cone crop size in a seed plantation of *Pseudotsuga menziesii* located at Lavercaitière (Southwestern France) from 2008 to 2012 (for cone crop rating see “Materials and methods”)

results confirmed these of Tamburini et al. (2012), who noticed *Leptoglossus* feeding on *P. sylvestris*, *P. nigra*, *P. mugo* and *L. decidua* in Northern Italy. However, no clear host preference was found during our study. Although seeds of *P. menziesii* were less selected by males than these of pines, further experiences on seeds within cones and not on extracted seeds are needed to confirm this result. Furthermore, European larch appeared much less attacked in the seed orchards but this species was only present in Lavercaitière orchard, and at this location, female seed cones suffered every year from a very low rate of natural pollination, and as a result produced only a few filled seeds except when manually pollinated (G. Philippe, pers. comm.). Therefore, this drastic limitation in resources susceptible to be exploited by bugs does not allow to conclude about a lower susceptibility of larch, the more as this species was well fed upon in the seed tests.

The type and extent of damage of *L. occidentalis* appears to differ with the period of the year, and subsequently the development stage of the female cone, and the bug life stage. Conversely to Bates et al. (2002b) in Western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex D. Don), bug feeding on 1st-year cones in *P. sylvestris* did not result in a more important abortion rate than natural processes acting in the insect-exclusion bags. Moreover, feeding on developing 2nd-year significantly reduced the number of filled seeds per cone, with each bug reducing yield by approximately 0.8 seeds per day in *P. sylvestris* and

Table 3 Pearson's correlations between *Leptoglossus* damage and the yearly variations in cone crop size in two plantations located at Lavercaitière (Southwestern France)

Variables	<i>Pinus sylvestris</i>		<i>Pseudotsuga menziesii</i>	
	r^2	P	r^2	P
Size of the year's cone crop	−0.494	0.671	0.228	0.771
Size of the previous cone crop	−0.982	0.122	−0.909	0.091
Change in cone crop	−0.032	0.979	0.894	0.041*

Significant relationship is asterisked

Table 4 Pearson's correlations between *Megastigmus* infestation and the yearly variations in cone crop size and *Leptoglossus* damage in a plantation of *Pseudotsuga menziesii* located at Lavercaitière (Southwestern France)

Variables	r^2	P
Size of the year's cone crop	−0.814	0.093
Size of the previous cone crop	−0.210	0.735
Change in cone crop	−0.367	0.543
<i>Leptoglossus</i> damage of the year	0.061	0.922
<i>Leptoglossus</i> damage of the previous year	−0.963	0.037*

Significant relationship is asterisked

0.7 in *P. nigra*. These values were lower than these found by Strong (2006) on lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) in the bug native range, where each female bug reduced the number of filled seeds by ca. 1.7 seeds per day from 6 May to 29 June in British Columbia. However, Strong (2006) showed that average female damage then decreased to 1.0–1.3 seeds per day from 29 June to 10 August, and dropped to 0.3 per day after 10 August, whereas the reduction caused by 3rd–5th instar nymphs averaged 0.6–1.2 seeds per day from late June to early August. Our experiments were carried out during the first two weeks of June for adults (which overwintered) and the first two weeks of July for nymphs (recently hatched). Therefore, it was impossible to confirm whether bug damage in the invaded range is more important early in the season and decreases during summer such as in the native area.

In the native British Columbia, Bates et al. (2002a, b) and Strong (2006) noticed that female bugs exhibited a greater rate of seed consumption, independently of their mating status. In contrast, our bagging experiments did

Is conifer diversity at risk?

not reveal any differences in total seed damage between male and female and a group of three 2nd instar nymphs, nor between virgin and mated female. The experiment using individual seeds confirmed, but only partly, these findings. No significant difference was observed between sexes in the total number of predated seeds but damage caused by males mostly affected less than 1/3 of the seed content ('light' category) whilst females predominantly consumed more than 2/3 of it ('severe' damage). In the bagging experiment, the only significant difference was observed between mated females and nymphs in *P. sylvestris*. Nevertheless, patterns of adult and nymph damage largely differed in native European pines. The 2nd-year cones attacked by adults mostly produced fused seeds whereas the percentage of such seeds was significantly lower in those offered to nymphs. However, cones were presented to nymphs about one month after the exposure to adults (first two weeks of July vs. first two weeks of June), and such cones were obviously physiologically more advanced in maturation. The presence of fused seeds as a result of bug damage is well known in the native area, e.g. in *Pinus monticola* (Connelly and Schowalter 1991), *P. contorta* (Strong et al. 2001; Bates et al. 2002a) and *Pseudotsuga menziesii* (Bates et al. 2000). Strong (2006) found that this damage in lodgepole pine was most prevalent in early May, less prevalent in late May and nonexistent after the beginning of June. Bug food uptake early in the season, before fertilization and seed coat hardening, was suggested to alter the physiological process by which the seed coat separates from the ovuliferous scale. Bates et al. (2000) showed that nymph feeding in June but not in July and August increased the number of fused seeds in Douglas-fir. In our experience, the control cones of *P. nigra* also showed a small proportion of fused seeds. They may have resulted from bug feeding on 1st-year cones—one year before the experimentation, when the insect exclusion bags were not present. Bates et al. (2002b) showed that the extractable seed set of the surviving 1st year cones of western white pine exposed to nymph feeding was reduced by 47 % compared to unexposed 1st year cones.

Since the arrival of *L. occidentalis* in Europe, new competitive interactions for seed resource could have emerged with the entomofauna already associated with cones and seeds. In Douglas-fir, the combined attack of the exotic *Megastigmus spermotrophus* and bugs resulted in a total percentage of damaged seeds fewer

than 10 % in two of the surveyed plantations but reached 40.7 % in 2010 and 37.5 % in 2012 at the Lavercaillère plantation. Looking at the interactions between *L. occidentalis* and *M. spermotrophus* in Douglas-fir in the native range, Blatt and Borden (1998) showed that the impacts of the two species are segregated and additive. In the Douglas-fir plantations surrounding the Lavercaillère seed orchard where both insect species are invading, Auger-Rozenberg and Roques (2012) showed that bug arrival by late 2008 resulted in an increase in total seed damage whereas the specific impact of *M. spermotrophus* appeared to have significantly decreased. Here, we found that the infestation of *M. spermotrophus* is negatively correlated to the extent of bug damage the year before. However, this correlation may actually correspond to confounding factors acting on the two species. Moreover, change in crop size from one year to the next in the Douglas fir plantation appeared to affect both bug and chalcid damage. Auger-Rozenberg and Roques (2012) have already observed a negative correlation between seed damage by *M. spermotrophus* and the annual variation in cone crop size in the surrounding plantations over a 25-years survey. The limited time of this study (5 years) may have prevented such an observation. However, we found that bug damage was related to the annual change in crop size and appeared to be more important when the cone crop decreased from one year to the next. In *Abies*, the combined attack of *Megastigmus rafni* and *M. suspectus* and bugs affected up to 25 % of the available seeds in 2011 but the bug damage was stable over years at low level unlike the large yearly fluctuations in chalcid infestation.

Without an estimation of the actual size of the bug populations, it is difficult to draw any definite conclusions about the population dynamics in the invaded area. However, yearly damage by bugs appeared to largely fluctuate since the insect arrival. In the Douglas-fir plantation of Lavercaillère, where it arrived by late 2008, damage showed a sharp increase during the first two years of presence but largely decreased in the following years. In the other seed orchards of the same region, damage either stabilized or decreased to a very low level in 2012. Direct visual observations, although without quantitative estimation, revealed that the presence of adults seemed more scarce in these areas in 2012 compared to the previous years (C. Blazy, pers. comm.). A quite similar situation was observed in the pine stands of the French

Alps where the species arrived two years before at least but also in the area of first record in Europe, Northeastern Italy, where it was difficult to find any bugs during autumn 2011. No mechanism has been proved to explain those collapses. It may proceed from massive migrations at rather long-distance owing to strong flight capability of adults. However, population fluctuations may be related to specific pattern in the life cycle observed in Europe. Except in Mexico (Cibrián-Tovar et al. 1995), the species was considered to be monovoltine in North America (Koerber 1963; Hedlin et al. 1980) with the possibility of a partial second generation (Bates et al. 2002b) whereas one to three generations were noticed in Europe (Bernardinelli and Rovato 2006; Tamburini et al. 2012). Tamburini et al. (2012) suggested that climatic conditions in late summer and autumn may led a large part of the nymphs of the last generation to be unable to reach the adult stage before winter, and therefore cannot survive overwintering.

This study confirmed that *L. occidentalis* can represent a threat in the continent and we highlighted the fact that the impact of invasive seed bug must be taken into account in future forest strategies. Moreover, our data suggests a possible competition between bugs and seed chalcids. Further investigations are necessary to clarify the relationships of the invasive bug with the other insects exploiting the same resource.

Acknowledgments We greatly acknowledge support from the European projects ISEFOR (*Increasing Sustainability of European Forests: Modelling for Security Against Invasive Pests and Pathogens under Climate Change*—collaborative project 245268), Cost action PERMIT (*Pathway Evaluation and pest Risk Management In Transport*) and the French Ministry of Agriculture, Food, Fisheries, Rural Affairs and Spatial Planning (convention DGFAR 01/09). We gratefully thank the Groupe d'Intérêt Economique (Vilmorin—ONF) which supplied seed samples for analysis, especially Christian Blazy and Gwenaél Philippe (IRSTEA). We also thank Jean-Paul Raimbault and Patrick Pineau for assistance in X-raying the seeds, and Francis Goussard for his help in collecting cones in the Alps. The authors are also indebted to Joel Giraud and the local authorities of L'Argentière-la-Bessée (05) for their support during the field work in the Alps. We are grateful to Olivier Denux for his help in the realization of Fig. 1.

References

- Ahn SJ, Son D, Choo HY, Park CG (2013) The first record on *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) in Korea, a potential pest of the pinaceous tree species. *J Asia Pacific Entomol* 16(3):281–284. doi:10.1016/j.aspen.2013.04.001
- Auger-Rozenberg MA, Roques A (2012) Seed wasp invasions promoted by unregulated seed trade affect vegetal and animal biodiversity. *Integr Zool* 7(3):228–246. doi:10.1111/j.1749-4877.2012.00308.x
- Bates SL, Borden JH, Kermode AR, Bennett RG (2000) Impact of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) on Douglas-fir seed production. *J Econ Entomol* 93(5):1444–1451. doi:10.1603/0022-0493-93.5.1444
- Bates SL, Lait CG, Borden JH, Kermode AR (2001) Effect of feeding by the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis*, on the major storage reserves of developing seeds and on seedling vigor of Douglas-fir. *Tree Physiol* 21(7):481–487
- Bates SL, Lait CG, Borden JH, Kermode AR (2002a) Measuring the impact of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) on seed production in lodgepole pine using an antibody-based assay. *J Econ Entomol* 95(4):770–777. doi:10.1603/0022-0493-95.4.770
- Bates SL, Strong WB, Borden JH (2002b) Abortion and seed set in lodgepole and western white pine conelets following feeding by *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae). *Environ Entomol* 31(6):1023–1029. doi:10.1603/0046-225x-31.6.1023
- Bernardinelli I, Rovato M (2006) Zandigiacomo P life history and laboratory rearing of *Leptoglossus occidentalis*. In: Forster B, Knizek M, Grodzki WE (eds) Proceedings IU-FRO working party 7.03.10 methodology of forest insect and disease survey in central Europe, Gmunden, p 225
- Bernardinelli I, Zandigiacomo P (2001) *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera, Coreidae): a conifer seed bug recently found in northern Italy. *J For Sci* 47(2):56–58
- Blatt SE, Borden JH (1996) Distribution and impact of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae) in seed orchards in British Columbia. *Can Entomol* 128(6):1065–1076
- Blatt SE, Borden JH (1998) Interactions between the Douglas-fir seed chalcid, *Megastigmus spermatophorus* (Hymenoptera: Torymidae), and the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae). *Can Entomol* 130(6):775–782
- Bosio G, Gerbaudo C, Piazza E (2010) *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu: an outline seven years after the first report in Piedmont (Italy). In: Bounous G, Beccaro GL (eds) Acta Horticulturae, I European Congress on Chestnut—Castanea 2009, vol 866, pp 341–348
- Bracalini M, Benedettelli S, Croci F, Terreni P, Tiberi R, Panzavolta T (2013) Cone and seed pests of *Pinus pinea*: assessment and characterization of damage. *J Econ Entomol* 106(1):229–234. doi:10.1603/ec12293
- Bustamante-Garcia V, Prieto-Ruiz JA, Alvarez-Zagoya R, Carrillo-Parra A, Corral-Rivas JJ, Merlin-Bermudes E (2012) Factors affecting seed production of *Pinus engelmannii* Carr in seed stands in Durango State, Mexico. *Southwest Entomol* 37(3):351–359. doi:10.3958/059.037.0311
- Cibrián-Tovar D, Tulio Méndez Montiel J, Campos Bolaños R, Yates HO III, Flores Lara J (1995) Insectos Forestales de México/forest insects of Mexico, vol 6. Universidad Autonoma Chapingo, Chapingo

Is conifer diversity at risk?

- Connelly AE, Schowalter TD (1991) Seed losses to feeding by *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) during two periods of second-year cone development in western white pine. *J Econ Entomol* 84(1):215–217
- Dusoulier F, Lupoli R, Aberlenc HP, Streito JC (2007) L'invasion orientale de *Leptoglossus occidentalis* en France: bilan de son extension biogéographique en 2007 (Hemiptera Coreidae). *L'Entomologiste* 63:303–308
- Fent M, Kment P (2011) First record of the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Turkey. *North-West J Zool* 7(1):72–80. doi:111106
- Gall WK (1992) Further eastern range extension and host records for *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae): well-documented dispersal of a household nuisance. *Great Lakes Entomol* 25(3):159–171
- Gandhi KJK, Herms DA (2010) North American arthropods at risk due to widespread *Fraxinus* mortality caused by the Alien Emerald ash borer. *Biol Invasions* 12(6):1839–1846
- Gapon DA (2012) First records of the western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* Heid (Heteroptera, Coreidae) from Russia and Ukraine, regularities in its distribution and possibilities of its range expansion in the palaearctic region. *Entomol Rev* 93(2):174–181
- Hedlin AF, Yates HO, Tovar DC, Ebel BH, Koerber TW, Merkel EP (1980) Cone and seed insects of North American conifers. Canadian Forestry Service, USDA Forest Service and Secretaria de Agricultura y Recursos Hidraulicos, Mexico
- Hulme PE (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *J Appl Ecol* 46(1):10–18. doi:10.1111/j.1365-2664.2008.01600.x
- International Seed Testing Association (1999) International rules for seed testing. Rules 1999. In: *Seed Sci Technol* 27 (Suppl.)
- Kegley S, Sturdevant N, Stein J, Willhite B, Flanagan P, Weatherby J, Marsden M (2001) Cone and seed insects and their impact on whitebark pine. Forest Health Protection Report—Northern Region, USDA Forest Service
- Koerber TW (1963) *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera, Coreidae), a newly discovered pest of coniferous seed. *Ann Entomol Soc Am* 56:229–234
- Liu H, Stiling P (2006) Testing the enemy release hypothesis: a review and meta-analysis. *Biol Invasions* 8(7):1535–1545. doi:10.1007/s10530-005-5845-y
- Luchi N, Mancini V, Feducci M, Santini A, Capretti P (2012) *Leptoglossus occidentalis* and *Diplodia pinea*: a new insect-fungus association in Mediterranean forests. *For Pathol* 42(3):246–251. doi:10.1111/j.1439-0329.2011.00750.x
- Malumphy C, Botting J, Bantock T, Reid S (2008) Influx of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Coreidae) in England. *Het News* 2(12):7–9
- McPherson JE, Packauskas RJ, Taylor SJ, O'Brien MF (1990) Eastern range extension of *Leptoglossus occidentalis* with a key to *Leptoglossus* species of America north of Mexico (Heteroptera:Coreidae). *Great Lakes Entomol* 23(2):99–104
- Meyerson LA, Mooney HA (2007) Invasive alien species in an era of globalization. *Front Ecol Environ* 5(4):199–208. doi:10.1890/1540-9295(2007)5[199:IASIAE]2.0.CO;2
- Pasek JE, Dix ME (1988) Insect damage to conelets, second-year cones and seeds of ponderosa pine in Southeastern Nebraska. *J Econ Entomol* 81(6):1681–1690
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. 2.11.1 edn. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Ridge-O'Connor GE (2001) Distribution of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) in Connecticut and parasitism by a tachinid fly, *Trichopoda pennipes* (F.) (Diptera: Tachinidae). *Proc Entomol Soc Wash* 103(2):364–366
- Roques A (2010) Taxonomy, time and geographic patterns. Chapter 2. In: Roques A et al. (Eds) *Alien terrestrial arthropods of Europe*. *BioRisk* 4 (1):11–26. doi:10.3897/biorisk.4.70
- Roques A, Skrzypczynska M (2003) Seed-infesting chalcids of the genus *Megastigmus* Dalman, 1820 (Hymenoptera: Torymidae) native and introduced to the West Palearctic region: taxonomy, host specificity and distribution. *J Nat Hist* 37(2):127–238. doi:10.1080/00222930110096069
- Roques A, Fabre JP, Raimbault JP, Delplanque A, Garcia J, Goussard F (1983) The insect pests of the cones and seeds of conifers in France/Les insectes ravageurs des cones et graines de coniferes en France. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris
- Roversi PF, Strong WB, Caleca V, Maltese M, Peverieri GS, Marianelli L, Marziali L, Strangi A (2011) Introduction into Italy of *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead), an egg parasitoid of the alien invasive bug *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. *EPPO Bull* 41(1):72–75. doi:10.1111/j.1365-2338.2011.02439.x
- Schaffner JC (1967) The occurrence of *Theognis occidentalis* in the midwestern United States (Hemiptera; Coreidae). *J Kansas Entomol Soc* 40:141–142
- Schowalter TD (1994) Cone and seed insect phenology in a Douglas-fir seed orchard during three years in western Oregon. *J Econ Entomol* 87(3):758–765
- Schowalter TD, Sexton JM (1990) Effect of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) on seed development of Douglas-fir at different times during the growing season in western Oregon. *J Econ Entomol* 83(4):1485–1486
- Schowalter TD, Haverty MI, Koerber TW (1985) Cone and seed insects in Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco, seed orchards in the Western United States: distribution and relative impact. *Can Entomol* 117(10):1223–1230
- Strong WB (2006) Seasonal changes in seed reduction in lodgepole pine cones caused by feeding of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae). *Can Entomol* 138(6):888–896
- Strong WB, Bates SL, Stoehr MU (2001) Feeding by *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) reduces seed set in lodgepole pine (Pinaceae). *Can Entomol* 133(6):857–865
- Tamburini M, Maresi G, Salvadori C, Battisti A, Zottele F, Pedrazzoli F (2012) Adaptation of the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* to Trentino, an alpine region (Italy). *Bull Insectol* 65(2):161–170
- Taylor SJ, Tescari G, Villa M (2001) A nearctic pest of pinaceae accidentally introduced into Europe: *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in northern Italy. *Entomol News* 112(2):101–103

Chapitre II

Compétition pour les ressources cônes/graines entre
le natif *Pissodes validirostris* et l'invasif *Leptoglossus occidentalis*

I. INTRODUCTION

Les invasions biologiques peuvent perturber le fonctionnement des écosystèmes et affecter les espèces natives (aussi bien la faune que la flore) de manière indirecte (e.g. effets cascade (Gandhi & Herms 2010)) ou directement (e.g. prédation, compétition pour la nourriture ou l'espace (Kenis et al. 2009; Kenis & Branco 2010)). Lors d'invasions biologiques, de nouvelles interactions interspécifiques se créent, les niches écologiques investies par les espèces exotiques étant dans la majorité des cas déjà occupées. L'espèce introduite mais également les espèces natives doivent donc faire face à de nouveaux compétiteurs avec lesquels elles n'ont pas co-évolué. Les conséquences pour les espèces considérées peuvent être importantes. En effet, ces nouvelles interactions peuvent alors entraîner soit un déplacement écologique (i.e. déplacement ou réduction de la niche écologique d'une ou plusieurs espèces permettant ainsi la coexistence), soit dans des cas de compétition drastique, l'exclusion de l'une des espèces (Holway 1999; Juliano & Lounibos 2005; Bøhn et al. 2008; Inoue et al. 2008). Dans leur revue, Reitz & Trumble (2002) ont noté que chez les insectes et les arachnides, une espèce exotique provoquait le déplacement compétitif d'une espèce native dans 33% des cas et d'une autre espèce exotique déjà établie dans 55% des cas. De même, Auger-Rozenberg & Roques (2012) ont montré que les chalcidiens exotiques des graines du genre *Megastigmus spp.* déplaçaient la faune native, mais aussi que l'impact combiné des espèces natives et exotiques diminuait fortement le potentiel de régénération de la plante hôte. Par conséquent, l'impact du nouvel arrivant peut alors s'ajouter à ceux déjà existants des ravageurs présents.

Les organismes invasifs sont souvent considérés comme des compétiteurs supérieurs. Echappant à leurs prédateurs et parasites naturels, ces derniers pourraient réallouer les ressources utilisées pour cette défense contre les agresseurs vers des capacités compétitrices (Blossey & Notzold 1995). Des traits d'histoire de vie spécifiques peuvent également procurer à l'espèce introduite des capacités de compétition supérieures, ce qui pourrait être le cas de *Leptoglossus occidentalis*. En effet, cette espèce est polyphage puisqu'observée sur plus d'une quarantaine de plantes hôtes (Hedlin et al. 1980; Tamburini et al. 2012; Lesieur et al. 2014). De plus, son mode de développement confère à cette compétition potentielle un statut particulier. En effet, cette espèce se nourrit depuis l'extérieur du cône (développement exophyte) contrairement à la plupart des insectes partageant la même ressource, qui se développent au sein du cône ou de la graine (développement endophyte). Ainsi, cette prise alimentaire particulière combinée aux capacités de vol (cf. Partie II, Chapitre III) permet aux adultes de se déplacer si les conditions sont défavorables et de choisir des plantes hôtes propices au développement de leur descendance. Cependant, aucune étude n'a pour le moment été menée en Europe afin de déterminer quel pouvait

être l'impact de ce nouveau compétiteur sur la faune native exploitant les mêmes ressources. De plus, les relations interspécifiques de *L. occidentalis* avec les autres insectes ravageurs des graines et des cônes n'ont été que très peu étudiées dans sa zone d'origine. Seuls les travaux réalisés par Blatt & Borden (1998) se sont intéressés aux relations *L. occidentalis* – *Megastigmus spermotrophus*, ravageur des graines de *Pseudotsuga menziesii* également originaire de l'Ouest américain. Les auteurs n'ont pas pu conclure précisément sur l'éventuelle compétition entre ces deux espèces. En revanche, les impacts engendrés par ces ravageurs sur la production de graines en vergers ont été jugés séparés, par conséquent leur impact semble donc s'additionner. Si cette observation se généralise aux relations de *L. occidentalis* avec d'autres espèces, de tels résultats en Europe pourraient alors avoir de lourdes répercussions sur la régénération naturelle de peuplements de conifères, notamment dans les peuplements où les attaques de ravageurs indigènes occasionnent déjà d'importants dégâts. Cependant, la situation en Europe pourrait être différente. Auger-Rozenberg & Roques (2012) ont montré que l'impact de *M. spermotrophus*, introduit lui aussi en Europe il y a plus d'un siècle, a significativement diminué pendant les trois années qui ont suivi l'arrivée de la punaise dans les vergers à graines du Sud-Ouest de la France. De même, le degré d'infestation de *M. spermotrophus* dans ces mêmes vergers pourrait être négativement corrélé à l'intensité des dégâts de *L. occidentalis* de l'année précédente (Lesieur et al. 2014). L'arrivée sur le continent européen de ce nouveau ravageur des graines pourrait donc être une menace tant pour la régénération des peuplements de conifères que pour la faune conospermatophage (i.e. consommateur des graines et des tissus du cône).

Dans la plupart des études sur les espèces exotiques ayant un impact écologique important, peu de données existent sur la structure de la communauté autochtone sur la période précédant l'invasion (Bohn et al. 2008). Cependant, en Europe, les espèces d'insectes phytophages associées aux cônes et graines du genre *Pinus* sont relativement bien connues (Roques 1983). Parmi ces différentes espèces, *Pissodes validirostris* (Coleoptera : Curculionidae) correspond au principal ravageur des cônes de *Pinus sylvestris*. Cet insecte, strictement inféodé aux pins, peut être observé sur toutes les espèces du genre *Pinus* de la section *silvestris* (*P. mugo*, *P. uncinata*, *P. nigra* et *P. leucodermis*) ainsi que sur les différentes espèces de pins méditerranéens (*P. pinea*, *P. halepensis* et *P. pinaster*) et sur certaines essences nord-américaines introduites en Europe (Annala 1975; Roques 1983; Roques et al. 2004). Ce ravageur est largement distribué dans toute la zone Paléarctique, depuis le Portugal et la Scandinavie jusqu'au Nord-Est de la Chine. Dans certaines parties d'Europe, les populations de *P. validirostris* peuvent atteindre des niveaux élevés occasionnant alors d'importants dégâts. Ainsi, plus de 80% de la production annuelle de cônes peuvent alors être détruits (Roques 1976; 1983; Roques et al. 1983; Roques et al. 2004). Bien qu'une nutrition de maturation des adultes ait lieu sur les rameaux des branches terminales ainsi que sur les cônes, ces dégâts

semblent insignifiants et non dommageables pour la croissance de l'arbre et la production de graines (Roques 1983; Lennox et al. 2009). Les dégâts sont donc exclusivement dus aux larves, notamment aux deux derniers stades larvaires, c'est-à-dire les stades L3 et L4 (Roques 1976). La période de ponte s'étale grossièrement de la mi-mai à la mi-juin, les œufs sont alors déposés sur la face externe du cône. Les larves vont ensuite se développer dans les cônes, creusant à l'intérieur et consommant toutes les graines sur leur passage. Deux à trois larves suffisent pour détruire la totalité d'un cône réduisant à l'état de sciure l'intérieur de celui-ci (Roques 1976). *Leptoglossus occidentalis* ne se nourrit que de graines et ne provoque aucun dégât visible depuis l'extérieur. Il est donc impossible de dissocier un cône sain d'un cône ayant été exploité par la punaise. L'utilisation du cône par *L. occidentalis* est possible tout au long du développement de ce dernier, mais plus l'exploitation est précoce plus elle est dommageable pour la production de graines saines, graines qui correspondent au potentiel de régénération naturelle (Strong 2006; Lesieur et al. 2014). La période de ponte de *P. validirostris* est relativement limitée dans le temps (environ un mois) et coïncide avec une phase bien précise du développement du cône (Roques 1976). Ainsi, la période d'exploitation du cône par l'un des ravageurs pourrait être un facteur important dans le choix de celui-ci tant par le charançon que par la punaise. En effet, on peut se demander si un cône attaqué par *P. validirostris* sera accepté par *L. occidentalis* et *vice versa*. De plus, Reitz et Trumble (2002) regroupent les mécanismes de compétition en deux catégories : l'exploitation (i.e. les individus d'une espèce acquièrent de manière plus importante la ressource) et l'interférence (i.e. les individus d'une espèce limitent ou empêchent les individus de l'autre espèce d'accéder à la ressource), les deux catégories n'étant pas exclusives. Par conséquent, la simple présence de l'une des deux espèces pourrait limiter ou empêcher l'utilisation du cône par l'autre espèce.

Les pertes engendrées par *L. occidentalis* peuvent s'avérer importantes en fonction des années dans les peuplements naturels de pins situés dans les Alpes, où les populations de punaises semblent maintenant bien installées (Dusoulier et al. 2007; Lesieur et al. 2014). Les données présentes dans la littérature (Roques et al. 1983; Roques 1988) et des observations personnelles ont montré que ces mêmes peuplements alpins pouvaient héberger des populations de *P. validirostris* importantes. De telles situations pourraient donc conduire à des phénomènes de forte compétition interspécifique. Ainsi, on peut se demander quelles sont les interactions de ces deux ravageurs dans ces peuplements, s'il existe une compétition importante entre eux et comment ces deux espèces vont se répartir la ressource alimentaire au sein du cône, de la plante-hôte ou du peuplement. L'objectif de cette étude est d'évaluer les relations interspécifiques entre une espèce invasive *L. occidentalis*, et une espèce native, *P. validirostris*, partageant les mêmes ressources, c'est-à-dire les cônes. Pour répondre à cet objectif, des expérimentations en conditions semi-contrôlées et des collectes en champ ont été réalisées, permettant ainsi de confronter des données obtenues dans des conditions

maîtrisées à des données constatées sur le terrain.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. Insectes utilisés

Les punaises utilisées dans cette étude provenaient de la colonie initiée à partir d'insectes collectés dans la région Orléanaise en septembre 2009 à laquelle sont périodiquement ajoutés des insectes prélevés dans la même région, afin d'éviter une trop forte consanguinité. La colonie a été placée en extérieur pour mimer au mieux les conditions naturelles. Les adultes utilisés correspondent donc à des individus ayant hiverné dans des cages d'élevage (0,5 x 0,5 x 1 m), chaque cage contenant un jeune plant de *Pseudotsuga menziesii* ainsi que des graines de *Pinus nigra* et *Pseudotsuga menziesii*.

Concernant les charançons, les individus utilisés de *P. validirostris* correspondent à des adultes collectés dans la région de Briançon sur *P. sylvestris* entre les 16 et 20 mai 2011, début de la période d'accouplement (Roques 1983). Pour être certain d'obtenir des femelles fécondées, seuls les couples déjà formés ont été prélevés, individualisés dans des pots de 180 ml en polypropylène (Gosselin Plastique, France) pour le transport jusqu'au laboratoire. Des rameaux de *P. sylvestris* ont été offerts aux couples de charançons jusqu'à leur utilisation.

