



HAL
open science

Composantes de la dynamique de l'interaction entre le maïs et les insectes lépidoptères foreurs de tige

Inoussa Sanane

► **To cite this version:**

Inoussa Sanane. Composantes de la dynamique de l'interaction entre le maïs et les insectes lépidoptères foreurs de tige. Amélioration des plantes. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASB018 . tel-03097916

HAL Id: tel-03097916

<https://theses.hal.science/tel-03097916v1>

Submitted on 5 Jan 2021

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

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

Composantes de la dynamique de l'interaction entre le maïs et les insectes lépidoptères foreurs de tige

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°567, Sciences du végétal : du gène à l'écosystème
(SEVE)

Spécialité de doctorat : Biologie des populations et écologie

Unités de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech, GQE - Le
Moulon, 91190, Gif-sur-Yvette, France,

et Université Paris-Saclay, CNRS, IRD, UMR Évolution, Génomes, Comportement et
Écologie, 91198, Gif-sur-Yvette, France.

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette,
le 20 octobre 2020, par

Inoussa SANANE

Composition du Jury

Valérie MECHIN

Directrice de Recherche, INRAE, IJPB

Présidente

Mathilde DUFAY

Professeure à l'Université de
Montpellier

Rapporteure

Ted TURLINGS

Professeur à l'Université Neuchâtel
(Suisse)

Rapporteur

Jean-Baptiste THIBORD

Responsable du pôle ravageur et
méthodes de lutte d'ARVALIS

Examineur

Christine DILLMANN

Professeure à l'Université Paris-Saclay

Directrice de thèse

Frédéric MARION-POLL

Professeur à l'Université Paris-Saclay

Directeur de thèse, invité

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier la Banque Islamique de Développement (BID) pour m'avoir accordé une bourse de doctorat (N° BID : 600033174). Ensuite, tous mes remerciements vont à l'endroit de Christine Dillmann et de Frédéric Marion-Poll qui m'ont encadré tout au long de ces 3 années. Travailler à vos côtés a été une expérience très enrichissante et même un grand plaisir pour moi. Je me rappelle comme si c'était hier lorsque j'étais à la recherche d'une Université d'accueil après l'obtention de la bourse. Merci Frédéric, je n'oublierai jamais votre réponse à mon mail qui a marqué le début de cette aventure. A Christine, malgré vos cours à l'Université et vos responsabilités à la direction de l'UMR GQE, vous avez toujours été disponible pour moi y compris au détriment de vos week-ends et vacances, un très grand merci.

Je remercie Valérie Méchin, Mathilde Dufay, Ted Turlings et Jean-Baptiste Thibord pour avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse. Un très grand merci à Judith Legrand, Adrienne Ressayre et Rozenn Le-Guyader pour vos aides à de multiples reprises, aussi bien pour les analyses de données que pour les relectures. Je remercie Denis Thiery, David Siaussat, Anne Genissel, Brigitte Gouesnard, Judith Legrand, Laure Kayser et François Rebaudo qui ont tous été membres de mon comité de thèse. Vos apports et conseils m'ont permis de recadrer mes objectifs. Je n'oublierai pas ces moments passés dans les champs avec toute l'équipe BASE (Biologie de l'Adaptation et Systèmes en Evolution) à la recherche des larves de pyrales, merci en particulier à Nathalie Galic et à Élodie Marchadier pour vos aides. Je remercie également Stéphane Nicolas, Cyril Bauland, Sophie Pin pour leurs appuis à la réalisation du projet core-panel dont le financement a été assuré par l'IDEEV (Institut Diversité, Ecologie, Evolution du Vivant). Mes remerciements vont également à l'endroit de Nathalie Faure de la plate-forme Cultures en Environnements Contrôlés de l'UMR EEP de Lille, Matthieu Reymond et Valérie Méchin de l'équipe Qualité de la biomasse et interactions avec la sécheresse de l'IJPB (Versailles) pour nos collaborations sur les analyses biochimiques. Je remercie Marion Giraud de Bioline AgroSciences pour son aide à la préparation du milieu pyrale. Merci également à Rémi Jeannette et Paul-André Calatayud pour leurs aides pour l'élevage des lépidoptères et l'identification des chrysalides. A tous mes collègues doctorants et post-doctorants : Julia M., Arnaud D.-P., Maroua F., Charlotte C., Andreas O., Cécile C., Julie C., Romain B., Vincent L., Perrine C., Edith G., Claudia S. et Hilaire K., je vous remercie pour ces agréables moments d'échanges. Je remercie toute l'équipe Pôle Comportement pour l'ambiance agréable. Un grand merci à l'ensemble des personnes que j'ai côtoyé au cours de la thèse dans les UMR GQE-Le Moulon et EGCE.

Un Grand merci à ma cousine Adeline, Antoine et Assami, ces aller-retours à Limoges à vos côtés m'ont vraiment fait du bien, ils ont été les moments conviviaux pendant ma thèse. Mes partenaires et promotionnaires de longue date, merci à vous, Elisée E. Dabré et Antoine Waongo. Merci à vous, Dramane S. et Amado S. pour votre confiance. Grâce à vous, malgré la distance, tous mes projets au pays se sont réalisés sans la moindre difficulté.

A vous, Pr Antoine SANON et Pr Prosper N. ZOMBRE respectivement mes professeurs à l'Université de Ouagadougou et l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, je vous dis merci. Vous avez toujours été à mes côtés malgré mon appartenance à un milieu professionnel autre que le vôtre. Vos conseils et encouragements à multiples reprises ont fini par me convaincre que je pouvais y arriver un jour.

Merci à vous, mes collègues et doyens de la Direction de la Protection des Végétaux et du Conditionnement (DPVC) et du Ministère de l'Agriculture du Burkina Faso **ma très chère Patrie**. Je vous dis grand merci pour vos messages d'encouragement et de réconfort.

A toi Papa Boukary SANANE et Maman Maïmouna ZAMPALIGRE juste merci, les mots me manquent pour décrire tous mes sentiments. Merci également aux oncles, tontons, tantes, beaux-parents, la liste est tellement longue que je n'ose pas vous citer nominativement.

A mes trois anges, mon épouse **Roukiatou SANANE/OUEDRAOGO**, mon fils **Arfan Abdoul-Nourou SANANE** et ma fille **Riyada SANANE**, vous remercier ne serait pas suffisant. A vous trois je dédie cette thèse.

Listes des abreviations

AGPM : association générale des producteurs de maïs

CWR : cell Wall residue

ADF : acid detergent fiber

ADL : acid detergent lignin

FAest / eth : acide férulique estérifié / étherifié

G : sous unités guaiacyles

H : sous unités p-hydroxyphényles

IVCWRD : in vitro cell wall residues digestibility

IVDMD : in vitro dry matter digestibility

KL : lignine Klason

MS : matière sèche

NDF : neutral detergent fiber

NIRS : near-infrared spectroscopy

PC : acide p-coumarique

PCest : acide p-coumarique estérifié

QTL : quantitative trait locus

S : sous unités siryngyles

MS : matière sèche

Medflo : mediane de la floraison

Mhau : hauteur des plantes

Pdsgreen : poids frais des parties vertes de la plante

Fatot : acides féruliques estérifié + étherifié

QTL : quantitative trait locus

LFNB : nombre de feuilles

Table des matières

Chapitre 1	1
Introduction	3
1. Relation plantes-insectes ravageurs	3
1.1 Stratégies de défense des plantes	4
1.1.1 Défenses physiques	4
1.1.2 Défenses chimiques.....	6
1.1.3 Stratégie d'évitement.....	9
1.1.4 Tolérance.....	9
1.2 Coût de la défense	10
1.3 Le compromis entre croissance et défense	12
1.3.1 Hypothèse de la défense optimale	13
1.3.2 Hypothèse du ratio carbone/azote ou des contraintes environnementales	14
1.3.3 Hypothèse du taux de croissance ou disponibilité de ressources	14
1.3.4 Hypothèse du compromis entre croissance et différenciation.....	16
2. Le maïs et la pyrale du maïs.....	18
2.1 L'importance du maïs.....	18
2.2 La pyrale du maïs	19
2.2.1 Cycle biologique de la pyrale du maïs	20
2.2.2 Choix de ponte	21
2.2.3 Le mouvement des larves.....	22
2.2.4 Les dégâts provoqués par la pyrale	24
3. Expériences de sélection divergente du Plateau de Saclay	27
3.1 Les expériences de sélection divergente de Saclay	28
3.2 Résultats de l'expérience de sélection divergente.....	30
4. Objectifs et démarche.....	33
Chapitre 2	35
2.1 A semi-automated design for high-throughput Lepidoptera larvae feeding bioassays	39
2.2 Résultats complémentaires sur la mise au point des tests de consommation.....	65
2.3 Conclusions	83
Chapitre 3	85
Compromis entre croissance et défense pour la précocité de floraison chez le maïs.....	89
3.1 Introduction	89
3.2 Matériel et méthodes	92
3.2.1 Matériel animal	92
3.2.2 Matériel végétal.....	92

3.2.3	Tests de consommation	94
3.2.4	Obtention des données	95
3.2.5	Analyse de données.....	96
3.2.6	Prévalence de la pyrale au champ	98
3.2.7	Caractérisation des plantes de l'expérience de sélection divergente	100
3.2.8	Date de floraison et hauteur des plantes.....	100
3.2.9	Analyses biochimiques	100
3.2.10	Analyses statistiques	103
3.3	Résultats	105
3.3.1	Appétence des larves de pyrales pour des disques foliaires de plants de maïs prélevés au champ.....	105
3.3.2	Prévalence des dégâts de pyrale.....	108
3.3.3	Composition chimique des plantes	112
3.4	Discussion	117
3.5	Reference.....	119
3.6	Données supplémentaires	123
Chapitre 4.....		129
Evaluation d'un panel de 18 lignées de maïs d'Europe et d'Amérique pour l'appétence à <i>Ostrinia nubilalis</i> Hübner (Lepidoptera : Crambidae)		133
4.1	Introduction	133
4.2	Matériel et Méthode	135
4.4.1	Matériel animal	135
4.4.2	Matériel végétal.....	135
4.4.3	Obtention de données de consommation	138
4.4.4	Analyse de données de consommation	141
4.4.5	Corrélations avec le métabolisme des plantes.....	142
4.3	Résultats	143
4.3.1	Les larves de pyrales ont des préférences pour certaines lignées	143
4.3.2	L'appétence des larves est faiblement corrélée avec la précocité de floraison.....	145
4.3.3	Les différences d'appétence peuvent être reliées aux caractéristiques biochimiques des lignées	147
4.4	Discussion	149
4.5	Bibliographie.....	151
4.6	Données supplémentaires	155
Chapitre 5.....		159
Discussion et perspectives		161

Bibliographie générale	165
Annexes	183

Chapitre 1

Introduction

Comme pour tous les êtres vivants, le phénotype des plantes est déterminé par leur génome et l'histoire de leurs interactions avec l'environnement physique ou vivant tout au long de leur cycle. Les caractères phénotypiques peuvent changer en réponse à un signal environnemental (plasticité) ou rester constants pour un même génotype. L'étude des interactions entre espèces permet de mieux comprendre le rôle de chacun des partenaires au sein d'un écosystème. Les interactions indirectes sont les situations de compétition pour une ressource commune. Les interactions directes, ou symbioses, peuvent être classées selon les avantages qu'en retire chaque espèce. On parle de mutualisme lorsque l'interaction est à bénéfices réciproques, de commensalisme lorsqu'elle avantage un partenaire mais reste neutre pour les autres partenaires, et de parasitisme lorsque l'interaction bénéficie à un partenaire au détriment des autres.

Dans ce chapitre, je m'intéresserai plus particulièrement aux relations de parasitisme entre les plantes et les insectes ravageurs, et au rôle des plantes dans cette relation. Je parlerai tout d'abord des stratégies de défense des plantes, et des hypothèses permettant d'expliquer la variabilité des réponses observées. Ensuite, je présenterai les modèles d'étude choisis pour la thèse, la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*, Hübner) (Lepidoptera : Crambidae) et les populations de maïs (*Zea mays* L.) utilisées. Ces éléments forment la toile de fond des questions auxquelles j'ai essayé de répondre au cours de ma thèse, questions qui visent à mieux comprendre si les mécanismes de défense mis en place par les plantes interagissent directement avec les mécanismes de croissance et de reproduction, en prenant pour exemple le maïs et un de ses ravageurs principaux, la pyrale du maïs.

1. Relation plantes-insectes ravageurs

Le cycle de vie des plantes comprend des phases de développement, de croissance et de différenciation, et des phases de reproduction. Pour assurer leur succès reproducteur, les plantes doivent non seulement trouver des ressources nutritives et écologiques (température, lumière) qui leur permettent de se développer, former des organes reproducteurs et résister aux aléas climatiques, mais aussi faire face à leurs compétiteurs, ainsi qu'aux attaques des agents pathogènes et des animaux herbivores. Au cours de l'évolution, de nombreuses stratégies ont été développées par les plantes pour se défendre contre leurs ennemis. Ces stratégies passent par la mise en place de barrières physiques, la production de composés chimiques, la capacité à réparer les dégâts mais aussi à éviter les attaques (Belsky *et al.*, 1993 ; Jost & Jost-Tse, 2016).

Parmi les espèces parasites des plantes, les insectes ravageurs sont particulièrement étudiés en raison des dégâts importants qu'ils peuvent faire subir aux cultures. Ces dégâts sont à la fois

directs, en consommant les parties vivantes ou les organes reproducteurs, et indirects, en favorisant ou en transmettant activement des agents pathogènes ou en altérant la qualité des récoltes.

