

**AFPP – 4^e CONFÉRENCE SUR L'ENTRETIEN
DES JARDINS, ESPACES VÉGÉTALISÉS ET INFRASTRUCTURES
TOULOUSE – 19 et 20 OCTOBRE 2016**

**L'INVASION FULGURANTE DE LA PYRALE DU BUIS EN FRANCE ET EN EUROPE: DIVERSITE
GENETIQUE ET APPROCHE PHYLOGEOGRAPHIQUE**

A. BRAS ⁽¹⁾, C. COURTIN ⁽¹⁾, M. KENIS ⁽²⁾, A. BERNARD ⁽¹⁾, A. ROQUES ⁽¹⁾, J. ROUSSELET ^{(1)*},
M-A. AUGER-ROZENBERG ^{(1)*}

*Co-derniers auteurs (contribution égale des auteurs à l'encadrement de l'étude)

⁽¹⁾ INRA, UR633 Zoologie Forestière, Orléans, France, abras@orleans.inra.fr

⁽²⁾ CABI, Delémont, Suisse, m.kenis@cabi.org

RÉSUMÉ

La pyrale du buis *Cydalima perspectalis* Walker a été observée pour la première fois en Allemagne en 2007 et cause depuis des dégâts sur les buis en France et en Europe. Elle aurait été introduite via le commerce de plantes d'ornements entre les pays européens et la Chine tandis que le commerce au sein de l'Europe aurait facilité sa dispersion. Pour mieux comprendre les voies d'invasions, des échantillons de Chine, de Corée et de 16 pays européens envahis par *C. perspectalis* ont été analysés avec un marqueur génétique mitochondrial. En Asie, sur un ensemble de 6 sites et de 45 individus, 7 haplotypes ont été observés. En Europe, sur 184 individus, 5 haplotypes ont été rencontrés dont 4 déjà observés en Asie. Les premiers résultats n'ont pas mis en évidence de structuration des populations dans la zone d'origine, ce qui ne permet pas de définir des zones-sources potentielles avec ce marqueur. En revanche, la présence d'une diversité génétique importante en Europe associée à une structuration géographique des populations sont en faveur d'introductions multiples.

Mots-clés : insecte invasif, *Cydalima perspectalis*, commerce ornemental, phylogéographie, introduction multiple.

ABSTRACT

THE INVASION OF HIGHLY INVASIVE BOX TREE MOTH IN FRANCE AND EUROPE : GENETIC DIVERSITY AND PHYLOGEOGRAPHIC APPROACH

The box tree moth *Cydalima perspectalis* Walker was first observed in Germany in 2007. In France and more generally in Europe, it causes a lot of damage on box plants. The trade of ornamental box plants between Europe and China has been hypothesized as the invasion pathway of the insect while the trade between European countries could explain its fast expansion. To trace the invasive pathways, samples of *C. perspectalis* were collected in China, Korea and so far in 16 invaded countries of Europe. In Asia, 7 haplotypes were observed among 45 individuals sequenced into 6 localities. In the invaded area, among 184 individuals sequenced, 5 haplotypes were found and among them 4 were present in Asia. The lack of genetic structure within the native range, did not yet allow to define the potential donor regions. Nevertheless, the high and geographically structured genetic diversity observed in Europe suggests multiple introductions events.

Keywords: invasive insect, *Cydalima perspectalis*, ornamental plant trade, phylogeography, multiple introductions.

INTRODUCTION

Le niveau actuel des introductions et des invasions biologiques n'avait jamais été observé auparavant, tant au niveau du rythme que de l'ampleur (Roques *et al*, 2016). Parmi ces invasifs, le nombre d'arthropodes terrestres introduits par an en Europe est en constante augmentation avec globalement un taux d'arrivée multiplié par deux en l'espace des trente dernières années, et la majorité des espèces répertoriées sont des insectes (Roques, 2010). Au cours de la dernière décennie, près de 70% des introductions d'insectes d'importance agronomique sont imputables au secteur de l'horticulture ornementale, en particulier au commerce de plantes ligneuses (arbres ou arbustes) (Martinez *et al*, 2014). Parmi ces introductions, on observe depuis une vingtaine d'années de plus en plus d'invasions dites « fulgurantes » dans lesquelles l'établissement des espèces introduites accidentellement est suivi par une propagation très rapide de ces ravageurs au sein de leur zone d'introduction, ce qui est en grande partie permis par les échanges commerciaux (Roques *et al*, 2016). C'est notamment le cas de la punaise américaine *Leptoglossus occidentalis* Heidemann introduite en Italie en 1999 (Lesieur *et al*, 2014), du cynips du châtaignier *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu signalé pour la première fois en Italie en 2002 (Avtzis et Matošević, 2013) ou encore de la pyrale du buis *Cydalima perspectalis* mentionnée pour la première fois en Allemagne en 2007 (Krüger, 2008).