II.2. Evaluation des relations *L. occidentalis* – *P. validirostris* en conditions semi-contrôlées

Les expérimentations ont été réalisées sur des *P. sylvestris* plantés dans les pépinières de l'INRA d'Orléans (France ; 47°49'N ; 01°54'E). Dix arbres ont été sélectionnés et des conelets et cônes ont été ensachés dans des bonnettes en gaze au printemps, avant l'émergence des ravageurs des cônes. Chaque bonnette contenait de deux à dix conelets et deux cônes. Afin de déterminer si la période d'exploitation du cône pouvait influencer le choix de ce dernier par *P. validirostris* et *L. occidentalis*, différentes modalités ont été testées et chaque bonnette a été assignée aléatoirement à une des six modalités suivantes : un couple de *P. validirostris* (une femelle et un mâle) (P) ; un couple de *P. validirostris* puis un couple de *L. occidentalis* (une femelle et un mâle) (PL) ; un couple de *L. occidentalis* puis un couple de *P. validirostris* (LP) ; un couple de *P. validirostris* et un couple de *L. occidentalis* simultanément (P+L) ; un couple de *L. occidentalis* (L) (TABLEAU 3). Le sixième et dernier traitement correspondait à un contrôle où les cônes n'ont été soumis à aucun insecte (T).

L'expérience se composait de dix répétitions par traitement (sur dix arbres différents) à l'exception des traitements L et T qui n'ont pu être répétés respectivement que neuf et huit fois. Chaque période d'accès aux cônes pour *P. validirostris* ou *L. occidentalis* était de 15 jours. L'expérience s'est déroulée du 13 mai au 25 juin 2011 (cf. TABLEAU 3, pour les détails des différents traitements). Tous les insectes ont alors été retirés et les bonnettes ont été laissées jusqu'à la récolte des cônes qui a eu lieu en septembre 2011. A cette date, la survie des conelets a été évaluée et les cônes ont été prélevés et inspectés visuellement afin de comptabiliser le nombre de trous d'émergence d'adultes de *P. validirostris*.

TABLEAU 3. Développement du charançon, *Pissodes validirostris*, en présence ou non d'un compétiteur, *Leptoglossus occidentalis*, selon différentes périodes d'accès au cône pour les deux espèces.

Modalité	Période de l'expérimentation		Nombre total de cônes offerts	Nc P total	Nc P Av.	Nt P	ratio <i>r</i>
	espèce 1	espèce 2					
P	Installé : 25 mai Retiré : 09 juin	/	19	10	2	9	47,37 a
PL	Installé : 25 mai Retiré : 09 juin	Installé : 10 juin Retiré : 25 juin	20	4	4	0	0,00 b
LP	Installé : 12 mai Retiré : 27 mai	Installé : 27 mai Retiré : 11 juin	19	8	5	3	15,79 ab
P+L	Installé : 25 mai Retiré : 09 juin	/	20	5	2	3	15,00 ab
L	Installé : 25 mai Retiré : 09 juin	/	18	/	/	/	/
T	/	/	16	/	/	/	/

Les différentes modalités correspondent à **P** : *Pissodes validirostris* seul ; **PL** : *P. validirostris* puis *Leptoglossus occidentalis* ; **LP** : *L. occidentalis* puis *P. validirostris* ; **P+L** : *P. validirostris* et *L. occidentalis* ; **T** : Témoin (aucun insecte). **Nc P total** représente le nombre total de cônes présentant des dégâts de *P. validirostris* alors que **Nc P Av.** correspond au nombre de cônes présentant des signes d'attaques avortées de *P. validirostris*. **Nt P** est le nombre total d'adultes de *P. validirostris* obtenus en septembre 2011 (fin de l'expérimentation). Le **ratio *r*** correspond au nombre d'adultes de *P. validirostris* obtenus en septembre (**Nt P**) / nombre total de cônes offerts. Les lettres différentes indiquent une différence significative (tests exacts de Fisher par paires avec correction de Bonferroni-Holm : $p < 0,05$).

Les cônes ont ensuite été séchés puis disséqués afin d'en extraire les graines. Le statut sanitaire de ces dernières a alors été déterminé par radiographie selon la méthodologie décrite par Lesieur et collaborateurs (2014). Ainsi, les graines ont été classées suivant quatre catégories : graines pleines (i.e. saines), graines vides (i.e. non fécondées), graines endommagées par *L. occidentalis* et graines détruites par *P. validirostris*. Afin de déterminer quelle modalité pouvait être la plus propice au développement de *P. validirostris*, le ratio *r* (i.e. nombre d'adultes de *P. validirostris* collectés en septembre / nombre de cônes soumis au départ) a été calculé. Le pourcentage moyen de graines

pleines par cône a servi de variable comparative pour déterminer quel traitement pouvait être le plus dommageable pour la production de graines pleines et déterminer un éventuel effet " traitement " sur la consommation des graines des ravageurs.

II.3. Evaluation des relations *L. occidentalis* – *P. validirostris* en peuplements naturels

Des collectes de cônes ont été réalisées fin septembre 2012 dans deux peuplements de pins (le Merdanel et Serre-Ponçon) situés dans les Hautes Alpes (Sud-Est de la France). Ces peuplements ont été sélectionnés pour leur composition spécifique (i.e. peuplements mixtes de *P. sylvestris* et *P. nigra*). De plus, les données de la littérature (Roques 1983; 1988; Dusoulier et al. 2007) et des observations personnelles des années précédentes ont montré que ces deux sites sont contrastés dans le niveau des populations des deux ravageurs. Les dégâts de *L. occidentalis*, plus élevés à Serre-Ponçon qu'à Merdanel laissent présager un niveau de population de punaises supérieur sur ce site, là où les populations de *P. validirostris* semblent importantes. Pour chaque site et pour chaque essence (i.e. *P. sylvestris* et *P. nigra*), 10 à 13 arbres ont été sélectionnés au hasard. Pour chaque arbre, le nombre total de cônes ainsi que le nombre de cônes attaqués par *P. validirostris* ont été comptabilisés. De même et bien que fin septembre corresponde à la période où les adultes de *L. occidentalis* recherchent un site d'hivernation et ont donc pour certains déjà quitté le peuplement, une inspection visuelle sur chaque arbre échantillonné a été réalisée pour déterminer la présence ou non de *L. occidentalis* (adultes ou larves). Pour chaque arbre, 20 cônes (en fonction des possibilités et du degré d'attaque de *P. validirostris*) ont été collectés suivant deux modalités : (A) cône sain (i.e. cône de couleur brun-vert sans aucun signe d'attaque de *P. validirostris* ou autre ravageur) et (B) cône attaqué par *P. validirostris* (trous d'émergence des adultes ou cône déshydraté de couleur brun foncé).

Suivant la méthode décrite précédemment, les cônes ont été séchés et disséqués. La dissection des cônes a également permis de distinguer des adultes de *P. validirostris* encore non émergés et restés dans leur logette de nymphose. Le nombre d'individus de *P. validirostris* par cône a été comptabilisé et le statut sanitaire de chaque graine a été déterminé selon les quatre catégories citées dans l'expérience précédente.

II.4. Analyses statistiques

Le ratio r des différentes modalités testées dans l'expérience d'ensachage de cônes a été comparé en utilisant le test exact de Fisher par paires avec correction de Bonferroni-Holm. Les pourcentages moyens de conelets avortés ainsi que les pourcentages moyens de graines pleines par

cône ont été comparés entre chaque modalité par des tests de Kruskal-Wallis suivis de tests post-hoc de comparaison par paires (tests de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni-Holm) lorsque la significativité était avérée.

Les pourcentages d'arbres infestés par *P. validirostris* ont été comparés par espèce et par site *via* des tests exacts de Fisher. La même analyse a été réalisée pour les arbres infestés par *L. occidentalis*. Au vu du très faible niveau d'attaque de *P. validirostris* sur *P. nigra*, les analyses suivantes se sont focalisées sur *P. sylvestris*. Le degré d'infestation moyen de chaque arbre (*P. sylvestris*) par le charançon a été comparé entre site par un test exact de Fisher. Au sein de chaque site, des comparaisons des pourcentages de cônes attaqués par *P. validirostris*, par *L. occidentalis* ou par les deux espèces ont été réalisées par des tests exacts de Fisher par paires avec correction de Bonferroni-Holm. Chaque modalité a également été comparée entre site. Une comparaison des pourcentages moyens de graines pleines par cône a été menée au sein de chaque site *via* des tests de Kruskal-Wallis suivis de tests post-hoc (tests de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni-Holm) et entre site (tests de Mann-Whitney).

III. RÉSULTATS

III.1. Evaluation des relations *L. occidentalis* – *P. validirostris* en conditions semi-contrôlées

Au cours de l'expérimentation et pour l'ensemble des modalités testées, la mortalité de *L. occidentalis* a été faible, correspondant seulement à quatre individus (deux individus pour la modalité LP, un pour P+L et un pour PL). De même, aucune mortalité de *P. validirostris* n'a été observée la première semaine. Au terme des 15 jours d'expérimentation, une femelle de *P. validirostris* n'a pas été retrouvée dans une des bonnettes de la modalité P et la mortalité de trois charançons (répartis sur les modalités LP et P+L) a été constatée.

Lors de la collecte des cônes en septembre 2011, aucun individu adulte de *P. validirostris* n'a été observé pour la modalité PL, seulement trois pour les modalités LP et P+L et neuf adultes ont été observés dans la modalité P (TABLEAU 3). Lors de la dissection des cônes, certains présentaient des signes de dégâts caractéristiques des jeunes stades larvaires (L1-L2) (i.e. trajet des larves sur la face interne des écailles (Annala 1975; Roques 1976)) notamment les modalités PL, LP et P+L (TABLEAU 3). Le ratio *rs* s'élève à 47,37% pour la modalité P, est nul pour la modalité PL et intermédiaire pour les modalités LP et P+L (environ 15% pour chacune). Cependant, ce ratio ne s'avère significativement

différent que pour la comparaison P-PL (test exact de Fisher : $p < 0,001$).

Aucune différence significative entre modalités n'a été observée concernant le pourcentage moyen d'avortement des conelets ($H = 4,517$; $df = 5$, $p = 0,478$). Les pourcentages de graines pleines sont significativement différents entre modalités ($H = 86,627$; $df = 5$; $p < 0,001$) (FIGURE 12). Toutes les modalités présentent des valeurs significativement plus faibles que la valeur observée dans la modalité T ($79,90\% \pm SE 3,19\%$), à l'exception de la modalité P ($65,44\% \pm SE 5,69\%$) où la différence n'est pas significative. Les plus faibles pourcentages de graines pleines correspondent aux pourcentages obtenus pour les modalités LP ($3,60\% \pm SE 0,98\%$) et P+L ($7,09\% \pm 2,01\%$).

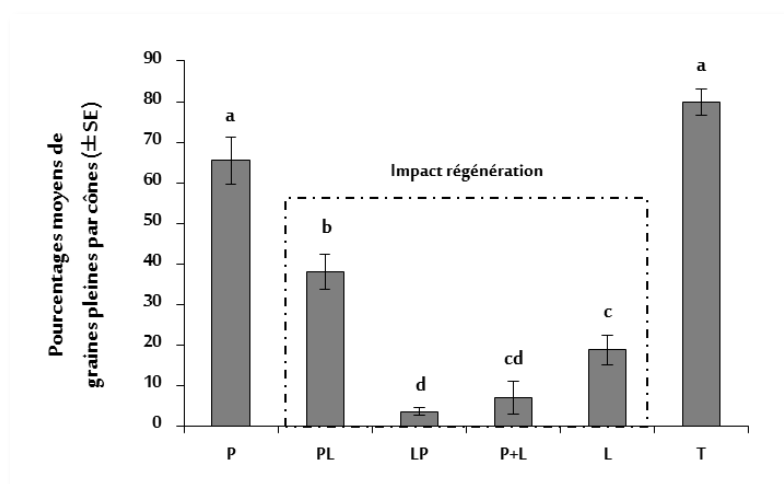


FIGURE 12. Comparaison de l'impact des différents traitements sur le pourcentage moyen de graines pleines par cône.

Les différentes modalités correspondent à **P** : *Pissodes validirostris* seul ; **PL** : *P. validirostris* puis *Leptoglossus occidentalis* ; **LP** : *L. occidentalis* puis *P. validirostris* ; **P+L** : *P. validirostris* et *L. occidentalis* ; **T** : Témoin (aucun insecte). Chaque cône a été offert 15 jours aux différents ravageurs selon la modalité (cf. TABLEAU 3, pour plus de détails). Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements après un test de Kruskal-Wallis suivi par des comparaisons par paires (tests de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni-Holm).

III.2. Evaluation des relations *L. occidentalis* – *P. validirostris* en peuplements naturels

Au total 521 cônes ont été collectés. La présence de *L. occidentalis* a été notée dans les deux sites et sur chaque essence. Les individus observés correspondaient à des adultes ainsi qu'à des larves de différents stades (L2 à L5). L'analyse des graines a permis de confirmer que tous les arbres sur lesquels des punaises avaient été observées comportaient des dégâts caractéristiques de l'espèce. Le pourcentage d'arbres, sur lesquels des dégâts de *L. occidentalis* ont été observés, ne varie pas entre sites, ni entre espèces (Tests exacts de Fisher $p > 0,05$ dans chaque cas) (FIGURE 13). Au sein du

peuplement de Serre Ponçon, aucun *P. nigra* échantillonné ne portait de cône infesté par *P. validirostris* et seulement 40% à Merdanel (FIGURE 13). Le pourcentage de pins sylvestres échantillonnés portant des cônes infestés par *P. validirostris* est plus élevé à Merdanel qu'à Serre Ponçon (test exact de Fisher : $p < 0,001$). En effet, 100% des arbres échantillonnés à Merdanel étaient colonisés par *P. validirostris* contre 30% à Serre Ponçon (FIGURE 13). Au sein du peuplement de Merdanel, le pourcentage de pins noirs échantillonnés et infestés par *P. validirostris* est plus faible que pour les pins sylvestres (test exact de Fisher : $p = 0,002$). La dissection des cônes a révélé que certains adultes de *P. validirostris* n'avaient pas encore émergés, cependant les seuls insectes non émergés ont tous été observés au sein de cônes considérés infestés. Le degré d'infestation moyen des pins sylvestres par le charançon (i.e. nombre total de cônes infestés / nombre total de cônes produits par arbre) s'est révélé significativement plus faible à Serre Ponçon ($10,50\% \pm 4,63\%$) qu'à Merdanel ($42,64\% \pm 5,90\%$). Le taux d'infestation moyen des pins noirs de Merdanel est quant à lui anecdotique ($0,60\% \pm 0,28\%$).

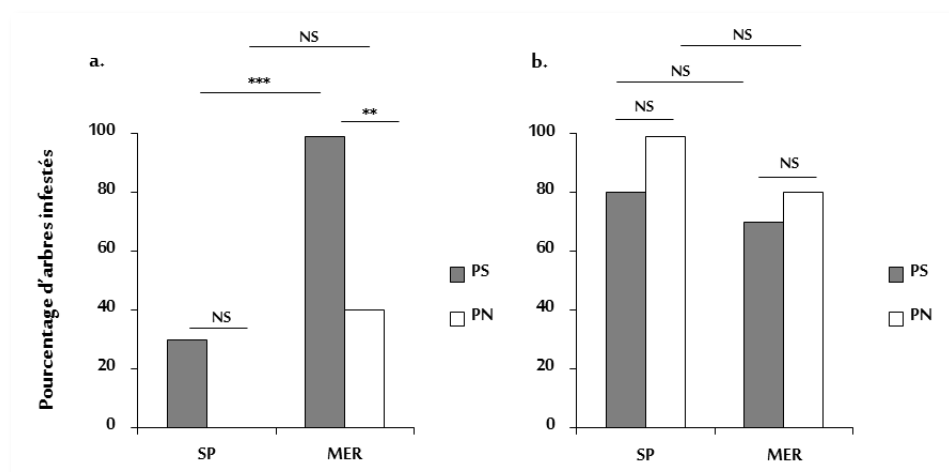


FIGURE 13. Comparaison des pourcentages d'arbres infestés par *Pissodes validirostris* ou par *Leptoglossus occidentalis* dans deux peuplements alpins de *Pinus sylvestris* et *Pinus nigra*

a. *Pissodes validirostris*, b. *Leptoglossus occidentalis*. Les sites correspondent à **SP** : Serre Ponçon et **MER** : Merdanel. Les plantes hôtes sont représentées par **PS** : *Pinus sylvestris* et **PN** : *Pinus nigra*. Les différentes lettres indiquent des différences au sein de chaque site. La significativité des tests exacts de Fisher est indiquée au-dessus des barres correspondantes (NS : non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

Le nombre de cônes présentant des dégâts de *L. occidentalis* dans le peuplement de Merdanel ne varie pas entre *P. sylvestris* et *P. nigra* (test exact de Fisher : $p = 1$). En revanche, la différence est significative sur le site de Serre Ponçon où le nombre de cônes de pin noir présentant des signes de consommation de la punaise est plus élevé que pour le pin sylvestre (test exact de Fisher : $p < 0,001$) (FIGURE 14).

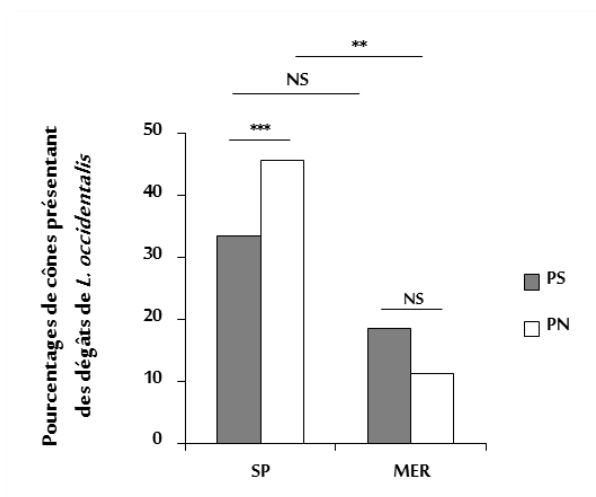


FIGURE 14. Comparaison des pourcentages de cônes présentant des dégâts de *Leptoglossus occidentalis* dans deux peuplements alpins de *Pinus sylvestris* et *Pinus nigra*.

Les sites correspondent à **SP** : Serre Ponçon et **MER** : Merdanel. La significativité des tests exacts de Fisher est indiquée au-dessus des barres correspondantes (NS : non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

Sur *P. sylvestris*, très peu de cônes ont montré des signes de dégâts des deux espèces 4,2% et 1,49% respectivement pour Serre Ponçon et Merdanel (FIGURE 15) et aucune différence significative n'a été observée entre site (test exact de Fisher : $p = 0,159$). A Serre-Ponçon, le nombre de cônes collectés présentant des dégâts de *L. occidentalis* est significativement plus important que le nombre de cônes attaqués par *P. validirostris* ou par les deux espèces (tests exacts de Fisher : $p = 0,023$ et $p < 0,001$ respectivement). A Merdanel, sur les 201 cônes prélevés, le nombre de cônes attaqués par le charançon est plus élevé que le nombre de cônes montrant des dommages dus à *L. occidentalis* ou aux deux espèces (tests exacts de Fisher : $p < 0,001$ dans les deux cas). Le nombre de cônes où des dégâts de *L. occidentalis* ont été identifiés ne diffère pas significativement entre site (test exact de Fisher : $p = 0,138$). Le nombre moyen de *P. validirostris* par cône à Merdanel est de 2,78 (SE $\pm 0,20$) avec un maximum de 10 individus au sein du même cône et est significativement supérieur à celui observé pour les cônes de Serre Ponçon 1,88 (SE $\pm 0,27$) avec un maximum de 8 individus ($U = 984,5$; $p = 0,002$).

Au sein de chaque site, des différences significatives ont été observées concernant les pourcentages moyens de graines pleines par cône ($H = 49,512$; $df = 3$; $p < 0,001$ et $H = 118,108$; $df = 3$; $p < 0,001$ respectivement pour Serre Ponçon et Merdanel). Les cônes sains possédaient dans chaque cas les pourcentages les plus élevés et les cônes infestés par le charançon les pourcentages les plus faibles (FIGURE 16). Les pourcentages moyens de graines pleines des modalités cône sain et cône attaqué par *L. occidentalis* étaient respectivement plus importants à Merdanel que ceux de Serre Ponçon ($U = 347$; $p < 0,001$ et $U = 589$; $p < 0,001$).

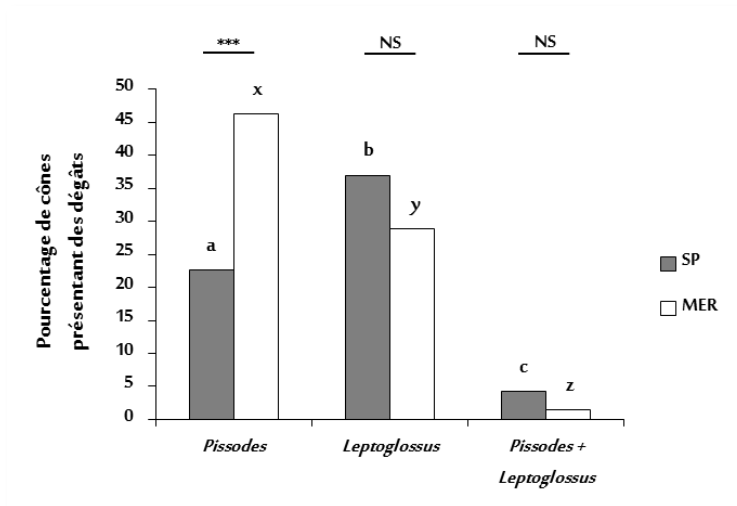


FIGURE 15. Comparaison des pourcentages de cônes présentant des dégâts de *Pissodes validirostris* et/ou *Leptoglossus occidentalis* dans deux peuplements alpins de *Pinus sylvestris*.

Les sites correspondent à **SP** : Serre Ponçon et **MER** : Merdanel. Les lettres différentes indiquent une différence significative au sein de chaque site (tests exacts de Fisher par paires avec correction de Bonferroni-Holm : $p < 0,05$) : a, b et c pour le site de Serre Ponçon, et x, y, z pour le site de Merdanel. La significativité des tests exacts de Fisher pour les comparaisons entre site est indiquée au-dessus des barres correspondantes (NS : non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

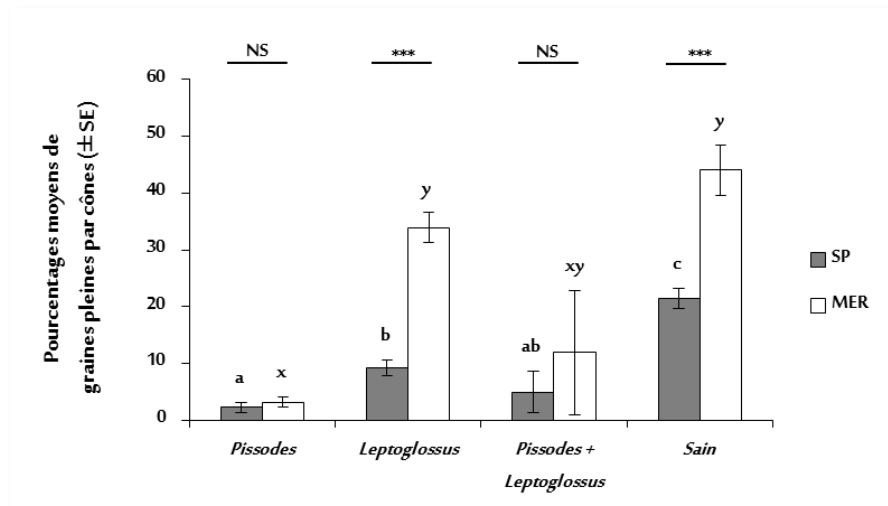


FIGURE 16. Comparaison des pourcentages moyens de graines pleines par cône, sain ou attaqué par *Pissodes validirostris* et/ou *Leptoglossus occidentalis* dans deux peuplements alpins de *Pinus sylvestris*.

Les sites correspondent à **SP** : Serre Ponçon et **MER** : Merdanel. Les lettres différentes indiquent une différence significative au sein de chaque site entre les traitements après un test de Kruskal-Wallis suivi par des comparaisons par paires (tests de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni-Holm) : a, b et c pour le site de Serre Ponçon, et x et y pour le site de Merdanel. Entre site chaque modalité a été comparée par des tests de Mann-Whitney dont la significativité est indiquée au-dessus des barres correspondantes (NS : non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

IV. DISCUSSION

Dans les conditions d'expérimentation testées, la présence de *Pissodes validirostris* ne semble pas affecter *Leptoglossus occidentalis*. En effet, quelle que soit la modalité considérée, la mortalité observée a été très faible et la quasi-totalité des cônes offerts présentaient des dégâts caractéristiques (Lesieur et al. 2014). De plus, aucune différence entre traitement n'a été observée concernant le pourcentage d'avortement des conelets.

Les individus de *L. occidentalis* ne se sont donc pas reportés davantage sur les conelets, même lorsque les punaises devaient partager la ressource " cônes " avec le charançon. Les différentes modalités impliquant *L. occidentalis* présentaient des pourcentages de graines pleines significativement plus faibles que les cônes témoins.

Au vu du très faible nombre de charançons qui se sont développés au sein des modalités PL et LP, les différences significatives observées concernant les pourcentages moyens de graines pleines entre les couples PL-L et LP-L peuvent donc être attribuées au décalage temporel de la période où les cônes ont été soumis à *L. occidentalis*. En effet, en raison des contraintes imposées par la période de ponte de *P. validirostris*, les cônes pour la modalité LP ont été soumis aux punaises plus tôt dans la saison que les cônes exposés aux punaises de la modalité L. De même, les cônes de la modalité PL ont été soumis à *L. occidentalis* plus tardivement (après la période où les cônes ont été offerts aux charançons). Or, Strong (2006) a montré sur *Pinus contorta* que les dégâts de *L. occidentalis* étaient les plus dommageables en début de saison, c'est-à-dire que *L. occidentalis* impactait le plus le nombre de graines pleines par cône. De même, Lesieur et collaborateurs (2014) ont observé que les pourcentages de graines pleines des cônes de *P. sylvestris*, soumis plus tardivement à des larves de *L. occidentalis*, étaient plus élevés que ceux des cônes offerts à des adultes plus tôt dans la saison. Les résultats de l'expérience d'ensachage des cônes confirment donc que plus l'exploitation du cône par *L. occidentalis* est précoce, plus les dégâts sont importants. En effet, une prise alimentaire des punaises au printemps, lorsque les cônes sont en phase d'élongation et les graines en formation, provoque l'adhésion de celles-ci aux écailles ovulifères et altère donc le développement de ces graines. De telles graines sont alors qualifiées de fusionnées (Strong et al. 2001; Bates et al. 2002; Lesieur et al. 2014). Une modification des processus physiologiques par lesquels la graine se sépare de son écaille ovulifère est alors supposée.

Le nombre d'adultes obtenus et le faible nombre d'attaques avortées (seulement 2) dans la modalité P indiquent que ces cônes constituaient une ressource acceptable pour les individus de *P. validirostris* utilisés au cours de cette étude. Cependant, peu d'adultes de *P. validirostris* (entre 0

et 3) ont été obtenus dans les modalités où *L. occidentalis* était ou avait été présente. De même, bien que les différences ne soient pas significatives, les attaques avortées de charançons (i.e. signes caractéristiques de dégâts de jeunes stades larvaires) semblent plus importantes dans ces mêmes modalités. Ces différentes observations pourraient être le résultat d'un mauvais développement embryonnaire et/ou d'une faible ponte des charançons. Néanmoins, dans les deux cas, *L. occidentalis* pourrait provoquer de telles réactions par une action (1) directe sur les œufs déjà déposés (e.g. prédation facultative comme chez d'autres espèces d'hétéroptères (Hagler et al. 2010)) ou sur les adultes de *P. validirostris* pouvant ainsi perturber la ponte (e.g. agressivité observée chez d'autres espèces du genre *Leptoglossus* (Miyatake 1997; Panizzi 2004)). Ceci pourrait également être le fruit (2) d'une action indirecte sur le comportement de ponte, sur le développement embryonnaire tout comme sur le développement larvaire du charançon. Dormont & Roques (2001) ont suggéré que le choix par le charançon du cône-hôte est assuré par des signaux olfactifs comme par exemple des monoterpènes volatils. La consommation du cône par *L. occidentalis* pourrait modifier le profil des monoterpènes émis, le cône ne constituerait alors plus un substrat de ponte acceptable pour *P. validirostris*. De plus, la rupture supposée de certains processus physiologiques engendrée par la prise alimentaire de *L. occidentalis* pourrait altérer le développement des larves de *P. validirostris* via une diminution de la valeur nutritive du cône ou encore via des changements chimiques ou physiques au sein de ce dernier. A ce titre, Roques (1976) a identifié une coïncidence phénologique étroite entre la période de ponte du charançon et l'augmentation de la teneur en eau du cône, une forte teneur en eau permettant à la larve de premier stade, dont les mandibules ne sont pas encore sclérifiées, de s'enfoncer plus facilement dans le cône. De plus, Annila (1975) a observé que lorsqu'un grand nombre d'encoche de ponte de *P. validirostris* étaient reportées sur le même cône, les couches externes de ce dernier s'asséchaient très rapidement provoquant ainsi la mort des larves nouvellement écloses. La prise alimentaire répétée de *L. occidentalis* pourrait donc avoir les mêmes conséquences. Les cônes de la modalité PL ont été offerts à *L. occidentalis* que très peu de temps après avoir été soumis aux charançons et par conséquent que peu de temps après la ponte, or le développement embryonnaire de *P. validirostris* s'effectue sur une durée de 15 à 20 jours en fonction des conditions d'exposition du cônes (Roques 1976). Aucun charançon ne s'est développé dans cette modalité où seulement des attaques avortées de jeunes stades larvaires ont été observées. Ainsi, une exploitation précoce des cônes par *L. occidentalis* par rapport à la période d'accouplement et de ponte de *P. validirostris* ou très peu de temps après pourrait donc être dommageable pour ce dernier.