1.1 Stratégies de défense des plantes

On peut classer les stratégies de défense des plantes en trois grandes catégories. D'une part, les stratégies de défense qui consistent à empêcher ou à limiter les attaques. Il peut s'agir de *défenses physiques* comme la présence de trichomes pour limiter le déplacement des insectes ou des larves, ou le renforcement des parois cellulaires pour limiter les attaques des herbivores. La défense peut aussi consister en la production de *composés chimiques* ou de métabolites secondaires (Sauvion *et al.*, 2013 ; Pagare *et al.*, 2015 ; Jost & Jost-Tse, 2016 ; Ahmed, Arshad, & Khan, 2017). D'autre part, les *stratégies d'évitement* permettent à certaines espèces de modifier leur phénologie pour échapper aux attaques des herbivores (Belsky *et al.*, 1993). Enfin, les *stratégies de tolérance* permettent à la plante de compenser ou réparer les dégâts provoqués par l'insecte.

1.1.1 Défenses physiques

Les défenses physiques des plantes sont définies comme des modifications morphologiques de la surface des organes où de la texture où de la dureté des organes qui empêchent ou réduisent la consommation, ou altèrent les pièces buccales des herbivores. Ces défenses physiques peuvent concerner toutes les cellules de l'épiderme (par exemple l'inclusion de cristaux dans l'épiderme des herbacées) ou se manifester par la présence de feuilles modifiées (par exemple les épines dans les rosacées ou beaucoup de plantes xérophytes), ou encore par des cellules épithéliales particulières comme les trichomes.

Les trichomes forment des expansions de la surface des feuilles, rendant la progression des micro-herbivores difficile et à leur accès aux feuilles (Zalucki, Clarke, & Malcolm, 2002). Par exemple, la comparaison entre des plantes sauvages et des mutants sans trichomes d'*Arabidopsis lyrata* montre que la présence de trichomes réduit la ponte et les dégâts des larves de la teigne des crucifères *Plutella xylostella* (Sletvold *et al.*, 2010). Outre leur rôle de défense physique, ces trichomes peuvent également avoir un rôle de défense chimique car ils sont souvent spécialisés dans l'accumulation de substances volatiles, toxiques ou même ayant un effet phéromonal.

Le renforcement des cellules de l'épiderme peut impliquer d'autres mécanismes que l'inclusion de cristaux. L'épaisseur de la paroi cellulaire détermine sa rigidité et peut freiner la consommation par des larves. Ainsi, on a observé que la rigidité de la paroi cellulaire des feuilles de maïs est associée à une résistance accrue contre *O. nubilalis* (Bergvinson, Arnason, & Pietrzak, 1994b ; Bergvinson *et al.*, 1994a). C'est le cas également pour *Agrotis ipsilon* qui éviterait les feuilles de plantes âgées à cause de leurs propriétés biomécaniques (Hong, Williamson, & Held, 2012). Parmi

les facteurs de résistance liés à la rigidité des parois, on note la composition de la paroi cellulaire en hémicellulose, cellulose et lignine (Buendgen *et al.*, 1990 ; Barros-Rios *et al.*, 2011 ; Santiago *et al.*, 2017), mais aussi le renforcement de la paroi cellulaire par des acides phénoliques, dont l'acide paracoumarique et l'acide férulique (Krakowsky *et al.*, 2004 ; Santiago & Malvar, 2010 ; Santiago, Barros-Rios, & Malvar, 2013 ; Santiago *et al.*, 2017).

Plusieurs travaux ont démontré l'existence d'une forte corrélation entre les composants de la paroi cellulaire et les dégâts de la pyrale (Bergvinson *et al.*, 1994a ; Cardinal & Lee, 2005). Ces travaux ont porté sur la détection de QTLs (Krakowsky *et al.*, 2004) et des études de génétique d'association génome wide (Li *et al.*, 2016). Santiago *et al.* (2016) ont observé que les variétés à forte teneur en acide diférulate estérifié sont moins digestibles par les ravageurs ; elles ont aussi des tiges de plus grande taille et un meilleur rendement en grain que les variétés à faible teneur en acide férulique estérifié.

La teneur en silice contribue aussi à renforcer les barrières physiques dans la plante contre les ravageurs (Buendgen *et al.*, 1990). En effet, les essais de maïs sur des sols riches en silice ont montré une réduction de 49% des dégâts de pyrale sur les feuilles (Coors, 1987). L'usure des dents chez de nombreux mammifères herbivores est liée directement à la présence de cristaux dans les feuilles, usure contournée par une croissance continue des molaires (Korth *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2009). Chez les larves d'insectes herbivores, la dureté des feuilles et/ou des parois cellulaires affecte également la forme et la dureté des mandibules (Bernays *et al.*, 1991).

1.1.2 Défenses chimiques

Les défenses chimiques sont constituées par la production de métabolites secondaires, des produits issus de la biosynthèse des métabolites primaires (Fig 1), molécules indispensables à la vie, au développement et à la reproduction de la plante (Royer, 2013 ; Pagare *et al.*, 2015 ; Ahmed *et al.*, 2017). Les métabolites secondaires sont des composés organiques qui ne sont pas directement impliqués dans la croissance et la reproduction ; ils sont généralement utilisés dans la pharmacutique, la cosmétique, dans divers produits industriels et comme additifs alimentaires (Compean, 2014 ; Tiwari & Rana, 2015). Ils sont impliqués dans la protection de la plante contre les stress biotiques et abiotiques et se répartissent en 3 grandes familles de composés : les alcaloïdes, les terpènes et les composés phénoliques et leur dérivés (Bratt, 2000 ; Cambier, Hance, & De Hoffmann, 2000 ; Chen, 2008 ; Howe & Jander, 2008 ; Regnault-Roger, Philogène, & Vincent, 2008 ; Sauvion *et al.*, 2013 ; Tiwari & Rana, 2015). Les alcaloïdes sont des composés azotés synthétisés à partir des acides aminés alors que les terpènes et les composés phénoliques sont synthétisés à partir des acides carboxyliques (Foyer, Noctor, & Emden, 2007 ; Jost & Jost-Tse, 2016). Ces composés de défense peuvent être produits de façon constitutive (toujours présents dans la plante et par exemple stockés dans des vacuoles), ou induite sous l'action de stimulus extérieur (Ballaré, 2014 ; Jost & Jost-Tse, 2016 ; Verdugo, Francis, & Ramírez, 2017). Ils sont impliqués en général dans plusieurs mécanismes de défenses incluant l'antibiose et/ou l'antixénose.

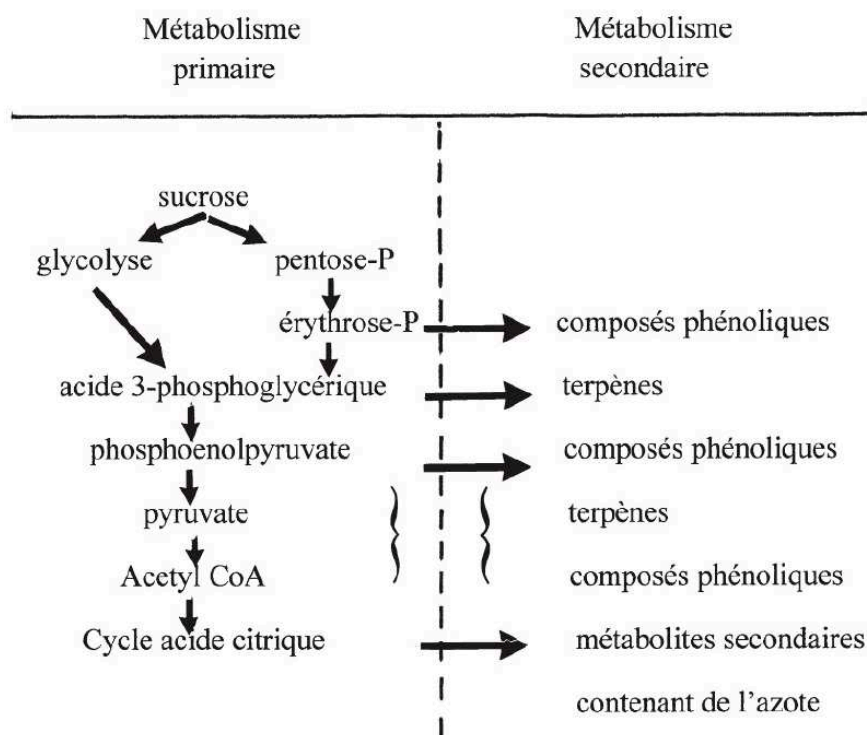


Figure 1 : Schéma des voies majeures de biosynthèse des métabolismes secondaires (Jost & Jost-Tse, 2016).

L'antibiose est une association entre deux ou plusieurs organismes qui inhibe la biologie d'au moins un d'entre eux, ou une association antagoniste entre un organisme et les composés chimiques produits par l'autre (Painter, 1951). Les composés chimiques et certaines structures de la paroi des plantes peuvent jouer un rôle inhibiteur chez plusieurs pathogènes dont les champignons et les bactéries, et affecter la physiologie et le comportement alimentaire de certaines larves d'insectes (Sauvion *et al.*, 2013).

Chez le maïs, le composé secondaire le mieux connu est le DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-méthoxy-1,4-benzoxazine-3-one), qui est un benzoxazinoïde produit par certaines variétés de maïs. Le DIMBOA inhibe la digestion chez la pyrale (Mumm & Hilker, 2006 ; Wouters *et al.*, 2016), entraînant une réduction du poids des larves et des chrysalides, et de la durée de vie des adultes (Campos *et al.*, 1989, 1990 ; Yan *et al.*, 1996 ; Santiago *et al.*, 2017). Il est synthétisé par les jeunes plantules (Cambier *et al.*, 2000). Les variétés de maïs produisant cette molécule sont dites résistantes, en particulier contre la première génération de la pyrale de maïs (Mihm, 1997 ; Niemeyer, 2009). Le DIMBOA est également efficace contre d'autres lépidoptères tels que *Diatraea grandiosella* et *Spodoptera frugiperda*.

Ainsi, des essais ont montré que le poids des larves nourries sur les variétés de maïs ne produisant pas de DIMBOA (variétés sensibles) était 2 fois supérieur à celui de larves nourries sur des variétés résistantes (Mihm, 1997). De même les larves de *S. frugiperda* ayant consommé les disques prélevés chez les variétés sensibles croissent plus vite que celles des variétés résistantes (Jin, 2017). Enfin, on observe une réduction des dégâts (trous d'entrée, nombre et longueur des galeries) causés par la sésamie (*S. nanogrioides*) chez les lignées de maïs résistantes (Butrón *et al.*, 1998).

L'antixénose ou la non-préférence décrit la situation où l'attraction du ravageur pour une plante dépend de la qualité de l'hôte et/ou des composés volatils (Painter, 1951) ou gustatifs. Ces composés peuvent avoir plusieurs fonctions de défense et de signal. Les substances de défense peuvent avoir un effet insecticide et/ou anti-nutritif (affectant ainsi la qualité de l'hôte). Les substances sémiochimiques (ayant un rôle de signal) n'ont pas forcément d'impact sur la physiologie des herbivores, mais elles affectent leur comportement de prise de nourriture, et peuvent jouer un rôle dissuasif au même titre que la forme et la couleur des feuilles.

Ces substances sémiochimiques des plantes peuvent être attractives ou répulsives pour l'alimentation et la ponte des ravageurs. Ainsi, les adultes de pyrale du maïs (*O. nubilalis*) sont attirés par certains composés volatils contenus dans les feuilles (Lupoli *et al.*, 1990 ; Udayagiri & Mason, 1997). Les pontes d'œufs peuvent aussi varier en fonction de la quantité de composés volatils émis par la plante. Chez la sésamie, il a été observé que le nombre d'œufs pondus sur une plante change avec la quantité de composés volatils émis par la plante (Konstantopoulou, Krokos, & Mazomenos, 2004). Les études de déplacement des jeunes larves de plante à plante montrent aussi qu'elles peuvent être attirées par certains composés volatils émis par les plantes (Piesik *et al.*, 2013 ; Rharrabe, Jacqui-Joly, & Marion-Poll, 2014).

Chez le maïs, il existe une variabilité génétique au sein de l'espèce pour la quantité et la qualité de composés volatils émis (Degen *et al.*, 2004). C'est vrai aussi chez d'autres espèces de plantes (Dufaj, 2003). De même, certaines variétés de maïs sont plus résistantes que d'autres à la consommation par des larves d'insectes herbivores (Robinson, Klun, & Brindley, 1978), et le niveau de résistance dépend de la qualité nutritive des plantes (Goldstein, Mason, & Pesek, 2010 ; Razzo & Mason, 2012). L'attractivité de certaines lignées de maïs pour les ravageurs détermine leur niveau de résistance. Ainsi, des lignées moins attractives ont montré un faible niveau de dégâts à une infestation artificielle de sésamie (*S. nanogrioides*) (Butrón *et al.*, 1998). Ces observations indiquent que les facteurs sémiochimiques peuvent être sélectionnés et sont héréditaires, au même titre que les facteurs de résistance classiques responsables de l'antixénose.