Cydalima perspectalis est un Lépidoptère de la famille des Crambidae et est présente naturellement en Chine, Corée et Japon. Cet insecte défoliateur fait son développement sur une quinzaine d'espèces du genre *Buxus* dont *B. microphylla*, très présent en Chine et utilisé en Asie comme plante ornementale dans les parcs et les jardins (Casteels *et al*, 2011). *C. perspectalis* est signalée pour la première fois en Allemagne dans la ville de Weil am Rhein en mai 2007, agglomération proche de la Suisse et de la France. Toutefois quelques pépiniéristes de la région ont rapporté avoir eu des problèmes avec des chenilles sur des buis dès 2006 (Brua, 2013). Une expansion fulgurante en Europe a suivi et elle est désormais présente dans 27 pays dont la France (Bella, 2013; Gninenko *et al*, 2014; Pérez-Otero *et al*, 2015; Beshkov *et al*, 2015; D. Matošević comm. pers.; M. Dautbasic comm. pers.; M. Kenis comm. pers.). Dans la zone d'introduction, l'insecte s'attaque à toutes les essences de buis présentes dont *Buxus sempervirens*, le buis commun endémique qui est très apprécié en ornement. L'insecte cause d'importants dégâts sur les buis ornementaux mais aussi en milieu forestier. Il a été observé pour la première fois dans notre pays en 2008 à Strasbourg et Saint Louis, villes proches des premiers foyers allemands (Feldtrauer *et al*, 2009). La pyrale du buis a ensuite été signalée en région parisienne en 2010 puis en Charente Maritime, dans les Alpes Maritimes et l'Allier en 2011 (Brua, 2013). La colonisation du territoire français a ensuite été très rapide et aujourd'hui plus de 70 départements sont concernés (Astredor & Plante & Cité, 2015).

L'importation en Allemagne de buis infestés depuis la Chine est l'hypothèse la plus fréquemment retrouvée dans la littérature pour expliquer l'arrivée de *C. perspectalis* en Europe (Casteels *et al*, 2011; Nacambo, 2012). Cette hypothèse est corroborée par les données connues sur le transport de buis ornementaux entre l'Europe et la Chine. L'intérêt du buis comme plante ornementale dont *B. sempervirens*, espèce très prisée des jardiniers professionnels et amateurs, se traduit par d'importants échanges commerciaux au sein même de l'Europe dont la France, ce qui pourrait expliquer l'expansion rapide de l'espèce sur le continent (EPPO 2012; Matošević, 2013). De plus, les premiers signalements de la pyrale du buis en France, très distants les uns des autres, laissent penser que la présence de l'insecte sur notre territoire résulte d'introductions multiples. L'objectif de notre travail est de retracer l'origine de la pyrale du buis et ses voies d'introduction en Europe et en France à l'aide de marqueurs moléculaires. Nous présentons ici les premiers résultats que nous avons obtenus avec un fragment d'ADN mitochondrial, classiquement utilisé dans les études de phylogéographie (Avisé *et al*, 1987) et qui peut servir à reconstituer les grandes lignes de l'histoire d'une invasion (Avtzis et Matošević, 2013; Garipey *et al*, 2015).

A l'heure actuelle, l'absence de données génétiques sur ce ravageur, que ce soit dans la zone d'origine ou dans la zone d'introduction, nécessite de caractériser tout d'abord (i) la diversité génétique

de l'insecte en Asie et en Europe. Les données obtenues vont ensuite nous permettre d'estimer le degré de différenciation des populations à travers l'étude de la distribution spatiale de cette diversité génétique (ii) dans la zone d'origine (conditionnant les possibilités de retracement de la source) et (iii) dans la zone d'introduction (dépendant du nombre d'introductions et des voies d'invasion) .

MATERIELS ET METHODES

ECHANTILLONNAGE

Zone d'origine

Les échantillons asiatiques utilisés dans notre étude proviennent de Chine et de Corée du Sud. Le Japon n'a pu être échantillonné. Ils ont tous été récoltés en milieu urbain entre 2012 et 2014 et proviennent de 5 localités distribuées dans 3 provinces chinoises (Beijing, Shandong, Zhejiang) et de la capitale sud-coréenne (Tableau I). A Fuyang et Pékin (figure 1), ce sont des chenilles qui ont été prélevées sur des plants de *B. microphylla*. Dans les autres localités, ce sont des papillons et l'hôte n'est donc pas connu. Au total, 45 individus ont été extraits et séquencés.

Zone d'introduction

Parmi les 27 pays attaqués à l'heure actuelle par *C. perspectalis* dans la zone d'introduction, 16 d'entre eux ont pu être échantillonnés (Tableau I). En fonction des pays, 1 à 4 localités ont été échantillonnées excepté pour la France où 11 localités ont pu être échantillonnées. Les individus collectés sont soit des adultes soit des chenilles. Les papillons ont été capturés par pièges à phéromones puis conservés à sec. Les chenilles ont été ramassées à la main sur du buis commun ornemental *B. sempervirens* sauf en Russie et en Georgie où elles ont été récoltées en milieu naturel sur le buis du caucase *B. colchica*. Après récolte, les chenilles ont été stockées dans l'alcool à 90% pour préserver l'ADN. Au total, 184 individus ont été extraits et séquencés.

ANALYSES MOLECULAIRES

L'ADN génomique de chaque individu a été extrait avec le kit NucleoSpin® Tissue XS. Nous avons amplifié un fragment d'ADN mitochondrial correspondant à une partie des gènes de la cytochrome oxydase I et II (COI, COII). Pour cela, nous avons utilisé un couple d'amorces déjà publié dans la littérature, dessiné par Zhu *et al.* (2013) pour une espèce appartenant à la même famille que la pyrale du buis, *Diaphania pyloalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) : LeCyd-F2 5' TGGAGCAGGAACAGGATGAAC 3' et Cynna-R2 5' GAGACCANTACTTGCTTTTCAG 3'. Les PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 25µL (15.8µL H₂O, 2.5µL de Dream Taq Green Buffer 10x, 2.5µL de dNTP à 10mM, 0.5 µL de MgCl₂ à 2.5mM, 1µL de chaque amorce à 10µM, 0.5µL de Bétaine (5 M) et 0.2µL de Dream Taq® à 5 U/µL). Le programme utilisé était de 5 minutes à 95°C suivi de 25 cycles d'amplification (dénaturation : 35s. à 94°C, hybridation : 45s. à 60°C, élongation : 3min. à 72°C). Les produits de PCR d'environ 1800pb ont été purifiés avec le kit NucleoFast® 96 PCR Plate. Le fragment PCR étant trop long pour être séquencé d'un seul tenant, le séquençage a été réalisé avec le kit de séquençage Big Dye® Terminator v3.1 en utilisant l'amorce Cynna (3,3µM) et l'amorce interne Jerry (5' CAACATTTATTTTGATTTTTGG 3') communément utilisée pour les Lépidoptères. Les séquences ont été précipitées à l'alcool puis analysées avec un Séquenceur ABI 3500 (Applied Biosystem®). Elles ont ensuite été corrigées à la main avec le logiciel CodonCode Aligner v3.7.1.