Les collectes de cônes et les observations en champs dans les deux peuplements alpins choisis montrent une préférence du charançon pour *P. sylvestris*. En effet, aucun arbre ni aucun cône de *P. nigra* ne possédaient de dégâts caractéristiques du charançon à Serre Ponçon et le taux

d'infestation des pins noirs de Merdanel était très faible (inférieur à 1%). Ces résultats confirment les observations passées, *P. validirostris* attaque préférentiellement le pin sylvestre dans les peuplements de pins alpins (A. Roques comm. pers.). De plus, les deux peuplements choisis apparaissent contrastés dans leur niveau de populations du charançon. Différents indices (i.e. le pourcentage d'arbres infestés, le taux d'infestation de chaque arbre ainsi que le nombre de charançons par cône) montrent que le site de Merdanel est plus touché par celui-ci. Roques et collaborateurs (1983) rapportaient déjà une forte présence de ce ravageur dans ce peuplement. Le nombre d'arbres où des dégâts de *L. occidentalis* ont été identifiés ne varie pas entre sites ni entre espèces, indiquant ainsi que les deux ravageurs peuvent être observés sur les mêmes arbres. De plus, le nombre d'arbres ainsi que le nombre de cônes présentant des dégâts de *L. occidentalis* au sein du peuplement de Merdanel ne varient pas entre *P. sylvestris* et *P. nigra*. La punaise ne s'est donc pas reportée davantage sur le pin noir, peu touché par *P. validirostris* sur ce site. Bien qu'aucune punaise (lors de la collecte des cônes) et aucun dégât n'aient été observés sur le seul arbre possédant un taux d'infestation de *P. validirostris* de 100%, ces deux espèces peuvent coexister au sein des mêmes peuplements et des mêmes arbres. En revanche, très peu de cônes (huit en combinant les deux sites d'études) présentaient des dégâts des deux espèces. Par conséquent, ces observations laissent présager d'un partage de la ressource " cônes ". Cependant, les cônes endommagés par le charançon montrent des degrés de destruction bien souvent importants, pouvant aller jusqu'à la totalité du cône, notamment pour les cônes infestés par plusieurs charançons, confirmant ainsi le potentiel destructeur de ce ravageur (Annala 1975; Roques 1976; 1983; 1988; Roques et al. 2004). Sur de tels cônes, d'éventuelles graines endommagées par la punaise ne sont donc pas/plus observables. On ne peut donc pas exclure que ces cônes aient été consommés par la punaise. De plus, l'expérience d'ensachage des cônes montrent qu'une consommation par *L. occidentalis* de cônes exploités par des charançons semble être possible, au moins dans les premières phases de développement du charançon. On peut, cependant, faire l'hypothèse qu'une fois les larves de *P. validirostris* bien installées dans le cône (larves de stades L3 et L4), celui-ci ne constituerait pas une source de nourriture optimale pour *L. occidentalis*. En effet, Roques (1976) a montré que la larve de *P. validirostris* de stade L3 se déplace au sein du cône, consommant toutes les graines sur son passage. De même, la larve de stade L4 continue à s'alimenter des graines et des tissus du cône réduisant parfois l'intérieur de celui-ci à l'état de sciure. Les travaux menés en laboratoire, dans le Nord-Ouest américain, sur les relations *L. occidentalis* – *M. spermotrophus* ont montré que les adultes de *L. occidentalis* ont refusé de s'alimenter sur des graines de *Pseudotsuga menziesii* lorsque plus de 40% des graines proposées étaient infestées par le chalcidien, *M. spermotrophus* (Blatt & Borden 1998). Les mêmes tendances ont été observées pour les larves de *L. occidentalis*. De plus, au cours de leurs expériences, aucune graine infestée par une larve de chalcidien n'a été attaquée lorsque celles-ci étaient proposées aux adultes. Par conséquent, *L. occidentalis* peut

discriminer entre des graines saines et des graines infestées. Une telle discrimination pourrait également être envisageable pour les cônes infestés par *P. validirostris*. Cette discrimination pourrait s'effectuer selon différentes modalités. Tout d'abord, elle pourrait faire intervenir des mécanismes spécifiques de reconnaissance des cônes-hôtes. En effet, l'assèchement des cônes provoqué par *P. validirostris* pourrait changer le rayonnement infra-rouge de ces cônes, or de récents travaux ont mis en évidence que la détection des cônes serait assurée par des récepteurs infra-rouge situés sur l'abdomen de la punaise (Takács et al. 2009). L'implication des volatils émis par le cône est soupçonnée dans le processus de sélection des cônes chez de nombreux insectes associés aux cônes. Des modifications qualitatives et quantitatives des substances volatiles émises par le cône se produisent après les attaques d'insectes (Turgeon et al. 2004), ces cônes pourraient donc ne plus être attractifs pour la punaise.

Cette étude apporte les premiers éléments de discussion sur les nouvelles interactions interspécifiques créées depuis l'arrivée de *L. occidentalis* en Europe. Cependant, divers biais liés à la méthode utilisée sont apparus. En effet, pour l'expérimentation d'ensachage de cônes, le nombre d'œufs déposés par les charançons n'a pas été déterminé. Ainsi, on ne peut donc pas savoir si le très faible nombre d'adultes obtenus en présence de punaises, est le résultat d'un mauvais développement embryonnaire et/ou d'une faible ponte des charançons. De plus, dans cette étude, seul un couple de *P. validirostris* par bonnette a été utilisé, ce qui peut expliquer le taux d'infestation relativement faible, même pour les cônes seulement offerts aux charançons. De telles conditions, mimant un faible niveau de compétition pour les punaises, ne semblent pas perturber *L. occidentalis*. Par conséquent, il paraît important de réitérer cette expérience avec des niveaux d'infestation supérieurs, en introduisant au départ plusieurs couples de charançons multipliant ainsi les chances d'obtenir des cônes fortement infestés. De même, une expérience complémentaire avec une période d'accès aux cônes pour les punaises, répartie sur toute la période de développement du charançon, apparaît nécessaire. En effet, les cônes ont été soumis aux punaises que très peu de temps après avoir été offerts aux charançons. Ainsi, l'éclosion des œufs de *P. validirostris* n'avait peut-être pas encore eu lieu, ou dans le cas contraire, les larves correspondaient très certainement à des larves de stade L1 qui ne causent que peu de dégâts au cône (Annala 1975; Roques 1976) permettant, par conséquent, l'exploitation du cône et la consommation de graines par *L. occidentalis*. Les larves de *L. occidentalis* possèdent les mêmes capacités que les adultes à discriminer entre des graines de *P. menziesii* infestées ou non par *M. spermatrophus*, refusant de s'alimenter sur les graines infestées (Blatt & Borden 1998). Seuls les adultes ont été utilisés dans notre étude. Pour avoir une vision globale des relations *P. validirostris* – *L. occidentalis*, il serait donc intéressant de tester les approches citées précédemment en soumettant des cônes infestés à des larves de *L. occidentalis* de différents stades.

La collecte de cônes réalisée en peuplements naturels n'a été effectuée que sur une seule année. Les effets de certaines espèces exotiques peuvent survenir qu'après une longue période (i.e. *Invasion debt* (Essl et al. 2011b)). Ainsi, un suivi des peuplements surveillés sur une période plus importante (cinq à dix ans) permettrait de confirmer ou non ces premiers résultats et permettrait de déterminer l'évolution des relations de ces deux ravageurs. De même, étendre ce suivi à d'autres peuplements apporterait de nouveaux éléments de discussion sur l'impact de *L. occidentalis* tant sur la régénération naturelle des peuplements de conifères que sur la faune conospermatophage présente en Europe.

Cette étude est la première à s'intéresser aux relations de *L. occidentalis* avec la faune entomologique européenne exploitant la même ressource alimentaire : le cône. Au vu des résultats, nous ne pouvons pas clairement statuer sur les relations entre *L. occidentalis* et *P. validirostris*. Il semble cependant qu'en conditions naturelles les deux espèces peuvent coexister dans le même peuplement, sur le même arbre-hôte et semblent se partager la ressource globale " cônes ". Au niveau du peuplement, l'impact de ces deux espèces apparaît donc additif et l'action combinée de ces deux ravageurs pourrait donc être un sérieux problème pour la régénération naturelle de certains peuplements.

Le développement larvaire de *P. validirostris* s'effectue exclusivement au sein d'un même cône, les larves ne pouvant survivre dans d'autres habitats (Roques 1983; Dormont & Roques 2001). Les larves ne peuvent donc pas se déplacer si les conditions viennent à changer et sont par conséquent, tributaires du site d'oviposition choisi par leur mère. De plus, les adultes de *P. validirostris* ne sont pas considérés comme de bons voiliers et ne se déplacent que sur de courtes distances depuis la plante où ils ont effectué leur cycle larvaire (Annala 1975). Ainsi, les populations sont donc confinées à des zones restreintes et ce même lorsque les conditions ne sont pas optimales notamment lors d'une faible production de cônes. Ces fluctuations annuelles de production de cônes peuvent alors conduire à une forte compétition qui, combinée à une colonisation précoce du peuplement par les punaises (avant ou pendant la période d'accouplement de *P. validirostris*), pourrait avoir un impact drastique sur les populations de charançons. Néanmoins, nous ne pouvons exclure que dans de telles situations, les populations de *L. occidentalis* qui apparaissent opportunistes et sans réelle préférence alimentaire (cette étude ; Lesieur et al. 2014), migreraient vers d'autres plantes hôtes ou vers un autre peuplement. En effet, contrairement au charançon, *L. occidentalis* possède de bonnes capacités de vol, les adultes peuvent en effet parcourir de grandes distances en un seul vol (cf. Partie II, Chapitre III). De plus, même si les capacités de dispersion naturelle des larves de *L. occidentalis* sont limitées (incapacité à voler), elles peuvent néanmoins se déplacer sur toute la plante hôte et donc rechercher un cône de meilleure qualité.

Chapitre III

Analyse des capacités de vol de *Leptoglossus occidentalis*

I. INTRODUCTION

De nombreux facteurs (e.g. l'absence d'ennemi naturel, les similarités éco-climatiques avec la zone d'origine ou encore certaines propriétés intrinsèques des populations envahissantes) sont impliqués dans le succès de l'établissement des espèces invasives et dans leur propagation ultérieure dans le nouveau milieu colonisé (Sakai et al. 2001; Liebhold & Tobin 2008). Parmi ces différents facteurs, les capacités de dispersion peuvent apparaître comme un facteur décisif. En effet, dans certains cas, une propagation rapide d'une population invasive réduit les probabilités d'extinction, en lui permettant par exemple d'accéder à de nouveaux milieux plus favorables (Travis & Dytham 2002; Wilson et al. 2009; Roques 2010b). Lors d'invasions d'insectes, l'examen du comportement de vol ainsi que l'évaluation des capacités de vol de l'espèce invasive sont importants pour comprendre la dynamique de l'invasion et la progression du front. De plus, l'estimation des capacités de dispersion est également nécessaire pour la mise en place d'un programme de gestion approprié.

L'invasion du continent européen par *Leptoglossus occidentalis* s'est produite de manière fulgurante. En effet, en l'espace d'une dizaine d'années, l'espèce a conquis la majorité du continent (Dusoulier et al. 2007; Fent & Kment 2011; Gapon 2012). Bien que différentes introductions, très probablement combinées à des translocations d'individus depuis des populations établies, aient eu lieu (cf. Partie I), la colonisation rapide du continent européen pourrait également s'expliquer par des capacités de vol importantes. Les adultes sont considérés comme de bon voiliers (Koerber 1963; Ridge-O'Connor 2001; Malumphy et al. 2008). Cependant, les informations sur le comportement et les capacités de vol de cette espèce sont très limitées. Ridge-O'Connor (2001) suggère que les adultes sont capables de parcourir plusieurs dizaines de mètres en un seul vol. En Colombie Britannique (i.e. zone d'origine), Blatt (1994) a estimé *via* des observations d'agrégation hivernale et sur la base de photographie aérienne que les punaises étaient capables de parcourir en vol des distances comprises entre 300 et 900 m. Néanmoins, les différentes observations insulaires rapportées dans la zone d'invasion européenne, en Corse (Dusoulier et al. 2007), sur de nombreuses îles croates (Kment 2008), sur l'île de Guernesey et plus généralement sur les îles anglo-normandes (Malumphy 2008) ou encore sur les îles Cies en Galice (pers. obs.) indiquent clairement des capacités de vol nettement supérieures à ces minima.

Différentes méthodes existent pour estimer les capacités de vol des insectes. Les techniques de capture-marquage-recapture (CMR) pouvant être combinées à des piégeages (utilisant ou non des phéromones) ont été largement utilisées pour déterminer les déplacements et les capacités de vol

de nombreuses espèces (Hagler & Jackson 2001). Cependant, elles ne paraissent pas adaptées à *L. occidentalis* (W. Strong comm. pers.), en particulier faute de méthode de piégeage efficace. Même si de récents travaux suggèrent l'utilisation des infra-rouges (Takács et al. 2009), aucun piège de ce type n'existe pour le moment. De même, si les piégeages phéromonaux sont communément utilisés pour le suivi des déplacements de certains insectes et pour estimer leurs aptitudes de vol, à ce jour aucun composé phéromonal attractif n'a été identifié chez *L. occidentalis*. La télédétection est également utilisée pour étudier les capacités de vol des insectes, néanmoins de telles méthodes ne sont pas toujours adaptées et restent encore financièrement peu abordables (Chapman et al. 2011). Nous avons choisi d'utiliser la méthode des manèges de vol, qui a permis d'effectuer des comparaisons quantitatives des capacités de vol pour de nombreuses espèces d'insectes (e.g. Coats et al. 1986; Schumacher et al. 1997; Tsunoda & Moriya 2008; Taylor et al. 2010; Lombaert et al. 2014). Bien que cette méthode place les insectes dans des conditions très artificielles (les insectes sont attachés à un bras tournant autour d'un axe et ne sont donc autorisés à voler que dans un cercle de circonférence connue), elle permet de recueillir de nombreuses informations sur le vol. En effet, un système d'enregistrement permet d'obtenir différents paramètres (e.g. nombre de tours effectués, durée, etc.) et ainsi estimer les capacités de vol de l'insecte.

Le cycle biologique de l'espèce est relativement bien connu, bien que celui-ci semble différer en fonction des zones géographiques (Koerber 1963; Bates et al. 2005; Bernardinelli 2006; Tamburini et al. 2012; Más et al. 2013). Néanmoins, aucune information n'est actuellement disponible sur le comportement de dispersion lié aux différentes phases du cycle. À l'automne, les adultes cherchent un site abrité pour hiverner (Koerber 1963; Blatt 1994; Tamburini et al. 2012) mais, on ignore si les punaises hivernent près de leurs sites de reproduction ou si elles sont capables d'engager des vols soutenus pour chercher un site d'hivernation. De plus, comme suggéré par Strong (2006), aucun élément ne permet pour le moment de déterminer si les adultes produits à l'automne vont ré-envahir le même peuplement de conifères au printemps suivant. Les adultes de *L. occidentalis* redeviennent actifs au printemps après une longue période de jeûne, les punaises ne s'alimentant pas durant l'hiver (elles subviendraient à leurs besoins grâce aux réserves lipidiques accumulées à l'automne). Les capacités de vol à la sortie de l'hivernation pourraient donc être affectées par cette longue période de jeûne. L'incidence de la reproduction sur les capacités de vol est également inconnue.

L'objectif principal de cette étude était d'examiner les capacités de vol de *L. occidentalis* via l'utilisation de manèges de vol. Par conséquent, nous avons effectué des tests de vol sur des insectes d'élevage tout au long de leur durée de vie. Nous avons pris en compte différents facteurs qui ont été signalés comme pouvant influencer le comportement de vol d'autres espèces d'hétéroptères tels que

l'âge, le sexe, la saison, l'accouplement ou encore pour les femelles la présence d'œufs (Ito 1980; Maharjan & Jung 2009; Nakamura et al. 1998; Stewart & Gaylor 1994). Des tests de vol ont également été réalisés sur des insectes capturés en conditions naturelles à différentes périodes caractéristiques du cycle biologique, afin de confronter les résultats à ceux obtenus avec des insectes d'élevage.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. Manège de vol et technique de fixation des insectes

Chaque manège se composait d'une tige en acier au sommet de laquelle était fixée une vis constituant l'axe vertical. Le bras horizontal correspondait lui à une tige de carbone de 64 cm portant un roulement à billes fixé en son centre, lequel était emmanché sur l'axe. Un petit morceau de mousse polyéthylène dans lequel était planté deux minuties, était collé à l'une des extrémités de la tige horizontale pour y fixer l'insecte. La mousse était placée de façon à ce qu'une révolution complète corresponde à un vol de deux mètres.

Les insectes étaient préparés de la manière suivante. Une attache constituée d'une fine bande de cartonnnette était collée sur le pronotum avec de la colle néoprène. L'autre extrémité de la bande comportait un morceau de mousse. Chaque attache pesait autour de 5 mg soit environ 5% du poids d'un individu. Au final, l'insecte était fixé au bras du manège de vol en insérant la mousse de l'attache sur les minuties du bras.

Afin de limiter la turbulence de l'air, chaque manège a été placé dans un compartiment en bois ouvert à l'avant, permettant ainsi d'accéder au manège de vol sans difficulté. Un système d'éclairage était installé dans chaque compartiment (baladeuse néon). Deux séries de huit manèges de vol, situés dans deux pièces à température ambiante ont été utilisés dans cette étude. Chaque pièce a été assignée à des insectes du même sexe, minimisant ainsi un éventuel effet phéromonal qui pourrait altérer le comportement de vol. Chaque rotation de la tige en carbone a été détectée *via* un couple émetteur-récepteur infra-rouge géré par un ordinateur équipé d'une carte d'acquisition (Arcom APCI-IB40) et d'un logiciel *ad hoc*. Ce dernier enregistrait le nombre de rotations et la durée de chaque rotation.

Les capacités de vol ont été estimées sur une période de 8 h. Les individus ont été pesés avant et après le test à l'aide d'une balance analytique (Mettler Toledo DeltaRange AG204).

II.2. Evaluation des capacités de vol tout au long de la vie (insectes d'élevage)

Les punaises utilisées dans cette expérience provenaient de l'élevage initié en septembre 2009 à partir d'individus collectés dans la région orléanaise. La colonie est maintenue en chambre climatique (20°C, 60% HR et 16:8 LD) dans des cages d'élevage (0,5 x 0,5 x 1 m) contenant un jeune plant de *Pseudotsuga menziesii* et des graines (*Pinus nigra* et *Pseudotsuga menziesii*). Des individus de stade L5 (dernier stade larvaire) ont été individualisés dans des cages d'élevage de (0,3 x 0,3 x 0,3 m) contenant des branches fraîches de *Pseudotsuga menziesii*, ainsi que des graines, et ont été suivis afin de déterminer la date de la mue imaginale. Ainsi, dans la suite de cette étude, l'âge sera exprimé en nombre de jours depuis la mue imaginale. Les adultes obtenus ont été sexés. Une fraction d'entre eux a été autorisée à s'accoupler en plaçant dans chaque cage deux individus du sexe opposé alors que l'autre fraction est restée vierge. Tous les trois jours, de nouvelles graines et une branche fraîche étaient fournies à chaque individu. Des inspections quotidiennes ont été réalisées afin de déterminer la durée de vie totale de l'insecte et pour les insectes autorisés à s'accoupler la date du premier accouplement. Ces insectes ayant une vie longue (plusieurs mois), nous avons choisi de tester les capacités de vol tous les 15 jours pour pouvoir en traiter un nombre suffisant. Des tests préliminaires ont permis de déterminer que le vol n'avait pas lieu chez les très jeunes adultes (i.e. moins de cinq jours après la mue imaginale) ou que la technique utilisée n'était pas adaptée pour de tels individus (la fixation de l'attache pouvant provoquer des blessures dues à la cuticule encore molle). Ainsi, le premier test a eu lieu cinq jours après la mue imaginale, le second le 15^e jour puis tous les 15 jours jusqu'à la mort de l'individu. 32 à 45 individus par modalité ont été testés, excepté pour les mâles accouplés où l'effectif testé est plus faible (seulement 15 individus).

II.3. Evaluation des capacités de vol en fonction de la saison (insectes capturés)

Afin d'évaluer l'effet de la saison sur les performances de vol des punaises, des individus ont été collectés dans la région orléanaise lors de la première quinzaine d'avril 2011 (i.e. période d'émergence des adultes de leur site d'hivernation), pendant la seconde quinzaine de mai 2011 (i.e. période d'accouplement) et enfin au cours de la seconde quinzaine de septembre 2011 (i.e. recherche des sites d'hivernation). Les individus ont été sexés puis préparés selon la méthode décrite précédemment, conservés dans les conditions de laboratoire et testés le lendemain. En fonction des modalités, 16 à 30 individus ont été utilisés et chaque individu n'a été testé qu'une seule fois.

II.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R (R Development Core Team 2008). Tous les tests ont été réalisés au seuil de 5%.

Pour chaque test de vol, le nombre de vols effectués par l'insecte et la distance totale parcourue (DP) ont été enregistrés. Nous avons ainsi calculé la distance totale parcourue cumulée sur l'ensemble des tests effectués sur un insecte (DC). Des analyses de corrélation ainsi que des analyses de variance ont été réalisées pour déterminer l'effet du sexe, de l'âge, de l'accouplement et du poids sur la DP, ainsi que sur la DC. Pour les données ne suivant pas une loi normale, des tests non paramétriques ont été utilisés. Les traits d'histoire de vie (l'âge du premier accouplement, la longévité et le nombre d'accouplements) ont également été analysés par des tests de corrélation et des analyses de variance.

Pour les insectes capturés, une analyse de variance à deux facteurs a été utilisée pour analyser l'effet du sexe et de la saison sur la DC, le nombre de vol et sur le poids avant le vol des individus. Pour les données ne suivant pas une loi normale, nous avons utilisé une analyse de variance permutacionnelle (adonis, package R vegan). Lorsque l'analyse montrait des différences significatives, les moyennes ont été séparées par des tests post-hoc.

III. RÉSULTATS

III.1. Evaluation des capacités de vol tout au long de la durée de vie (insectes d'élevage)

III.1.a. Âge d'accouplement et longévité

L'âge moyen du premier accouplement a été de 46,53 j pour les mâles et 45,19 j pour les femelles, aucun effet du sexe n'a été observé. La durée de vie des individus accouplés est plus courte que celle des individus non-accouplés ($F = 7,35$; $df = 3, 131$; $p < 0,001$). En effet, la longévité moyenne des individus accouplés était de 75,74 j ($\pm$ SE 3,46) contre 102,60 j ($\pm$ SE 4,05) pour les individus non accouplés. Aucun effet du sexe sur la longévité n'a été observé.

III.1.b. Distance totale parcourue cumulée (DC)

Aucun effet du sexe n'a été observé sur la DC ($H = 0,213$; $df = 1$; $p = 0,664$). L'accouplement en revanche diminue la DC chez les femelles ($H = 6,329$; $df = 1$; $p = 0,012$), mais n'a pas d'effet sur

les mâles ($H = 0,176$; $df = 1$; $p = 0,675$) (FIGURE 17). La DC entre individus est très variable, mais elle est fortement corrélée à la distance totale moyenne parcourue par test ($r^2 = 0,888$; $p < 0,001$). En d'autres termes, certains individus peuvent être qualifiés de bons voiliers et ce sur l'ensemble de leur vie.

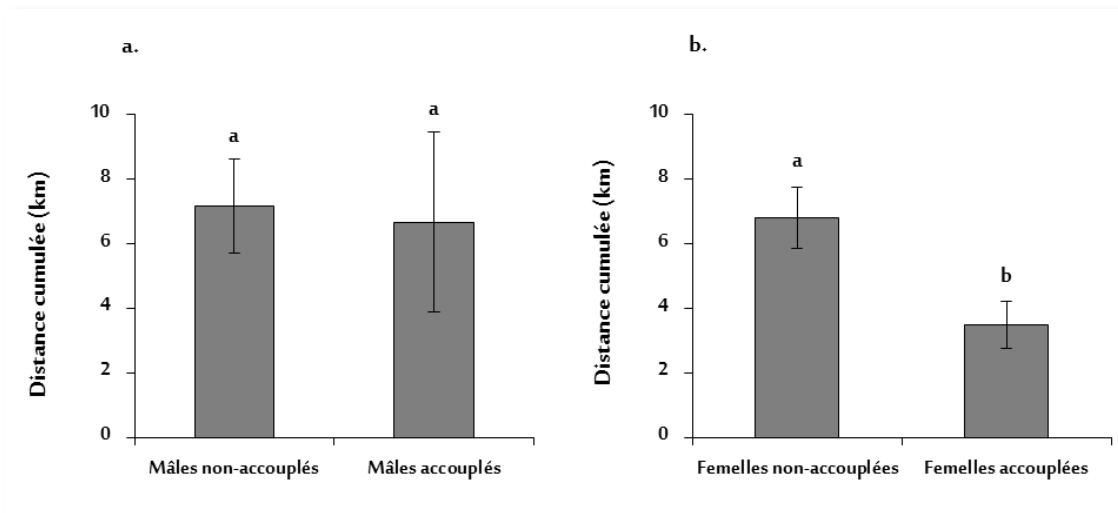


FIGURE 17. Distance totale parcourue cumulée (DC) sur l'ensemble des tests par des individus de *Leptoglossus occidentalis* testés en manèges de vol.

a. Mâles ; b. Femelles. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements après un test de Kruskal-Wallis.

III.1.c. Structure du vol

La structure du vol au sein de chaque test est la même quels que soient l'âge et le sexe considérés. Pour chaque test, la DP dépend essentiellement du vol le plus long qui représente 70 à 75% de la DP (corrélation linéaire : $r^2 = 0,911$; $p < 0,001$). Ce vol correspond dans la majorité des cas au premier vol initié par l'insecte. La DP au sein de chaque test n'est pas corrélée au nombre de vols. Concernant la distribution des longueurs de chaque vol, aucune différence majeure n'est observée en fonction de l'âge ou du sexe. Plus les vols sont longs, plus leur fréquence est faible, la décroissance étant continue depuis zéro (FIGURE 18). Aucune corrélation n'a été observée entre le poids avant le vol et la DP et ce quels que soient le test ou le sexe. En revanche, nous avons observé une corrélation positive entre la perte de poids et la DP, pour les deux sexes et quel que soit le test (par exemple pour les mâles à 45 j : $r^2 = 0,217$; $p < 0,001$).

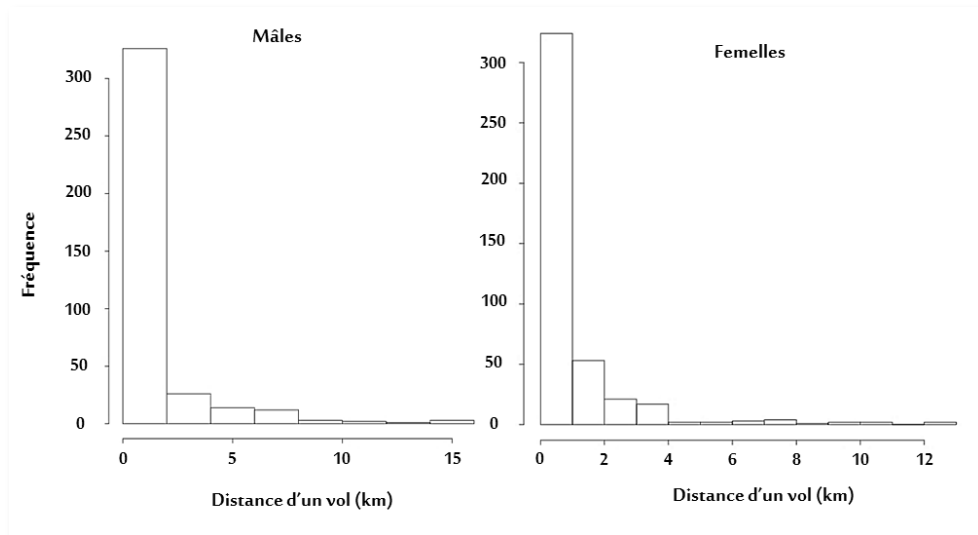


FIGURE 18. Distribution de la distance parcourue par vol chez les individus d'élevage de *Leptoglossus occidentalis* testés en manèges de vol.

III.1.d. Evolution de la distance totale parcourue par test (DP)

La DP maximale observée a été de 12,525 km pour les femelles (observation à 45 j) et de 15,444 km pour les mâles (observation à 15 j). Une variabilité très importante a été observée au sein de chaque test (FIGURE 19), mais également entre les différents tests, pouvant expliquer le peu de différences significatives observées.

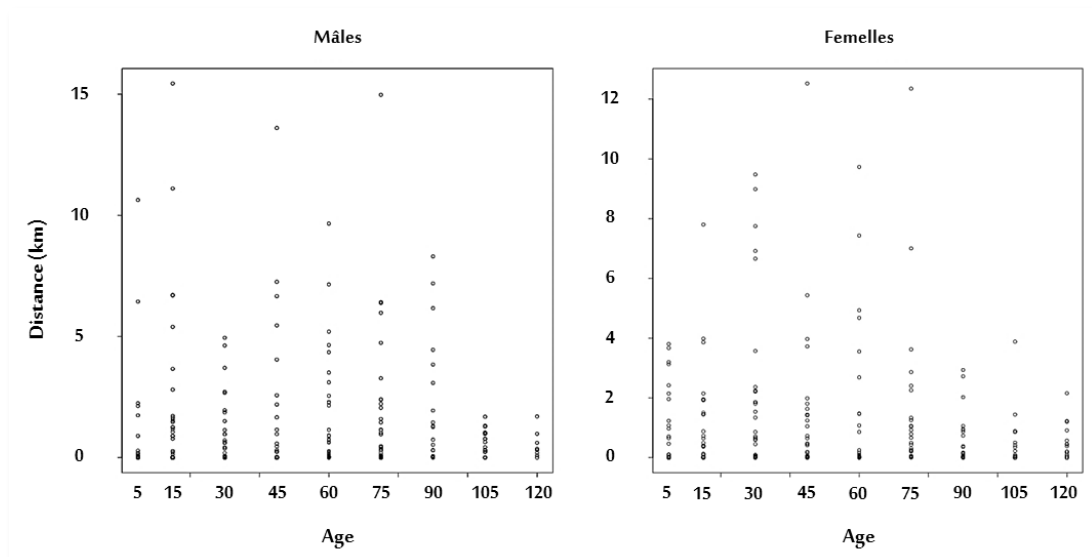


FIGURE 19. Evolution de la distance totale parcourue (DP) par test en fonction de l'âge des individus de *Leptoglossus occidentalis* testés en manèges de vol.