1.1.3 Stratégie d'évitement

L'évitement est une stratégie mise en place par certaines espèces de plantes pour échapper aux attaques des ravageurs (Belsky *et al.*, 1993). Les plantes peuvent modifier leur phénologie ou certains caractères phénotypiques pour échapper aux attaques de ravageurs. C'est le cas du fenouil potamot *Potamogeton pectinatus* qui est capable de réguler la profondeur de ces tubercules pour échapper à la prédation du cygne de Bewick (*Cygnus columbianus*) lorsqu'il détecte leur présence (Hidding *et al.*, 2012). L'évitement peut aussi porter sur la vitesse de développement. C'est le cas pour *gemmifera*, une sous-espèce d'*Arabidopsis halleri* qui peut modifier sa date de floraison lorsqu'elle détecte la présence de ravageurs. En effet, des essais en milieu naturel ont montré que *gemmifera* fleurit plus tôt, avant l'émergence des larves de *Phaedon brassicae* lorsqu'elle a été exposée à des insectes adultes (Kawagoe & Kudoh, 2010). Chez d'autres espèces, c'est un retard de la date de floraison qui leur permet d'échapper aux attaques d'herbivores. Par exemple, la floraison tardive chez la lobélie syphilitique (*Lobelia siphilitica*) lui permet d'échapper aux attaques de son parasite *Cleopmiarus hisdulus* (Parachnowitsch *et al.*, 2012). Chez le maïs également, un retard de floraison permet aux plantes d'être plus résistantes à la deuxième génération de pyrales en Espagne (Ordas *et al.*, 2013).

1.1.4 Tolérance

Les plantes tolérantes sont capables de croître et de se reproduire, ou de réparer leurs blessures, malgré la pression des ravageurs (Painter, 1951). On a ainsi observé que certaines plantes de maïs pouvaient produire plus de biomasse après avoir subi une défoliation manuelle (Collantes, Gianoli, & Niemeyer, 1998). Le plus souvent la tolérance est associée à un autre mécanisme de défense de la plante, mais son expression peut être masquée par certaines conditions environnementales. Pour Franeta *et al.* (2019), la tolérance pourrait être liée à l'antibiose et elle est difficile à quantifier au sein d'une même espèce. Ainsi, chez le maïs, plusieurs QTLs identifiés sont impliqués en même temps dans plusieurs mécanismes, dont la tolérance contre certains ravageurs de feuilles, foreurs de tiges et dans les défenses chimiques et physiques (Meihls, Kaur, & Jander, 2012). Cependant, les travaux de Butrón *et al.* (1998) sur les mécanismes de défense chez certaines lignées de maïs et leurs hybrides n'ont pas pu mettre en évidence l'existence simultanée de la tolérance et de l'antibiose. Les lignées qui expriment la tolérance contre la sésamie (*S. nanogrioides*) n'ont pas d'antibiose et vice versa. La même observation avait été faite par Mihm (1997) sur la tolérance à *S. frugiperda*.

Pour conclure, les plantes, pour mieux résister aux attaques des différents pathogènes et ravageurs, mettent en place plusieurs stratégies de défense dont l'évitement, la production de défenses physiques et chimiques, ou la tolérance. La mise en place de ces stratégies est probablement coûteuse pour la plante, car elle implique la synthèse de composés ou d'organes, ou des décalages des périodes de croissance.

1.2 Coût de la défense

La production des défenses nécessite une mobilisation d'énergie pour la biosynthèse, la modification, le transport, le stockage de nouveaux composés, mais aussi pour assurer les fonctions de maintenance (Strauss *et al.*, 2002 ; Stamp, 2004; Züst & Agrawal, 2017). Ce coût peut varier d'une plante à une autre. Il dépend de la disponibilité des ressources, du taux de renouvellement des métabolites, de leurs caractéristiques chimiques et de leur coût de production (Skogsmyr & Fagerström, 1992 ; Cipollini, Walters, & Voelckel, 2017). Il peut se quantifier par différentes mesures comme la quantité de dioxyde de carbone (CO₂) requise par gramme (g) de métabolite produit, le taux de photosynthèse, ou la baisse de rendement¹. Ainsi, la production de trichomes chez *Arabidopsis lyrata*, qui lui confère une résistance contre la teigne des crucifères *Plutella xylostella*, entraîne une réduction de la taille des rosettes (Sletvold *et al.*, 2010). De même, l'induction de la défense par le jasmonate chez *Nicotiana attenuata* entraîne la baisse du nombre de grains (Baldwin, 1998). Cependant, en présence de ravageurs, la baisse de rendement est moins importante chez les plantes induites que chez les plantes non induites par le jasmonate. Chez les sapins, le processus de différenciation des canaux résinifères initié par certaines espèces en conditions de stress entraîne une baisse de la croissance de la plante (Ferrenberg, Kane, & Langenhan, 2015). Han & Lincoln (1994) ont aussi démontré que *Diplacus aurantiacus* perd 2,1 g de biomasse en investissant 2,52 g de son glucose pour produire 1 g de résine. Pour le taux de photosynthèse, un modèle mathématique a montré que la production de glucosinolates chez les *Brassicaceae* augmente la photosynthèse de 15% au moins (Bekaert *et al.*, 2012), en conditions de ressources non limitantes. L'augmentation de la photosynthèse au profit de la synthèse de glucosinolates entraîne une réduction de l'énergie allouée pour la croissance des feuilles de rosettes. Le coût peut aussi varier selon le type de molécule produite. Par exemple, la production des alcaloïdes est plus coûteuse que celles des glucosides cyanogènes et terpénoïdes. En effet, leur

¹ Rendement : Production de grain ou de biomasse, caractères morphologiques comme taille des fleurs, taille des rosettes etc.

production nécessite respectivement 5, 2,8 et 2,6 g de CO₂ par gramme (g) de métabolite (Gulmon & Mooney, 1986). Le coût de la défense peut aussi se mesurer en termes de métabolites primaires alloués à la biosynthèse de métabolites secondaires. L'induction des mécanismes de défense chez *Nicotiana attenuata* entraîne la production de métabolites secondaires comme la nicotine, la caffeoylputrescine, la dicafeoylspermidine et le 17-hydroxygeranylinalool diterpene glycosides (DTGs). Inversement, on observe une réduction des substances de réserve (l'amidon) et de plusieurs métabolites primaires incluant le glucose, le fructose et le sucrose dans les feuilles, puis une diminution de la croissance (Machado, Baldwin, & Erb, 2017). Le coût de l'allocation de l'énergie pour la production de métabolites secondaires est la réduction des sucres solubles, puis la croissance des feuilles.

Ainsi, l'investissement des plantes dans la production de composés de défense a un coût énergétique qui se traduit par une diminution de l'investissement dans d'autres fonctions, ou alors par une utilisation plus importante des ressources. A ressources constantes, une plante ne peut pas investir à la fois dans toutes ses fonctions et un compromis doit être trouvé entre les fonctions de croissance et celles de défense (Garland, 2014). La production des défenses, bien qu'elle soit coûteuse, permet cependant à certaines plantes de maximiser leur valeur sélective (Cipollini *et al.*, 2017).

1.3 Le compromis entre croissance et défense

Ce compromis existe du fait que les plantes, pour maximiser leur fitness, doivent simultanément assurer au moins trois fonctions importantes : la croissance, la reproduction et la défense contre les agressions (Herms & Mattson, 1992a ; Stamp, 2003 ; Cipollini *et al.*, 2017). Lorsque les ressources sont limitées, l'allocation à une fonction se fait au détriment des autres (Fig 2).

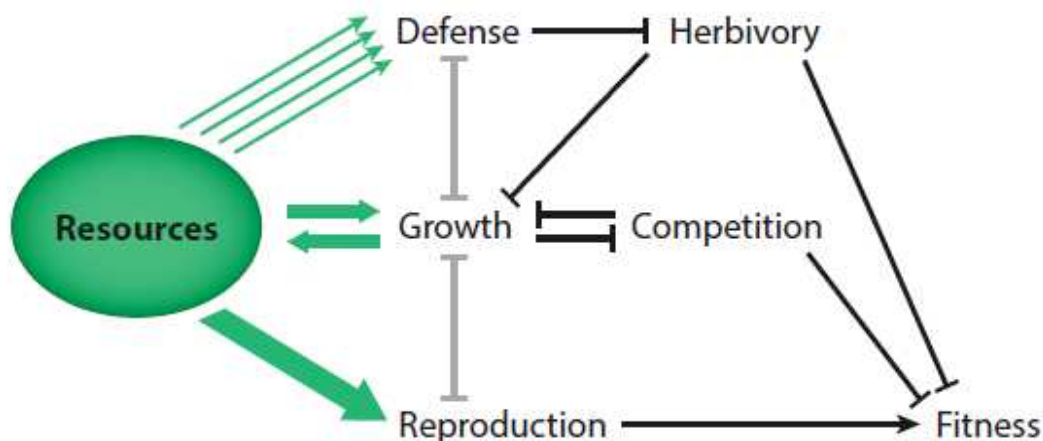


Figure 2 : Compromis entre croissance et défense et entre croissance et reproduction. Les flèches représentent une relation positive, les barres une relation négative (Züst & Agrawal, 2017).

La fonction de croissance joue un rôle particulier puisqu'elle consomme des ressources, mais en produit aussi, au travers de l'augmentation des surfaces photosynthétiques. La croissance d'une plante augmente sa compétitivité, mais elle est ralentie par la compétition avec d'autres plantes. Enfin, les défenses limitent l'impact des herbivores, mais ces derniers limitent aussi la croissance. Au total, on attend une corrélation négative entre des caractères liés aux défenses des plantes et les caractères liés à la croissance et la reproduction, et une corrélation négative entre croissance et reproduction. Les plantes doivent réguler ces trois principales fonctions en fonction de la disponibilité des ressources au cours de leur vie. Par exemple, chez certaines espèces végétales de prairie, les différents compromis peuvent être liés à leurs traits d'histoire (Lind *et al.*, 2013). En règle générale, la domestication des plantes cultivées a été conduite en favorisant la croissance des plantes au détriment de leurs capacités de défense contre leurs ennemis. C'est vrai pour le maïs domestiqué et son ancêtre sauvage (téosinte) qui est mieux défendu mais moins productif (Rosenthal & Dirzo, 1997).

Face à la variété des situations environnementales et des pressions parasitaires rencontrées sur l'ensemble de l'aire de répartition d'une espèce, on peut s'attendre à trouver du polymorphisme génétique aux loci impliqués dans la mise en place des réactions de défense de plantes. Ainsi, au

sein des collections mondiales d'accessions de *Arabidopsis thaliana*, on trouve deux allèles différents au locus ACD6. L'allèle Est-1 confère aux plantes une meilleure résistance à différents pathogènes, incluant des bactéries du genre *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 et des champignons du genre *Golovinomyces orontii* T1, mais entraîne une réduction de la biomasse. L'autre allèle, col-0, confère une meilleure croissance mais une sensibilité à ces différents pathogènes (Todesco *et al.*, 2010). L'existence d'un tel polymorphisme génétique au sein d'une espèce est une preuve de l'existence du compromis entre croissance et défense.

Parmi les mécanismes moléculaires impliqués dans ce compromis pour l'allocation des ressources aux différentes fonctions, les phytohormones jouent un rôle important. En particulier, l'acide jasmonique et l'acide salicylique sont impliqués dans la stimulation des réactions de défense, alors que l'auxine et l'acide gibbérellique stimulent la croissance (Huot *et al.*, 2014). Chez certaines espèces en C3 comme le riz, le niveau d'expression du facteur de transcription WRKY70 contrôle l'équilibre entre la production de métabolites de défense induite par l'acide jasmonique et la croissance induite par l'acide gibbérellique (Züst & Agrawal, 2017). L'activation des mécanismes de défense par l'acide jasmonique entraîne une réduction de la croissance des plantes (Zhang & Turner, 2008 ; Attaran *et al.*, 2014). En exploitant cette voie d'inhibition de la croissance par le jasmonate, Campos *et al.* (2016) ont pu créer un mutant (jazQ phyB) chez *Arabidopsis* capable à la fois de croître et d'assurer sa défense. Cette expérience montre qu'il est possible de rompre la relation négative entre croissance et défense.

De façon plus générale, plusieurs hypothèses, non exclusives, ont été avancées pour expliquer comment ce compromis difficile pouvait être contourné.

1.3.1 Hypothèse de la défense optimale

Selon cette hypothèse la répartition des métabolites secondaires dans la plante varie en fonction de l'importance et de la valeur des parties à protéger (Coley, Bryant, & Stuart Chapin, 1985 ; Stamp, 2003 ; Alba, Bowers, & Hufbauer, 2012). Les plantes en compétition pour la lumière auront tendance à protéger les parties aériennes parce qu'elles sont plus accessibles aux herbivores (risque d'attaque), mais aussi importantes pour la photosynthèse (Ballaré, 2014 ; De Vries, Evers, & Poelman, 2017). Chez certaines espèces, la concentration de métabolites secondaires est plus élevée chez les jeunes feuilles par rapport aux feuilles âgées (McCall & Fordyce, 2010 ; Alba *et al.*, 2012). Or, les larves d'insectes attaquent de préférence les feuilles plus jeunes (Mraja *et al.*, 2011). Ainsi le DIMBOA, métabolite secondaire synthétisé par certaines variétés de maïs, est en concentration élevée dans les jeunes feuilles tendres (Cambier *et al.*, 2000). En somme,

l'hypothèse de la défense optimale est que la plante alloue des ressources à la défense au bon moment et au bon endroit de la plante.

1.3.2 Hypothèse du ratio carbone/azote ou des contraintes environnementales

Selon cette hypothèse, la voie de la synthèse constitutive de défenses chimiques par la plante est déterminée par les contraintes environnementales, et en particulier par le ratio carbone sur azote (C/N) présent dans l'environnement (Herms & Mattson, 1992a ; Stamp, 2003), car les trois grandes familles de composés des plantes sont issues soit du métabolisme de l'azote (alcaloïdes), soit des voies métaboliques du carbone (Fig 1).