ANALYSES DES DONNES GENETIQUES

Les séquences ont été alignées avec le logiciel Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implémenté dans le logiciel BioEdit v.7.1. Le caractère codant de la séquence a été vérifié avec le logiciel MEGA v.6. (Kumar *et al.*, 2008). Un réseau d'haplotypes a été construit à l'aide du logiciel TCS (Clement *et al.*,

2000). Les distances génétiques intraspécifiques ont été calculées avec le logiciel MEGA 6, en utilisant le modèle sélectionné par le logiciel (Tamura à 3 paramètres avec un gamma de 200), qui prend en compte le contenu de G/C au sein de la séquence et le biais entre les événements de substitutions de type transition et transversion. Les diversités haplotypiques H et nucléotidiques P_i ont été calculées avec le logiciel DNAsp v.5. (Librado et Rozas, 2009) pour chaque localité de la zone d'origine et les différents pays de la zone d'introduction excepté la France où les calculs ont été faits pour chaque ville échantillonnée.

Une AMOVA (Analyse MOléculaire de VAriance) a été réalisée avec le logiciel Arlequin v3.5 (Excoffier et Lischer, 2010) afin de définir si il existe une structuration des populations au sein de la zone d'origine. Nous avons défini un groupe chinois et un groupe coréen (malgré la présence d'un seul échantillon coréen dans notre jeu de données). Si ces groupes sont génétiquement différenciés, la variance entre groupes doit être significativement non nulle.

Au sein de la zone d'introduction, nous avons de la même façon cherché à savoir si la diversité génétique était géographiquement structurée ou inversement répartie de manière homogène sur toute la zone échantillonnée. Pour cela, une AMOVA a été également réalisée en séparant les localités européennes en trois groupes : (1) Europe de l'Ouest comprenant l'Allemagne, la France, l'Italie, la Belgique et la Suisse ; (2) Europe Centrale comprenant la Slovénie, la Croatie, la Hongrie, l'Autriche, la Slovaquie et la Serbie ; et (3) les pays entourant la Mer Noire : la Bulgarie, la Turquie, la Russie et la Géorgie. Ces groupes ont été définis en fonction de leurs échanges commerciaux et de leur situation géographique. L'Europe de l'Ouest correspond à des pays qui sont à la fois de gros importateurs (intra et extra UE), producteurs et exportateurs de plantes ornementales vers l'Europe (Cadic et Widehem, 2006). Les pays d'Europe centrale peuvent-être définis comme petits producteurs (moins industrialisés et moins mondialisés), importateurs de plants d'ornement essentiellement depuis l'Europe de l'Ouest. Les pays entourant la Mer Noire forment un groupe historiquement, économiquement et géographiquement plus éloignés des deux autres groupes européens. Si on suppose qu'il y a eu plusieurs événements d'introduction différents, soit depuis la Chine, soit à partir des premiers foyers d'introduction, on peut s'attendre, du fait de ces différences d'échanges commerciaux, à ce que ces introductions aient été suivies par une propagation préférentielle au sein de chaque groupe, ce qui se traduirait par des groupes génétiquement différenciés (variance entre groupes significativement non nulle).

RESULTATS

DIVERSITE GENETIQUE DE LA PYRALE DU BUIS

Au total, 8 haplotypes ont été observés parmi les 229 individus séquencés de la zone d'origine et d'introduction. Le fragment obtenu est codant et de 1505pb. Le réseau d'haplotypes (Figure 1A) montre la présence de 3 haplogroupes distincts: l'haplogroupe A comprenant les haplotypes HT1, HT2, HT3 et HT8, l'haplogroupe B constitué uniquement de l'haplotype HT7 et l'haplogroupe C comprenant HT4, HT5 et HT6. La distance génétique moyenne séparant l'haplogroupe C de l'haplogroupe A ou de l'haplogroupe B est de 0,6%. Celle séparant l'haplogroupe A de l'haplogroupe B est de 0,7%.