Pour les femelles, quel que soit l'âge, aucun effet de la gravidité sur la DP n'a été observé ($p > 0,05$ dans chaque cas). En revanche, l'âge semble influencer la DP, les individus les plus vieux ayant des DP plus faibles. En effet, une chute significative de la DP moyenne a été observée après 75 j pour les femelles ($H = 6,882$; $df = 1$; $p = 0,009$). La même tendance est observée pour les mâles après 90 j, mais la diminution n'est pas significative ($H = 0,09$; $df = 1$; $p = 0,764$).

III.2. Evaluation des capacités de vol en fonction de la saison (insectes capturés)

Comme pour les individus d'élevage testés, de grandes variations ont été observées concernant la DP.

Comme pour les insectes d'élevage, la DP dépend essentiellement d'un seul vol qui représente 70 à 85% de la DP (corrélation linéaire : $r^2 = 0,964$; $p < 0,001$). Ce vol correspond dans la majorité des cas au premier vol initié par l'insecte. L'analyse de variance permutational a révélé que la DC parcourue variait significativement avec la saison ($pseudoF = 3,97$; $df = 2$; $p = 0,003$). En revanche, malgré l'observation d'une tendance (les mâles parcourant des distances plus importantes) l'effet du sexe reste juste en deçà du seuil de significativité ($pseudoF = 2,40$; $df = 1$; $p = 0,062$) et il n'y a pas d'interaction entre ces deux facteurs ($pseudoF = 1,39$; $df = 2$; $p = 0,228$). Par conséquent, les données ont été regroupées pour les analyses de comparaisons par paires. La plus faible DP est observée au début de l'été avec une moyenne de 0,967 km ($\pm$ SE 0,242 km) alors que les DP au printemps et à l'automne sont plus élevées (moyennes respectives : 5,649 km ($\pm$ SE 1,032 km) et 6,068 km ($\pm$ SE 1,220 km)) et ne sont pas statistiquement différentes (FIGURE 20). La DP maximale observée a été de 30,183 km pour les femelles et 25,527 km pour les mâles.

Aucune différence n'a été observée entre les saisons concernant le nombre de vols engagés, cependant, le nombre de vols réalisés par les femelles est plus élevé que celui des mâles (3,58 vs 2,69) ($pseudoF = 4,68$; $df = 1$; $p = 0,015$).

Concernant le poids des individus testés, nous avons détecté une interaction des facteurs sexe et saison ($F = 6,99$; $df = 2$; $p = 0,002$). Pour chaque sexe, le poids le plus faible a été observé au printemps et le plus élevé à l'automne. En revanche, au début de l'été le poids des mâles reste stable (comparé au printemps) alors qu'une forte augmentation est observée chez les femelles (FIGURE 21). Comme pour les insectes d'élevage, aucun effet du poids n'a été détecté sur la DP.

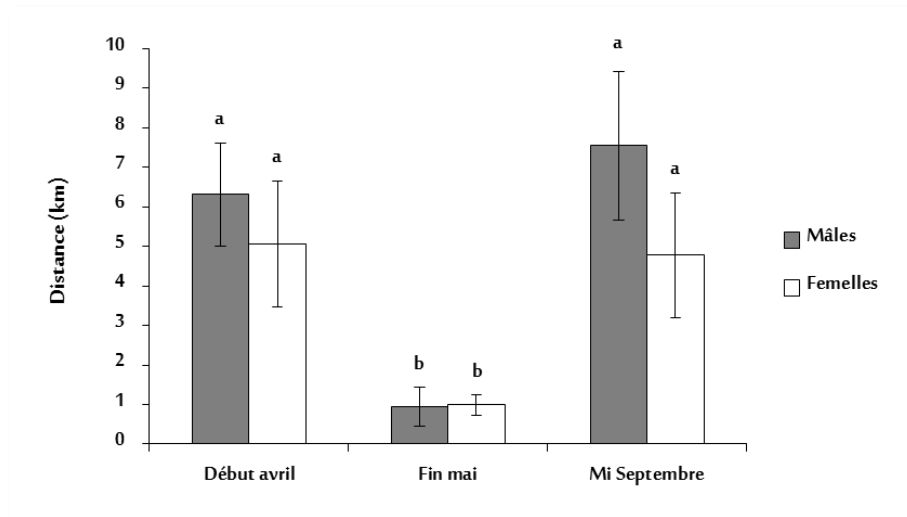


FIGURE 20. Evolution de la distance totale parcourue (DP) par des individus de *Leptoglossus occidentalis* en fonction de la saison.

Les individus correspondaient à des spécimens capturés en conditions naturelles. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements après une analyse de variance permutationalnelle suivi par des comparaisons par paires (tests de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni-Holm).

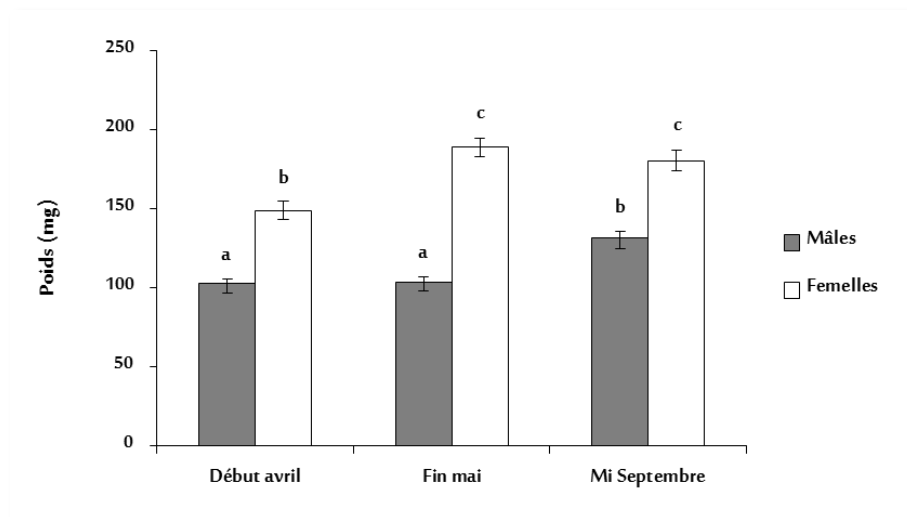


FIGURE 21. Évolution du poids des individus de *Leptoglossus occidentalis* en fonction de la saison.

Les individus correspondaient à des spécimens capturés en conditions naturelles et le poids représenté ici a été déterminé avant le vol. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements après une analyse de variance suivie par des comparaisons multiples (tests HSD de Tukey).

IV. DISCUSSION

Au cours de cette étude, nous avons examiné les capacités de vol de *Leptoglossus occidentalis* via l'utilisation de manèges de vol. Les différentes expérimentations révèlent que les capacités de vol de cet insecte sont supérieures aux minima précédemment estimés sur la base d'observations. Koerber (1963) décrivait les adultes comme de " bons voiliers " et capables de " s'envoler aisément lorsqu'ils étaient dérangés " sans pour autant donner des estimations. De même, les capacités de cette espèce à voler une distance de 60 m en un seul vol ou de couvrir des distances comprises entre 300 et 900 m sont ici vérifiées (Blatt 1994; Ridge-O'Connor 2001).

Une grande variabilité a été observée entre individus que ce soit pour les insectes d'élevage ou pour les insectes capturés en conditions naturelles. De même, le suivi de l'évolution des capacités de vol tout au long de la vie des insectes a montré de fortes variations entre les différents tests, rendant complexe l'analyse des résultats. Il est donc difficile de dégager une structure bien définie des capacités de vol sur l'ensemble de la période de vie de l'insecte. Néanmoins, il semblerait que l'accouplement diminue les capacités de vol notamment des femelles. La distance totale parcourue cumulée (DC) est plus faible pour les femelles accouplées, mais elle est fortement corrélée à la distance totale moyenne parcourue par test. Par conséquent, la diminution observée de la DC n'est pas seulement liée à la durée de vie plus courte des femelles accouplées mais aussi à une distance moyenne parcourue au sein de chaque test plus faible. De même, les individus les plus vieux effectueraient des vols de plus courtes distances. L'âge et l'accouplement sont deux facteurs communément observés comme influençant les capacités de vol des hétéroptères (Gu & Walter 1989; Stewart & Gaylor 1994; Maharjan & Jung 2009). Les capacités de vol des insectes collectés en conditions naturelles fin mai confirment les résultats obtenus lors de l'évaluation des capacités de vol des insectes d'élevage. En effet, comparées aux deux autres périodes testées, les capacités de vol de ces insectes sont apparues plus faibles. Cette période représente la période d'accouplement des punaises et, d'autre part, ces individus correspondaient à des individus âgés puisque produits à l'automne précédent. Si l'accouplement réduit les capacités de vol, il ne les supprime pas totalement. Certaines femelles accouplées ont été capables de parcourir des distances de plus de 4 km par test. De plus, nous n'avons pas détecté d'effet de la gravidité sur les performances de vol. D'autres espèces d'hétéroptères, notamment du genre *Lygus*, sont capables d'effectuer de longs vols bien que possédant un stock d'œufs important (Blackmer et al. 2004; Lu et al. 2007). De même, Ito (1980) n'a trouvé aucune relation entre les capacités de vol et le développement ovarien chez une autre espèce de Coreidae, *Cletus punctiger*. Les femelles de *L. occidentalis* déposent leurs œufs par séries, pouvant contenir une vingtaine d'œufs, pendant

plusieurs semaines (Koerber 1963; pers. obs). Ainsi garder des capacités de vol, même limitées, pourrait réduire la compétition pour la nourriture entre les larves, en pondant des œufs sur des arbres différents, mais aussi, répartir le risque en cas de ponte dans un site inadéquat.

Les punaises testées à l'automne, correspondant donc à de jeunes individus, ont montré de bonnes capacités de vol. Ces capacités peuvent ainsi permettre aux insectes de trouver un site d'hivernation approprié. Les aptitudes de vol des individus collectés début avril (i.e. sortie d'hivernation) étaient comparables à celles des punaises collectées à la fin septembre, suggérant ainsi que ces individus peuvent disperser de nouveau au printemps. De plus, l'existence de vols relativement longs pendant près de trois mois en laboratoire (sans hivernation) confirme la longueur de la période de vol. Les capacités à disperser à la sortie de l'hivernation permettent alors aux insectes de chercher des plantes hôtes appropriées pour leur alimentation et l'oviposition. Ainsi, *L. occidentalis* a les capacités de coloniser un peuplement de conifères proche de son site d'hivernation mais, si les conditions ne sont pas favorables dans celui-ci, les populations peuvent alors migrer vers d'autres peuplements. Dans ce sens, les essais de capture-marquage-recapture menés en Colombie Britannique sur des individus relâchés à l'automne dans des vergers à graines indiquent que la quasi-totalité des individus observés au printemps suivant ne correspondait pas aux individus relâchés (W. Strong, comm. pers). Ces résultats suggèrent un renouvellement de la population et vont dans le sens d'une forte dispersion de l'espèce, au moins à l'automne et/ou au printemps. Southwood (1962) a indiqué que des migrations se produisaient chez les insectes se nourrissant de graines, dont les plantes hôtes sont distribuées de manière hétérogène dans l'espace et dans le temps. *Leptoglossus occidentalis* est une espèce polyphage observée sur plus d'une quarantaine d'espèces (Koerber 1963; Lesieur et al. 2014). Cependant, la production de cônes chez les conifères varie largement d'une année sur l'autre et d'un peuplement à un autre (Krannitz & Duralia 2004; Philippe et al. 2006). Les capacités de vol des punaises pourraient donc être une adaptation aux fluctuations annuelles de l'abondance des ressources. Ce potentiel de dispersion important pourrait également, au moins en partie, expliquer les fluctuations de populations observées, permettant aux punaises de répondre aux changements d'habitats ou à d'autres types de changements biotiques ou abiotiques.

Si ces données apportent les premiers éléments de discussion sur le comportement et les capacités de vol de l'insecte, ces résultats doivent être interprétés avec prudence. En effet, les estimations des capacités de vol ont ici été réalisées avec des manèges de vol. Cette méthode place les insectes dans des conditions très artificielles (e.g. absence de choix) et donne une estimation des capacités de vol qui peuvent être différentes du vol réalisé *in natura* si, par exemple, l'insecte s'arrête dès qu'il trouve un site favorable. Ainsi ce procédé peut sous-estimer ou au contraire surestimer les

capacités de vol des individus testés. Il semble dans notre cas que les capacités de vol estimées avec les insectes d'élevage soient largement sous-estimées. Les DP des insectes d'élevage sont apparues nettement plus faibles que celles des insectes prélevés en conditions naturelles. A titre d'exemple, la distance maximale parcourue en un seul vol pour les insectes issus de l'élevage est d'environ 15,5 km pour les mâles et 12,5 km pour les femelles alors que les valeurs atteignent respectivement pour mâle et femelle collectés en conditions naturelles environ 21,5 km et 22,5 km. Concernant ces fortes disparités observées entre insectes d'élevage et insectes collectés en conditions naturelles, plusieurs hypothèses sont envisageables. Différents mécanismes peuvent conduire à des changements génétiques au sein des élevages en laboratoire tels que la dérive génétique, la consanguinité et la sélection (Hopper & Roush 1993) pouvant conduire à une sous-estimation ou une surestimation des capacités de vol. Nous ne pouvons donc pas exclure que de tels changements aient eu lieu. Il semble cependant plus probable que les conditions d'élevage ne favorisent pas le vol. Ainsi, le manque d'entraînement ou encore les conditions favorables offertes par les conditions d'élevage comme l'accès continu à la nourriture pourraient expliquer les différences observées entre les individus d'élevage et les spécimens collectés en conditions naturelles. La privation de nourriture chez la punaise *Nezara viridula* a incité les individus à effectuer des vols plus longs (Gu & Walter 1989). Par conséquent, il serait intéressant de tester les individus quotidiennement pour déterminer si une stimulation quotidienne améliore les performances mais également de tester si le manque de nourriture peut inciter le vol chez *L. occidentalis*. De même, les DC moyennes obtenues sont assez faibles (inférieures à 8 km). Cependant, elles ont été déterminées à partir d'individus testés seulement tous les 15 jours. Ces estimations peuvent ainsi être considérées comme les capacités de dispersion minimales. Des tests quotidiens permettraient donc d'avoir une vision plus précise des capacités de dispersion de *L. occidentalis*. De même, réitérer les tests sur des individus collectés en conditions naturelles en réalisant, là-aussi, des tests quotidiens sur une période définie, fournirait des informations sur les capacités réelles de dispersion. De même, nous n'avons pas considéré dans cette étude un possible comportement de vol nocturne comme rapporté chez d'autres espèces d'hétéroptères (Blackmer et al. 2004). De telles capacités de vol pourraient exister comme le souligne Malumphy et collaborateurs (2008). Il pourrait donc être intéressant de déterminer si une dispersion nocturne est réellement engagée et quelle est sa part dans la dispersion de cette espèce. Enfin, la méthode d'attache utilisée dans notre étude semblerait gêner l'accouplement, notamment des mâles, pouvant ainsi expliquer le faible effectif de mâles accouplés obtenu. Développer une nouvelle méthode d'attache permettrait d'obtenir un effectif plus important.

Si l'on regarde la distance moyenne parcourue par test (i.e. DC / nombre de test), les valeurs obtenues sont de l'ordre du kilomètre (plus faible pour les femelles vierges). On ignore pour le moment si les punaises sont capables d'effectuer de tels vols quotidiennement. Dans ce cas, les

adultes de *L. occidentalis*, capables de vivre plusieurs mois, seraient donc en mesure de parcourir des distances importantes, pouvant ainsi expliquer, en partie, la rapidité de l'invasion européenne. De plus, bien que la dispersion à courte distance soit importante dans la propagation d'une espèce invasive, la vitesse d'expansion dans de nouveaux habitats dépend souvent d'individus capables de disperser sur de longues distances. Ces événements, même rares, peuvent ainsi entraîner des propagules loin du site d'introduction (Travis & Dytham 2002; Liebhold & Tobin 2008). Certains individus testés dans notre étude ont montré d'importantes capacités de dispersion. Ces résultats semblent se vérifier *in natura*. Dans ce sens, de nombreuses punaises ont été capturées dans des pièges lumineux le long de la côte Sud de l'Angleterre en 2008. Différents auteurs ont fait l'hypothèse de vols actifs à travers la Manche (Malumphy et al. 2008; Reynolds et al. 2013). La distance minimale entre les côtes françaises et anglaises est d'environ 30 km. Au cours de nos expériences, seulement un individu a volé une telle distance. Cependant, nos expériences ont été réalisées sur une période de 8 h. Certains insectes ont volé de manière continue tout au long du test et ont été arrêtés à la fin de cette période, suggérant des capacités de vol plus importantes. En outre, le vent pourrait, dans certains cas, aider à couvrir de plus longues distances (Jeffries et al. 2013; Reynolds et al. 2013). Par conséquent, la combinaison de processus de dispersions à courte distance et à longue distance, appelée dispersion stratifiée, est un facteur clé dans la propagation, et plus particulièrement, la vitesse de propagation d'un invasif (Liebhold & Tobin 2008). Les fortes variations observées tant au niveau des insectes d'élevage que des insectes capturés suggèrent que *L. occidentalis* possède une dispersion de type stratifiée fournissant ainsi un élément supplémentaire pour comprendre la rapidité de son invasion en Europe.

Chapitre IV

Analyses préliminaires d'un facteur pouvant être impliqué
dans les fluctuations de populations

I. INTRODUCTION

L'augmentation des connaissances sur la biologie thermique s'est avérée particulièrement utile pour comprendre les fluctuations de populations d'insectes et prévoir d'éventuelles pullulations de ravageurs (Kingsolver 1989; Denlinger & Lee 2010). Les conditions hivernales (i.e. sévérité de l'hiver, variations temporelles et spatiales) exercent une influence considérable sur la dynamique des populations de certaines espèces (Leather et al. 1993). Les températures basses associées à l'hiver inhibent généralement les taux de croissance des populations d'insectes, *via* une réduction du développement, une inhibition de l'activité ou encore une mortalité due aux effets directs ou indirects du froid. Une forte mortalité hivernale entraînera une diminution des populations au printemps suivant. De plus, il est important pour les insectes que le stade de développement approprié à l'hivernation soit atteint précisément au bon moment de l'année pour maximiser leurs chances de survivre dans des conditions difficiles (Leather et al. 1993).

Depuis l'établissement en Europe de *Leptoglossus occidentalis*, des fluctuations du niveau des populations sont observées à différents endroits sur le continent (e.g. Nord de l'Italie, Sud-Ouest de la France, région orléanaise). Cette espèce est considérée comme univoltine en Amérique du Nord (Koerber 1963; Hedlin et al. 1980), alors que deux à trois générations ont lieu au Mexique (Cibrián Tovar et al. 1995). De récentes études ont montré la possibilité de plusieurs générations par an (jusqu'à trois) en Italie et en Espagne (Bernardinelli et al. 2006; Tamburini et al. 2012; Más et al. 2013). *Leptoglossus occidentalis* est connu pour hiverner sous la forme adulte (Koerber 1963; Strong 2006; Tamburini et al. 2012). Cependant, de nombreuses larves, de tous stades, ont été observées en octobre 2012 dans la région orléanaise ou plus récemment dans le Languedoc-Roussillon (octobre 2013). La présence à l'automne de différents stades larvaires a également été rapportée en Colombie Britannique (Bates et al. 2002) et en Italie (Tamburini et al. 2012). Les auteurs considèrent que cette génération n'est probablement pas achevée avant l'arrivée du froid. Cependant, la capacité à atteindre le stade hivernant est d'une importance vitale pour la survie hivernale des insectes, les individus n'ayant pas atteint ce stade sont généralement condamnés (Leather et al. 1993; Saulich & Musolin 2007; Musolin et al. 2010). Tamburini et collaborateurs (2012) ont donc fait l'hypothèse que les fluctuations de populations observées dans le Nord de l'Italie peuvent être, au moins en partie, expliquées par une inadéquation entre la présence de larves en automne et les mauvaises conditions climatiques associées à cette saison. Néanmoins, chez certaines espèces d'hétéroptères (e.g. *Ischnodemus sabuleti*, Lygaeidae) différents stades sont capables de passer l'hiver (Saulich & Musolin 2007). Bien que les exigences thermiques pour le développement larvaire aient été étudiées (Bernardinelli et al. 2006;

Tamburini et al. 2012), les capacités de survie automnales et/ou hivernales des larves de *L. occidentalis* restent inconnues.

Le site d'hivernation et, par conséquent, le choix de ce site sont d'une grande importance pour la survie des individus et plus généralement de la population au cours des mois d'hiver (Leather et al. 1993). A l'automne, les adultes se regroupent pour hiverner à l'abri dans des cavités d'arbres, des nids, mais aussi dans des structures créées par l'Homme telles que des empilements de bois, des hangars ou des habitations (Koerber 1963; Blatt 1994; Tamburini et al. 2012). Il semblerait cependant que ce comportement intrusif dans les constructions humaines corresponde plus à une opportunité plutôt qu'à une réelle nécessité. Si le comportement d'hivernation initié en automne a été observé à maintes reprises, aucune étude ne s'est intéressée à la survie hivernale ni à la résistance au froid des adultes. L'aire de distribution de *L. occidentalis* ne s'étend pas au-delà de l'isotherme correspondant à une température moyenne de -12°C en janvier avec une température absolue minimum de -46°C (Gapon 2012). De plus, la présence de cet insecte dans certaines zones peut s'expliquer par sa capacité à choisir des "micro-stations favorables", ce qui est typique d'autres insectes mobiles (Gapon 2012).

La survie hivernale pourrait avoir joué un rôle important dans la propagation rapide de *L. occidentalis* sur le continent européen (notamment dans les parties Nord et Centrale). Ce facteur mais aussi l'apparition d'une génération "tardive" pourraient également expliquer les fluctuations observées du niveau des populations depuis son arrivée sur le continent. A travers une série d'expérimentations, nous avons tenté de (i) caractériser la survie automnale/hivernale de *L. occidentalis* et déterminer si le comportement intrusif des adultes pouvait être bénéfique, et (ii) de déterminer si les larves étaient susceptibles de survivre aux conditions hivernales. Dans ce but, nous avons réalisé un suivi de mortalité hivernale, mais aussi estimé le point de surfusion pour les adultes et les larves. Le point de surfusion (Supercooling point, SCP) est défini comme la température à laquelle les tissus et fluides corporels gèlent (Zachariassen 1985) et est souvent utilisé dans les études de résistance au froid chez les insectes (Bale 2002; Denlinger & Lee 2010).

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. Supercooling Point (SCP)

Deux stades larvaires ont été testés, correspondant aux stades L3 et L5. Les larves

provenaient d'un élevage maintenu dans les conditions suivantes (20°C, 60% HR et 16:8 L:D) puis placées à 15°C pendant 24h et 10°C pendant 72h. Les adultes correspondaient à des adultes hivernants, collectés en octobre 2012 dans la région orléanaise et maintenus dans des conditions d'hivernation (i.e. températures < à 10°C et conditions de luminosité extérieure) dans un bâtiment faiblement chauffé jusqu'à la réalisation de l'expérimentation, c'est-à-dire janvier 2013.

Chaque individu a été installé dans un tube de cryogénie 4,5 ml (Corning) permettant une bonne diffusion du froid depuis l'environnement ambiant. Un morceau de polystyrène maintenait immobile l'insecte dans le tube et permettait le contact entre le corps de ce dernier et une sonde thermique (thermocouple T sheathed Kapton) connectée à un enregistreur de données. Les tubes ont ensuite été immergés par série de 12 dans le bain-marie d'un cryostat (Hubber PD 415) rempli d'un liquide antigel (éthylène glycol) à la température initiale de 10°C ($\pm$ 1°C). La température du bain a ensuite été abaissée à raison de 1°C/min jusqu'à atteindre le SCP des différents individus testés. La régulation de la vitesse de refroidissement a été automatiquement entraînée par un dispositif électronique programmable (thermo-régulateur, Hubber Unisat, plage de réglage: -35°C à 200°C) pour une bonne reproductibilité d'un essai à l'autre.

La température du corps de l'insecte atteinte avant la libération de la chaleur latente de cristallisation a été enregistrée pour chaque individu et chaque modalité comportait entre 25 et 33 individus (TABLEAU 4). A la fin de l'expérimentation, chaque insecte a été pesé par utilisation d'une balance analytique Mettler Toledo DeltaRange AG204.

II.2. Survie hivernale

Les adultes ont été collectés à la fin du mois d'octobre 2012 dans la région orléanaise puis sexés et repartis en groupe de 30-40 individus selon leurs sexes dans des cages d'élevage (0,5 x 0,5 x 1 m). Chaque cage contenait un jeune plant de *Pseudotsuga menziesii* et des graines de *Pinus nigra* et *Pseudotsuga menziesii* en mélange afin d'assurer la survie jusqu'à l'entrée en hibernation. Les cages ont ensuite été réparties selon deux modalités (i) hibernation dans un bâtiment non chauffé (mais maintenu hors-gel) ou (ii) hibernation dans des conditions extérieures (cages placées sous un abri grillagé ouvert sur l'extérieur). L'année précédente de nombreux individus avaient été observés cherchant à hiverner sous cet abri, nous avons donc considéré que ce site mimait un site d'hivernation dans des conditions extérieures. Cette expérience comprenait trois réplicats par sexe et par modalité. L'expérimentation a débuté le 14 novembre 2012 (en lien avec l'augmentation du nombre d'observations d'insectes cherchant un site d'hivernation). Un suivi de mortalité a ensuite été réalisé tous les 15 jours. La fin de l'expérience a été déterminée par une reprise d'activité constatée des insectes dans les cages, mais aussi par l'observation d'un grand

nombre d'individus actifs en conditions naturelles.

Les larves ont été collectées les 4 et 5 octobre 2012 dans la région orléanaise. Le stade de chaque individu a ensuite été déterminé. Des groupes de 10 à 17 individus pour chaque stade ont été formés puis placés dans une cage contenant un jeune plant *Pseudotsuga menziesii* et des graines de *Pinus nigra* et *Pseudotsuga menziesii*. La cage a ensuite été placée sous l'abri grillagé mimant ainsi les conditions extérieures. Un suivi de mortalité a alors été réalisé toutes les semaines. La fin de l'expérience a été déterminée par la mort du dernier individu.

Les insectes (adultes ou larves) étaient considérés morts lorsqu'ils étaient étendus au sol ou sur les branches de sapin de Douglas, immobiles, sans mouvement d'antennes et les pattes recroquevillées vers l'abdomen.

Les données climatiques (température et taux d'humidité) ont été obtenues *via* des enregistreurs climatiques Smart Button SL54TH (AOIP, France) placés au sein des cages et récupérées à l'aide du logiciel associé Temp IT4. La température et le taux d'humidité ont été enregistrés toutes les deux heures tout au long de l'expérience.

III.3. Analyses statistiques

Des tests de Shapiro-Wilk et des tests de Levene ont été réalisés pour tester respectivement la normalité et l'homoscédasticité des variables. Des tests *t* de Students ont été effectués pour comparer le SCP moyen des mâles et des femelles, ainsi que le SCP moyen des deux stades larvaires. Les relations entre le SCP et le poids de chaque individu pour chaque sexe et stade larvaire ont été testées en utilisant une analyse de corrélation selon la méthode de Pearson.

Des tests exacts de Fisher ont été utilisés pour comparer la survie hivernale des adultes en fin d'expérimentation entre les différents traitements.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Development Core Team 2008).

III. RÉSULTATS

III.1. Supercooling Point (SCP)

Le SCP moyen pour les femelles et les mâles hivernants étaient respectivement de $-12,0^{\circ}\text{C}$ et $-13,6^{\circ}\text{C}$ (TABLEAU 4). Cependant de grandes variations de SCP ont été observées aussi bien chez les mâles que chez les femelles ; les valeurs les plus faibles observées chez les femelles et chez les mâles

étaient très proches $-18,3^{\circ}\text{C}$ et $-18,2^{\circ}\text{C}$ (TABLEAU 4). Le SCP moyen entre mâles et femelles n'était significativement pas différent ($t = 1,738$, $df = 59,524$, $p = 0,087$). Pour les femelles, le SCP était positivement corrélé avec le poids de chaque individu (Pearson $r^2 = 0,472$, $p = 0,005$), et donc plus les femelles étaient lourdes plus leur SCP était haut. En revanche, aucune corrélation entre SCP et poids des mâles n'a été observée (Pearson $r^2 = -0,047$, $p = 0,804$).

Les valeurs de SCP moyen pour les larves de stades L3 et L5 se sont montrées relativement proches ($-11,5^{\circ}\text{C}$ et $-10,5^{\circ}\text{C}$ respectivement) et nous n'avons pas déterminé de différence significative ($t = -1,543$, $df = 48,375$, $p = 0,129$) (TABLEAU 4). Une relation négative entre SCP et poids des larves L5 a été observée (Pearson $r^2 = -0,482$, $p = 0,017$), le SCP des larves L5 est plus faible pour les larves les plus lourdes. Une telle corrélation n'a pas été observée chez les larves de stades L3 (Pearson $r^2 = 0,092$, $p = 0,627$).