Cette hypothèse suppose que les plantes préfèrent investir dans les défenses à base de carbone lorsque le facteur limitant de la photosynthèse est l'azote et non la source de lumière ou la teneur en CO₂. Inversement, lorsque le facteur limitant de la photosynthèse est la quantité de lumière ou d'autres nutriments, les plantes alloueront le surplus en azote pour la synthèse de composés chimiques de défense (Stamp, 2003 ; Cipollini *et al.*, 2017). Par exemple, des essais en milieu naturel et en laboratoire ont montré que les algues rouges *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniaceae) synthétisent des métabolites secondaires azotés dans un milieu ombragé, pauvre en lumière. Inversement, elles synthétisent des métabolites secondaires riches en carbone lorsqu'on augmente la disponibilité en CO₂ dans le milieu (Mata, Gaspar, & Santos, 2012). Les mêmes résultats ont été observés chez la tomate par la régulation du ratio C/N (Royer *et al.*, 2013). En effet, on observe une corrélation positive entre le ratio C/N et les métabolites secondaires à carbone tels que l'acide chlorogénique (C₁₆H₁₈O₉), le kaempferol-rutinoside (C₂₇H₃₀O₁₅) et la rutine (C₂₇H₃₀O₁₆). Cependant, on note une corrélation négative entre le ratio C/N et la tomatine (C₅₀H₈₃NO₂₁), un métabolite secondaire azoté. En résumé, l'hypothèse des contraintes environnementales suppose que les défenses constitutives de la plante sont modulées en fonction de la nature des ressources disponibles dans l'environnement.

1.3.3 Hypothèse du taux de croissance ou disponibilité de ressources

Selon cette hypothèse, le taux de croissance intrinsèque est lié à la disponibilité de ressources (Coley *et al.*, 1985). Elle suppose que le taux de croissance de la plante régule le niveau des ressources et donc l'investissement possible dans la défense (Fig 2), avec plusieurs conséquences :

- Lorsque les ressources sont abondantes, les espèces à croissance lente peuvent utiliser l'excès de ressources pour produire de façon constitutive des métabolites qui sont stockés et dont la concentration va augmenter avec l'âge de la plante (Coley *et al.*, 1985 ; Stamp, 2003). Les espèces à croissance rapide mobilisent leurs ressources pour la croissance et auront plutôt

tendance à utiliser des défenses induites, synthétisées seulement lorsque le besoin s'en fait sentir.

- Lorsque les ressources sont limitées, les plantes qui croissent moins peuvent continuer à investir de façon plus modeste dans la production de défenses constitutives. Les plantes à croissance rapide auront du mal à synthétiser des défenses induites et seront donc plus susceptibles aux attaques d'herbivores (Coley *et al.*, 1985 ; Coley, 1987 ; Herms & Mattson, 1992b).

Pour cette hypothèse du taux de croissance, on s'attend à trouver un lien entre vitesse de croissance, niveau de ressources, et importance et nature des défenses produites.

1.3.4 Hypothèse du compromis entre croissance et différenciation

Au sens large, la croissance comprend l'ensemble des processus développementaux aboutissant à l'apparition de nouveaux phytomères et leur croissance en volume. Elle décrit la production des feuilles, tiges et racines et implique des mécanismes liés à la division et l'élongation des cellules. La différenciation est l'amélioration de la structure et des fonctions des cellules telles que la maturation et la spécialisation. La production de trichomes, de métabolites secondaires, ou l'épaississement de la cuticule des feuilles, qui font partie des stratégies de défense des plantes, sont des processus de différenciation. Ainsi, le compromis entre croissance et défense est un compromis entre croissance et différenciation (Herms & Mattson, 1992b ; Stamp, 2003).

Selon cette hypothèse, la photosynthèse est limitée par les ressources, notamment l'azote et les minéraux. L'accroissement des ressources entraîne une augmentation de la photosynthèse, jusqu'à atteindre un plateau (Fig 3). La croissance est limitée à la fois par les ressources disponibles dans l'environnement et par la photosynthèse, mais il y a un décalage entre l'augmentation de la vitesse d'assimilation photosynthétique et l'augmentation de la vitesse de croissance (Fig 3). Enfin, la différenciation ne peut se produire que lorsque le différentiel entre assimilation photosynthétique et croissance est important, c'est-à-dire lorsque les métabolites produits par la photosynthèse ne sont pas entièrement consommés pour la croissance. Ainsi, c'est pour un niveau de ressources intermédiaires que le niveau de différenciation sera le plus élevé (Fig 3B).

En résumé, la disponibilité en ressources dans l'environnement conditionne les capacités de la plante à engager des processus de croissance et de différenciation. L'investissement dans la différenciation est maximal pour des niveaux de ressources intermédiaires.

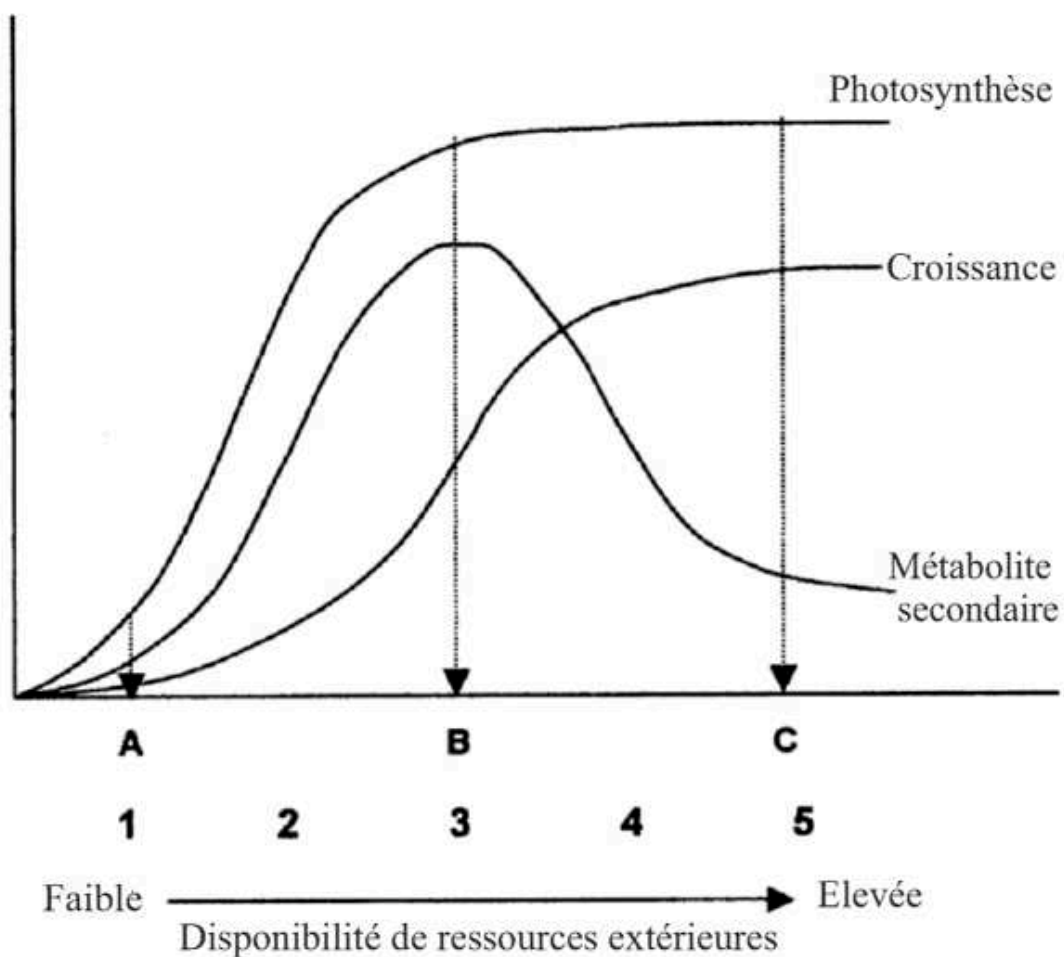


Figure 3 : Illustration du compromis entre croissance et différenciation. Relations entre le niveau de ressources extérieures et le taux d'assimilation photosynthétique NAR (net assimilation rate), la croissance relative RGR (relative growth rate) et la différenciation (Secondary metabolism) (Herms & Mattson, 1992b ; Stamp, 2003).

En résumé, les plantes peuvent mettre en place différentes stratégies contre les insectes ravageurs qui incluent des mécanismes de défense, d'évitement, ou de tolérance. La mise en place de ces stratégies est coûteuse d'un point de vue énergétique et se traduit pour la plante par un compromis à réaliser pour l'allocation des ressources entre les fonctions de croissance et reproduction, et la fonction de défense. Les mécanismes utilisés par les plantes pour contourner ce problème d'allocation de ressources sont mal connus. Les hypothèses comprennent :

* Une allocation de ressources pour la défense ciblée dans certains organes ou dans le temps (réponses induites). C'est l'hypothèse de *défense optimale*.

* Différents mécanismes de défense chimique selon la disponibilité des différentes ressources, et notamment de la balance carbone/azote. C'est l'hypothèse des *contraintes environnementales*.

* Une régulation de la nature des défenses par le taux de croissance, avec une accumulation du niveau de défenses constitutives avec l'âge chez les plantes à croissance plus lente. C'est l'hypothèse du *taux de croissance*.

* Une régulation du niveau des défenses par la capacité photosynthétique, à travers le *compromis entre croissance et différenciation*.

2. Le maïs et la pyrale du maïs

2.1 L'importance du maïs

Le maïs (*Z. mays*) occupe la première place de production céréalière dans le monde devant le blé et le riz. En 2018, sa production dans le monde était estimée à près de 1,2 milliard de tonnes sur une superficie totale d'environ 200 millions d'ha (FAOSTAT, 2018). Selon la même source, la France a produit 13123044 tonnes sur 1444438 ha la même année. Cette production est principalement destinée à l'alimentation animale et humaine mais elle concerne aussi la production d'amidon et de biocarburant tel que l'éthanol.

En Europe, plusieurs facteurs abiotiques et biotiques constituent des contraintes majeures à la productivité du maïs. Des conditions climatiques extrêmes telles que la sécheresse et les grêles peuvent entraîner des stress hydriques et la destruction des feuilles. Parmi les facteurs biotiques, les oiseaux (corbeaux et pigeons) et les insectes ravageurs peuvent occasionner d'importants dégâts. Les corbeaux s'attaquent aux jeunes plants pour se nourrir des graines. Les insectes par contre, s'attaquent au maïs depuis la mise en terre jusqu'à la récolte. Ainsi, on note des ravageurs

post-levée qui s'attaquent aux graines en germination et aux jeunes plantules. On peut citer les taupins (*Agriotes* et *Athous*) et mouches des semis (*Delia platura*). Puis, viennent les ravageurs du stade 3 à 7 feuilles, tels que les limaces (*Deroceras reticulatum*, *Arion sp*), la géomyze (*Geomyza tripunctata*) et l'oscinié (*Oscinella frit*). Certains ravageurs s'attaquent au système racinaire comme les scutigérelles (*Pratylenchus sp.*), les nématodes (*Scutigerella immaculata*), les vers gris (*Agrotis segetum*, *Agrotis ipsilon*) et la chrysomèle (*Diabrotica virgifera virgifera*). On a également les ravageurs du stade développement et maturité de la plante tels que la cicadelle commune (*Zyginidia scutellaris*), les pucerons (*Rhopalosiphum padi*), l'héliothis (*Helicoverpa armigera*) et les acariens (*Tetranychus urticae* et *T. turkestanii*). Enfin, les lépidoptères foreurs de tiges, qui s'attaquent aux parties aériennes de la plante sont la sésamie (*Sesamia nanogrioides* L.) et la pyrale du maïs (*O. nubilalis*) (ARVALIS, 2017).

2.2 La pyrale du maïs

La pyrale du maïs (*O. nubilalis*) est l'un des ravageurs les plus importants du maïs dans le monde (Jean & Boisclair, 2001, 2009) avec des dégâts pouvant atteindre 80% des plantes et 93% d'épis abimés chaque année (Beres, 2012). C'est un Lépidoptère de la famille des Crambidae dont les larves sont essentiellement phytophages. Il a été identifié pour la première fois en Europe en 1796 (Hübner, 1805). Par la suite, il a été accidentellement introduit sur le continent Nord-Américain en 1917 (Brindley & Dicke, 1963) et s'est ensuite propagé dans le Nord-Ouest de l'Afrique et dans l'Asie de l'Ouest (Mutuura & Munroe, 1970). En France, la pyrale a évolué de façon divergente en plusieurs races, la spéciation (encore incomplète) s'accompagnant d'une spécialisation d'hôtes. Les femelles de l'espèce Z, *O. nubilalis*, pondent spécifiquement sur le maïs. Celles de l'espèce E, *O. scapularis*, préfèrent l'armoise (*Artemisia vulgaris* L.) et le houblon doré (*Humulus lupulus* L.) (Thomas *et al.*, 2003 ; Bethenod *et al.*, 2005 ; Malausa *et al.*, 2008). Les croisements entre les deux espèces sont encore possibles. Ainsi, on parle indifféremment d'espèce ou de race. Roelofs *et al.* (1985) ont décrit l'existence de trois races de pyrale dont deux races spécialisées sur le maïs : une race univoltine avec une génération par an, et une race bivoltine pouvant produire deux générations par an ; et une race multivoltine spécialisée sur l'armoise et le houblon. Chez le maïs, les deux races de pyrale peuvent cohabiter dans un même environnement (Derron, Goy, & Breitenmoser, 2009).