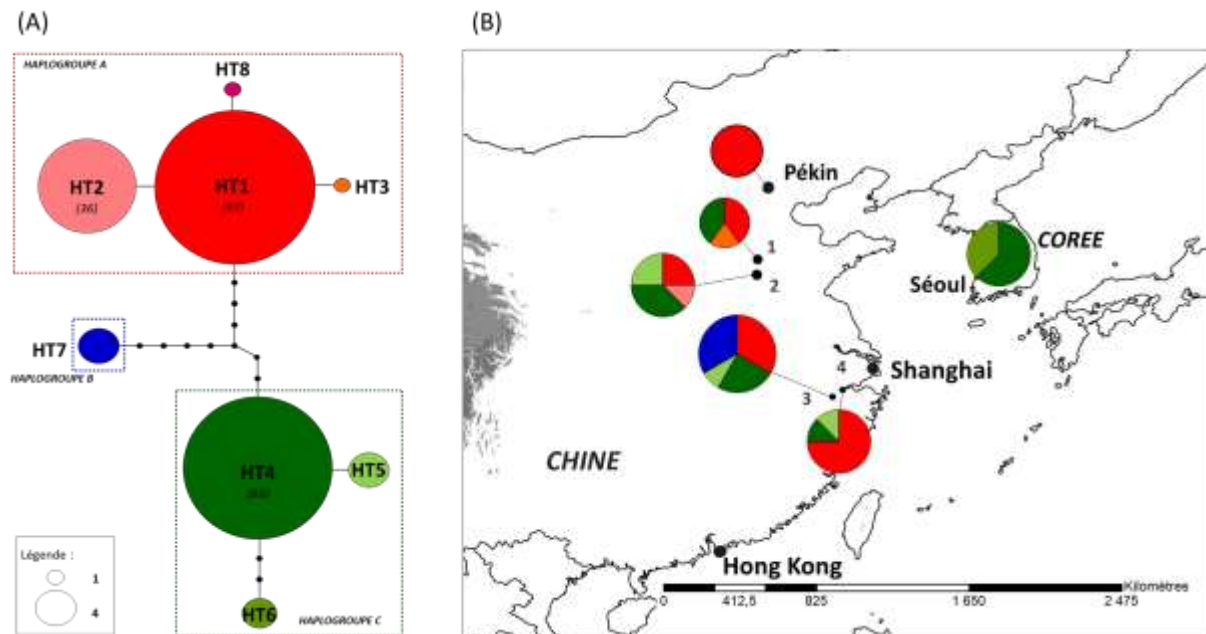
Tableau I : Liste des échantillons de *C. perspectalis* issus de la zone d'origine et de la zone d'introduction et répartition des haplotypes. N : Nombre d'individus par population, H : Diversité haplotypique (\pm Erreur Standard SD), P_i : Diversité nucléotidique (\pm SD), 1^{er} obs : Année de première observation (cf page suivante).

List of samples from the native and invaded areas of C. perspectalis and haplotypes distribution. N : Number of individuals per population, H : Haplotype diversity (\pm Standard Deviation SD), P_i : Nucleotide diversity (\pm SD), 1^{er} obs : Year of first observation.

Pays Localité	Collecte	N	Haplotypes	H	Pi	1 ^{er} obs.	Sources
Corée S. Seoul	2012	8	HT4 (5); HT6 (3)	0,54 (±0,12)	0,0008 (±0,0002)		
Chine Jinan	2012	5	HT1 (2); HT3 (1); HT4 (2)	0,80 (±0,16)	0,0032 (±0,0009)		
Taian	2012	8	HT1 (2); HT2 (1); HT4 (3); HT5 (2)	0,82 (±0,10)	0,0031 (±0,0006)		
Fuyang	2014	12	HT1 (4); HT4 (3); HT5 (1); HT7 (4)	0,77 (±0,07)	0,0042 (±0,0004)		
Hangzhou	2012	8	HT1 (6); HT4 (1); HT5 (1)	0,46 (±0,20)	0,0023 (±0,0009)		
Pékin	2013	4	HT1 (4)	0	0		
ZO		45		0,74 (±0,04)	0,0033 (±0,0002)		
Allemagne	Elevage	5	HT1 (3); HT4 (2)	0,60 (±0,18)	0,0029 (±0,0009)	2007	Bella, 2013
Autriche	2015	6	HT 4 (6)	0	0	2008	Bella, 2013
Belgique	2015	4	HT 1 (4)	0	0	2010	Bella, 2013
Bulgarie	2014-2015	6	HT2 (2); HT4 (4)	0,53 (±0,17)	0,0028 (±0,0009)	2014	Beshkov <i>et al</i> , 2015
Croatie	2014	17	HT1 (3); HT2 (1); HT4 (13)	0,40 (±0,13)	0,0019 (±0,0006)	2012	Bella, 2013
France		54	HT1 (30); HT2 (11); HT4 (7); HT5 (5); HT8 (1)	0,68 (±0,02)	0,0027 (±0,0001)	2008	Feldtrauer <i>et al</i> , 2009
Bastia	2015-2016	4	HT1 (2); HT2 (2)	0,67 (±0,20)	0,0004 (±0,0001)		
La Rochelle	2014-2016	5	HT1 (1); HT2 (4)	0,40 (±0,24)	0,0003 (±0,0002)		
Bordeaux	2015	4	HT2 (2); HT4 (2)	0,67 (±0,20)	0,0035 (±0,0012)		
Tours	2015	5	HT1 (4); HT4 (1)	0,40 (±0,24)	0,0019 (±0,0011)		
Grenoble	2014	3	HT1 (3)	0	0		
Orléans	2014	5	HT1 (2); HT4 (3)	0,60 (±0,18)	0,0028 (±0,0008)	2014	
Paris	2014	5	HT1 (5)	0	0	2010	
Lagnes	2014	10	HT1 (7); HT2 (2); HT5 (1)	0,51 (±0,16)	0,0013 (±0,0008)		
Strasbourg	2016	3	HT5 (3)	0	0	2008	
Saint Louis	2016	5	HT1 (3); HT5 (1); HT8 (1)	0,70 (±0,22)	0,0024 (±0,0012)	2008	
Nantes	2015	5	HT1 (3); HT2 (1); HT4 (1)	0,70 (±0,22)	0,0021 (±0,0011)		
Géorgie	2015	13	HT1 (4); HT2 (7); HT4 (2)	0,64 (±0,10)	0,0017 (±0,0007)	2015	M. Kenis, comm. pers.
Hongrie	2014-2015	18	HT1 (6); HT4 (12)	0,47 (±0,08)	0,0022 (±0,0004)	2011	Bella, 2013
Italie	2014	15	HT1 (1); HT2 (4); HT4 (10)	0,51 (±0,12)	0,0025 (±0,0005)	2010	Bella, 2013
Russie	2014	11	HT1 (9); HT2 (2)	0,33 (±0,15)	0,0002 (±0,0001)	2013	Gninenko <i>et al</i> , 2014
Serbie	2014	5	HT1 (2); HT4 (3)	0,60 (±0,18)	0,0028 (±0,0008)	2014	M. Glavendekic, comm. pers.
Slovaquie	2015	4	HT2 (4)	0	0	2013	Bella, 2013
Slovénie	2012-2015	10	HT1 (2); HT4 (8)	0,36 (±0,16)	0,0017 (±0,0007)	2011	G. Seljak, comm. pers.
Suisse	2012-2014	9	HT1 (9)	0	0	2007	Bella, 2013
Turquie	2014-2015	7	HT1 (4); HT2 (1); HT4 (2)	0,67 (±0,16)	0,0024 (±0,0008)	2011	Bella, 2013
ZI		184		0,66 (±0,02)	0,0025 (±0,0001)		