TABLEAU 4. Comparaison du poids, des SCP moyens, minimaux et maximaux et corrélation entre SCP et poids pour différents stades physiologiques de *Leptoglossus occidentalis*.

Modalité	<i>n</i>	Poids (mg)	SCP (°C)			SCP x Poids	
			moy.	min.	max.	<i>r</i> ²	<i>p</i>
ADULTES							
Mâle	30	103,66	-13,6	-18,2	-6,1	-0,047	0,804
Femelle	33	150,81	-12,0	-18,3	-5,3	0,472	0,005
STADES LARVAIRES							
L3	30	16,28	-11,5	-14,6	-7,3	0,092	0,627
L5	25	84,02	-10,5	-15,6	-6,1	-0,482	0,017

Les adultes correspondaient à des individus hivernants maintenus dans des conditions d'hivernation jusqu'à la réalisation de l'expérimentation (cf. Matériels et Méthodes). Les larves sont issues d'un élevage initié au sein du laboratoire.

III.2. Survie hivernale

Excepté la première semaine au cours de laquelle l'inspection a révélé des larves actives (mouvements et alimentation), un comportement grégaire est apparu dès la chute des températures avec un arrêt de leur activité. Lors de la deuxième semaine d'expérimentation, le nombre de larves a drastiquement chuté avec une mortalité atteignant environ 50%. Cette dernière serait corrélée à l'observation d'une diminution significative de la température moyenne (de 15°C à 5°C) couplée à une augmentation d'humidité relative (FIGURE 22). Les jeunes larves (L1 et L2) ont été les plus touchées (respectivement 92% et 59% de mortalité). La mortalité a ensuite été progressive et fin novembre, 11 individus sur les 13 survivants (soit environ 85% des individus restants)

correspondaient à des larves de stades L4 ou L5. La mortalité a continué à augmenter pour atteindre quasiment 100% mi-décembre, où seul un individu (une larve L5) survivait. Le suivi s'est achevé le 30 janvier avec la mort du dernier individu.

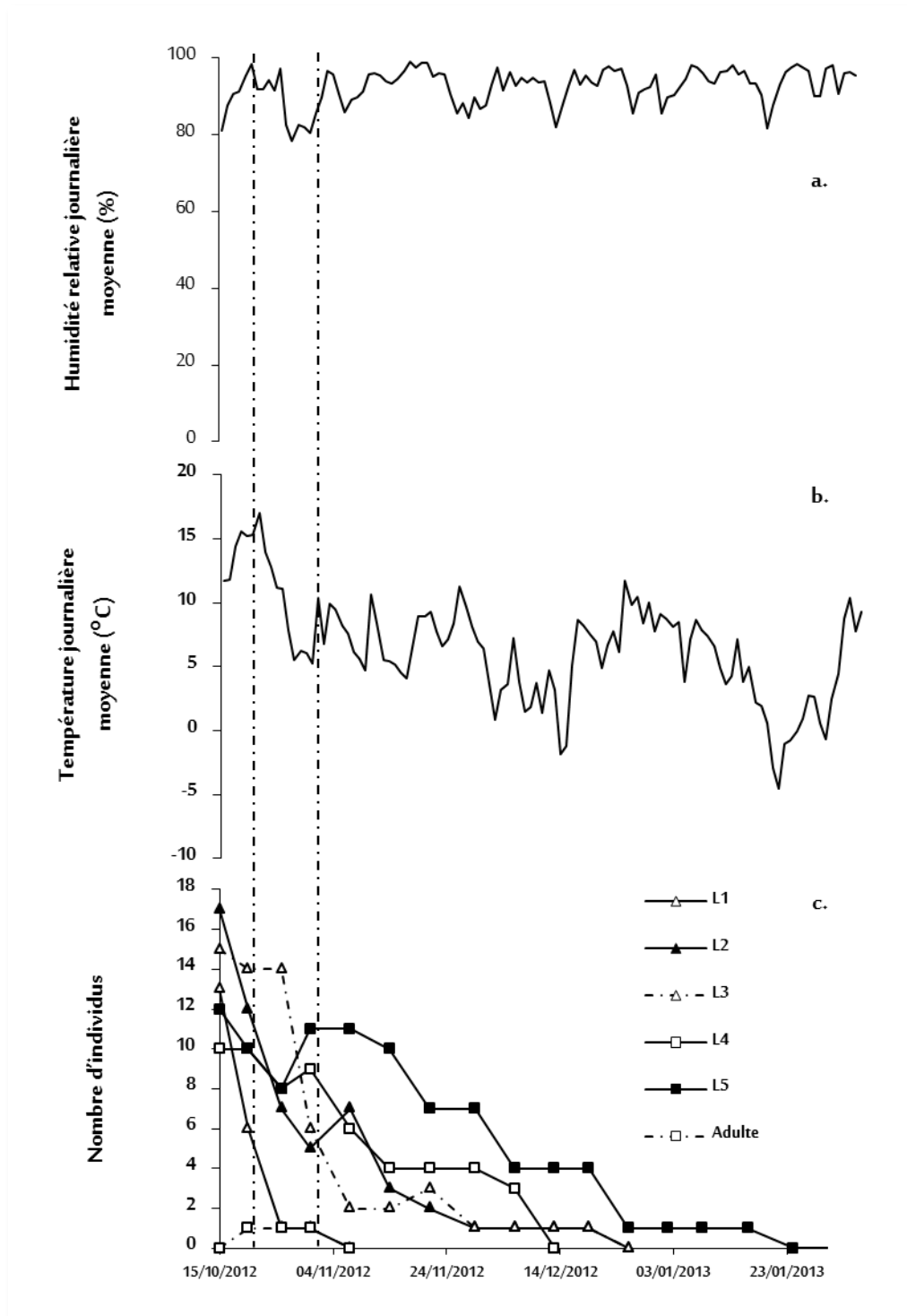


FIGURE 22. Evolution temporelle de la survie automnale des larves de *Leptoglossus occidentalis* placées dans des conditions extérieures en relation avec les conditions climatiques.

a. Humidité relative ; b. Température ; Nombre d'individus vivants pour chaque stade.

Lors du deuxième contrôle (fin novembre), les adultes des deux sexes avaient presque complètement cessé tout mouvement et se sont pour la plupart regroupés pour former des agrégats de 5 à environ 30 individus. Ces comportements ont été observés chez les individus hivernants dans les conditions extérieures, mais aussi dans les cages placées dans le bâtiment. Ces agrégats ont été maintenus tout au long de l'hiver, à l'exception de quelques observations sporadiques d'individus actifs. La reprise d'activité fut observée autour du 10 avril et fut légèrement plus précoce pour les insectes ayant hiverné dans le bâtiment. L'expérimentation a été stoppée le 15 avril.

La mortalité observée à la fin de l'expérience chez les femelles ayant hiverné dans le bâtiment était faible (~18%) et modérée pour les trois autres modalités (comprise entre 46 et 55%) (FIGURE 23 et 24). Les conditions d'hivernation n'ont pas influencé la mortalité hivernale chez les mâles (Test exact de Fisher, $p = 0,384$). Cependant, la mortalité hivernale des femelles qui ont hiverné au sein du bâtiment était significativement plus faible que celle des femelles placées en conditions extérieures (Test exact de Fisher, $p < 0,001$; FIGURE 23). De même, une différence significative a été observée entre mâles et femelles qui ont hiverné dans le bâtiment ; les femelles ayant un taux de mortalité plus faible (Test exact de Fisher, $p < 0,001$; FIGURE 23). Aucune différence n'est apparue entre mâles et femelles hivernant à l'extérieur (Test exact de Fisher, $p = 0,366$).

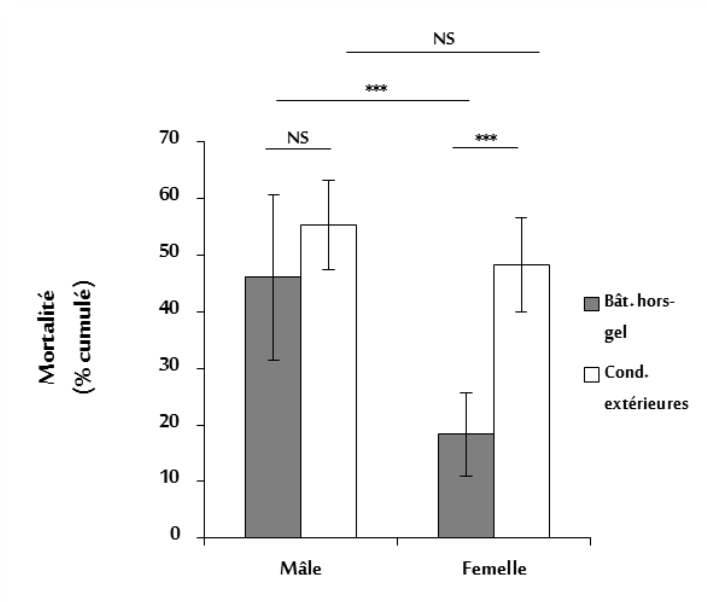


FIGURE 23. Mortalité hivernale des adultes de *Leptoglossus occidentalis* placés dans des conditions d'hivernation différentes.

La significativité des tests exacts de Fisher est indiquée au-dessus des barres correspondantes. (***) $p < 0,001$; ns, non significatif).

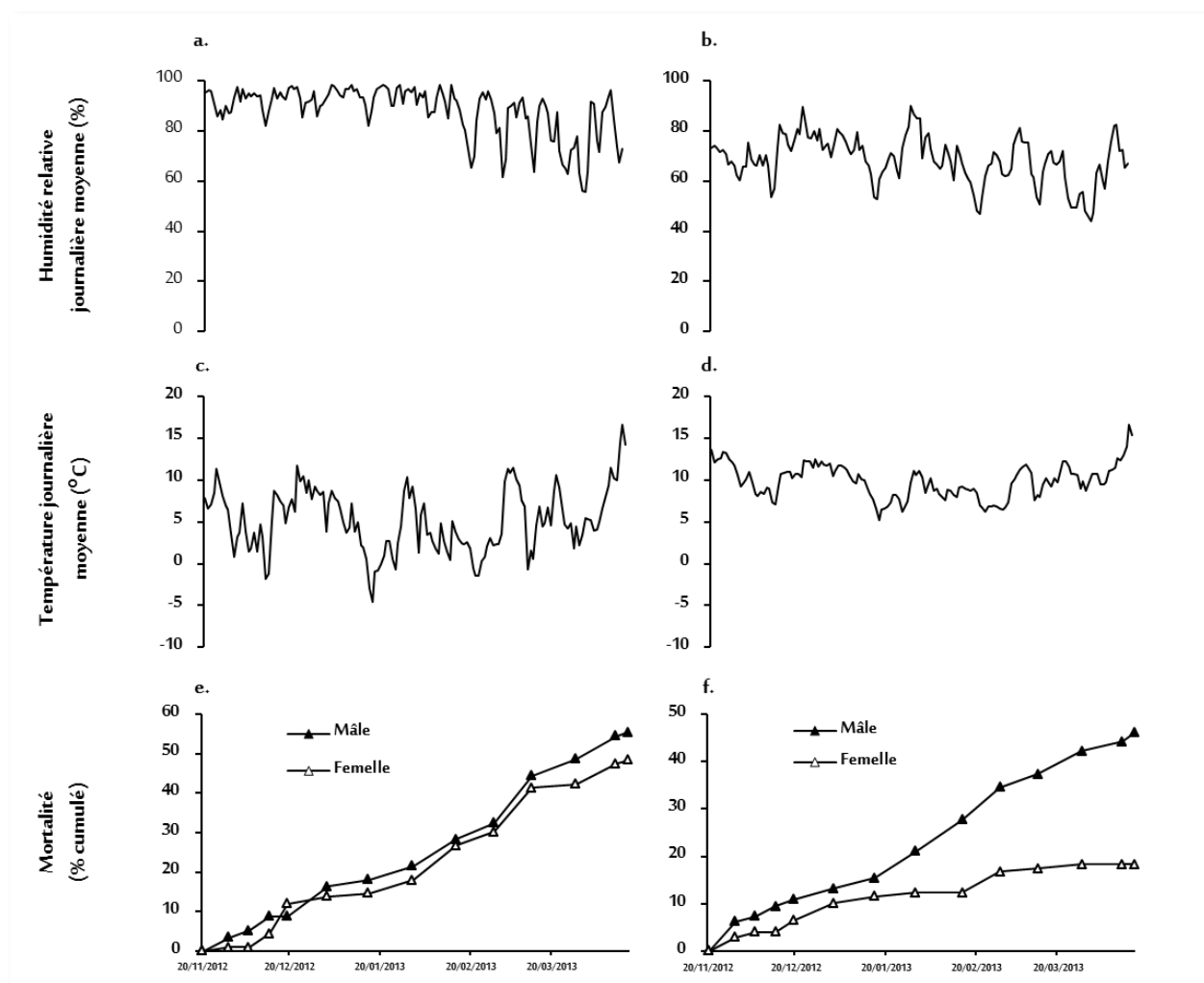


FIGURE 24. Evolution temporelle de la mortalité hivernale des adultes de *Leptoglossus occidentalis* placés dans des conditions d'hivernation différentes en relation avec les conditions climatiques.

(gauche: conditions extérieures; droite: bâtiment hors-gel). a-b Humidité relative; c-d Température; e-f Mortalité.

IV. DISCUSSION

Les SCP déterminés dans cette étude pour les adultes de *Leptoglossus occidentalis* sont dans la gamme des SCP observés chez d'autres espèces d'hétéroptères possédant une large distribution géographique (Elsey 1993; Slachta et al. 2002). Les espèces tolérantes au froid sont capables de survivre à des températures rencontrées au cours de l'hiver, mais montrent une mortalité à des températures supérieures à leur SCP due à une accumulation de froid (Bale 1993). La température la plus basse relevée au cours de notre expérimentation dans les conditions d'hivernation extérieures ($-4,57^{\circ}\text{C}$) était nettement supérieure aux SCP. Cependant, les taux de mortalité observés pour les mâles et les femelles étaient d'environ 50%. *Leptoglossus occidentalis* peut être par conséquent considérée comme une espèce tolérante au froid.

Au cours de cette étude, nous n'avons pas mis en avant une surmortalité hivernale pour les mâles hivernant dans des conditions extérieures. En revanche pour les femelles, les taux de mortalité ont différé avec un taux nettement supérieur pour les femelles qui ont passé l'hiver dans les conditions extérieures. De plus, mâles et femelles ayant hiverné dans le bâtiment maintenu hors-gel ont un taux de mortalité significativement différent (respectivement 55% et 18%). Cette différence est surprenante et inexpliquée. Takeda et collaborateurs (2010) ont montré qu'une élévation de $2,5^{\circ}\text{C}$ des températures hivernales provoquait une augmentation de la survie hivernale chez la punaise verte, *Nezara viridula*. Cependant, aucune différence n'a été observée entre mâles et femelles. Néanmoins, une telle observation a déjà été rapportée chez *Harmonia axyridis* (Labrie et al. 2008). Les mâles pourraient être sujets à une dessiccation ou à un épuisement des réserves plus rapide combiné à de plus faibles réserves lipidiques que chez les femelles, leur assurant donc une moins bonne réserve énergétique. Labrie et collaborateurs (2008) ont montré que chez *H. axyridis*, la teneur en lipides des individus hivernant à 10°C était plus faible que celle des individus qui hivernaient à -5°C , indiquant une plus grande utilisation des réserves d'énergie à 10°C . De plus, même si en général, les deux sexes pour la plupart des espèces d'hétéroptères étudiées ont les mêmes stratégies d'hivernation (Saulich & Musolin 2007), il n'est pas rare que les femelles et les mâles de la même espèce soient dans un état physiologique différent pour passer l'hiver (Takeda et al. 2010).

Il apparaît donc qu'une hivernation dans des conditions climatiques moins contraignantes a des conséquences importantes sur la propagation de l'espèce. Les structures artificielles liées à l'activité humaine peuvent représenter de telles conditions (températures supérieures, variations moins brutales) et donc améliorer la survie hivernale. Par conséquent, un plus grand nombre d'individus participera à la génération post-hivernation et permettra une meilleure croissance de la

population. En outre, au vu de la mortalité hivernale (environ 50%) et des SCPs moyens déterminés dans cette étude, le comportement intrusif de cette espèce facilite également sa colonisation et son établissement dans des zones climatiques moins favorables. En effet, l'espèce est présente dans le Nord-Est américain mais aussi en Europe Centrale ou encore en Scandinavie, zones géographiques où les températures hivernales peuvent descendre sous les $-18,3^{\circ}\text{C}$, correspondant au plus faible SCP observé. Comme suggéré par Gapon (2012), la capacité de cet insecte à choisir des micro-stations " mieux chauffées " permettrait sa présence dans des zones géographiques au climat moins favorable.

Les SCP moyens des larves de stades L3 et L5 se sont montrés relativement bas $-11,5^{\circ}\text{C}$ et $-10,5^{\circ}\text{C}$ respectivement. Ces résultats suggèrent donc que les larves sont surement capables de résister aux gels précoces qui peuvent avoir lieu en automne. Toutefois, les nymphes ont été incapables de survivre à l'hiver, même les stades les plus avancés (L4 et L5) et ce, même lorsque la nourriture était disponible, confirmant ainsi les observations passées (Koerber 1963; Tamburini et al. 2012). Une exposition de longue durée à des températures basses expliquerait la mortalité observée au cours de cette période. Les stades larvaires n'étant pas les stades appropriés pour l'hivernation, ces derniers n'ont probablement pas accumulé assez de réserves lipidiques pour survivre à une longue période de jeûne. De plus, lors de chaque inspection hebdomadaire, les larves étaient immobiles, souvent agrégées, mais aucune n'a été observée en train de s'alimenter. Chez les adultes, il s'avère qu'il existe une température minimale comprise entre 14 et 18°C pour l'alimentation post-hivernation et pour déclencher l'augmentation progressive de mobilité (Tamburini et al. 2012). Il semblerait que les larves de derniers stades (L4 et L5) soient moins sensibles au froid que les plus jeunes stades larvaires. Cependant, le taux de mortalité inférieur des stades larvaires les plus avancés pourrait être déterminé par une meilleure tolérance à la famine plutôt qu'à une tolérance au froid plus importante. Dans ce sens, une corrélation a été observée entre le SCP et le poids des larves de stade L5, ce qui pourrait traduire une plus grande accumulation de réserves lipidiques. En outre, les températures critiques et/ou sous-optimales sont défavorables à de nombreux processus physiologiques (Kingsolver 1989; Denlinger & Lee 2010), or la mue est un processus physiologique sensible. Certains individus, plus particulièrement les jeunes stades larvaires (L2 et L3), sont morts au cours de leur mue, incapables de s'extraire de leur exuvie. Cette incapacité à muer correctement lorsque les larves sont exposées à de faibles températures a déjà été observée chez d'autres espèces de punaises (Luz et al 1999; D. Musolin comm. pers.). Ce phénomène peut aussi s'expliquer par un taux d'humidité important ($> 80\%$) ou par une combinaison des deux facteurs (Luz et al. 1999).

La seule larve (larve de stade L5) ayant atteint le stade adulte (dès la première semaine d'expérimentation) n'a survécu que trois semaines. Tout comme les larves, les très jeunes adultes

pourraient donc être également sensibles au froid. L'apparition de générations tardives peut donc être considérée comme une allocation inefficace des ressources puisque ces générations sont vouées à l'échec. La production de telles générations pourraient donc avoir de lourdes répercussions sur les populations de *L. occidentalis*. Ces observations soulèvent donc une question importante : ce comportement de ponte tardive est-il homogène dans l'ensemble de la population ? Les premiers éléments à notre disposition semblent indiquer le contraire. En effet, les femelles collectées en octobre et utilisées dans cette expérience n'ont pas pondu. De même, des dissections ont été réalisées et aucun oocyte n'a été observé dans les ovarioles des femelles disséquées. Ces dernières semblaient donc en état de diapause reproductrice. La ponte d'une femelle de *L. occidentalis* s'effectue sur une période relativement longue jusqu'à plusieurs semaines (Bates et al. 2005; pers. obs.). Ainsi, au vu de ces premiers éléments (i.e. dissections et absence d'oviposition des femelles collectées en octobre), il semblerait donc que les adultes provenant des œufs pondus les plus précocement dans la saison joueraient un rôle important dans la mise en place d'une nouvelle génération. Ces individus doivent faire face à deux situations : un développement direct avec une oviposition peu de temps après la mue imaginale ou une diapause reproductrice. Il serait donc intéressant de déterminer quels éléments pourraient déclencher chez *L. occidentalis* l'entrée en diapause reproductrice. Divers facteurs tels que la photopériode, la température, le type et la qualité de la nourriture ou une combinaison de ces différents facteurs sont connus pour influencer la diapause chez les hétéroptères (Saulich & Musolin 2007).

Une des questions que soulève cette étude préliminaire est la suivante : quel sera l'impact du changement climatique sur les populations de *L. occidentalis*? L'élévation des températures en lien avec les changements climatiques (EEA 2012) permettrait un développement plus rapide des insectes, un allongement de la saison favorable et conduirait dans certains cas à la production d'une génération supplémentaire (Bale et al. 2002; Musolin 2007; Robinet & Roques 2010; Kiritani 2013). Selon les données de Bernardinelli et collaborateurs (2006), la somme des températures efficaces nécessaire pour le développement pré-imaginal de *L. occidentalis* est de 400 à 600 degrés-jours, avec un seuil inférieur de développement d'environ 14°C. Il est donc fort probable que même sous des latitudes au climat tempéré, les générations tardives observées à l'automne pourront être achevées et la survie hivernale améliorée. Même si la situation semble plus compliquée (e.g. effets délétères de températures chaudes en été (Musolin et al. 2010)), l'apparition de plusieurs générations successives pourrait amplifier l'impact déjà existant de cette espèce aussi bien sur les productions commerciales de graines que sur la régénération naturelle des peuplements de conifères (Bracalini et al. 2013; Lesieur et al. 2014).

Il serait présomptueux de tirer des conclusions générales sur la survie hivernale de cet insecte, ce travail correspondant plus à une première approche de l'évaluation de la survie hivernale de *L. occidentalis*. Pour confirmer ces résultats, il paraît important de reproduire ces expériences de suivi de mortalité hivernale sur plusieurs années consécutives, mais aussi sur des populations établies sur différents sites contrastés pour leurs climats et plus particulièrement pour leurs températures hivernales. En effet, cette expérimentation a été menée dans un climat océanique tempéré (températures hivernales modérées). De même, bien qu'observée en différents points d'Europe, cette mauvaise synchronie avec les conditions climatiques ne semble pas caractéristique des populations invasives européennes. Bates et collaborateurs (2002) reportaient déjà en Colombie Britannique (i.e. zone d'origine), l'apparition d'une seconde génération qu'ils qualifiaient de partielle et incomplète. Il serait néanmoins intéressant de pouvoir comparer ces données avec celles d'individus provenant de la zone Est américaine, source des différentes introductions européennes.

De plus, le SCP (des adultes) a été déterminé au cours du mois de janvier or celui-ci peut varier au cours du temps (Slachta et al. 2002; Berkvens et al. 2010; Coyle et al. 2011). De même, au-delà de la mortalité provoquée par congélation, et comme suggéré par les résultats concernant les suivis de mortalité (adultes et larves), un insecte peut aussi mourir à des températures au-dessus du SCP. Le SCP seul ne suffit pas à expliquer la mortalité hivernale (Bale 2002; Denlinger & Lee 2010; Berkvens et al. 2010; Coyle et al. 2011). Des expositions à long terme à de faibles températures peuvent également avoir des conséquences importantes sur la survie hivernale, on parle alors de réponse indirecte. Il serait donc intéressant de déterminer, *via* l'utilisation de chambres climatiques, la température létale la plus basse (i.e. la température à laquelle 50% des individus testés succombent) et la durée létale d'exposition au froid (i.e. le temps requis où 50% des individus testés succombent à une certaine température) (Bale 2002; Denlinger & Lee 2010).

Cette étude n'a porté que sur la survie de *L. occidentalis* au cours de l'hiver et la fitness des adultes survivants n'a pas été évaluée. De futures recherches devraient également porter sur l'effet des températures hivernales sur la capacité de reproduction des adultes émergents. Cependant, aucune différence de longévité, ni de fécondité n'a été observée entre des femelles de *N. viridula* ayant hiverné dans des conditions climatiques différentes (Takeda et al. 2010).

Discussion Générale et Perspectives

Ces dernières décennies représentent un tournant majeur concernant les mouvements d'espèces au sein du globe avec une augmentation sans précédent du rythme et de l'ampleur des invasions biologiques, en grande majorité d'origine accidentelle (Meyerson & Mooney 2007; Westphal et al. 2008; Hulme 2009; Roques 2010b). Dans ce contexte, comprendre les raisons du succès invasif est devenu un enjeu primordial de la Biologie de l'invasion. La réussite d'une invasion est souvent multifactorielle (e.g. facteurs anthropiques, écologiques, biologiques, génétiques) et fait également intervenir une grande part de stochasticité. Ce phénomène " d'invasions biologiques " peut être vu comme un phénomène " à deux vitesses ". En effet, certaines espèces introduites vont proliférer démographiquement et spatialement mais vont rester relativement cantonnées à la zone d'introduction tandis que d'autres vont au contraire se propager à une vitesse fulgurante dans leur nouveau milieu. Des traits favorisant le succès invasif chez les plantes ont été identifiés (Pyšek et al. 2014) mais l'analyse des principales espèces d'insectes phytophages introduites ces dernières années en Europe et ayant eues une progression très rapide au sein du continent, n'a pas permis de dégager de tels éléments.

Cette thèse a visé à apporter des éléments de réponse pour comprendre ce phénomène à partir du cas d'une espèce à forte capacité invasive, la punaise *Leptoglossus occidentalis*. Le succès invasif récent de ce ravageur des graines de conifères et la rapidité de sa propagation en Europe en faisaient un modèle d'étude particulièrement intéressant. En effet, cette espèce a colonisé le continent européen en une dizaine d'années seulement. Pour expliquer cette invasion fulgurante, j'avais fait les hypothèses suivantes :

- L'invasion européenne de ce ravageur correspond à des introductions multiples dans différentes parties du continent, non pas depuis la zone native, mais depuis la zone d'invasion primaire américaine (i.e. " tête de pont ")
- Des transports accidentels en Europe sur de longues distances, depuis les zones nouvellement colonisées, sont favorisés par le comportement grégaire et intrusif des adultes à l'automne
- Une polyphagie importante, une prise alimentaire ectophyte, contrairement à de nombreux insectes partageant les mêmes ressources cônes/graines, et des capacités de vol importantes permettent à *L. occidentalis* d'évoluer facilement dans son nouvel environnement et peuvent conférer à cet insecte le statut de compétiteur supérieur par rapport aux insectes natifs

Pour tester ces hypothèses, une approche pluridisciplinaire combinant des études de génétique des populations (de la zone présumée d'origine et des aires d'introduction) et des études de biologie et d'écologie des populations invasives a été menée. Cette approche a permis de vérifier et valider, au

moins en partie, les hypothèses de départ, en apportant des premières réponses concernant les raisons possibles du succès invasif de *L. occidentalis* et de son invasion fulgurante en Europe. Sur ce plan, les résultats qui découlent de cette étude viennent conforter des éléments d'analyse émergents dans la littérature concernant les invasions biologiques, en mettant notamment l'accent sur des phénomènes sous-estimés il y a encore peu de temps comme le scénario d'invasion *Bridgehead*. La discussion qui suit vise donc à préciser la contribution de mon travail à ces questions générales concernant les invasions d'insectes en particulier.

I. TÊTE DE PONT, INTRODUCTIONS MULTIPLES ET DISPERSION : AUTANT DE FACTEURS CLÉS PERMETTANT UNE INVASION FULGURANTE

I.1. *Bridgehead* : vers une nouvelle conception des invasions ?

L'invasion européenne de *Leptoglossus occidentalis* est un nouvel exemple d'invasion de type *Bridgehead* (tête de pont), au sens où une population invasive sert de source à de nouvelles invasions dans des sites géographiquement distants (Lombaert et al. 2010). Depuis que cette notion a été formalisée, ce phénomène a été identifié à de nombreuses reprises pour des cas concernant aussi bien des invasions animales que végétales (Ascunce et al. 2011; Boubou et al. 2012; Guiller et al. 2012; Keller et al. 2012; Rius et al. 2012). Il semble aussi s'appliquer rétrospectivement à d'autres invasions (e.g. Downie 2002; Miller et al. 2005). Ce scénario de tête de pont est fortement suspecté dans des introductions récentes comme celle en Juillet dernier du capricorne asiatique, *Anoplophora glabripennis* en Corse (www.fredon-corse.com/actions/capricorne_asiatique.htm). En effet, tout porte à penser que cette introduction ne provient pas d'Asie (i.e. zone d'origine de cette espèce) mais d'Italie où l'insecte a été introduit et les populations sont établies depuis 2007 (Haack et al. 2010). L'invasion en Europe d'autres insectes à propagation rapide comme celle de la drosophile, *Drosophila suzukii* (Mortelmans et al. 2012) ou celle de la cécidomyie du robinier, *Obolodiplosis robiniae* (Bálint et al. 2010) pourraient aussi procéder d'introductions de type *Bridgehead* combinées à des introductions indépendantes. Même si un grand nombre d'invasions résultent toujours de l'arrivée des espèces directement depuis leur aire native (e.g. l'arrivée en Amérique du Nord depuis l'Asie du bupreste, *Agrilus planipennis* (Keever et al. 2013)), la multiplication des exemples de scénario *Bridgehead* amène à réorienter la manière dont on perçoit les invasions biologiques. En effet, il ne s'agit plus de regarder exclusivement les zones d'origine comme sources des invasions, d'autant que le processus de mondialisation amène à la généralisation des échanges en tous sens entre les différentes régions du globe et avec de nombreux transits. Par conséquent, les voies et les vecteurs d'invasions doivent être considérés autrement, les espèces ne voyageant pas nécessairement

avec leur hôte de la région d'origine. De plus, si de nombreux insectes phytophages invasifs sont introduits *via* le commerce de leur plante hôte, l'exemple de *L. occidentalis* confirme qu'une partie l'est également comme passagers clandestins souvent associés au transport de diverses marchandises (Rabitsch 2010).