2.2.1 Cycle biologique de la pyrale du maïs

Le cycle biologique de la pyrale peut varier suivant la disponibilité de son hôte et les conditions environnementales. La pyrale du maïs *O. nubilalis* peut avoir une seule génération (race univoltine) ou deux générations (race bivoltine) en une année. Quelle que soit la race de pyrale, les larves passent la période hivernale sous forme de diapause au stade 5. Puis, elles reprennent leur développement normal à partir du printemps pour donner des chrysalides. Les adultes se reproduisent et les femelles pondent des œufs sur les jeunes plants. Les larves se développent en se nourrissant de la plante et vont passer successivement par cinq stades larvaires (fig. 4). Les conditions climatiques du printemps et d'été déterminent la venue de la seconde génération chez la race bivoltine. Par rapport à la race univoltine, la race bivoltine est caractérisée par 1) une courte durée de postdiapause qui lui permet d'émerger plus tôt ; 2) une sensibilité à la photopériode qui déclenche, pour une partie des larves, la formation de chrysalides au lieu de l'entrée en diapause.

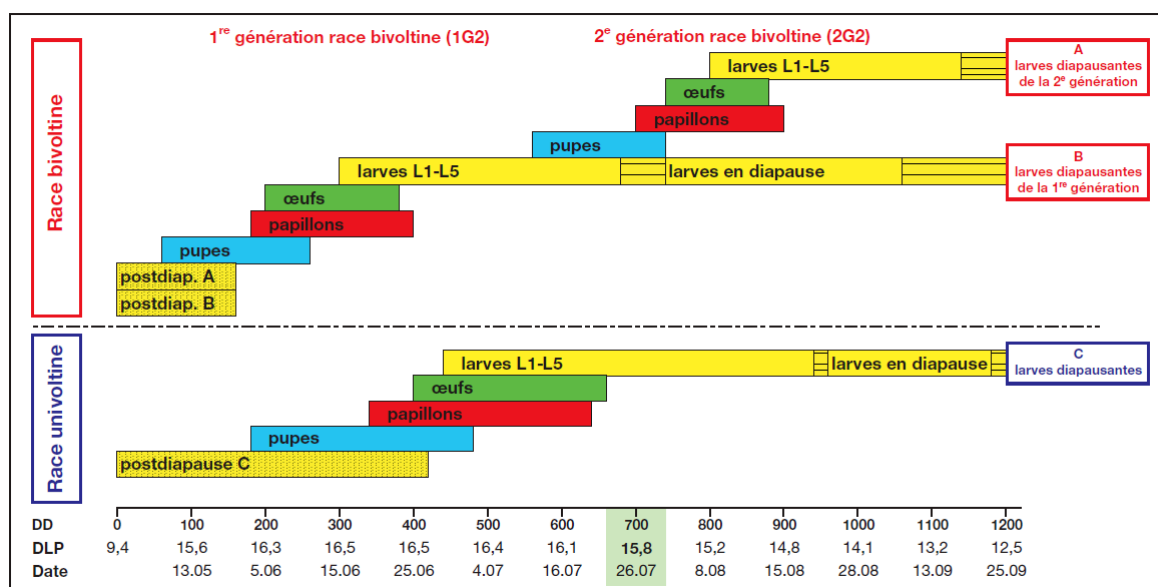


Figure 4 : Cycle biologique des races univoltines et bivoltines chez le maïs. Synthèse de la situation observée en 2008 : La somme des températures (DD) en degrés-jours, la photopériode (DLP) en heures et la date sont les moyennes de 2000 à 2008 (Derron *et al.*, 2009). La durée de la postdiapause est de 15,6 jours pour la race bivoltine et de 33 jours pour la race univoltine à 20 °C. La photopériode critique pour la venue de la seconde génération de la race bivoltine est de 15,8 h à 20 °C et une somme des températures de 700 degrés-jours.

On constate une bonne synchronisation entre le cycle de vie de la pyrale et celui du maïs (Fig 5). Les insectes adultes de première génération se reproduisent entre mai et juin et pondent sur les jeunes plants de maïs. Les vols de la seconde génération interviennent généralement entre août et septembre, suivant les conditions climatiques, lors de la période de remplissage des grains chez le maïs. Cependant, la cohabitation des deux races de pyrale (univoltine et bivoltine) pourrait réduire l'effet des différents mécanismes de défense du maïs contre ce ravageur. En pratique, la mise en place des stratégies de lutte est toujours difficile contre les deux races simultanément.

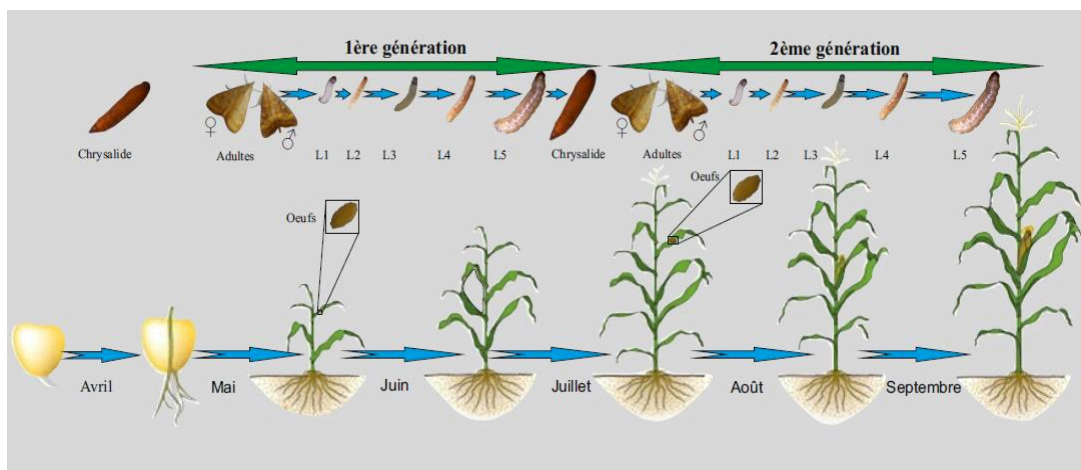


Figure 5 : Synchronisation des cycles biologiques de la pyrale et du maïs. Exemple de cycle d'une race bivoltine, inspiré de Derron *et al.* (2009) et AGPM (2017).

2.2.2 Choix de ponte

Le choix de ponte des lépidoptères est influencé par les composés sémiochimiques émis par les plantes (Sauvion *et al.*, 2013). Les insectes peuvent percevoir les odeurs à travers les sensilles olfactives situées sur leurs antennes, mais aussi les palpes maxillaires ou sur l'ovipositeur. On note également chez certains diptères le rôle du système olfactif dans le choix de l'hôte. C'est le cas de la mouche du pommier *Rhagoletis pomonella* attirée par l'odeur de l'hexanoate de butyle, le principal composé volatil des fruits du pommier mais repoussée par le 3-méthylbutan-1-ol du fruit de l'aubépine (Le Guyader, 2020). L'olfaction peut être aussi associée à la vision pour la sélection de l'hôte. Chez le papillon de vigne *Lobesia botrana*, l'interaction entre l'olfaction et la vision augmente la ponte des femelles (Tasin *et al.*, 2011).

Des substances non volatiles peuvent aussi influencer la ponte. Ainsi, pour la pyrale du maïs, le choix de ponte serait influencé par la teneur en sucre des feuilles (Fiala, Derridj, & Jolivet, 1985), mais aussi par certaines n-alkanes des parois cellulaires (Udayagiri & Mason, 1997). Les femelles pondent les œufs sur la face inférieure des feuilles (Suverkropp *et al.*, 2008 ; Goldstein *et al.*, 2010) entre les rangs foliaires 8 à 13 (Lupoli *et al.*, 1990).

La qualité de l'hôte peut aussi influencer la répartition des œufs au champ. Chez la pyrale, les femelles semblent éviter de pondre sur des plantes déjà colonisées par des larves de leurs congénères, qu'elles détectent grâce aux odeurs de leurs fèces (Harmon, White, & Andow, 2003). Par contre, les œufs pondus sur des plantes déjà infestées par des pucerons ont un taux de survie plus élevé que ceux pondus sur les plantes sans infestation comme observés par Musser & Shelton (2003). Ces auteurs ont montré que la présence simultanée de pucerons sur une plante permet de réduire la prédation des œufs de pyrale par *Orius insidiosus* (Say), *Coleomegilla maculata* (DeGeer), et *Harmonia axyridis* (Pallas). En effet, les jeunes larves de *C. maculata* et *H. axyridis* se nourrissent spécialement des œufs de pyrale. Par contre *O. insidiosus*, consomme également les larves de *O. nubilalis*. La présence du parasite peut réduire la population des larves de pyrales dans les aisselles, gaines, tiges et épis jusqu'à 80% (Coll & Bottrell, 1992).

2.2.3 Le mouvement des larves

Les composés volatils émis par les plantes jouent non seulement un rôle pour la ponte des adultes, mais peuvent attirer ou repousser les larves. Les larves de lépidoptères ont des antennes capables de détecter ces composés et de s'orienter. Rharrabe *et al.* (2014) ont montré que les larves de *Spodoptera littoralis* sont attirées ou repoussées en fonction de leur concentration. Par exemple, les composés comme le (Z)-3-hexenyl acétate (Z3HAC) et le (Z)-3-hexenal (Z3HAL) sont attractifs à faible concentration et répulsifs à forte concentration pour les larves de pyrale (Piesik *et al.*, 2013).

Les larves de pyrale et d'autres lépidoptères peuvent se déplacer passivement sur des distances assez importantes en se laissant entraîner par le vent, portées par un fil de soie qu'elles ont tissé elles-mêmes (Goldstein *et al.*, 2010 ; Razze & Mason, 2012). Cependant, en règle générale, les déplacements restent réduits dans l'espace et entraînent une mortalité importante. Seulement 6% des larves peuvent survivre jusqu'au 6^{ème} jour après leur émergence (Coll & Bottrell, 1992), et 1/3 peut se retrouver sur les plantes adjacentes en 48h (Goldstein *et al.*, 2010). Rarement les larves vont au-delà de la deuxième plante adjacente (Ross & Ostlie, 1990), soit 3,6 m pour les larves de *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae), (Visser *et al.*, 2020).

La qualité de l'hôte peut jouer un rôle important dans le mouvement des larves. Des essais en milieu naturel ou contrôlé ont montré que les jeunes larves de pyrale ont tendance à ne pas rester longtemps sur les plantes transgéniques de maïs BT après l'émergence. Par contre, elles ont tendance à rester plus longtemps sur les plantes non transgéniques (Goldstein *et al.*, 2010 ; Razze & Mason, 2012). Les larves se mettent à l'abri des prédateurs dans les gaines, les bourgeons terminaux et les soies des épis. On observe aussi des comportements semblables lors de la

diapause. Les larves de *O. nubilalis* descendent vers le bas de la tige au moment de la diapause, contrairement à leur espèce sympatrique *O. scapularis* (Calcagno *et al.*, 2017). Ce comportement est interprété comme une adaptation aux pratiques culturales du maïs, et permet aux larves en diapause de passer l'hiver dans les résidus de culture. Au cours de leur développement, les larves de pyrale passent par 5 stades larvaires (Fig 5) au cours desquels elles occasionnent d'importants dégâts.

2.2.4 Les dégâts provoqués par la pyrale

Pendant tous les stades larvaires, les pyrales se nourrissent sur toutes les parties aériennes du maïs. Dès l'émergence, les jeunes larves font des petits trous caractéristiques appelés « coup de fusil » pour se nourrir. Elles perforent les feuilles enroulées au niveau du bourgeon terminal laissant par la suite des rangées consécutives de petits trous sur les feuilles (Fig 6A). Ensuite, les larves perforent les tiges vers le bas de l'entrenœud (Fig 6B) pour se nourrir sur la moelle des tiges (Bergvinson, Larsen, & Arnason, 1995 ; Velasco *et al.*, 2007 ; Beres P. K, 2012), la panicule et les épis (Jean & Boisclair, 2001, 2009 ; Velasco *et al.*, 2007). Les galeries réalisées dans les tiges et les panicules provoquent une fragilité et des risques de ruptures en cas de coup de vent (Fig 6C). L'alimentation des larves à l'intérieur des tiges entraîne une réduction de la production en termes de nombre de grains et de fourrage.

Le niveau de dégâts peut se mesurer en pourcentage de plantes ou d'épis abimés dans une parcelle. Chez certains hybrides résistants, les dégâts des larves varient entre 0,5 et 0,7% des plantes du champ, alors qu'ils avoisinent les 40-44% chez les variétés susceptibles (Beres, 2010). On observe une variabilité de la sévérité des dégâts entre types variétaux et entre les parties de la plante. Chez le maïs fourrage, la sévérité des dégâts peut varier de 58 à 80,2% des plantes et de 29,5 à 42,2% des épis. Chez le maïs doux, les chiffres varient de 89,5 à 93% des plantes et de 53,5 à 76 % des épis (Piesik *et al.*, 2013). La densité des larves peut varier de 0,2 à 3,2 par plante (Camerini *et al.*, 2016) en fonction du niveau d'infestation. Les larves réalisent également des galeries au niveau des épis puis laissent derrière elles des striures (fig.6D). Elles se nourrissent également sur les jeunes grains laitieux.