Figure 1 : (A) Réseau d'haplotypes COI-COII de *C. perspectalis*. Les ronds noirs correspondent à des haplotypes manquants, chaque ligne représente un pas mutational. (B) Carte de répartition des haplotypes en Asie (la taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus). 1 : Jinan, 2 : Taian,

3 : Fuyang, 4 : Hangzhou. (A) Haplotype network of *C. perspectalis* based on COI-COII. Black circles correspond to missing haplotypes and branches to mutation steps. (B) Haplotypes distribution in Asia (size circle is proportional to the number of individuals).



ZONE D'ORIGINE

Sur les 8 haplotypes mis en évidence dans l'ensemble du jeu de données, 7 ont été rencontrés parmi les 45 individus séquencés dans la zone d'origine. Deux haplotypes sont majoritaires, HT1 et HT4. En Corée, 2 haplotypes dont un privé (présent dans une seule population) ont été retrouvés à Séoul : HT4 et HT6 (Tableau I; Figure 1B). En Chine, 6 haplotypes ont été retrouvés dans les 5 villes échantillonnées. HT1 et HT4 sont présents dans toutes les localités tandis que HT5 est observé dans 3 d'entre elles. Les localités de Taian (n°2) et Jinan (n°1) présentent des haplotypes privés : HT2 et HT3 respectivement. HT7 est aussi un haplotype privé, identifié chez 4 individus à Fuyang (n°3). On n'a retrouvé que des haplotypes partagés dans la localité de Hangzhou (n°4). A l'inverse, aucune diversité génétique n'a été observée à Pékin. La diversité haplotypique H est de 0,54 à Séoul et la diversité nucléotidique Pi est de 0,0008 alors qu'elle varie entre 0,0023 (n°4) à 0,0042 (n°3) en Chine.

Les résultats d'AMOVA n'ont pas mis en évidence de structuration des populations., L'indice de fixation (Fct), et la part de variance expliquée par l'effet groupe, ne sont pas significativement différent de zéro, malgré une valeur élevée (Fct=0.32).