I.2. Et si une recombinaison génétique était le véritable scénario gagnant ?

Le scénario *Bridgehead* correspondrait au scénario le plus parcimonieux d'un point de vue évolutif ce qui peut expliquer la fréquence à laquelle on l'observe. En effet, en l'absence de population tête de pont, les changements évolutifs devront se produire au sein de chaque population envahissante alors que les changements n'auraient lieu qu'une seule fois (dans la population tête de pont) en cas d'invasion de type *Bridgehead* (Lombaert et al. 2010; Guillemaud et al. 2011). Des changements évolutifs ont pu survenir dans ces populations, leur conférant par exemple, des traits d'histoire de vie adaptés au nouvel environnement, même si l'on ne peut exclure que l'invasion procède de population pré-adaptées par des changements adaptatifs au sein de l'aire native, comme dans le cas de la petite fourmi de feu, *Wasmannia auropunctata* (Foucaud et al. 2013). Pour *L. occidentalis*, nous ne pouvons confirmer si de tels changements évolutifs ont eu lieu en Europe ou dans la zone d'invasion américaine. En effet, la population du Nord-Est américain, source des introductions européennes, n'a pour le moment été que très peu étudiée tant du point de vue génétique des populations que du point de vue des traits d'histoire de vie. Les seules informations dont nous disposons correspondent principalement à la documentation géographique de l'invasion (e.g. McPherson et al. 1990; Marshall 1991; Gall 1992; Ridge-O'Connor 2001). Cependant, certaines caractéristiques des populations européennes peuvent laisser supposer que des changements évolutifs auraient pu se produire, au moins dans la zone européenne. En effet, deux à trois générations sont observées en Europe, or, *L. occidentalis* est décrite dans sa zone d'origine comme univoltine même en Californie où le climat semble pourtant propice au développement de plusieurs générations (Koerber 1963). Il serait important de vérifier la fiabilité de ces données mais aussi d'obtenir le cycle biologique des populations de l'Est américain (pour le moment inconnu). Ainsi, la confrontation de ces données à celles existantes déjà en Europe permettrait de déterminer si et où des changements évolutifs ont pu se produire.

De même, une purge des allèles délétères, comme observée chez *H. axyridis* (Facon et al. 2011), diminuant ainsi la dépression de consanguinité, n'a peut-être eu lieu qu'une seule fois dans la population du Nord-Est américain, permettant à celle-ci de devenir la tête de pont de l'invasion européenne. Pour vérifier cette hypothèse, des expériences de génétique quantitative

devront être réalisées sur des populations natives et introduites (aussi bien en Europe qu'en Amérique de l'Est) afin de les comparer sous des niveaux différents de consanguinité. Cette expérience permettrait ainsi de tester si la performance des individus consanguins est supérieure dans les populations envahissantes. De même, l'invasion de *L. occidentalis* ne se limite plus au Nord-Est américain et à l'Europe. L'espèce est maintenant présente en Afrique du Nord (Ben Jamaa et al. 2013) mais aussi et surtout en Asie (Ishikawa & Kikuhara 2009; Zhu 2010; Ahn et al. 2013), ce qui offre la possibilité d'étudier de nouveaux scénarios d'invasion. Dans un premier temps, il apparaît nécessaire d'identifier la zone source de ces nouvelles populations invasives. Les individus à l'origine des populations envahissantes observées en Chine, Corée du Sud et Japon peuvent provenir des trois grands foyers actuels. S'il apparaît probable que ces fondateurs proviennent de la zone d'origine, c'est-à-dire l'Ouest américain (développement récent des voies économiques maritimes entre l'Asie et la Californie (Los Angeles) et l'État de Washington (Seattle) (Rodrigue et al. 2013)) aucun scénario ne peut pour le moment être exclu.

La multiplicité des introductions offre des situations complexes pouvant être favorables à la propagation rapide dans de nouveaux milieux. En effet, une fois établies, ces différentes populations sont autant de sources potentielles pour de futures invasions, en d'autres termes ces populations sont autant de populations " tête de pont " hypothétiques. De plus, si la zone envahie correspond à un carrefour commercial ou plus généralement une zone importante d'échanges fortement connectée à d'autres régions, la probabilité de donner lieu à des invasions ultérieures sera alors d'autant plus grande (Floerl et al. 2009). De même, plus une espèce est associée aux activités humaines plus elle aura de chance d'être exportée (Hulme 2009; Rabitsch 2010). L'invasion européenne de *L. occidentalis* confirme pleinement ces hypothèses. De nombreuses observations de ce ravageur ont été faites dans des zones portuaires à forte activité commerciale comme, par exemple, dans la région de Barcelone ou encore celle de Valence. A ce titre, la présence de *L. occidentalis* en Espagne semble procéder de différentes introductions de populations potentiellement différenciées. La mise en contact de ces populations pourrait donc aboutir à de nouvelles recombinaisons génétiques. En effet, des hybridations intra-spécifiques entre individus provenant de populations différenciées peuvent conduire, dans certains cas, à l'apparition de nouvelles combinaisons génétiques avantageuses d'un point de vue sélectif pouvant se traduire, par exemple, par une augmentation de la fitness (Turgeon et al. 2011). Néanmoins l'effet inverse peut également être observé (dépression hybride). La mise en contact de différentes populations établies ainsi que la vitesse de propagation dans le nouveau milieu sont également dépendantes des capacités de dispersion (naturelle ou par action de l'Homme).

I.3. Une forte capacité de dispersion est-elle nécessairement un facteur facilitateur ?

Il est indéniable que de fortes capacités de dispersion vont influencer la vitesse de propagation d'un invasif une fois les populations établies, dès lors qu'aucune barrière abiotique (e.g. climat) n'empêche l'expansion. Les données concernant les capacités de dispersion naturelles de nombreuses espèces exotiques sont souvent inconnues. Cependant, les aptitudes de vol de l'agrile du frêne, *Agrilus planipennis*, notamment des femelles accouplées, favoriseraient la propagation de cet insecte en Amérique du Nord (Taylor et al. 2011). De même, bien que les capacités de vol soient pour le moment ignorées, *Drosophila suzukii* est considérée comme un bon voilier ce qui pourrait en partie expliquer sa propagation très rapide en Europe ainsi que dans l'Ouest américain (DAFFB 2013). Notre étude montre que les capacités de vol de certains individus de *L. occidentalis* peuvent être importantes. La vitesse d'expansion dans de nouveaux habitats dépend souvent d'individus capables de disperser sur de longues distances. Ces événements, même rares, peuvent ainsi entraîner des propagules loin du site d'introduction (Travis & Dytham 2002; Liebhold & Tobin 2008). De tels événements peuvent cependant favoriser les effets Allee pouvant alors influencer la démographie et la diversité des populations colonisatrices (Roques et al. 2012). Par conséquent, la combinaison de processus de dispersions à courte distance et à longue distance, appelée dispersion stratifiée, est un facteur clé dans la propagation, et plus particulièrement, la vitesse de propagation d'un invasif. La dispersion longue distance est souvent due à l'action de l'Homme. Ces transports soulignent donc une nouvelle fois l'importance du scénario *Bridgehead*. Concernant *L. occidentalis*, j'ai observé au cours de ma thèse, des agrégations hivernales comptant plusieurs dizaines d'individus sous les toits de ruches Dadant (i.e. modèle de ruches le plus utilisé en France). Cet exemple illustre parfaitement les translocations possibles d'individus (et même de groupes d'individus pouvant être importants) sur de longues distances depuis par exemple des populations établies vers des zones non encore colonisées puisqu'après hibernation en un site, les ruches sont souvent transportées au printemps sur d'autres sites en fonction de la production de miel voulue.

Ainsi, des introductions multiples suivant un scénario " tête de pont " combinées à une forte dispersion (naturelle ou non) semblent correspondre à des facteurs clés permettant d'expliquer la rapidité de certaines invasions. Cependant d'autres facteurs, communément impliqués dans le succès invasif lors d'invasions plus " classiques " comme, par exemple, les conditions biotiques et abiotiques de la zone d'introduction, ont également un rôle majeur. Cette étude apporte aussi un nouvel exemple d'une espèce qui jusqu'à maintenant avait seulement été considérée dans sa zone d'origine pour ses dégâts économiques mais qui pourrait avoir un impact écologique (et économique) notable dans sa zone d'introduction.

II. SI L'ON CREUSE UN TANT SOIT PEU... COMBIEN D'ESPÈCES EXOTIQUES D'INSECTES AVEC UN IMPACT ÉCONOMIQUE ET ÉCOLOGIQUE ?

Vilà et collaborateurs (2010) ont estimé que 24,2 % des espèces d'arthropodes terrestres introduits en Europe ont occasionné des dégâts économiques contre 13,8 % des dégâts d'ordre écologique. Si à première vue ces résultats laissent suggérer que les impacts économiques sont plus fréquents, ils peuvent également signifier que ces derniers sont plus facilement détectables. De même, ces résultats peuvent traduire une étude plus fréquente du risque économique de certaines invasions car touchant directement l'Économie et donc, un point crucial de notre société. En effet, l'impact des invasions biologiques et plus particulièrement l'impact des insectes invasif, a le plus souvent été considéré sous l'aspect économique, et les impacts écologiques de ces introductions ont été peu étudiés, notamment en Europe (Kenis et al. 2009). Cependant, plus les recherches progressent, plus on remarque que même des espèces pouvant être considérées comme anodines ou inoffensives dans leurs zones d'origine peuvent avoir un impact écologique non négligeable dans la zone d'introduction *via* des perturbations des processus écosystémiques. Le cas des chalcidiens des graines du genre *Megastigmus* illustre parfaitement ce phénomène (i.e. déplacement compétitif et diminution du potentiel de régénération) (Auger-Rozenberg & Roques 2012). Les résultats de ce travail de thèse vont également dans ce sens et apportent un nouvel exemple du risque que peuvent représenter certaines espèces exotiques dans leur zone d'introduction tant sur le plan économique qu'écologique. *Leptoglossus occidentalis* n'a pour le moment été considérée dans sa zone d'origine que pour ses effets sur la production de graines en vergers et donc seul l'aspect économique a été pris en compte. De plus, aucune étude ne s'est intéressée aux éventuels effets économiques ou écologiques de cette espèce dans sa zone d'introduction américaine. Cet exemple illustre également le manque flagrant de connaissances sur la biologie et l'écologie de nombreuses espèces invasives. En outre, Essl et collaborateurs (2011b) ont montré que beaucoup d'espèces qui posent problème actuellement ne correspondent pas à des espèces introduites récemment mais il y a plusieurs décennies (*Invasion debt*). On peut donc se demander quelle sera l'influence sur l'économie mais aussi et surtout sur les processus écosystémiques des invasions récentes, notamment des invasions à grande échelle comme celle de *L. occidentalis*.

II.1. Impacts économiques

L'impact économique bien qu'existant dans les vergers à graines français suivis dans notre étude semble pour le moment raisonnable (toujours inférieur à 25 % de la production). Cependant,

on peut s'interroger sur l'évolution de ces dégâts dans le futur. Ainsi, le suivi des différentes parcelles surveillées dans cette étude se poursuit au sein de l'Unité URZF, en collaboration avec les gestionnaires des vergers à graines (ONF et Vilmorin). De plus, l'arrivée de ce ravageur depuis quatre à cinq ans dans les pays scandinaves pourrait avoir de lourdes répercussions économiques (Mjøs et al. 2010; Lindelöw & Bergsten 2012). En effet, les vergers à graines de ces différents pays sont largement impliqués dans les politiques de reforestation. Notre étude sur les relations interspécifiques de *L. occidentalis* avec le natif *Pissodes validirostris* ainsi que les études antérieures menées dans la zone d'origine de la punaise sur les interactions de cette dernière avec *Megastigmus spermotrophus* (Blatt & Borden 1998) laissent présager que les dégâts de ces ravageurs des graines sont additifs. Or, les vergers scandinaves sont déjà fortement touchés par de nombreux ravageurs, notamment *Dioryctria abietella* et *Cydia strobilella*, et les pertes peuvent aller jusqu'à plus de 90 % du rendement en graines attendu (O. Rosenberg, comm. pers.). *Leptoglossus occidentalis* pourrait donc accroître ces pertes déjà conséquentes.

La punaise envahissante étant suspectée d'être à l'origine d'importantes diminutions de la production de graines consommables de *Pinus pinea* en Italie (Roversi et al. 2011; Bracalini et al. 2013), sa présence actuelle dans toute la zone de production, notamment en Espagne et au Portugal, inquiète les producteurs locaux. Ainsi, Sousa & Naves (2011) estiment qu'une attention particulière devrait être accordée aux dégâts potentiels de *L. occidentalis* sur *P. pinea*. En effet, le Portugal est un des principaux producteurs européens de graines de *P. pinea* avec plus de 50 000 tonnes de cônes récoltées chaque année, correspondant à une valeur de plus de 20 millions d'euros. Cette essence n'a pas été étudiée au cours de cette thèse mais des projets sont actuellement en cours au Portugal et en Espagne afin d'estimer l'impact de ce ravageur des graines sur la production de graines commerciales de *P. pinea*.

II.2. Impacts écologiques

II.2.a. Sur la flore native

Au-delà de l'impact économique, l'impact de ce prédateur des graines pourrait se révéler important, notamment sur la flore native. Le suivi des peuplements mixtes de pins des Alpes montrent que les dégâts, bien que variables en fonction des années, peuvent diminuer drastiquement le potentiel de graines pouvant participer à la régénération. De plus, les capacités de germination des graines endommagées par l'insecte sont fortement réduites même lorsque le dégât est qualifié de léger (i.e. moins d'un tiers de la graine consommée). Ainsi, l'impact de la punaise pourrait accentuer

les problèmes de régénération déjà existants chez certaines plantes hôtes potentielles telles que genévriers et cèdres (A. Roques, comm. pers.). De même, une forte prédation par *L. occidentalis* dans des peuplements à haute valeur écologique (e.g. ressource génétique, biotope particulier, etc.) pourrait avoir des conséquences importantes sur les capacités de régénération de ces peuplements. A ce titre, au cours de l'été 2013, une population importante de punaises (plus de 50 larves et adultes en moyenne par branche fructifère) a été observée dans un peuplement de pins de Salzmann, *Pinus nigra salzmanni*, situé à Saint-Guilhem-le-Désert. Ce peuplement, considéré comme un peuplement relictuel, représente un enjeu européen majeur, et a été qualifié d'habitat prioritaire par la directive Habitats (D. 92/43 CEE du 21 mai 1992) : " Pinèdes (sub-) méditerranéennes de pins noirs endémiques : Pin de Salzmann " (Fady et al. 2010). Une estimation de la population a alors été réalisée sur 30 arbres choisis au hasard *via* une méthode standardisée de collecte par battage. Des cônes ont ensuite été prélevés sur ces mêmes arbres à la fin de la saison de maturation (i.e. fin septembre). Les résultats sont en cours d'analyse et permettront, d'une part d'estimer les dégâts de *L. occidentalis* dans ce peuplement d'intérêt, et d'autre part de relier l'estimation des dégâts à une densité d'individus, paramètre qui n'a pas été pris en compte dans nos différentes évaluations des dégâts tant en vergers à graines que dans les peuplements alpins.

Au cours de l'étude sur la compétition pour les ressources entre *Pissodes validirostris* et *L. occidentalis*, la population de *P. validirostris* est apparue importante sur *Pinus sylvestris* sur le site de Merdanel, où le taux d'infestation du charançon s'élevait à plus de 40% de la production de cônes. Sur ce même site, près de 20% des cônes collectés considérés comme sains (i.e. sans dégâts de ravageurs visibles depuis l'extérieur) présentaient des signes d'attaque de *L. occidentalis*, dégâts venant donc s'additionner à ceux déjà existants. Ainsi, au vu de nos résultats, notamment dans les peuplements alpins, l'impact de *L. occidentalis* sur le potentiel de régénération pourrait avoir une répercussion sur la dynamique des populations de conifères d'un point de vue quantitatif mais aussi qualitatif. En effet, en diminuant le nombre de graines saines et donc, le nombre de graines viables pouvant participer à la régénération, *L. occidentalis* limite drastiquement la diversité génétique mise à disposition pour le renouvellement des peuplements et, par conséquent, limite le potentiel adaptatif. Cette prédation correspond donc à une pression de sélection conséquente ; or, dans le contexte actuel de changements globaux (i.e. perturbations des milieux, changements climatiques, etc.), une diversité génétique importante pourrait permettre aux communautés végétales de répondre de manière appropriée à ces différents changements (Jump & Peñuelas 2005). Néanmoins, il apparaît essentiel de maintenir le suivi des dégâts dans les peuplements utilisés dans cette étude sur une période plus longue. Un tel suivi, dans des peuplements où les populations de *L. occidentalis* sont bien établies, permettrait de déterminer si les dégâts augmentent, diminuent ou se stabilisent dans le temps. La poursuite de cette étude permettrait également d'évaluer l'impact de ce ravageur à

long terme sur la régénération de ces peuplements et, par conséquent, de déterminer si *L. occidentalis* affecte réellement la régénération naturelle de ces peuplements. En effet, Harper (1977) cite l'exemple d'un coléoptère introduit en Nouvelle Zélande pour contrôler l'ajonc, *Ulex europaeus*. Bien que les coléoptères aient détruit 98 % des graines, le faible pourcentage de graines intactes était suffisant pour maintenir et permettre le renouvellement des populations d'ajonc mais aussi assurer la propagation de cette espèce.

L'impact négatif de cet insecte invasif sur la flore native pourrait également être accentué *via* la transmission de différents virus ou champignons pathogènes par *L. occidentalis*. Depuis l'arrivée de la punaise sur le continent européen, de nouvelles interactions se sont créées. Ainsi, la détection de spores du champignon pathogène et natif d'Europe, *Diplodia pinea* (*Sphaeropsis sapinea*) sur des punaises collectées en conditions naturelles a été démontrée en Italie (Luchi et al. 2012; Tamburini et al. 2012). Au vu de ces résultats, ce ravageur pourrait également véhiculer un autre pathogène hautement dommageable pour les conifères et plus précisément pour les pins : *Fusarium circinatum* ("Pitch Canker"). Ce pathogène probablement natif du Mexique et du Sud de la Floride a été introduit en différents points du continent (Wingfield et al. 2008). En Europe, il a été observé en Espagne notamment au Pays Basque et en Galice, en Italie, au Portugal (mais aussi en France où il semble toutefois éradiqué) (Wingfield et al. 2008; Bragança et al. 2009). Les fortes capacités de dispersion de *L. occidentalis*, c'est-à-dire les capacités de vol de l'insecte tout comme d'éventuelles translocations d'individus depuis des zones infestées par le pathogène pourraient être un moteur à la propagation de ce pathogène en Europe. Des essais sont actuellement menés en collaboration avec nos collègues italiens (N. Luchi et A. Santini, Istituto per la Protezione delle Piante, Florence) afin de déterminer si *L. occidentalis* peut être considéré comme vecteur du "Pitch Canker" (PCR en temps réel pour détecter l'ADN de champignons sur et/ou dans des individus de *L. occidentalis*).

II.2.b. Sur la faune native

Pour le moment, les observations réalisées en conditions naturelles suggèrent que *L. occidentalis* peut coexister dans des peuplements où sont présents les compétiteurs pour les ressources. Cependant, les expérimentations effectuées en conditions semi-contrôlées sur les relations *L. occidentalis* – *P. validirostris* tout comme les observations concernant les populations de *M. spermotrophus* réalisées dans les vergers à graines du Sud-Ouest de la France (Auger-Rozenberg & Roques 2012) laissent présager que *L. occidentalis* pourrait avoir un effet sur les populations d'insectes exploitant les mêmes ressources (i.e. déplacements de niches écologiques). De plus, au vu des résultats de Essl et collaborateurs (2011b), on ne peut donc pas exclure que les espèces introduites et considérées comme inoffensives aujourd'hui ne deviendront pas les espèces

problématiques de demain. C'est pourquoi, là encore, le suivi des relations de cet invasif avec les compétiteurs natifs ou exotiques sur une échelle de temps plus importante permettra de déterminer si l'impact potentiel de *L. occidentalis* est avéré et/ou si celui-ci disparaît ou au contraire s'accroît dans les prochaines années. En effet, bien qu'aucun pattern général n'ait été observé, les différents exemples d'invasions des espèces exotiques de chalcidiens des graines (sur sapins, roses sauvages ou encore cèdres) semblent indiquer que l'arrivée de ces compétiteurs a principalement provoqué le déplacement des espèces natives après une période de partage de la ressource (Auger-Rozenberg & Roques 2012).

Leptoglossus occidentalis offre un cas particulier de compétition pour les ressources alimentaires par rapport aux compétitions communément observées chez les insectes exploitant les graines et les cônes. Cette espèce se nourrit et se développe depuis l'extérieur du cône ce qui lui permet de ne pas être dépendant d'un seul cône ou d'une seule graine. De même, cette espèce polyphage peut aussi bien exploiter les cônes de nombreuses espèces du genre *Pinus* que ceux de *Larix spp.*, *Abies spp.* ou encore *Pseudotsuga menziesii*. En outre, les capacités de dispersion, surtout des adultes, même si les larves sont capables de se déplacer sur la plante hôte, permettent de rechercher les sites les plus favorables. Ainsi, ces différentes caractéristiques confèrent à ce ravageur un avantage par rapport aux espèces confinées à leur milieu de développement (i.e. le cône ou la graine) et strictement inféodées à une espèce hôte (voire à un genre), notamment en cas de conditions défavorables (e.g. faible production de cônes, forte présence de compétiteurs, conditions climatiques non optimales, etc.). Par conséquent, l'association d'une polyphagie, d'un développement ectophyte combinée à de fortes capacités de dispersion peuvent correspondre à des facteurs donnant un avantage à certains insectes invasifs, bien que de telles associations n'aient pas été considérées pour le moment dans la littérature.

De nombreuses inconnues persistent sur les caractéristiques biologiques et écologiques des populations envahissantes européennes. En effet, les effondrements spectaculaires des populations observées dans certaines zones géographiques depuis l'arrivée de la punaise en Europe restent pour le moment inexpliqués. Néanmoins, nos expériences de survie hivernale, bien que préliminaires, apportent des premiers éléments de réponses. L'apparition de générations tardives, incapables de résister aux conditions climatiques hivernales, pourraient expliquer ces fluctuations. Cette mauvaise synchronie avec l'arrivée des premiers froids pourrait cependant être atténuée par l'élévation des températures en lien avec les changements climatiques (EEA 2012). Toutefois, on ne peut pas exclure que ces effondrements soient dus à des migrations en masse, mais les facteurs à l'origine de ces hypothétiques migrations restent à déterminer.

III. CONCLUSION

Les invasions biologiques correspondent à un réel problème sociétal actuel. Les causes et conséquences de ces très nombreuses introductions sont multifactorielles comme vu tout au long de notre étude. Un effort conséquent a été réalisé pour identifier les traits favorisant l'invasion notamment au niveau des plantes, néanmoins les résultats restent mitigés (Pyšek et al. 2014). De même, il semble difficile de dégager des patterns généraux applicables à l'ensemble des espèces d'insectes invasifs, en d'autres termes, dresser le portrait robot d'un invasif apparaît impossible (Peacock & Worner 2008). Cependant, nos résultats viennent conforter des éléments d'analyse émergents (e. g. *Bridgehead*). De plus, chez les arthropodes, une forte pression de propagule ne serait pas, à elle seule, suffisante pour permettre l'établissement. En revanche, l'interaction des facteurs pression de propagule, présence d'hôtes appropriés et conditions climatiques favorables serait le moteur du succès invasif (Bacon et al 2014). Le cas de *L. occidentalis* confirme pleinement cette hypothèse et la combinaison "introductions multiples + polyphagie + plasticité écologique" permettra à l'insecte de trouver aisément de nouveaux écosystèmes vulnérables et susceptibles d'être envahis.

Références Bibliographiques

- Ahn SJ, Son D, Choo HY, Park CG (2013) The first record on *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) in Korea, a potential pest of the pinaceous tree species. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 16 (3):281–284
- Allen RC (1969) A revision of the genus *Leptoglossus* Guérin (Hemiptera: Coreidae). *Entomologia Americana*, 45:35–140
- Allendorf FW, Lundquist LL (2003) Introduction: Population biology, evolution, and control of invasive species. *Conservation Biology*, 17 (1):24–30
- Anderton LK, Jenkins MJ (2001) Cone entomofauna of whitebark pine and alpine larch (Pinaceae): potential impact of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) and a new record of *Strobilomyia macalpinei* (Diptera: Anthomyiidae). *Canadian Entomologist*, 133 (3):399–406
- Annala E (1975) The biology of *Pissodes validirostris* Gyll. (Col., Curculionidae) and its harmfulness, especially in Scots pine seed orchards. *Metsantutkimuslaitoksen Julkaisuja*, 85: 95p.
- Arca M (2012) Caractérisation génétique et étude comportementale d'une espèce envahissante en France: *Vespa velutina* Lepeletier (Hymenoptera, Vespidae). Thèse, Université Pierre et Marie Curie, Paris
- Ascunce MS, Yang CC, Oakey J, Calcaterra L, Wu WJ, Shih CJ, Goudet J, Ross KG, Shoemaker D (2011) Global Invasion History of the Fire Ant *Solenopsis invicta*. *Science*, 331 (6020):1066–1068
- Auger-Rozenberg MA, Boivin T, Magnoux E, Courtin C, Roques A, Kerdelhue C (2012) Inferences on population history of a seed chalcid wasp: invasion success despite a severe founder effect from an unexpected source population. *Molecular Ecology*, 21 (24):6086–6103
- Auger-Rozenberg MA, Roques A (2012) Seed wasp invasions promoted by unregulated seed trade affect vegetal and animal biodiversity. *Integrative Zoology*, 7 (3):228–246
- Aukema B, Bruers JM, Viskens GM (2009) Nieuwe en zeldzame Belgische wantsen III (Hemiptera: Heteroptera). *Bulletin van de Koninklijke Belgische Vereniging voor Entomologie*, 145:25–31
- Aukema B, Libeer R (2007) Eerste waarneming van *Leptoglossus occidentalis* in België (Heteroptera: Coreidae). *Bulletin van de Koninklijke Belgische Vereniging voor Entomologie*, 143:92–93
- Aukema JE, Leung B, Kovacs K, Chivers C, Britton KO, Englin J, Frankel SJ, Haight RG, Holmes TP, Liebhold AM, McCullough DG, Holle Bv (2011) Economic impacts of non-native forest insects in the continental United States. *PLoS ONE*, 9:e24587
- Aukema JE, McCullough DG, Von Holle B, Liebhold AM, Britton K, Frankel SJ (2010) Historical Accumulation of Nonindigenous Forest Pests in the Continental United States. *Bioscience*, 60 (11):886–897
- Bacon SJ, Aebi A, Calanca P, Bacher S (2014) Quarantine arthropod invasions in Europe: the role of climate, hosts and propagule pressure. *Diversity and Distributions*, 20:84–94
- Barta M (2010) Preliminary evaluation of insect-pathogenic *Hypocrea* against *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in laboratory conditions. *Folia Oecologica*, 37 (2):137–143
- Bale JS (1993) Classes of insect cold-hardiness. *Functional Ecology*, 7 (6):751–753

- Bale JS (2002) Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 357 (1423):849–861
- Bale JS, Masters GJ, Hodkinson ID, Awmack C, Bezemer TM, Brown VK, Butterfield J, Buse A, Coulson JC, Farrar J, Good JEG, Harrington R, Hartley S, Jones TH, Lindroth RL, Press MC, Symrnioudis I, Watt AD, Whittaker JB (2002) Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology* 8 (1):1–16
- Bálint J, Neacsu P, Balog A, Fail J, Véték G (2010) First record of the black locust gall midge, *Obolodiplosis robiniae* (Haldeman) (Diptera: Cecidomyiidae), in Romania. *North-Western Journal of Zoology*, 6 (2):319–322
- Bates SL, Borden JH (2004) Parasitoids of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) in British Columbia. *Journal of the Entomological Society of British Columbia*, 101:143–144
- Bates SL, Borden JH (2005) Life table for *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) and prediction of damage in lodgepole pine seed orchards. *Agricultural and Forest Entomology*, 7 (2):145–151
- Bates SL, Borden JH, Kermode AR, Bennett RG (2000) Impact of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera : Coreidae) on Douglas-fir seed production. *Journal of Economic Entomology*, 93 (5):1444–1451
- Bates SL, Lait CG, Borden JH, Kermode AR (2001) Effect of feeding by the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis*, on the major storage reserves of developing seeds and on seedling vigor of Douglas-fir. *Tree Physiology*, 21 (7):481–487
- Bates SL, Strong WB, Borden JH (2002) Abortion and seed set in lodgepole and western white pine conelets following feeding by *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera : Coreidae). *Environmental Entomology*, 31 (6):1023–1029
- Baufeld P,ENZIAN S (2005) Maize growing, maize high-risk areas and potential yield losses due to western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) damage. In: Vidal S, Kuhlmann U, Edwards CR (eds), selected European countries in Western corn rootworm. *Ecology and Management*, 14:285
- Beaumont MA (2010) Approximate Bayesian Computation in Evolution and Ecology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41: 379–406
- Beaumont MA, Zhang WY, Balding DJ (2002) Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, 162 (4):2025–2035
- Ben Jamaa ML, Mejri M, Naves P, Sousa E (2013) Detection of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera: Coreidae) in Tunisia. *African Entomology*, 21 (1):165–167
- Berkvens N, Bale JS, Berkvens D, Tirry L, Clercq Pd (2010) Cold tolerance of the harlequin ladybird *Harmonia axyridis* in Europe. *Journal of Insect Physiology* 56 (4):438–444
- Bermond G, Ciosi M, Lombaert E, Blin A, Boriani M, Furlan L, Toepfer S, Guillemaud T (2012) Secondary Contact and Admixture between Independently Invading Populations of the Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* in Europe. *PLoS ONE*, 7 (11): e50129
- Bernardinelli I, Rovato M, Zandigiacomo (2006) Life history and laboratory rearing of *Leptoglossus*