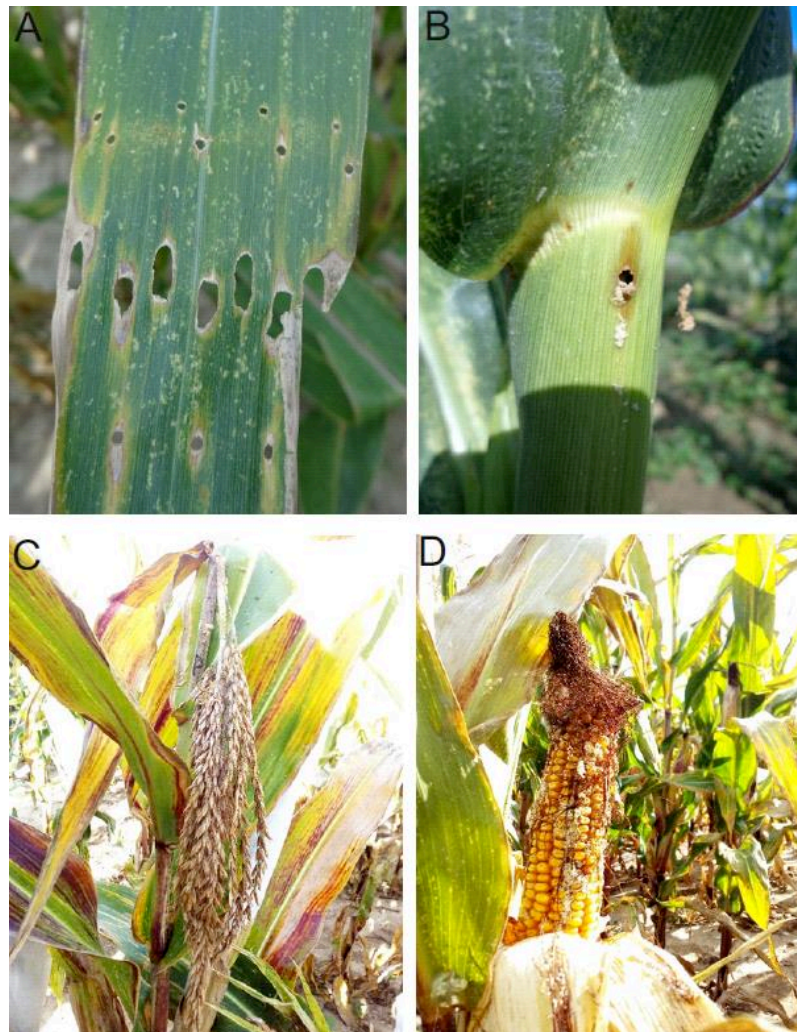


Figure 6 : Dégâts des larves de la pyrale sur les parties aériennes du maïs : A) petits trous ou "coup de fusil" sur les feuilles, B) trous dans les tiges, C) panicule cassée et D) épis endommagés avec des sciures visibles (photos Inoussa Sanane).

Les attaques des épis peuvent constituer des sources d'infestation d'autres maladies fongiques comme les champignons du genre *Aspergillus* (Lillehoj *et al.*, 1982) et *Fusarium* (Sobek & Munkvold, 1999 ; Magg *et al.*, 2002 ; Alma *et al.*, 2005 ; Blandino *et al.*, 2015). La contamination des épis par les mycotoxines produites par les champignons (fumonisine et zearalinone) constitue un problème sanitaire pour l'alimentation humaine et animale (Hussein & Brasel, 2001 ; Reddy *et al.*, 2010 ; Edite Bezerra da Rocha *et al.*, 2014).

En conclusion, la pyrale est l'un des principaux ravageurs du maïs en Europe et dans le monde entier. L'adulte est un papillon crépusculaire et les larves se nourrissent sur les parties aériennes du maïs. Les dégâts des larves peuvent être directs et indirects. Les dégâts directs sont la réduction des rendements. Les dégâts indirects sont la réduction de la qualité par la contamination par des mycotoxines.

En résumé le cycle de vie de la pyrale est en synchronie avec celui du maïs, son hôte principal. Plusieurs stratégies de défense sont mises en place par les plants de maïs contre les ravageurs. Pour le cas de la pyrale, le maïs est confronté à l'insecte durant chacune des phases de son développement :

- Les adultes, principalement les femelles, qui choisissent une plante pour y déposer leurs œufs. Ces adultes ne s'alimentent pas sur la plante et font leur choix principalement en fonction de signaux sensoriels, liés aux odeurs et aux composés de surface provenant de la plante, et des ravageurs ou microorganismes déjà établis. Ils ont des capacités de déplacement importants et effectuent des choix.
- Les larves qui éclosent des ooplaques ont une première phase d'alimentation à la surface des feuilles et ensuite percent le bouquet de feuilles pour entrer dans la tige. Ces larves s'alimentent sur la plante et peuvent éventuellement la quitter à un stade précoce (par ballooning) ou ultérieurement par locomotion. Les facteurs qui gouvernent l'alimentation de la larve sont la valeur nutritive des tissus (richesse en sucres), la dureté des tissus, la quantité de substances de défenses de la plante, et dans une moindre mesure l'odeur de la plante.

Du côté de la plante, les recherches ont mis en évidence des facteurs de résistance dans le maïs, facteurs dont le rôle n'est pas toujours bien établi comme pour le DIMBOA. En fait, le maïs et d'autres plantes de ce type sont plutôt considérées comme échappant à la pression parasitaire en adoptant une croissance rapide (Collantes *et al.*, 1998).

3. Expériences de sélection divergente du Plateau de Saclay

Durant ces dernières décennies, d'importants progrès ont été faits dans le domaine de l'amélioration des plantes ; et ils concernent à la fois les méthodes de sélection et la connaissance des bases génétiques des caractères d'intérêt. Chez le maïs, qui est une céréale allogame, l'exploitation du phénomène de vigueur des hybrides (hétérosis) a conduit à la production de lignées pures par autofécondation de plants issus des populations traditionnelles cultivées. Les variétés commercialisées sont des hybrides F1 obtenus en croisant deux lignées complémentaires. La sélection consiste en la production de nouvelles lignées pures par croisement. Ainsi, les ressources génétiques de l'espèce sont aujourd'hui constituées par des panels de lignées pures, divisés en groupes d'aptitude à la combinaison pour la production des hybrides. Dans le chapitre 4 de la thèse, j'ai utilisé un core-panel de 18 lignées de maïs représentatives de la diversité génétique des plantes cultivées en Europe et aux Etats-Unis, en incluant des lignées sensibles et résistantes à la pyrale, pour comparer l'appétence de larves de pyrales entre les différentes lignées.

La sélection consiste à croiser des lignées d'un même groupe et autoféconder les descendants du croisement pour produire des lignées recombinantes possédant un mélange des combinaisons d'allèles des deux parents. L'évaluation des nouvelles lignées produites est établie sur la base de leur performance en croisement avec des lignées de groupes complémentaires. Le choix des lignées à croiser et l'évaluation des performances des hybrides peut être réalisé dans des dispositifs expérimentaux, ou par génotypage des lignées candidates (sélection génomique). Un enjeu actuel est de mieux comprendre les bases génétiques des caractères agronomiques d'intérêt, pour orienter les choix des croisements.

Les méthodes classiques pour identifier des régions génomiques impliquées dans la variation de caractères d'intérêt agronomique sont la détection de QTLs, impliquant l'étude de populations issues du croisement entre deux lignées, et la génétique d'association génome-wide, impliquant l'étude de panels de lignées représentant la diversité de l'espèce (Lorant, Ross-Ibarra, & Tenaillon, 2020). Plus marginalement, les expériences de sélection divergente permettent de constituer, à partir d'une même population initiale, des populations fortement différenciées pour le caractère cible de la sélection. La comparaison entre les populations évoluées permet d'identifier les régions génomiques ciblées par la sélection, mais aussi les caractères qui ont changé en même temps que le caractère cible. La réponse à la sélection permet aussi d'estimer l'héritabilité du caractère ciblé par la sélection.

Chez le maïs, les expériences de sélection divergente les plus célèbres sont les expériences de sélection divergente de l'Illinois (Moose, Dudley, & Rocheford, 2004) pour la teneur en huile et

la teneur en protéine des grains. On peut également citer deux expériences de sélection divergente sur 3 générations successives qui ont été initiées chez le maïs respectivement pour la teneur en acide diférulique estérifié (Barros-Rios *et al.*, 2012) et la date de transition juvénile-adulte (Revilla *et al.*, 2005). La première expérience a permis de sélectionner deux populations divergentes, l'une avec une forte teneur et l'autre une faible teneur en acide diférulique estérifié à l'intérieur de la tige. On constate que la réponse à la sélection pour une forte teneur en acide férulique estérifié a indirectement renforcé certains caractères de la plante, comme la taille des tiges et la productivité en grain. La seconde expérience a permis de sélectionner deux populations divergentes, dont l'une précoce et l'autre tardive pour la date de transition juvénile-adulte.

3.1 Les expériences de sélection divergente de Saclay

Les expériences de sélection divergente pour la date de floraison du maïs du plateau de Saclay ont été initiées à partir de deux lignées de maïs, F252 et MBS847, elles visent à :

- Mesurer le rôle des mutations sur la variabilité pour la date de floraison ;
- Comprendre le déterminisme génétique de ce caractère ;
- Mesurer les limites physiologiques pour la date de floraison ;
- Etudier les réponses corrélatives sur d'autres caractères.

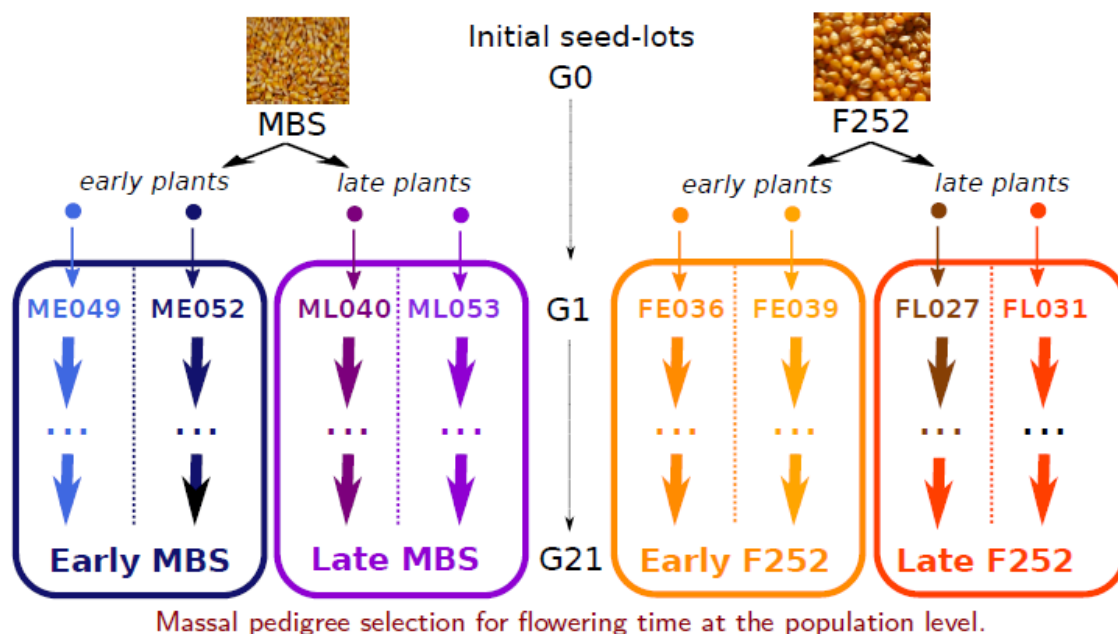


Figure 7 : Sélection divergente pour la date de floraison de Saclay. Chaque famille dérive par autofécondation d'une plante de la génération G0. Les familles sont structurées selon la lignée de départ (MBS ou F252) et le type de sélection (Précoce ou Tardif). Au total, huit familles différentes sont évaluées chaque année dans des conditions agronomiques sur le Plateau de Saclay, et sélectionnées pour leur date de floraison.

Dans chacune des lignées, deux populations, une population précoce et une population tardive ont été formées à partir des graines de deux plantes, qui forment deux familles indépendantes (Fig 7). Par la suite, on sélectionne chaque année 10 épis issus d'autofécondation dans chaque population. L'évaluation est réalisée dans des conditions agronomiques sur le Plateau de Saclay en semant 100 graines pour chacune des 10 plantes sélectionnées sur un dispositif expérimental constitué de 4 blocs randomisés. Parmi les 1000 plantes évaluées dans chaque population, on en sélectionne 10 chaque année, sur la base de leur précocité ou leur tardiveté de floraison, en respectant la contrainte de maintenir deux familles indépendantes dans chaque population. Les plantes sélectionnées sont autofécondées. Chaque année, des plantes de quatre populations différentes sont observées, selon la lignée d'origine et le type de sélection. Le dispositif inclut aussi des plantes témoins, issues du lot de semence initial. Chaque population est structurée en deux familles (huit familles au total). Les plantes d'une même famille dérivent par autofécondation d'une seule plante de la génération G0.

Il ne peut pas y avoir de réponse à la sélection sans variabilité génétique. Dans cette expérience, les sources de variabilité génétique sont l'hétérozygotie résiduelle des lots de semence initiaux et la mutation. Deux plantes d'une même famille diffèrent donc a priori par un tout petit nombre de locus, les locus qui étaient hétérozygotes à la génération précédente. On peut donc considérer qu'à une génération donnée, les différences génétiques entre plusieurs plantes de la même famille sont suffisamment faibles pour que les descendants d'une plante de la famille suffisent à représenter la famille entière. Durant la thèse, j'ai utilisé des génotypes représentant quatre familles évaluées à la génération G18 de l'expérience de sélection divergente : les familles précoces FE036 (issue de la lignée F252) et ME052 (issue de la lignée MBS), et les familles tardives FL317 (issue de la lignée F252) et ML040 (issue de la lignée MBS). J'ai mesuré pour chaque génotype l'appétence de larves de pyrales pour des disques foliaires issue de plantes au champ.