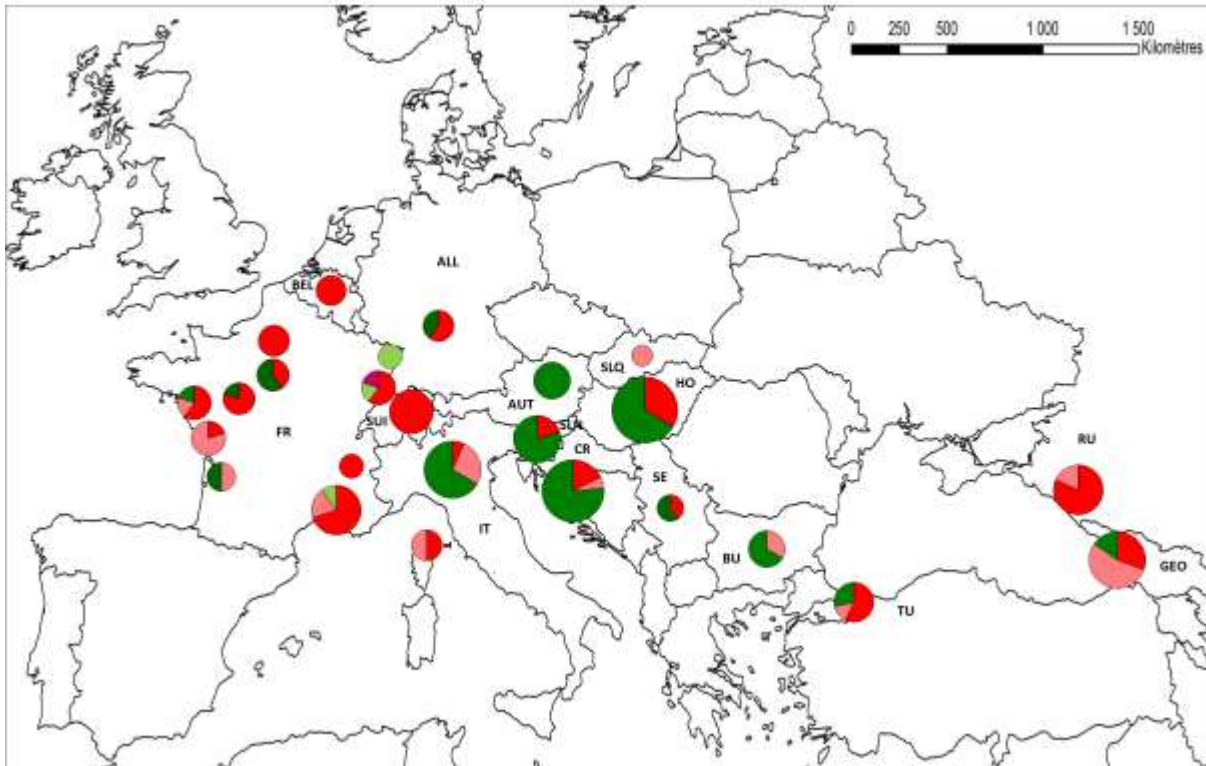
ZONE D'INTRODUCTION

Parmi les 184 individus séquencés dans la zone d'introduction, 5 haplotypes ont été identifiés. L'haplotype HT8 a été trouvé uniquement en Europe à Saint Louis (France) (Tableau I; Figure 2). Les autres haplotypes correspondent à ceux trouvés en Asie. On retrouve majoritairement les haplotypes HT1 et HT4 comme dans la zone d'origine alors que HT2 est retrouvé dans 9 des 16 pays européens échantillonnés et HT5 a été retrouvé seulement dans 3 localités françaises (Tableau I; Figure 2). Aucune diversité haplotypique n'a été observée dans 4 pays européens alors que pour les 12 autres pays, H varie de 0,33 à 0,70.

Les 5 haplotypes ont uniquement été retrouvés en France, pays où l'effort d'échantillonnage a été le plus fort (54 individus séquencés contre un total de 130 pour les 15 autres pays). Les villes de

Paris, Strasbourg et Grenoble ne présentent pas de diversité génétique alors que pour les autres localités, H varie de 0,40 à 0,70.

Figure 2 : Carte de répartition des haplotypes de *C. perspectalis* en Europe. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus. FR: France; ALL: Allemagne; BEL: Belgique; SUI: Suisse; IT: Italie; AUT: Autriche; SLN: Slovénie; SLQ: Slovaquie; CR: Croatie; HO: Hongrie; SE: Serbie; BU: Bulgarie; TU: Turquie; RU: Russie; GEO: Géorgie. *Haplotypes distribution of C. perspectalis in Europe. Size circle is proportional to the number of individuals. FR: France; ALL: Germany; BEL: Belgium; SUI: Switzerland; IT: Italy; AUT: Austria; SLN: Slovenia; SLQ: Slovakia; CR: Croatia; HO: Hungary; SE: Serbia; BU: Bulgaria; TU: Turkey; RU: Russia; GEO: Georgia.*



L'AMOVA a été réalisée en séparant la zone d'introduction en trois groupes : (1) Europe de l'Ouest, (2) Europe Centrale et (3) les pays entourant la Mer Noire. Tous les indices de fixation sont significatifs quel que soit le niveau hiérarchique choisi (Fct, p.value <0,05 ; Fsc, p.value <0,001 ; Fst, p.value <0,001). L'analyse montre que 58% de la variance génétique totale est attribuable à la variance au sein des populations et que 21% est attribuable à la variance entre populations au sein des groupes (Tableau II). La part de la variance entre groupes est de 19%, ce qui indique l'existence de groupes génétiquement différenciés dans la zone d'introduction.

Tableau II : Résultats de l'AMOVA à 3 groupes au niveau de la zone d'introduction. * : p.value < 0,05, ***, p.value < 0,001, Indice de différenciation F. Méthode de calcul : Pairwise differentiation.

*Results of AMOVA with 3 groups in the invaded area. * : p.value < 0,05, *** ; p.value < 0,001, Fixation indice : F. Computation method : Pairwise differentiation.*

Source de variation	Variance	% de variation	Indice F
Entre groupes	0,401	19,71	FCT = 0,197*
Entre populations au sein des groupes	0,445	21,86	FSC = 0,272 ***
Au sein des populations	1,190	58,43	FST = 0,416 ***
Total	2,036		

DISCUSSION

Dans la zone d'origine, un nombre assez faible d'haplotypes a été mis en évidence, contrairement à ce qui peut être observé chez d'autres Lépidoptères en Chine (Wahlberg et Saccheri, 2007; Niu *et al*, 2014). Cela peut s'expliquer par le faible nombre d'échantillons analysés à l'heure actuelle, et par la couverture géographique limitée de notre échantillonnage. La découverte d'un nouvel haplotype uniquement en France permet de supposer que toute la diversité génétique en Asie n'a pas encore été décrite, en particulier dans les forêts naturelles. En effet, nous n'avons échantillonné à ce jour que dans trois provinces et uniquement en milieu urbain où la pyrale a été importée à la faveur d'aménagements d'espaces verts et de jardins privés (M. Kenis, comm. pers.). L'absence de diversité génétique à Pékin peut d'ailleurs s'expliquer par l'introduction de *C. perspectalis* dans cette partie de la Chine via le transport de plants d'ornement (Nacambo *et al*, 2014), ses essences hôtes n'étant pas présentes dans cette région (Fang *et al*, 2011). Cependant, cette faible variabilité haplotypique chez *C. perspectalis* reste également cohérente avec la faible diversité génétique observée chez *Chilo suppressalis*, autre espèce de Crambidae présente en Chine (Meng *et al*, 2008). A l'inverse, le degré de divergence observé entre haplotypes est parfois important. Ces derniers sont répartis en 3 haplogroupes séparés d'au moins 7 pas mutationnels. La distance génétique entre ces haplogroupes est inférieure à 1%, ce qui correspond bien à des valeurs intra-spécifiques, mais cela traduit néanmoins une diversification ancienne de ces lignées mitochondriales (sans que cette histoire évolutive puisse être retracée à partir de notre échantillonnage actuel).