- occidentalis*. In: Forster B, Knizek M, Grodzki WE (eds), methodology of forest insect and disease survey in central Europe- Proceedings IUFRO working party 7.03.10, Gmunden, Austria, p.225
- Bernardinelli I, Zandigiacomo P (2001) *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera, Coreidae): a conifer seed bug recently found in northern Italy. Journal of Forest Science, 47 (Special Issue 2):56–58
- Bertorelle G, Benazzo A, Mona S (2010) ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. Molecular Ecology, 19 (13):2609–2625
- Binazzi F, Benassai D, Peverieri GS, Roversi PF (2013) Effects of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera Coreidae) egg age on the indigenous parasitoid *Ooencyrtus pityocampae* Mercet (Hymenoptera Encyrtidae). Redia-Giornale Di Zoologia, 96:79–84
- Blackburn TM, Pysek P, Bacher S, Carlton JT, Duncan RP, Jarosik V, Wilson JR, Richardson DM (2011) A proposed unified framework for biological invasions. Trends in Ecology & Evolution, 26 (7):333–339
- Blackmer JL, Naranjo SE, Williams LH (2004) Tethered and untethered flight by *Lygus hesperus* and *Lygus lineolaris* (Heteroptera : Miridae). Environmental Entomology, 33 (5):1389–1400
- Blatt SE (1994) An unusually large aggregation of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae), in a man-made structure. Journal of the Entomological Society of British Columbia, 91:71–72
- Blatt SE, Borden JH (1996) Evidence for a male-produced aggregation pheromone in the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae). The Canadian Entomologist, 128 (4):777–778
- Blatt SE, Borden JH (1998) Interactions between the Douglas-fir seed chalcid, *Megastigmus spermotrophus* (Hymenoptera: Torymidae), and the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera : Coreidae). The Canadian Entomologist, 130 (6):775–782
- Blossey B, Notzold R (1995) Evolution of increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. Journal of Ecology, 83 (5):887–889
- Bøhn T, Amundsen PA, Sparrow A (2008) Competitive exclusion after invasion? Biological Invasions, 10 (3):359–368
- Boissin E, Hurley B, Wingfield MJ, Vasaitis R, Stenlid J, Davis C, De Groot P, Ahumada R, Carnegie A, Goldarazena A, Klasmer P, Wermelinger B, Slippers B (2012) Retracing the routes of introduction of invasive species: the case of the *Sirex noctilio* woodwasp. Molecular Ecology, 21 (23):5728–5744
- Bosio G, Gerbaudo C, Piazza E (2010) *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu: an Outline Seven Years after the First Report in Piedmont (Italy). In: Bounous G, Beccaro GL (eds), I European Congress on Chestnut Castanea 2009, Cuneo, Torino, Italia. In: Acta Horticulturae, 866:341–348
- Boubou A, Migeon A, Roderick GK, Auger P, Cornuet JM, Magalhaes S, Navajas M (2012) Test of colonisation scenarios reveals complex invasion history of the red tomato spider mite *Tetranychus evansi*. PLoS ONE, 7 (4):e35601
- Bowler DE, Benton TG (2005) Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating

- individual behaviour to spatial dynamics. *Biological Reviews*, 80 (2):205–225
- Bracalini M, Benedettelli S, Croci F, Terreni P, Tiberi R, Panzavolta T (2013) Cone and seed pests of *Pinus pinea*: assessment and characterization of damage. *Journal of Economic Entomology*, 106 (1):229–234
- Bragança H, Diogo E, Moniz F, Amaro P (2009) First report of pitch canker on pines caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant Disease*, 93 (10):1079
- Brailovsky H, Barrera E (1998) A review of the Costa Rican species of *Leptoglossus* Guérin, with descriptions of two new species (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae: Coreinae: Anisoscelini). *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 50:167–184
- Brailovsky H, Barrera E (2004) Six new species of *Leptoglossus* Guérin (Hemiptera : Heteroptera : Coreidae : Coreinae : Anisoscelini). *Journal of the New York Entomological Society*, 112 (1):56–74
- Brockerhoff EG, Liebhold AM, Jactel H (2006) The ecology of forest insect invasions and advances in their management. *Canadian Journal of Forest Research*, 36 (2):263–268
- Brown JH, Sax DF (2004) An essay on some topics concerning invasive species. *Austral Ecology*, 29 (5):530–536
- Brown PMJ, Thomas CE, Lombaert E, Jeffries DL, Estoup A, Handley LJJ (2011) The global spread of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): distribution, dispersal and routes of invasion. *BioControl* 56 (4):623–641
- Cassey P, Blackburn TM, Duncan RP, Chown SL (2005) Concerning invasive species: Reply to Brown and Sax. *Austral Ecology*, 30 (4):475–480
- Chapman JW, Drake JA, Reynolds DR (2011) Recent insights from radar studies of insect flight. *Annual Review Entomology*, 56:337–356
- Chen YP, Pettis JS, Evans JD, Kramer M, Feldlaufer MF (2004) Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35 (4):441–448
- Cibrián Tovar D, Tulio Méndez Montiel J, Campos Bolaños R, Yates III HO, Flores Lara J (1995) *Insectos Forestales de México* [Forest Insects of Mexico]. vol 6. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México, 453 p.
- Ciosi M, Miller NJ, Kim KS, Giordano R, Estoup A, Guillemaud T (2008) Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity. *Molecular Ecology*, 17 (16):3614–3627
- Coats SA, Tollefson JJ, Mutchmor JA (1986) Study of migratory flight in the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 15 (3):620–625
- Cornell HV, Hawkins BA (1993) Accumulation of native parasitoid species on introduced herbivores: a comparison of hosts as natives and hosts as invaders. *The American Naturalist*, 141 (6):847–865
- Cornuet JM, Ravigne V, Estoup A (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0). *BMC Bioinformatics*, 11:401
- Coyle DR, Duman JG, Raffa KF (2011) Temporal and species variation in cold hardiness among invasive rhizophagous weevils (Coleoptera: Curculionidae) in a northern hardwood forest.

- Annals of the Entomological Society of America, 104 (1):59–67
- Csillery K, Blum MGB, Gaggiotti OE, Francois O (2010) Approximate Bayesian Computation (ABC) in practice. *Trends in Ecology & Evolution*, 25 (7):410–418
- Department of Agriculture, Fisheries and Forestry Biosecurity, DAFFB (2013) Final pest risk analysis report for *Drosophila suzukii*. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Canberra, 139 p.
- DAISIE (2009) Handbook of Alien Species in Europe. *Invading Nature*, 3. Springer, Science Dordrecht, 325 p.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000) Wildlife ecology – Emerging infectious diseases of wildlife – Threats to biodiversity and human health. *Science*, 287 (5452):443–449
- Davidson AD, Hewitt CL (2014) How often are invasion-induced ecological impacts missed? *Biological Invasions*, 16(5):1165–1173
- Denlinger DL, Lee RE (2010) Low temperature biology of insects. Cambridge University Press, Cambridge(UK), New York, 390 p.
- Derjanschi V (2010) Additional Data to the Fauna of Heteroptera (Insecta Hemiptera) from the Republic of Moldova. Muzeul Olteniei Craiova, Studii și Comunicări, Științele Naturii, 26 (1):109–110
- di Castri F (1989) History of Biological Invasions with Special Emphasis on the Old World. In: Drake JA, Mooney HA, di Castri F (eds), *Biological invasions: a global perspective*. SCOPE, John Wiley & Sons, New York, pp.1–30
- Dlugosch KM, Parker IM (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, 17 (1):431–449
- Dormont L, Roques A (2001) Why are seed cones of Swiss stone pine (*Pinus cembra*) not attacked by the specialized pine cone weevil, *Pissodes validirostris*? A case of host selection vs. host suitability. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 99 (2):157–163.
- Downie DA (2002) Locating the sources of an invasive pest, grape phylloxera, using a mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology*, 11 (10):2013–2026
- Dusoulier F, Lupoli R, Aberlenc HP, Streito JC (2007) L'invasion orientale de *Leptoglossus occidentalis* en France: bilan de son extension biogéographique en 2007 (Hemiptera Coreidae). *L'Entomologiste*, 63:303–308
- Else KD (1993) Cold tolerance of the southern green stink bug (Heteroptera, Pentatomidae). *Environmental Entomology*, 22 (3):567–570
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2009) Development of *Aedes albopictus* risk maps. Technical report, European Centre for Disease Prevention and Control Stockholm, Sweden 45 p.
- Eckenwalder JE (2009) *Conifers of the World: The Complete Reference*. Timber Press, Portland, 720 p.
- European Environment Agency (EEA) (2012) Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2012: An indicator-based report. EEA, Copenhagen. EEA Report, 12: 300 p.
- Essl F, Dullinger S, Rabitsch W, Hulme PE, Hulber K, Jarosik V, Kleinbauer I, Krausmann F, Kuhn I, Nentwig W, Vila M, Genovesi P, Gherardi F, Desprez-Loustau ML, Roques A, Pysek P (2011a)

- Reply to Keller and Springborn: No doubt about invasion debt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (25):E221–E221
- Essl F, Dullinger S, Rabitsch W, Hulme PE, Hulber K, Jarosik V, Kleinbauer I, Krausmann F, Kuhn I, Nentwig W, Vila M, Genovesi P, Gherardi F, Desprez-Loustau ML, Roques A, Pysek P (2011b) Socioeconomic legacy yields an invasion debt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (1):203–207
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology*, 19 (19):4113–4130
- Excoffier L, Foll M, Petit RJ (2009) Genetic Consequences of Range Expansions. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 40:81–501
- Fabre JP, Auger-Rozenberg MA, Chalon A, Boivin S, Roques A (2004) Competition between exotic and native insects for seed resources in trees of a Mediterranean forest ecosystem. *Biological Invasions*, 6 (1):11–22
- Facon B, Crespin L, Loiseau A, Lombaert E, Magro A, Estoup A (2011) Can things get worse when an invasive species hybridizes? The harlequin ladybird *Harmonia axyridis* in France as a case study. *Evolutionary Applications*, 4 (1):71–88
- Facon B, Genton BJ, Shykoff J, Jarne P, Estoup A, David P (2006) A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 21 (3):130–135
- Fady B, Brahic P, Cambon D, Gilg O, Rei F, Roig A, Royer J, Thévenet J, Turion N (2010) Valoriser et conserver le Pin de Salzmann en France. *Forêt méditerranéenne*, 31 (1):3–14
- Falk-Petersen J, Bohn T, Sandlund OT (2006) On the numerous concepts in invasion biology. *Biological Invasions*, 8 (6):1409–1424
- Fauvergue X, Vercken E, Malausa T, Hufbauer RA (2012) The biology of small, introduced populations, with special reference to biological control. *Evolutionary Applications*, 5 (5):424–443
- Fent M, Kment P (2011) First record of the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Turkey. *North-Western Journal of Zoology*, 7 (1):72–80
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484 (7393):186–194
- Floerl O, Inglis GJ, Dey K, Smith A (2009) The importance of transport hubs in stepping-stone invasions. *Journal of Applied Ecology*, 46 (1):37–45
- Foucaud J, Orivel J, Fournier D, Delabie JHC, Loiseau A, Le Breton J, Cerdan P, Estoup A (2009) Reproductive system, social organization, human disturbance and ecological dominance in native populations of the little fire ant, *Wasmannia auropunctata*. *Molecular Ecology*, 18 (24):5059–5073
- Foucaud J, Rey O, Robert S, Crespin L, Orivel J, Facon B, Loiseau A, Jourdan H, Kenne M, Mbenoun Masse PS, Tindo M, Vonshak M, Estoup A (2013) Thermotolerance adaptation to human-modified habitats occurs in the native range of the invasive ant *Wasmannia auropunctata* before long-distance dispersal. *Evolutionary Applications* 6 (4):721–734
- Fraga FB, Alencar IDC, Tavares MT (2009) Disseminação de Insetos-Praga por Meio de Embalagens à

- Base de amido Extrusado. *Neotropical Entomology*, 38 (4):548–549
- Frankham R (2005) Invasion biology – Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity*, 94 (4):385–385
- Fridriksson S, Magnússon B (1992) Development of the Ecosystem on Surtsey with References to Anak Krakatau. *GeoJournal*, 28 (2):287–291
- Gall WK (1992) Further eastern range extension and host records for *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae): well-documented dispersal of a household nuisance. *Great Lakes Entomologist*, 25 (3):159–171
- Gandhi KJK, Herms DA (2010) Direct and indirect effects of alien insect herbivores on ecological processes and interactions in forests of eastern North America. *Biological Invasions*, 12 (2):389–405
- Gapon DA (2012) First Records of the Western Conifer Seed Bug *Leptoglossus occidentalis* Heid. (Heteroptera, Coreidae) from Russia and Ukraine, Regularities in Its Distribution and Possibilities of Its Range Expansion in the Palaearctic Region. *Entomological Review*, 93 (2):174–181
- Gardener MR, Atkinson R, Renteria JL (2010) Eradications and People: Lessons from the Plant Eradication Program in Galapagos. *Restoration Ecology*, 18 (1):20–29
- Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, 21 (3):394–407
- Gilchrist GW, Huey RB, Serra L (2001) Rapid evolution of wing size clines in *Drosophila subobscura*. *Genetica*, 112:273–286
- Gisder S, Aumeier P, Genersch E (2009) Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, 90:463–467
- Goebel T, Waters MR, O'Rourke DH (2008) The Late Pleistocene dispersal of modern humans in the Americas. *Science*, 319 (5869):1497–1502
- Gogala A (2003) Listonožka (*Leptoglossus occidentalis*) žev Sloveniji (Heteroptera: Coreidae)[A leaf-footed conifer seed bug (*Leptoglossus occidentalis*) in Slovenia already Heteroptera: Coreidae]. Faunistical notes, *Acta Entomologica Slovenica* 11:189–190
- Grapputo A, Boman S, Lindstrom L, Lyytinen A, Mappes J (2005) The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular Ecology*, 14 (14):4207–4219
- Green AJ, Sanchez MI (2006) Passive internal dispersal of insect larvae by migratory birds. *Biology Letters*, 2 (1):55–57
- Gu H, Walter GH (1989) Flight of green vegetable bugs *Nezara viridula* (L.) in relation to environmental variables. *Journal of Applied Entomology*, 108 (4):347–354
- Guilbon S (2010) Analyses préliminaires de l'impact écologique de la punaise invasive *Leptoglossus occidentalis* sur plusieurs espèces de conifères européens. Première approche de la structuration génétique des populations. Rapport Master II, Université d'Orléans, Orléans
- Guillemaud T, Beaumont MA, Ciosi M, Cornuet JM, Estoup A (2010) Inferring introduction routes of invasive species using approximate Bayesian computation on microsatellite data. *Heredity*,

- 104 (1):88–99. doi:10.1038/hdy.2009.92
- Guillemaud T, Ciosi M, Lombaert E, Estoup A (2011) Biological invasions in agricultural settings: Insights from evolutionary biology and population genetics. *Comptes Rendus Biologies*, 334 (3):237–246
- Guiller A, Martin MC, Hiraux C, Madec L (2012) Tracing the invasion of the Mediterranean land snail *Cornu aspersum aspersum* becoming an agricultural and garden pest in areas recently introduced. *PLoS ONE*, 7 (12):e49674
- Gurevitch J, Padilla DK (2004) Are invasive species a major cause of extinctions? *Trends in Ecology & Evolution*, 19 (9):470–474
- Haack RA, Herard F, Sun JH, Turgeon JJ (2010) Managing Invasive Populations of Asian Longhorned Beetle and Citrus Longhorned Beetle: A Worldwide Perspective. *Annual Review of Entomology*, 55: 521–546
- Hagler JR, Jackson CG (2001) Methods for marking insects: Current techniques and future prospects. *Annual Review Entomology*, 46:511–543
- Hagler JR, Jackson CG, Blackmer JL (2010) Diet selection exhibited by juvenile and adult lifestages of the omnivores western tarnished plant bug, *Lygus hesperus* and tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Journal of Insect Science*, 10:127
- Harmat B, Kondorosy E, Rédei D (2006) A nyugati levéllábú poloska (*Leptoglossus occidentalis* Heidemann) első magyarországi megjelenése (Heteroptera: Coreidae). *Növényvédelem*, 42:491–494
- Harper JL (1977) Population biology of plants. Academic Press, New-York, 892 p.
- Hedlin AF, Yates HO, III, Tovar DC, Ebel BH, Koerber TW, Merkel EP (1980) Cone and seed insects of North American conifers. Environment Canada, Forestry Service, Pacific Forestry Centre, Victoria, BC, co-published by the United States Forest Service and Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México, 123 p.
- Heidemann O (1910) New species of *Leptoglossus* from North America (Hemiptera-Coreidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 12:231–238
- Hizal E (2012) Two invasive alien insect species, *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) and *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae), and their distribution and host plants in Istanbul province, Turkey. *Florida Entomologist*, 95 (2):344–349
- Holway DA (1999) Competitive mechanisms underlying the displacement of native ants by the invasive Argentine ant. *Ecology*, 80 (1):238–251
- Hopper KR, Roush RT (1993) Mate Finding, Dispersal, Number Released, and the Success of Biological Control Introductions. *Ecological Entomology*, 18 (4):321–331
- Hulme PE (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology*, 46 (1):10–18
- Hulme PE, Roy DB (2010) DAISIE and arthropod invasions in Europe. In: Roques A, Kenis M, Lees D et al. (eds) Alien terrestrial arthropods of Europe, vol 4(1). Pensoft, Sofia,BGR, pp 1–3
- Humair F, Edwards PJ, Siegrist M, Kueffer C (2014) Understanding misunderstandings in invasion science: why experts don't agree on common concepts and risk assessments. *NeoBiota*, 20:1–30

- Ings TC, Ward NL, Chittka L (2006) Can commercially imported bumble bees out-compete their native conspecifics? *Journal of Applied Ecology*, 43 (5):940–948
- Inoue MN, Yokoyama J, Washitani I (2008) Displacement of Japanese native bumblebees by the recently introduced *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera : Apidae). *Journal of Insect Conservation* 12 (2):135–146
- Ishikawa T, Kikuhara Y (2009) *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae), a presumable recent invader to Japan. *Japanese Journal of Entomology*, 12 (3):115–116
- Ito K (1980) Seasonal change of flight ability of *Cletus punctiger* (Heteroptera, Coreidae). *Applied Entomology and Zoology*, 15 (1):36–44
- Jeffries DL, Chapman J, Roy HE, Humphries S, Harrington R, Brown PMJ, Handley LJJ (2013) Characteristics and Drivers of High-Altitude Ladybird Flight: Insights from Vertical-Looking Entomological Radar. *PLoS ONE*, 8 (12)
- Juliano SA, Lounibos LP (2005) Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. *Ecology Letters*, 8 (5):558–574
- Jump AS, Peñuelas J (2005) Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology Letters*, 8 (9):1010–1020
- Keever CC, Nieman C, Ramsay L, Ritland CE, Bauer LS, Lyons DB, Cory JS (2013) Microsatellite population genetics of the emerald ash borer (*Agrilus planipennis* Fairmaire): comparisons between Asian and North American populations. *Biological Invasions*, 15:1537–1559
- Kegley S, Sturdevant N, Stein J, Willhite B, Flanagan P, Weatherby J, Marsden M (2001) Cone and seed insects and their impact on whitebark pine. *Forest Health Protection Report Northern Region*, USDA Forest Service (01–6), 13 p.
- Keller RP, Springborn M (2011) Long-term correlations in European socioeconomic conditions create a bias to conclusion that an invasion debt occurs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (25):E220–E220
- Keller SR, Gilbert KJ, Fields PD, Taylor DR (2012) Bayesian inference of a complex invasion history revealed by nuclear and chloroplast genetic diversity in the colonizing plant, *Silene latifolia*. *Molecular Ecology*, 21 (19):4721–4734
- Keller SR, Taylor DR (2008) History, chance and adaptation during biological invasion: separating stochastic phenotypic evolution from response to selection. *Ecology Letters*, 11 (8):852–866
- Kingsolver JG (1989) Weather and the population-dynamics of insects – Integrating physiological and population ecology. *Physiological Zoology*, 62 (2):314–334
- Kenis M, Auger-Rozenberg MA, Roques A, Timms L, Pere C, Cock MJW, Settele J, Augustin S, Lopez-Vaamonde C (2009) Ecological effects of invasive alien insects. *Biological Invasions*, 11 (1):21–45
- Kenis M, Branco M (2010) Impact of alien terrestrial arthropods in Europe. In: Roques A, Kenis M, Lees D et al. (eds) *Alien terrestrial arthropods of Europe*, vol 4(1). Pensoft, Sofia, BGR, 5:51–71
- Kenis M, Rabitsch W, Auger-Rozenberg MA, Roques A (2007) How can alien species inventories and interception data help us prevent insect invasions? *Bulletin of Entomological Research*, 97 (5):489–502

- Khamis FM, Karam N, Ekesi S, de Meyer M, Bonomi A, Gomulski LM, Scolari F, Gabrieli P, Siciliano P, Masiga D, Kenya EU, Gasperi G, Malacrida AR, Guglielmino CR (2009) Uncovering the tracks of a recent and rapid invasion: the case of the fruit fly pest *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) in Africa. *Molecular Ecology*, 18 (23):4798–4810
- Kiritani K (2013) Different effects of climate change on the population dynamics of insects. *Applied Entomology and Zoology*, 48 (2):97–104
- Kirk H, Dorn S, Mazzi D (2013) Molecular genetics and genomics generate new insights into invertebrate pest invasions. *Evolutionary Applications*, 6 (5):842–856
- Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 274 (1608):303–313
- Kment P, Baňar P (2008) Additional records of the invasive nearctic bug *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Croatia. *Natura Croatica*, 17 (2):141–147
- Koch RL (2003) The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science*, 3:1–13
- Koerber TW (1963) *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera, Coreidae), a Newly Discovered Pest of Coniferous Seed. *Annals of the Entomological Society of America*, 56:229–234
- Krannitz PG, Duralia TE (2004) Cone and seed production in *Pinus ponderosa*: A review. *Western North American Naturalist*, 64 (2):208–218
- Krysan JL, Miller TA (1986) *Methods for the study of pest Diabrotica*. Springer-Verlag, New York, USA, 260 p.
- Kühn I, Kowarik I, Kollmann J, Starfinger U, Bacher S, Blackburn T, Bustamante R, Celesti-Grapow L, Chytrý M, Colautti R, Essl F, Foxcroft L, Gollasch S, García-Berthou E, Hierro J, Hufbauer R, Hulme PE, Jarošík V, Jeschke J, Karrer G, Mack R, Molofsky J, Murray B, Nentwig W, Osborne B, Pyšek P, Rabitsch W, Rejmanek M, Roques A, Shaw R, Sol D, van Kleunen M, Vilà M, von der Lippe M, Wolfe L, Penev L (2011) Open minded and open access: introducing NeoBiota, a new peer-reviewed journal of biological invasions. *NeoBiota*, 9:1–12
- Labrie G, Coderre D, Lucas E (2008) Overwintering strategy of multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae): cold-free space as a factor of invasive success. *Annals of the Entomological Society of America*, 101 (5):860–866.
- Lait CG, Bates SL, Kermode AR, Morissette KK, Borden JH (2001) Specific biochemical marker-based techniques for the identification of damage to Douglas-fir seed resulting from feeding by the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera: Coreidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31:739–746
- Leather SR, Walters KFA, Bale JS (1993) *The ecology of insect overwintering*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, 255 p.
- Lennox CL, Hoffmann JH, Coutinho TA, Roques A (2009) A threat of exacerbating the spread of pitch canker precludes further consideration of a cone weevil, *Pissodes validirostris*, for biological control of invasive pines in South Africa. *Biological Control*, 50 (2):179–184.
- Lesieur V, Yart A, Guilbon S, Lorme P, Auger-Rozenberg M-A, Roques A (2014) The invasive *Leptoglossus* seed bug, a threat for commercial seed crops, but for conifer diversity?

- Biological Invasions:17p.
- Levinson H, Levinson A (1994) Origin of grain storage and insect species consuming desiccated food. *Anzeiger Fur Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz*, 67 (3):47–60
- Liebholt AM, Tobin PC (2008) Population ecology of insect invasions and their management. *Annual Review of Entomology*, 53: 387–408
- Lindelöw Å, Bergsten J (2012) Stor skönhet från Nordamerika med smak för barrträdkottar: *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) en ny bredkantskinnbagge i Sverige. *Entomologisk Tidskrift*, 132 (1–2):55–58
- Lis JA, Lis B, Gubernator J (2008) Will the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Hemiptera : Heteroptera : Coreidae) seize all of Europe? *Zootaxa*, (1740):66–68
- Liu H, Stiling P (2006) Testing the enemy release hypothesis: a review and meta-analysis. *Biological Invasions*, 8 (7):1535–1545
- Lockwood JL, Cassey P, Blackburn T (2005) The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 20 (5):223–228
- Lombaert E, Estoup A, Facon B, Joubard B, Gregoire JC, Jannin A, Blin A, Guillemaud T (2014) Rapid increase in dispersal during range expansion in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Journal Evolutionary Biology*, 27 (3):508–517
- 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)
- Lombaert E, Guillemaud T, Thomas CE, Handley LJJ, Li J, Wang S, Pang H, Goryacheva I, Zakharov IA, Jousset E, Poland RL, Migeon A, van Lenteren J, De Clercq P, Berkvens N, Jones W, Estoup A (2011) Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Molecular Ecology*, 20 (22):4654–4670
- Lopez-Vaamonde C, Glavendekić M, Paiva MR (2010) Invaded habitats. In: Roques A, Kenis M, Lees D et al. (eds) *Alien terrestrial arthropods of Europe*, vol 4(1). Pensoft, Sofia, BGR, 4:45–50
- Lounibos LP (2002) Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Reviews of Entomology*, 47:233–266
- Lu Y, Wu K, Guo Y (2007) Flight potential of *Lygus lucorum* (Meyer-Dur) (Heteroptera : Miridae). *Environmental Entomology*, 36 (5):1007–1013
- Luchi N, Mancini V, Feducci M, Santini A, Capretti P (2012) *Leptoglossus occidentalis* and *Diplodia pinea*: a new insect-fungus association in Mediterranean forests. *Forest Pathology*, 42 (3):246–251
- Luz C, Fargues J, Grunewald J (1999) Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera : Reduviidae) under constant and cyclic conditions of temperature and humidity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (3):403–409
- Lye GC, Lepais O, Goulson D (2011) Reconstructing demographic events from population genetic data: the introduction of bumblebees to New Zealand. *Molecular Ecology*, 20 (14):2888–2900
- Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, Evans H, Clout M, Bazzaz FA (2000) Biotic invasions: Causes,

- epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications*, 10 (3):689–710
- Magnússon B, Magnússon S, Fridriksson S (2009) Developments in plant colonization and succession on Surtsey during 1999–2008. *Surtsey Research*, 12:57–76
- Maharjan R, Jung C (2009) Flight behavior of the bean bug, *Riptortus clavatus* (Thunberg) (Hemiptera: Alydidae), relative to adult age, sex and season. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 12 (3):145–150
- Majzlan O, Roháčová M (2007) Faunistické správy zo Slovenska. *Naturae Tutela*, 11:199–200
- Malacrida AR, Gomulski LM, Bonizzoni M, Bertin S, Gasperi G, Gugliclmino CR (2007) Globalization and fruitfly invasion and expansion: the medfly paradigm. *Genetica*, 131 (1):1–9
- Malausa T, Gilles A, Meglecz E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Delye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Le Corre V, Lung-Escarmant B, Male PJG, Ferreira S, Martin JF (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources*, 11 (4):638–644
- Maltese M, Caleca V, Carapezza A (2009) Primi reperti in Sicilia su diffusione e biologia di *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae), cimice americana dei semi delle conifere. In: proceedings III Congresso Nazionale di Selvicoltura per il miglioramento e la conservazione dei boschi italiani, pp.1413–1418
- Maltese M, Caleca V, Guerrier E, Strong WB (2012) Parasitoids of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) recovered in western North America and first record of its egg parasitoid *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead) (Hymenoptera: Platygasteridae) in California. *Pan-Pacific Entomologist*, 88 (3):347–355
- Malumphy C, Botting J, Bantock T, Reid S (2008) Influx of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Coreidae) in England. *Het News*, 2 (12):7–9
- Marshall SA (1991) A new Ontario record of a seed eating bug (Hemiptera: Coreidae) and other examples of the role of regional insect collections in tracking changes to Ontario's fauna. *Proceedings of the Entomological Society of Ontario*, 122:109–111
- Más H, Naya M, Pérez-Laorga E, Aguado A, Marco M, Aragoneses J, Rodriguo E Estudio del ciclo biológico de *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera,Coreidae) en la Comunitat Valenciana (2013). In: 6e Congreso Forestal Espanol, Sociedad Espanola de Ciencias Forestales-Montes. Servicios y desarrollo rural, 10–14/06/2013, Vitoria-Gasteiz. 6CFE01–394. 13 p.
- McManus MA, Woodson CB (2012) Plankton distribution and ocean dispersal. *Journal of Experimental Biology*, 215 (6):1008–1016
- McPherson JE, Packauskas RJ, Taylor SJ, O'Brien MF (1990) Eastern range extension of *Leptoglossus occidentalis* with a key to *Leptoglossus* species of America north of Mexico (Heteroptera:Coreidae). *Great Lakes Entomologist*, 23 (2):99–104
- Mellars P (2006) A new radiocarbon revolution and the dispersal of modern humans in Eurasia. *Nature*, 439 (7079):931–935
- Meyerson LA, Mooney HA (2007) Invasive alien species in an era of globalization. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5 (4):199–208

- Miller N, Estoup A, Toepfer S, Bourguet D, Lapchin L, Derridj S, Kim KS, Reynaud P, Furlan L, Guillemaud T (2005) Multiple transatlantic introductions of the western corn rootworm. *Science* (Washington), 310 (5750):992
- Mitchell PL (2000) Leaf-footed bugs (Coreidae). In: Schaeffer CW and Panizzi AR (eds Heteroptera of economic importance. CRC Press Boca Raton, USA, 11:337–403
- Mitchell PL, Wheeler AG (2008) Host plants of *Leptoglossus oppositus* (Say) (Hemiptera: Coreidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 110 (4):1034–1041
- Miyatake T (1997) Functional morphology of the hind legs as weapons for male contests in *Leptoglossus australis* (Heteroptera: Coreidae). *Journal of Insect Behavior*, 10 (5):727–735
- Mjøs AT, Nielsen TR, Ødegaard F (2010) The western conifer seed bug (*Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910) (Hemiptera, Coreidae) found in SW Norway. *Norwegian Journal of Entomology*, 57 (1):20–22
- Moritz RFA, Hartel S, Neumann P (2005) Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity. *Ecoscience*, 12 (3):289–301
- Mortelmans J, Casteels H, Beliën T (2012) *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): A pest species new to Belgium. *Belgian Journal of Zoology*, 142 (2): 143–146
- Mouchet J, Giacomini T, Julvez J (1995) La diffusion anthropique des arthropodes vecteurs de maladie dans le monde. *Cahiers Santé*, 5:293–298
- Musolin DL (2007) Insects in a warmer world: ecological, physiological and life-history responses of true bugs (Heteroptera) to climate change. *Global Change Biology*, 13 (8):1565–1585
- Musolin DL, Tougou D, Fujisaki K (2010) Too hot to handle? Phenological and life-history responses to simulated climate change of the southern green stink bug *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). *Global Change Biology*, 16 (1):73–87.
- Nakamura K, Hodkova M, Hodek I (1998) Effect of photoperiod on flight activity in *Graphosoma lineatum* (Heteroptera : Pentatomidae). *European Journal of Entomology*, 95 (2):297–300
- Nathan R, Katul GG, Bohrer G, Kuparinen A, Soons MB, Thompson SE, Trakhtenbrot A, Horn HS (2011) Mechanistic models of seed dispersal by wind. *Theoretical Ecology*, 4 (2):113–132
- Niemela P, Mattson WJ (1996) Invasion of North American forests by European phytophagous insects – Legacy of the European crucible? *Bioscience*, 46 (10):741–753
- O'Shea DJ, Schwartz MD, Rogers R, Sweeney J (2005) Occurrence of Western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, (Heteroptera:Coreidae) in New Brunswick and Nova Scotia. *Tree Seed Work Group News Bulletin*, 41:7–10
- Olivieri N (2004) *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera, Coreidae) prima segnalazione per l'Abruzzo di specie neartica di recente introduzione in Italia. . *Bollettino della Società Entomologica Italiana*, 136 (1):75–78
- ONF (2013) Catalogue 2013/2014. Graines d'arbres et d'arbustes forestiers. ONF, 18 p.
- Packauskas RJ, Schaefer CW (2001) Clarification of some taxonomic problems in Anisoscelini and Leptoscelini (Hemiptera: Coreidae: Coreinae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 103 (1):249–256
- Panizzi AR (2004) A possible territorial or recognition behavior of *Leptoglossus zonatus* (Dallas) (Heteroptera, Coreidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 48 (4):577–579.