La comparaison entre les génotypes précoces et tardifs issus d'une même lignée de départ permet de voir si la sélection pour changer la date de floraison a également modifié l'appétence des larves de pyrale. Selon certaines hypothèses liées au compromis entre croissance et défense, on s'attend à ce que les génotypes précoces, pour lesquels la période de croissance est plus courte, aient accumulé moins de défenses constitutives et que les larves montrent plus d'appétence pour ces génotypes.

3.2 Résultats de l'expérience de sélection divergente

L'expérience de sélection divergente de Saclay a permis de sélectionner par des autofécondations successives sur plusieurs générations deux familles précoces et deux familles tardives dans chaque lignée (Durand *et al.*, 2010, 2015). La réponse à la sélection provient de la fixation de polymorphismes présents sous forme d'hétérozygotie résiduelle dans les premières générations et de l'apparition de mutations au cours de l'expérience (Durand *et al.*, 2012, 2015). Globalement, on observe que les familles précoces deviennent de plus en plus précoces, quelle que soit la lignée de départ. De même, les familles tardives deviennent de plus en plus tardives (Fig. 8). A l'exception de la population F252-tardive, les deux familles d'une même population se comportent de la même façon. Pour la population F252-tardive, une famille se distingue par une très forte réponse à la sélection. A la génération G13, aucune plante de cette famille n'a fleuri et la famille a été perdue. Il est possible qu'une limite physiologique ait été atteinte.

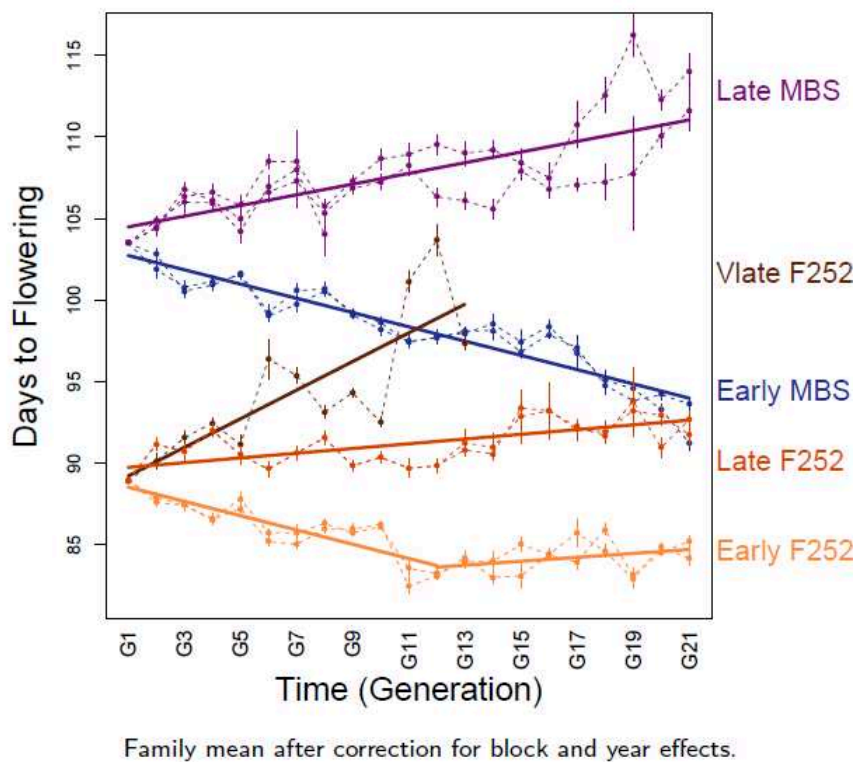


Figure 8 : Réponse à la sélection. La date moyenne de floraison de chaque famille est représentée en fonction de l'année de sélection (en nombre de générations). La famille très tardive « Vlate F252 » a été perdue en génération 13 (Durand *et al.*, 2015).

La figure 9 montre la distribution des dates de floraison des génotypes précoces, tardifs et témoins pour les 2 fonds génétiques F252 et MBS, observée en 2016. Globalement, les génotypes issus de la lignée F252 sont plus précoces que ceux issus de la lignée MBS. La floraison débute mi-juillet pour les génotypes F252 précoces et s'étale jusqu'à la fin du mois de juillet pour les génotypes F252 tardifs. Chez MBS, les génotypes précoces fleurissent vers la fin juillet, et les génotypes tardifs vers la fin du mois d'août. Les écarts observés entre les populations précoces et tardives diffèrent selon le fonds génétique. Ils sont d'environ 15 jours pour le fonds génétique F252, et presque un mois pour le fonds génétique MBS. Au total, les floraisons s'étalent de mi-juillet à début septembre, soit une bonne partie de l'été.

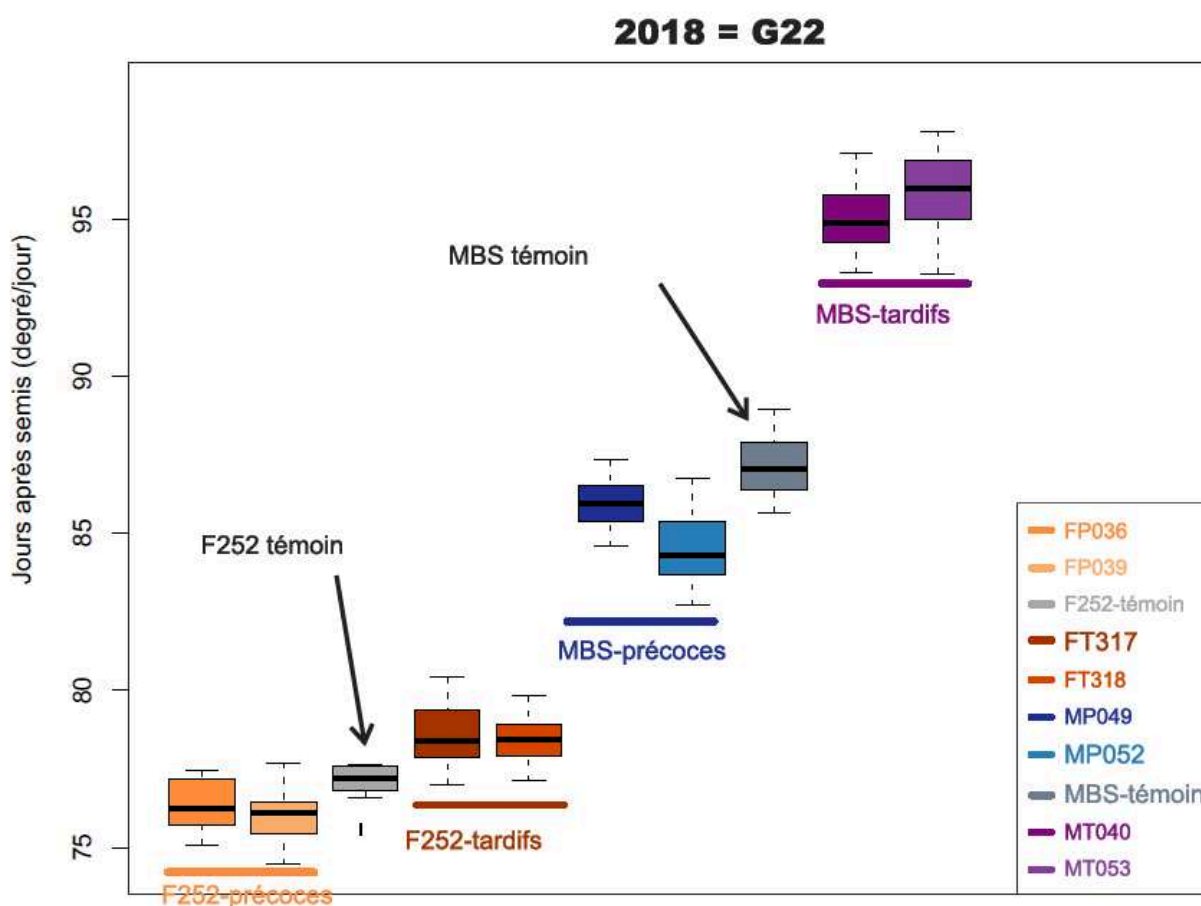


Figure 9 : Distribution des dates de floraison des génotypes précoces, tardifs et témoins des 2 fonds génétiques lors de l'évaluation de la génération G22. Les couleurs représentent les familles. Le code couleur attribué à chaque famille est indiqué dans la légende de la figure.

Chaque année, une nouvelle génération de l'expérience de sélection divergente est implantée, dans des conditions agronomiques, sur le plateau de Saclay. Les terrains expérimentaux subissent une infestation naturelle par la pyrale du maïs. En 2018 et 2019, un suivi hebdomadaire plante à plante des dégâts causés par les larves de pyrale a été réalisé tout au long de la saison, entre l'apparition

des premiers dégâts vers la fin du mois de juin, et le début de la période de maturation des grains, vers la mi-septembre. La dynamique de progression de l'épidémie a pu être établie pour tous les génotypes des générations G22 et G23 des expériences de sélection divergente. La comparaison de la prévalence des dégâts entre les quatre populations permet de tester différentes hypothèses, et d'évaluer l'efficacité d'une stratégie d'évitement. En effet, les plantes des différentes populations ne sont pas au même stade de croissance lorsque l'attaque par les larves débute, et ce décalage persiste presque tout au long de la saison. Les larves ont le choix, au sein d'une même zone de dimensions réduite, entre plusieurs types de plantes, qui diffèrent à la fois pour leur génotype et leur vitesse de croissance. Si la stratégie d'évitement fonctionne, on s'attend à trouver des différences au minimum entre les populations issues de F252, qui fleurissent en juillet, et celles issues de MBS, qui fleurissent en août. On s'attend aussi à ce que la population de maïs dont le cycle de vie est le mieux coordonné avec le cycle de vie de la population naturelle de pyrales soit la plus infestée.

En conclusion, le matériel végétal des expériences de sélection divergente de Saclay est un matériel de choix pour étudier les stratégies de défense du maïs contre les lépidoptères foreurs de tige. Les populations tardives et précoces d'un même fonds génétique diffèrent principalement pour la date de floraison, et donc pour la longueur de la phase de croissance, toutes choses égales par ailleurs. Leur comparaison permet de tester des hypothèses sur le compromis entre croissance et défense. Disposer de populations issues de fonds génétiques différents permet aussi de comparer des populations dont la date de floraison s'étale tout au long de la saison d'été, et qui ne sont pas forcément toutes en phase avec le cycle de vie de la population naturelle de pyrales du Plateau de Saclay. Leur comparaison permet aussi de tester l'efficacité éventuelle de stratégies d'évitement.

4. Objectifs et démarche

Les objectifs de ma thèse étaient de mettre en évidence des différences de défense des plantes contre la pyrale entre populations précoces et tardives de maïs issues des expériences de sélection divergente de Saclay, et de tester certaines hypothèses du compromis entre défense et croissance.

Dans un premier temps, j'ai cherché à mettre en évidence des différences entre génotypes de maïs pour la consommation des feuilles par les larves de pyrale. Il s'agissait de mettre au point une méthode permettant d'évaluer, à grande échelle et de façon non destructive, l'appétence des larves de pyrale pour des feuilles de maïs. La vitesse de consommation des larves, mesurée au laboratoire à partir de disques foliaires prélevés sur des plantes vivantes, est utilisée comme un proxy de l'état physiologique des plantes et de leur niveau de défense.

Le **Chapitre 2** de la thèse décrit le dispositif de test de consommation, et sa validation par l'utilisation de substances antiappétentes. Il est écrit sous la forme d'un projet d'article qui sera soumis à la revue *PLOS-Biology*. Je démontre dans ce chapitre que les larves de pyrale ont des comportements variables lorsqu'elles sont mises en présence d'un disque foliaire de maïs, et qu'il est possible d'établir une typologie de leurs comportements alimentaires. Chaque type d'échantillon de feuilles peut être caractérisé de façon reproductible par la fréquence de chacun des types de comportement alimentaire des larves d'insecte. En présence d'une substance antiappétente comme le NeemAzal, la fréquence des comportements de non-consommation augmente avec la concentration de la substance. Les résultats présentés dans ce chapitre constituent une validation de la méthode.

Dans le **Chapitre 3**, j'ai utilisé le test de consommation pour comparer le comportement alimentaire des larves de pyrales face à des plantes cultivées au champ et issues des lignées précoces et tardives des expériences de sélection divergente de Saclay. Je montre qu'il est possible de caractériser de façon reproductible l'attractivité des différents génotypes de maïs par l'appétence des larves de pyrales pour des disques foliaires prélevés au champ. Cette expérience, répétée deux années successives, révèle que la famille précoce issue de la lignée MBS est beaucoup plus appétente pour les larves que la famille tardive issue de la même lignée. Les différences entre les familles précoces et tardives issues de la lignée F252 sont moins importantes, et significatives uniquement en 2019. Or, les familles MBS présentent des différences beaucoup plus importantes de dates de floraison que les familles F252 (Fig 9).