Si les populations asiatiques sont ou ont été structurées au cours de leur histoire ancienne, la co-occurrence géographique d'haplotypes divergents dans les villes chinoises échantillonnées pourrait être due à l'histoire récente de ces populations avec une remise en contact des différents groupes soit de manière naturelle (redéploiement après les glaciations à partir de refuges isolés) soit par l'Homme (transports accidentels). Même si certains haplotypes sont largement partagés, la présence d'haplotypes privés dans trois des quatre villes chinoises et dans la ville coréenne pourrait être en faveur d'une différenciation locale et d'une structuration de la zone d'origine. Malgré une valeur élevée de l'indice de fixation F_{ct} et de la part de la variance entre groupes (dont l'écart à zéro traduit le niveau de structuration des populations), l'AMOVA ne semble pas corroborer cette hypothèse. L'absence de significativité du F_{ct} pourrait s'expliquer par notre faible échantillonnage en Asie.

Pour le moment, l'absence de mise en évidence de structuration des populations en Asie ne nous permet pas de définir des zones-sources potentielles. Néanmoins, la Corée n'apparaît pas être une des sources les plus vraisemblables. En effet, les haplotypes observés dans la zone d'introduction ont tous été retrouvés en Chine (à l'exception de HT8 trouvé uniquement en France à ce jour), alors que la Corée présente deux haplotypes, un privé (HT6) et l'autre partagé avec l'Europe ainsi que la Chine (HT4) où il est très fréquent. Nos résultats sont donc en faveur d'une origine chinoise, ce qui est en accord avec la littérature (Nacambo *et al*, 2014). Un plus large échantillonnage en Chine et l'ajout d'échantillons provenant du Japon seront nécessaires pour infirmer ou confirmer cette hypothèse.

Dans la zone d'introduction, l'utilisation de marqueurs moléculaires permet de détecter d'éventuelles signatures génétiques liées à l'historique de l'invasion, comme la perte de diversité due à des goulets d'étranglement (Sakai *et al*, 2001). On observe une réduction de la diversité génétique dans les populations européennes de *C. perspectalis* puisque tous les haplotypes ne sont pas présents en Europe. Plus de la moitié des haplotypes trouvés dans la zone d'origine ont été mis en évidence dans celle d'introduction, avec deux-tiers de la diversité génétique en Chine retrouvée en Europe. L'existence d'une forte diversité génétique en Europe, et notamment en France, est en faveur d'introductions multiples de l'espèce, comme cela a été mis en évidence pour la chrysome des racines du maïs *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte en Europe (Ciosi *et al*, 2008) ou encore la punaise diabolique *Halyomorpha halys* Stal (Gariépy *et al*, 2015). Les résultats de l'AMOVA vont également dans ce sens. Ils ont permis de révéler que les populations européennes de pyrale du buis étaient géographiquement structurées, ce qui suggère l'existence de plusieurs événements d'introductions indépendants et d'une propagation préférentielle intra-groupe à l'origine de leur

différenciation génétique. Au vu de ce que l'on sait des échanges commerciaux intra et extra Europe (Cadic et Widehem, 2006), on peut envisager deux scénarios compatibles avec nos résultats : (i) la pyrale du buis a été introduite une seule fois en Europe depuis la Chine mais massivement, avec un fort pool génétique, et a ensuite été redistribuée dans les différents pays européens ou (2) elle a été introduite de manière répétée dans le temps et/ou dans l'espace depuis la Chine vers différents points de l'Europe. Au vu de la littérature et du fonctionnement du commerce ornemental en Europe, il est probable qu'une partie des populations déjà établies aient été redistribuées entre les pays européens et dans la région du caucase, selon un processus similaire à celui mis en évidence chez le lézard *Lampropholis delicata* De Vis (Chapple *et al*, 2013). En effet, l'introduction de *C. perspectalis* en Russie proviendrait de pieds de buis infestés importés depuis l'Italie pour les jeux olympiques de Sotchi (Gninenko *et al*, 2014). De même, l'introduction de la pyrale du buis à Paris proviendrait de buis infestés importés depuis l'Allemagne.

CONCLUSION

L'absence de mise en évidence de structure génétique dans la zone d'origine ne nous permet pas de définir des zones-sources potentielles des populations françaises et européennes de pyrale du buis. Néanmoins, les haplotypes retrouvés en France et en Europe sont en faveur d'une origine chinoise. De plus, la diversité génétique retrouvée en France et en Europe, quasi équivalente à celle observée à ce jour en Asie, ainsi que l'existence d'une structuration des populations au sein de l'Europe suggèrent que les populations du ravageur résulteraient d'introductions multiples. Un plus large échantillonnage dans les zones d'origine et d'introduction, couplé à l'utilisation de marqueurs plus polymorphes de type microsatellites, nous permettront de préciser les scénarios d'introductions de *C. perspectalis* mais également de mieux comprendre sa dispersion rapide en France et en Europe.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié du soutien financier de la région Centre Val de Loire (projet INCA). Nous remercions toutes les personnes qui nous ont fournis des échantillons : C. Burban, P. de Champsavin, E. Chatzidimitriou, A. Dupin, V. Gabor, S. Gomboc, C. Gutleben, J. Haran, A. Herz, K. Ipekda, I. Ivanova, C. Kruczkowski, C. Lopez Vaamonde, J.-C. Martin, D. Matošević, J.-E. Michaut, E. Morel, P. Pineau, G. Roux, G. Seljak, V. Shurov, J. Soors, C. Stauffer, K. Tuba, L. Van Remoortere et P. Zach.