- Pascual M, Chapuis MP, Mestres F, Balanya J, Huey RB, Gilchrist GW, Serra L, Estoup A (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular Ecology*, 16 (15):3069–3083
- Peacock L, Worner SP (2008) Biological and ecological traits that assist establishment of alien invasive insects. *New Zealand Plant Protection*, 61:1–7
- Pérez Valcárcel J, Prieto Piloña F (2010) La contribución de registros fotográficos en internet para estudios faunísticos: el caso de la expansión iberoibalea de la especie invasora *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Hemiptera, Coreidae). *Arquivos Entomoloxicos*, 4:45–52
- Peterson AT (2003) Predicting the geography of species' invasions via ecological niche modeling. *Quarterly Review of Biology*, 78 (4):419–433
- Petrakis PV (2011) First record of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Greece. *Entomologia Hellenica*, 20:83–93
- Peverieri GS, Furlan P, Benassai D, Caradonna S, Strong WB, Roversi PF (2013) Host Egg Age of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera, Coreidae) and Parasitism by *Gryon pennsylvanicum* (Hymenoptera, Platygasteridae). *Journal of Economic Entomology*, 106 (2):633–640
- Peverieri GS, Furlan P, Simoni S, Strong WB, Roversi PF (2012) Laboratory evaluation of *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead) (Hymenoptera, Platygasteridae) as a biological control agent of *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera, Coreidae). *Biological Control*, 61 (1):104–111
- Philippe G, Baldet P, Héois B, Ginisty C (2006) Reproduction sexuée des conifères et production de semences en vergers à graines. Collection Synthèses, Quae, Versailles, 570 p.
- Phillips BL, Brown GP, Shine R (2010) Life-history evolution in range-shifting populations. *Ecology*, 91 (6):1617–1627
- Pimentel D (2002) Biological invasions: economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species. CRC Press, Boca Raton, USA, 369 p.
- Pimentel D, Zuniga R, Morrison D (2005) Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*, 52 (3):273–288
- Pluess T, Cannon R, Jarosik V, Pergl J, Pysek P, Bacher S (2012) When are eradication campaigns successful? A test of common assumptions. *Biological Invasions*, 14 (7):1365–1378
- Prasad AM, Iverson LR, Peters MP, Bossenbroek JM, Matthews SN, Sydnor TD, Schwartz MW (2010) Modeling the invasive emerald ash borer risk of spread using a spatially explicit cellular model. *Landscape Ecology*, 25 (3):353–369
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2):945–959
- Protić L (2008) *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) in Serbia. *Acta Entomologica Serbica*, 13 (1/2):81–84
- Puillandre N, Dupas S, Dangles O, Zeddiam JL, Capdevielle-Dulac C, Barbin K, Torres-Leguizamon M, Silvain JF (2008) Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biological Invasions*, 10 (3):319–333
- Pyšek P, Jarošík V, Pergl J, Moravcová L, Chytrý M, Kühn I (2014) Temperate trees and shrubs as

- global invaders: the relationship between invasiveness and native distribution depends on biological traits. *Biological Invasions*, 16 (3):577–589
- Pyšek P, Richardson DM (2010) Invasive Species, Environmental Change and Management, and Health. *Annual Review of Environment and Resources*, 35: 25–55
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. 2.11.1 edn. R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Austria
- Rabitsch W (2010) Pathways and vectors of alien arthropods in Europe. In: Roques A, Kenis M, Lees D et al. (eds) *Alien terrestrial arthropods of Europe*, vol 4(1). Pensoft, Sofia, BGR, 6:27–43
- Rabitsch W, Heiss E (2005) *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910, eine amerikanische Adventivart auch in Österreich aufgefunden (Heteroptera: Coreidae). *Berichte des Naturwissenschaftlich-Medizinischen Vereins in Innsbruck*, 92:131–135
- Rappaport NG, Haverty MI, Shea PJ, Sandquist RE (1994) Efficacy of esfenvalerate for control of insects harmful to seed production in disease-resistant western white pines. *Canadian Entomologist*, 126 (1):1–5
- Rasplus JY (2010) Future trends. In: Roques A, Kenis M, Lees D et al. (eds) *Alien terrestrial arthropods of Europe*, vol 4(1). Pensoft, Sofia, BGR, 6:73–80
- Reiter P (1998) *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988–1995: the shape of things to come? *Journal of American Mosquito Control Association*, 14 (1):83–94
- Reitz SR, Trumble JT (2002) Competitive displacement among insects and arachnids. *Annual Review of Entomology*, 47:435–465
- Reynolds DR, Nau BS, Chapman JW (2013) High-altitude migration of Heteroptera in Britain. *European Journal of Entomology*, 110 (3):483–492
- Ribes J, Escolà O (2005) *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910, Hemipter nearctic trobat a Catalunya (Hemiptera: Heteroptera: Coreidae). *Sessio Conjuncta d'Entomologia ICHN-SCL*, 13:47–50
- Rice RE, Uyemoto JK, Ogawa JM, Pemberton WM (1985) New findings in pistachio problems. *California Agriculture*, 39 (1):15–18
- Richards CL, Bosdorf O, Muth NZ, Gurevitch J, Pigliucci M (2006) Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecology Letters*, 9 (8):981–993
- Richardson DM, Pyšek P, Carlton JT (2011) A Compendium of Essential Concepts and Terminology in Invasion Ecology. In: Richardson DM (eds), *Fifty Years of Invasion Ecology: The Legacy of Charles Elton*, Wiley-Blackwell, Oxford, 30:409–420
- Richardson DM, Pyšek P, Rejmánek M, Barbour MG, Panetta FD, West CJ (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions*, 6 (2):93–107
- Richardson DM, Ricciardi A (2013) Misleading criticisms of invasion science: a field guide. *Diversity and Distributions*, 19 (12):1461–1467
- Ridge-O'Connor GE (2001) Distribution of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (Heteroptera: Coreidae) in Connecticut and parasitism by a tachinid fly, *Trichopoda pennipes* (F.) (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 103 (2):364–366
- Rius M, Turon X, Ordonez V, Pascual M (2012) Tracking Invasion Histories in the Sea: Facing

Complex Scenarios Using Multilocus Data. PLoS ONE 7 (4):e35815

- Robinet C, Kehlenbeck H, Kriticos DJ, Baker RHA, Battisti A, Brunel S, Dupin M, Eyre D, Faccoli M, Ilieva Z, Kenis M, Knight J, Reynaud P, Yart A, van der Werf W (2012) A Suite of Models to Support the Quantitative Assessment of Spread in Pest Risk Analysis. PLoS ONE, 7 (10):e43366
- Robinet C, Roques A (2010) Direct impacts of recent climate warming on insect populations. Integrative Zoology, 5 (2):132–142
- Robinet C, Van Opstal N, Baker R, Roques A (2011) Applying a spread model to identify the entry points from which the pine wood nematode, the vector of pine wilt disease, would spread most rapidly across Europe. Biological Invasions, 13 (12):2981–2995
- Roques A (1976) Observations on the biology and ecology of *Pissodes validirostris* Gyll (Coleoptera, Curculionidae) in the forest of Fontainebleau [Observations sur la biologie et l'ecologie de *Pissodes validirostris* Gyll (Coleoptere, Curculionidae) en foret de Fontainebleau]. Annales de Zoologie, Ecologie Animale, 8 (4):523–542
- Roques A (1983) Les insectes ravageurs des cones et graines de coniferes en France. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 134 p.
- Roques A (1988) La spécificité des relations entre cônes de coniferes et insectes inféodés en Europe occidentale. Un exemple d'étude des interactions plantes-insectes. Thèse de Doctorat, Université de Pau, Pau
- Roques A (2010a) 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 Science, 40 (Suppl):S77–S94
- Roques A (2010b) Taxonomy, time and geographic patterns. In: Roques A, Kenis M, Lees D et al. (eds) Alien terrestrial arthropods of Europe, vol 4(1). Pensoft, Sofia, BGR, 2:11–26
- Roques A, Raimbault JP, Goussard F (1983) Impact des insectes ravageurs des cônes et graines sur la régénération naturelle du pin à crochets dans quelques forêts de montagne des Alpes du Sud et des Pyrénées Orientales. Acta Biologica Montana, 2:331–347
- Roques A, Roux-Morabito G, Hoffmann JH, Kleinhentz M, Gourov A (2004) Determining the suitability of a European cone weevil, *Pissodes validirostris*, for biological control of invasive pines in South Africa. In: Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds, Canberra, Australia, 27 April–2 May, 2003. CSIRO Publishing, 315–321
- Roques L, Garnier J, Hamel F, Klein EK (2012) Allee effect promotes diversity in traveling waves of colonization. Proceedings of the National Academy of Sciences, 09 (23):8828–8833
- Roversi PF, Peverieri GS, Maltese M, Furlan P, Strong WB, Caleca V (2014) Pre-release risk assessment of the egg-parasitoid *Gryon pennsylvanicum* for classical biological control of *Leptoglossus occidentalis*. Journal of Applied Entomology, 138 (1–2):27–35.
- Roversi PF, Strong WB, Caleca V, Maltese M, Peverieri GS, Marianelli L, Marziali L, Strangi A (2011) Introduction into Italy of *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead), an egg parasitoid of the alien invasive bug *Leptoglossus occidentalis* Heidemann. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 41 (1):72–75

- Roy HE, Roy DB, Roques A (2011) Inventory of terrestrial alien arthropod predators and parasites established in Europe. *BioControl*, 56 (4):477–504
- Ruesink JL, Parker IM, Groom MJ, Kareiva PM (1995) Reducing the risks of non indigenous species introductions. *Bioscience*, 45 (7):465–477
- Ruicănescu A (2009) *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera: Coreidae). In: Rakosy L, Momeu L (eds), *Neobiota în România*, Presa Universitară Clujeană, Arcașia, Romania. 153–154
- Rumine P, Barzanti GP (2008) Controllo microbiologico della "Cimice delle conifere" prove preliminari di laboratorio, [Microbiological control of the leaf-footed bug *Leptoglossus occidentalis*: first laboratory trials]. In: Brunelli A, Collina M (eds), *Giornate Fitopatologiche 2008*, Cervia. 1:307–308
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, McCauley DE, O'Neil P, Parker IM, Thompson JN, Weller SG (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review Of Ecology And Systematics*, 32:305–332
- Saulich AH, Musolin DL Four seasons: diversity of seasonal adaptations and ecological mechanisms controlling seasonal development in true bugs (Heteroptera) in the temperate climate (2007). In: Stekolnikov AA (ed), *Adaptive Strategies of Terrestrial Arthropods to Unfavourable Environmental Conditions: A Collection of Papers in Memory of Professor Viktor Petrovich Tyshchenko*—Proceeding of the Biological Institute of St Petersburg State University, 53:25–106
- Sax DF, Stachowicz JJ, Gaines SD (2005) *Species Invasions: Insights into Ecology, Evolution and Biogeography*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 495 p.
- Schaffner JC (1967) The occurrence of *Theognis occidentalis* in the midwestern United States (Hemiptera; Coreidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 40:141–142
- Schumacher P, Weber DC, Hagger C, Dorn S (1997) Heritability of flight distance for *Cydia pomonella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 85 (2):169–175
- Simberloff D (1989) Which insect introductions succeed and which failed. In: Drake JA, Mooney HA, Di Castri F (eds) *Biological invasions: a global perspective*. John Wiley & Sons, New York, 3:61–75
- Simberloff D (2003) Confronting introduced species: a form of xenophobia? *Biological Invasions*, 5 (3):179–192
- Simberloff D (2009) The Role of Propagule Pressure in Biological Invasions. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, vol 40:81–102
- Simberloff D (2013) Biological invasions: What's worth fighting and what can be won? *Ecological Engineering*. In press, 10 p.
- Simberloff D, Martin JL, Genovesi P, Maris V, Wardle DA, Aronson J, Courchamp F, Galil B, Garcia-Berthou E, Pascal M, Pysek P, Sousa R, Tabacchi E, Vila M (2013) Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution*, 28 (1):58–66
- Simov N (2008) Western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera:

- Coreidae) already in Bulgaria. *Historia naturalis bulgarica*, 19:179–180
- Slachta M, Vambera J, Zahradnickova H, Kostal V (2002) Entering diapause is a prerequisite for successful cold-acclimation in adult *Graphosoma lineatum* (Heteroptera : Pentatomidae). *Journal of Insect Physiology*, 48 (11):1031–1039.
- Solignac M, Cornuet JM, Vautrin D, Conte YL, Anderson D, Evans J, Cros-Arteil S, Navajas M (2005) The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 272 (1561):411–419
- Sousa E, Naves P (2011) The western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* Heidemann, 1910 (Heteroptera: Coreidae) in Portugal. *Boletim de Sanidad Vegetal-Plagas*, 37 (1):65–67
- Southwood TRE (1962) Migration of terrestrial arthropodes in relation to habitat. *Biological Reviews*, 37 (2):171–214
- Stewart SD, Gaylor MJ (1994) Effects of age, sex, and reproductive status on flight by the tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae). *Environmental Entomology*, 23 (1):80–84
- Strong WB (2006) Seasonal changes in seed reduction in lodgepole pine cones caused by feeding of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae). *Canadian Entomologist*, 138 (6):888–896
- Strong WB, Bates SL, Stoeck MU (2001) Feeding by *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) reduces seed set in lodgepole pine (Pinaceae). *Canadian Entomologist*, 133 (6):857–865
- Takács S, Bottomley H, Andrejler I, Zaradnik T, Schwarz J, Bennett R, Strong W, Gries G (2009) Infrared radiation from hot cones on cool conifers attracts seed-feeding insects. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 276 (1657):649–655
- Takeda K, Musolin DL, Fujisaki K (2010) Dissecting insect responses to climate warming, overwintering and post-diapause performance in the southern green stink bug, *Nezara viridula*, under simulated climate-change conditions. *Physiological Entomology*, 35 (4):343–353
- Tamburini M, Maresi G, Salvadori C, Battisti A, Zotte F, Pedrazzoli F (2012) Adaptation of the invasive western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* to Trentino, an alpine region (Italy). *Bulletin of Insectology*, 65 (2):161–170
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) Mega5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10):2731–2739
- Taylor RAJ, Bauer LS, Poland TM, Windell KN (2010) Flight Performance of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) on a Flight Mill and in Free Flight. *Journal of Insect Behavior*, 23 (2):128–148
- Taylor SJ, Tescari G, Villa M (2001) A nearctic pest of pinaceae accidentally introduced into Europe: *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera : Coreidae) in northern Italy. *Entomological News*, 112 (2):101–103
- Templeton AR (2009) Statistical hypothesis testing in intraspecific phylogeography: nested clade phylogeographical analysis vs. approximate Bayesian computation. *Molecular Ecology*, 18 (2):319–331
- Templeton AR (2010) Coherent and incoherent inference in phylogeography and human evolution.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107 (14):6376–6381
- Tescari G (2004) First record of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) in Croatia. Entomologia Croatica, 8 (1/2):73–75
- Tobin P, Kean J, Suckling D, McCullough D, Herms D, Stringer L (2014) Determinants of successful arthropod eradication programs. Biological Invasions, 16 (2):401–414.
- Torres-Leguizamon M, Dupas S, Dardon D, Gomez Y, Nino L, Carnero A, Padilla A, Merlin I, Fossoud A, Zeddarn JL, Lery X, Capdevielle-Dulac C, Dangles O, Silvain JF (2011) Inferring native range and invasion scenarios with mitochondrial DNA: the case of *T. solanivora* successive north-south step-wise introductions across Central and South America. Biological Invasions, 13 (7):1505–1519
- Travis JMJ, Dytham C (2002) Dispersal evolution during invasions. Evolutionary Ecology Research, 4 (8):1119–1129
- Tsunoda T, Moriya S (2008) Measurement of flight speed and estimation of flight distance of the bean bug, *Riptortus pedestris* (Fabricius) (Heteroptera: Alydidae) and the rice bug, *Leptocoris chinensis* Dallas (Heteroptera: Alydidae) with a speed sensor and flight mills. Applied Entomology and Zoology, 43 (3):451–456
- Turgeon JJ, Jones C, Bellocq MI (2004) Seed cone traits and insect damage in *Tsuga canadensis* (Pinaceae). Canadian Journal of Forest Research–Revue Canadienne de Recherche Forestière, 34 (1):261–265.
- Turgeon J, Tayeh A, Facon B, Lombaert E, De Clercq P, Berkvens N, Lundgren JG, Estoup A (2011) Experimental evidence for the phenotypic impact of admixture between wild and biocontrol Asian ladybird (*Harmonia axyridis*) involved in the European invasion. Journal of Evolutionary Biology, 24 (5):1044–1052
- Valade R, Kenis M, Hernandez-Lopez A, Augustin S, Mena NM, Magnoux E, Rougerie R, Lakatos F, Roques A, Lopez-Vaamonde C (2009) Mitochondrial and microsatellite DNA markers reveal a Balkan origin for the highly invasive horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae). Molecular Ecology, 18 (16):3458–3470
- Vilà M, Basnou C, Pysek P, Josefsson M, Genovesi P, Gollasch S, Nentwig W, Olenin S, Roques A, Roy D, Hulme PE, Andriopoulos P, Arianoutsou M, Augustin S, Bacher S, Bazos I, Bretagnolle F, Chiron F, Clergeau P, Cocharde PO, Cocquempot C, Coeur d'Acier A, David M, Delipetrou P, Desprez-Loustau ML, Didziulis V, Dorkeld F, Essl F, Galil BS, Gasquez J, Georgioud K, Hejda M, Jarosik V, Kark S, Kokkoris I, Kuhn I, Lambdon PW, Lopez-Vaamonde C, Marcer A, Migeon A, McLoughlin M, Minchin D, Navajas M, Panov VE, Pascal M, Pergl J, Perglova I, Pino J, Poboljsaj K, Rabitsch W, Rasplus JY, Sauvard D, Scalera R, Sedlacek O, Shirley S, Winter M, Yannitsaros A, Yart A, Zagatti P, Zikos A, Partners D (2010) How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment. Frontiers in Ecology and the Environment, 8 (3):135–144
- Villa M, Tescari G, Taylor SJ (2001) New data about the Italian presence of *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera Coreidae). Nuovi dati sulla presenza in Italia di *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera Coreidae). Bollettino della Società Entomologica Italiana, 133 (2):103–112

- Vitousek PM, Dantonio CM, Loope LL, Rejmanek M, Westbrooks R (1997) Introduced species: A significant component of human-caused global change. *New Zealand Journal of Ecology*, 21 (1):1–16
- Walther GR, Roques A, Hulme PE, Sykes MT, Pysek P, Kuhn I, Zobel M, Bacher S, Botta-Dukat Z, Bugmann H, Czucz B, Dauber J, Hickler T, Jarosik V, Kenis M, Klotz S, Minchin D, Moora M, Nentwig W, Ott J, Panov VE, Reineking B, Robinet C, Semenchenko V, Solarz W, Thuiller W, Vila M, Vohland K, Settele J (2009) Alien species in a warmer world: risks and opportunities. *Trends in Ecology & Evolution*, 24 (12):686–693
- Wares JP, Hughes AR, Grosberg RK (2005) Mechanisms that drives evolutionary change: insights from species introductions and invasions. In: Sax DF, Stachowicz JJ, Gaines SD (eds), *Species Invasions: Insights into Ecology, Evolution and Biogeography*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, pp 229–257
- Warren CR (2007) Perspectives on the 'alien' versus 'native' species debate: a critique of concepts, language and practice. *Progress in Human Geography*, 31 (4):427–446
- Werner DJ (2006) *Leptoglossus occidentalis* nun auch in Deutschland. *Heteropteron*, 23:38
- Westphal MI, Browne M, MacKinnon K, Noble I (2008) The link between international trade and the global distribution of invasive alien species. *Biological Invasions*, 10 (4):391–398
- Wheeler AG (1992) *Leptoglossus occidentalis*, A New Conifer Pest and Household Nuisance in Pennsylvania. Pennsylvania Department of Agriculture Bulletin, 18:29–30
- Whitman DW, Agrawal AA (2009) What is phenotypic plasticity and why is it important? In: Whitman DW, Ananthakrishnan TN (eds), *Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences*. Science Publishers, University of Minnesota, pp 1–63
- Williamson M, Fitter A (1996) The varying success of invaders. *Ecology*, 77 (6):1661–1666
- Wilson JR, Dormontt EE, Prentis PJ, Lowe AJ, Richardson DM (2009) Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends in Ecology & Evolution*, 24 (3):136–144
- Wingfield MJ, Hammerbacher A, Ganley RJ, Steenkamp ET, Gordon TR, Wingfield BD, Coutinho TA (2008) Pitch canker caused by *Fusarium circinatum*: a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology*, 37(4):319–334
- Xu H, Qiang S, Genovesi P, Ding H, Wu J, Meng L, Han Z, Miao J, Hu B, Guo J, Sun H, Huang C, Lei J, Le Z, Zhang X, He S, Wu Y, Zheng Z, Chen L, Jarosik V, Pysek P (2012) An inventory of invasive alien species in China. *NeoBiota*, (15):1–26
- Zayed A, Constantin SA, Packer L (2007) Successful Biological Invasion despite a Severe Genetic Load. *PLoS ONE*, 2 (9):e 868
- Zepeda-Paulo FA, Simon JC, Ramirez CC, Fuentes-Contreras E, Margaritopoulos JT, Wilson ACC, Sorenson CE, Briones LM, Azevedo R, Ohashi DV, Lacroix C, Glais L, Figueroa CC (2010) The invasion route for an insect pest species: the tobacco aphid in the New World. *Molecular Ecology*, 19 (21):4738–4752
- Zhu G-P, Rédei D, Kment P, Bu W-J (2013) Effect of geographic background and equilibrium state on niche model transferability: predicting areas of invasion of *Leptoglossus occidentalis*. *Biological Invasions*.16(5):1069–1081

- Zhu WB (2010) Exotic coreid bugs introduced into China. In. proceeding of the 4th meeting of the International Heteropterist's Society. Nankai University, Tianjin, China, July 12-17,2010. Nankai University, Tianjin, p.71
- Zachariassen KE (1985) Physiology of cold tolerance in insects. *Physiological Review*, 65 (4):799-832

**Invasion de la punaise américaine *Leptoglossus occidentalis* en Europe.
une contribution à la compréhension des invasions fulgurantes**

RÉSUMÉ :

Les dernières décennies représentent un tournant majeur concernant les invasions biologiques avec une augmentation sans précédent de leur rythme et de leur ampleur, en lien direct avec les activités humaines, en particulier la mondialisation. Certains invasifs se propagent à une vitesse très rapide dans leur nouveau milieu. L'invasion européenne de la punaise *Leptoglossus occidentalis*, illustre parfaitement ce phénomène et offre un modèle d'étude particulièrement intéressant. Cette thèse a pour but de tester des hypothèses permettant d'expliquer la rapidité de cette invasion. Pour répondre à cet objectif, nous avons choisi d'utiliser une approche pluridisciplinaire combinant des études de génétique des populations (natives et introduites) à des études de biologie et d'écologie des populations invasives.

Grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires et de méthodes Bayésiennes (ABC), nous démontrons que l'invasion en Europe suit un scénario " tête de pont ", au sens où la population invasive de l'Est de l'Amérique du Nord a servi de source pour l'invasion européenne. Nos résultats confirment les soupçons d'introductions multiples dans des zones géographiquement déconnectées. En outre, l'étude de génétique des populations, associée aux mesures expérimentales des capacités de vol, indique que les capacités intrinsèques de dispersion de cette espèce sont particulièrement élevées.

Les conditions rencontrées en Europe par les populations introduites ne sont pas un frein à l'invasion. L'espèce s'accommode parfaitement des nouvelles essences de conifères rencontrées sur le continent. La polyphagie observée dans la zone native est confirmée dans la zone d'introduction européenne, constituant un atout pour l'établissement des populations. De plus, cette étude révèle les risques écologiques que cette espèce représente pour la flore native européenne. Les dégâts occasionnés semblent s'additionner à ceux des ravageurs natifs, diminuant ainsi le potentiel de régénération naturelle.

L'ensemble de ces résultats constitue une contribution à la connaissance des mécanismes sous-tendant les invasions biologiques, notamment sur la rapidité de propagation de certains invasifs, et met l'accent sur des phénomènes sous-estimés il y a encore peu de temps comme le scénario d'invasion " tête de pont ".

MOTS-CLÉS : Génétique des populations ; conifère ; impact écologique ; insectes des cônes et des graines ; invasion ; régénération naturelle ; scénario tête de pont

**European invasion of the Western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis*
a contribution to improve understanding of rapid invasions**

ABSTRACT:

During the last decades, biological invasions were observed to increase exponentially, at an unprecedented rate and magnitude, in direct relation with the human activities, especially globalization. In this context, some invasive species spread very quickly in the area of introduction. The European invasion of *Leptoglossus occidentalis* is a good example of this phenomenon. This study aimed at testing some hypotheses to explain the rapidity of this invasion. To reach this goal, we used a multidisciplinary approach combining population genetics (analyzing samples from native and invaded areas) with a study of biological and ecological characteristics of the invasive populations.

Through the use of molecular markers and Bayesian methods (ABC), we confirmed previous suspicions and demonstrated that the European invasion proceeded from multiple introductions in distant geographic areas. Our results also indicated that a primarily invaded area of Eastern North America acted as a bridgehead for the invasion in Europe. Moreover, population genetics, combined with an experimental measurement of the bug flight capabilities using flight mills, revealed that the intrinsic capacities of dispersion of this species are particularly high

The environmental conditions of the newly invaded areas in Europe did not constitute a barrier to the invasion of *L. occidentalis*. Its high degree of polyphagy was confirmed on European conifers, quite all species being susceptible to be exploited, thus favoring population establishment. Furthermore, this study highlights the ecological threat represented by this insect which can affect the native flora in Europe. Actually, bug damage which can be important, seems to be additive to those of native insects exploiting cone and seed resources, thus decreasing the potential of natural regeneration.

This work contributes to improve knowledge on biological invasions, especially to understand the reasons underlying the rapid spread observed in some invasive species, and highlights phenomenon underestimated until recently such as the Bridgehead scenario.

KEYWORDS: Population genetics; conifer; ecological impact; seed & cone insects; invasion; natural regeneration; Bridgehead scenario