BIBLIOGRAPHIE

- Astredhor, Plante&Cit , 2015 - Synth se 2014, Programme SaveBuxus, Volet pyrale du buis. (Visite 24.06.2016) http://www.valhor.fr/fileadmin/A-Valhor/Valhor_PDF/Innovation_PC_SynthesePyrale_Savebuxus2015.pdf
- Avis  J. C., Arnold J., Ball R. M. et al, 1987 - Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 489–522.
- Avtzis D.N., Matosevic D., 2013 - Taking Europe by storm: a first insight in the introduction and expansion of *Dryocosmus kuriphilus* in central Europe by mtDNA. *ŠUMARSKI LIST*, 137, 7-8, 387–94.
- Bella S., 2013 - The box tree moth *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) continues to spread in southern Europe: new records for Italy (Lepidoptera Pyraloidea Crambidae). *Redia*, 96, 51–55.
- Beshkov S., Abadjiev S., Dimitrov D., 2015 - *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae: Spilomelinae) – New invasive pest moth in Bulgaria. *The Entomologist's Record and Journal of Variation*, 127, 1, 18–22.
- Brua C., 2013 - La pyrale du buis, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859), espèce exotique envahissante, caractéristique de sa dynamique d'expansion en France et en Europe, des dégâts occasionnés sur les buis (*Buxus spp*) et des stratégies de lutte. Annales AFPP. Conférence sur l'Entretien des Espaces Verts, Jardins, Gazons, Forêts, Zones Aquatiques et Autre Zones non Agricoles, Toulouse (2013-10-15 - 2013-10-17).
- Cadic A., Widehem C., 2006 - L'horticulture ornementale française. Structure, acteurs et marchés, Un Point sur ..., INRA Editions, Paris (France) 2-7380-1207-8.
- Casteels H., Witters J., Vandierendonck S., Van Remoortere L., Goossens F., 2011 - First report of *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera : Crambidae) in Belgium.

Chapple D.G., Miller K.A., Kraus F., Thompson M.B., 2013-Divergent Introduction Histories among Invasive Populations of the Delicate Skink (*Lampropholis delicata*): Has the Importance of Genetic Admixture in the Success of Biological Invasions Been Overemphasized? *Diversity and Distributions*, 19, 2, 134-46.

Ciosi M., Miller N. J., Kim K. S., 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, 3614-27.

Clement M., Posada DCKA., Crandall K. A., 2000 - TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology*, 9, 10, 1657-59.

Fang J., Wang Z., Tang Z., 2011 - *Atlas of woody plants in China: distribution and climate*. Heidelberg ; New York : Beijing: Springer ; Higher Education Press.

Feldtrauer J.-F., Feltrauer J.-J., Brua C., 2009 - Premiers signalements en France de la Pyrale du Buis *Diaphania perspectalis* (Walker, 1859), espèce exotique envahissante s'attaquant aux Buis. 65, 4, 55-58.

Garipey T.D., Bruin A., Haye T., Milonas P., Véték G., 2015 - Occurrence and Genetic Diversity of New Populations of *Halyomorpha halys* in Europe. *Journal of Pest Science*, 88, 3, 451-60.

Gninenko Y. I., Shiryaeva N. V., Shurov V. I., 2014 - The box tree moth - a new invasive pest in the Caucasian Forests. *Èàðàíðèí ðàñðòáíèé Ìàóéà è ïðàéðèéà*, 36-39.

Krüger E.O., 2008 - *Glyphodes perspectalis* (Walker, 1859) - new for the European fauna (Lepidoptera: Crambidae). *Entomologische Zeitschrift mit Insekten-Börse*, 118, 2, 81-83.

Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K., 2008 - MEGA: A Biologist-Centric Software for Evolutionary Analysis of DNA and Protein Sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9, 4, 299-306.

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*, 16, 9, 1833-49.

Librado P., Rozas J., 2009 - DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. *Bioinformatics*, 25, 11, 1451-52.

Martinez M., Germain J.-F., Streito J.-C., 2014 - Actualités entomologiques : nouveaux insectes ravageurs introduits en France métropolitaine (Période juillet 2005 à juin 2014). *Annales AFPP. Colloque Ravageurs et Insectes Invasifs et Emergents, Montpellier (2014-10-21)*.

Matošević D., 2013 - Box Tree Moth (*Cydalima perspectalis*, Lepidoptera; Crambidae), New Invasive Insect Pest in Croatia. *SEEFOR (South-East European Forestry)*, 4, 2, 89-94.

Nacambo S., 2012, Parasitisme, développement, modèle climatique et impact de *Cydalima perspectalis* en Europe. Master 2, Université de Neuchâtel, 40p.

Nacambo S., Leuthardt F., Wan H. et al, 2014-Development characteristics of the box-tree moth *Cydalima perspectalis* and its potential distribution in Europe. *Journal of Applied Entomology*, 138, 1-2,14-26.

Pérez-Otero R., Mansilla J.P., Vidal M., 2015-*Cydalima perspectalis* Walker, 1859 (Lepidoptera,Crambidae): una nueva amenaza para *Buxus spp.* en la Península Ibérica. *Arquivos Entomoloxicos*, 10, 225-28.

Roques A., 2010 - 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*, 77-94.

Roques A., Auger-Rozenberg M.-A., Blackburn T M. et al, 2016 - Temporal and Interspecific Variation in Rates of Spread for Insect Species Invading Europe during the Last 200 Years. *Biological Invasions*, 18, 4.

Sakai A. K., Allendorf F.W., Holt J.S. et al, 2001 - The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32, 305-32.

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., 1994 - CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22, 22, 4673-80.

Van der Straten M., Muus T., 2010 - The box tree pyralid, *Glyphodes perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae), an invasive alien moth ruining box trees. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting*, 21, 107-11.

Zhu B.-J., Liu Q.-N., Dai L.-S. et al, 2013 - Characterization of the Complete Mitochondrial Genome of *Diaphania pyloalis* (Lepidoptera: Pyralididae). *Gene*, 527, 1, 283-91.