Dans ce chapitre, je décris aussi la dynamique d'infestation naturelle par les larves de pyrale, au cours de la saison d'été, des génotypes des générations G22 et G23 des expériences de sélection divergente. Une fois encore, on trouve des différences importantes pour le niveau de prévalence

entre les génotypes MBS précoces et tardifs, les familles précoces étant toujours plus infectées. Enfin, des analyses de la composition chimique des parois réalisées sur des échantillons de plantes de la génération G23 mettent en évidence des différences importantes entre les familles MBS précoces et tardives. Ainsi, les génotypes les plus contrastés pour la date de floraison présentent des différences importantes à la fois pour l'appétence des larves pour les feuilles, pour la prévalence des larves sur les plantes au champ, et pour la qualité des parois cellulaires. En particulier, les génotypes MBS précoces sont particulièrement plus tendres que leurs homologues tardifs. Ils contiennent plus d'eau et ont une paroi cellulaire plus mince. *Ces résultats sont conformes à l'hypothèse du trade-off entre croissance et défense.*

Enfin, le test de consommation a été utilisé pour mesurer la variabilité génétique d'un panel de 18 lignées de maïs pour l'appétence des larves de pyrales. Les résultats sont présentés dans le **Chapitre 4** de la thèse. Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec l'unité expérimentale INRAE de Saint-Martin de Hinx, avec Stéphane Nicolas de l'UMR GQE-Le Moulon et a été financé par l'IDEEV. Dans cette expérience, les plantes ont été cultivées en serre, et j'ai réalisé des semis décalés pour comparer des génotypes de précocité différentes, évalué à un même stade de développement. Je confirme l'existence, au sein du panel, d'une grande variabilité entre lignées pour l'appétence des larves de pyrale. Les contrôles, qui étaient constitués par deux variétés de maïs, l'une tolérante, l'autre résistante à la pyrale, se comportent comme attendu, la variété tolérante étant plus appétente que la variété résistante.

Au total, au cours de ma thèse, j'ai mis en place un dispositif de test de consommation sur des disques foliaires de maïs pour mesurer la vitesse de consommation des larves. Ensuite, j'ai démontré l'existence du compromis (trade-off) entre croissance et défense pour la précocité de floraison chez le maïs. Enfin, l'étude d'une core-collection de lignées de maïs a montré des différences importantes pour l'appétence des larves de pyrale entre des lignées contrastées de maïs.

Dans ce chapitre 2, nous présentons la partie méthodologique de la mise en place du dispositif de test de consommation des larves sur disques foliaires. Ce nouveau dispositif sera utilisé dans les autres chapitres (3,4) pour mesurer la vitesse de consommation des larves entre des génotypes contrastés pour leur date de floraison d'une part, et entre des lignées de maïs caractérisées pour leur variabilité génétique d'autre part. Ce chapitre est présenté en trois parties :

- ✓ Une première partie sous forme de projet d'article qui sera soumis à la section « Methods » de la revue *PLOS-Biology*. Dans cette partie, on présente le dispositif de test de consommation avec tous les outils de mise en place, d'analyse d'images et des données issues de la consommation des larves. On a aussi montré dans cette partie que le dispositif peut bien marcher lorsqu'on traite les disques foliaires avec différentes concentrations de molécules antiappétentes. Un preprint de l'article est disponible sur BioRxiv (<https://doi.org/10.1101/2020.08.02.232256>). Par ailleurs, les plans et patrons pour la fabrication du dispositif, les données et les scripts d'analyse ont été déposés dans le dataverse CORNPESTS et sont libre d'accès à l'adresse suivante :[:https://data.inrae.fr/dataverse/cornpests](https://data.inrae.fr/dataverse/cornpests)
- ✓ Dans la deuxième partie, sous forme de complément, on montre que la variable t50 n'est pas la meilleure méthode par rapport à celle utilisée dans l'article pour comparer les vitesses de consommation des larves. En effet, on trouve qu'il y a une forte dispersion des valeurs de consommation des larves autour de la médiane pour la plupart des concentrations de substances antiappétentes. Même si ces résultats sont apparemment comparables à ceux de la catégorisation des types de comportements alimentaires, ils ne sont pas interprétables du fait de la non indépendance des résidus.
- ✓ Dans la troisième partie, également en complément à l'article méthodologique, on étudie l'effet de l'éthanol sur l'appétence des larves. On a trouvé que l'éthanol se comporte comme un antiappétent, et masque l'effet dose réponse des substances utilisées sur la consommation des larves. Malgré le faible nombre de réplicats réalisés, ces résultats étaient suffisamment convaincants pour motiver le choix d'utiliser l'eau à la place de l'éthanol comme solvant pour la validation de ce nouveau dispositif de test de consommation.

2.1 A semi-automated design for high-throughput Lepidoptera larvae feeding bioassays

Inoussa Sanané^{1&2}, Judith Legrand¹, Christine Dillmann¹, Frédéric Marion-Poll^{2&3}

(1) Université Paris-Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech, GQE - Le Moulon, 91190, Gif-sur-Yvette, France.

(2) Université Paris-Saclay, CNRS, IRD, UMR Évolution, Génomes, Comportement et Écologie, 91198, Gif-sur-Yvette, France.

(3) Université Paris-Saclay, AgroParisTech, Paris, France.

Abstract

Lepidopteran pests cause considerable damage to all crops over the world. As larvae are directly responsible for these damages, many research efforts are devoted to find plant cultivars which are resistant or tolerant to pest attacks. However, such studies take time, efforts and are costly, especially when one wants to not only find resistance traits but also to evaluate their heritability. We present here a high throughput approach to screen plants for resistance or chemicals for their deterrence, using a leaf-disk consumption assay, which is both suitable for large scale tests and economically affordable. To monitor larvae feeding on leaf disks placed over a layer of agar, we designed 3D models of 50 cages plates. One webcam can sample simultaneously 3 of such plates at a rate of 1 image/min, and follow individual feeding activities on each leaf disk and the movements of 150 larvae. The resulting image stacks are first processed with a custom program running under an open-source image analysis package (Icy) to measure the surface of each leaf disk over time. We further developed statistical procedures running under the R software, to analyze the time course of the feeding activities of the larvae and to compare them between treatments. As a test case, we compared how European corn borer larvae respond to quinine, considered as a bitter alkaloid for many organisms, and to NeemAzal containing azadirachtin, which is a common antifeedant against pest insects. We found that increasing doses of azadirachtin reduce and delay feeding. However, contrary to our expectation, quinine was found poorly effective at the range of concentrations tested. The 3D printed model of the cage and the camera holder, the plugins running under Icy, and the R scripts are freely available, and can be modified according to the particular needs of the users.

Keys words: plant-insect warfare, feeding preferences, digital image analysis, high-throughput device

Introduction

Crops are exposed to increased pressure from insect pests, partly due to climate warming which changes the distribution of pest insects [1,2]. It is also a consequence of the globalization of human activities, which allow pests to cross natural barriers and invade new ecosystems, causing massive direct and indirect economical costs [3]. Such pests often become invasive because they lack their usual natural enemies, and they face plants which may have poor defenses against them [4]. When confronted to new biotic and abiotic conditions, they may become more adaptable [5]. Invasive pests require the design of new strategies to protect cultures including swift detection and efficient measures to contain their spread [4].

To cope with pests, resistant or tolerant crop varieties can be developed but the whole process is both costly and time-consuming [6]. To facilitate the process, high-throughput laboratory assays are needed to identify plants potentially carrying resistance traits, within traditionally bred varieties or material derived from global germplasm. This can be done by growing plants either in a field or in a controlled environment and then, by measuring the impact of specific pests on the final yield or on plant organs exposed to the pest.

Leaf-disk assays are commonly used to evaluate plant resistance against insects with chewing mouthparts [7,8] by measuring the area of tissues consumed. They can be used also on mites, thrips, aphids, whiteflies, or even fungi by monitoring visual changes related to the damaged areas of the leaves [9]. While disk assays have drawbacks such as the damage inflicted to the tissue, several studies demonstrate that resistance scores obtained using this approach are comparable to those completed on detached or attached leaves [9].

Leaf-disk assays are particularly well adapted to evaluate antibiosis factors against Lepidoptera larvae feeding on leaves [10]. They are even relevant to study larvae feeding within the stem because adult females deposit their eggs on the plant surface. Therefore, first instar larvae hatching from the eggs need to graze on the leaf surface, and bore a tunnel through the leaves to reach the inner tissues. Leaf-consumption by young larvae can thus be used as a proxy to evaluate plant resistance, and to find and evaluate the effectiveness of feeding deterrents extracted from plants or of synthetic origin [10–14].

So far, very few systems have been described to perform such tests on a large number of insects at once. Most experimental setups used image analysis to measure leaf disk area consumed by few larvae either visually [7,10], or digitally [15–19]. These approaches are well suited to laboratory investigations on small scale series, but handle a limited number of repetitions and often make use of specialized and expensive hardware.

Here, we describe a fast and reliable testing protocol that can be performed using a minimum of hardware components [20], based upon measuring the consumption of leaf disks by larvae. Our approach combines three elements (i) a novel and flexible feeding bioassay whereby the consumption and movements of 150 larvae can be followed across several days with a webcam, (ii) programs to analyze the stacks of images (RoitoRoiArray and AreaTrack), written as plugins running within the free bio-image software ICY [21], and (iii) a new cutting-edge statistical approach to compare the kinetics of larval feeding [22], taking into account the diversity of behavioural responses in the insect population. As an example, we monitored the feeding behaviour of European corn borer (ECB) second instar larvae on maize leaf disks treated with different concentrations of NeemAzal and of quinine, which are considered as antifeedants for a number of insect species.

Results

The typology of feeding behaviours results from a novel, high-throughput feeding bioassay

We designed a high-throughput feeding bioassay to analyse the feeding behaviour of second instar larvae (L2) from European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae) on maize leaf disks. We examined the feeding behaviour of cohorts of larvae given access to maize disk treated with different amounts of two antifeedant products. Although considerable variation exists between larvae, we showed that their behaviour can be classified into six categories (behavioural types). Differences between behavioural types relate to the time to engage into sustained consumption and to the consumption rate. The building-up of behavioural typologies relies on three innovations:

A custom recording system: each recording unit (Fig 1) includes three plates of 50 cages, placed over a white LED panel and monitored by a webcam mounted on a custom stand. The bottom of each plate is made of a transparent glass plate. Each cage is first filled with a 2-3 mm layer of agar on which a freshly cut leaf-disk is deposited. Then one larva is placed in each cage and a second glass plate is placed on the top to close cages. The cost of one system (including the webcam, the LED panel and the plates) is less than 400 \$ US. The camera can record images at regular intervals (1 per minute) using a surveillance camera security software (VisionGS). This allowed us to register the feeding behaviours of 150 larvae, distributed into three plates, during several days. Each plate received a different treatment corresponding to different concentrations of antifeedant product. One standard computer could easily control 4 webcams that is to say it is possible to record feeding bioassay tests with 600 larvae at a time on one computer. The limiting factor is the time required to introduce insect larvae into the cages. For this reason, it is difficult for one operator alone to start more than two experiments including 300 larvae at a time, as was done here. In this paper, a single bioassay or batch corresponded to two cameras, each monitoring three plates.

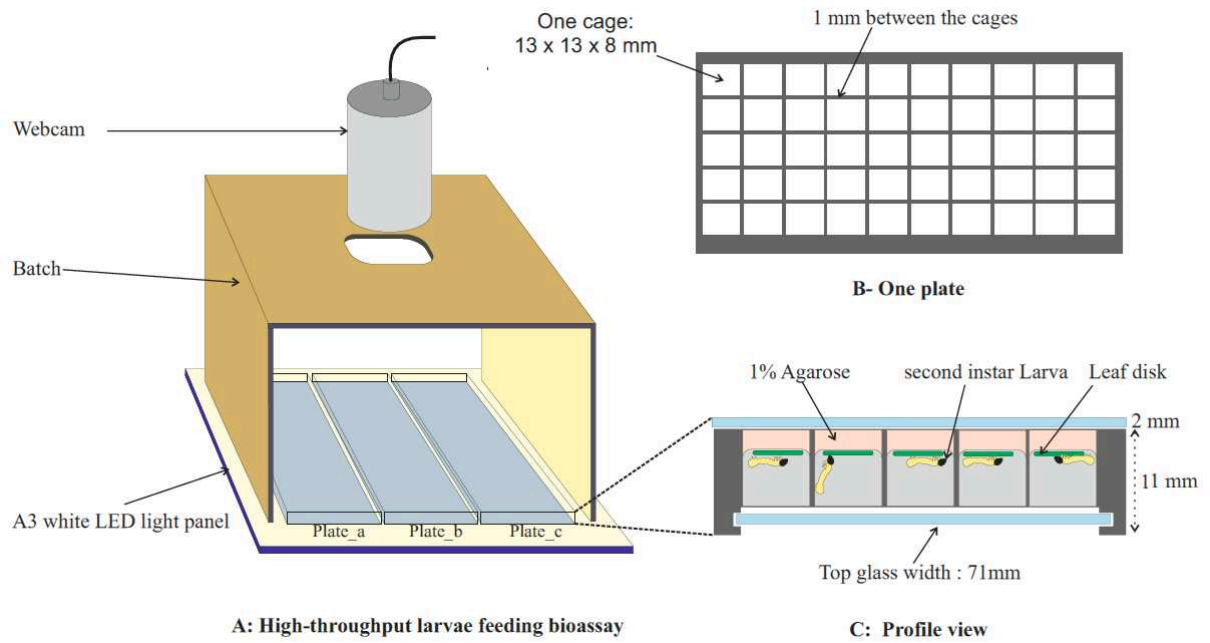


Fig 1. Feeding bioassay device for real-time image video recording. **A.** One feeding bioassay corresponds to one batch, that includes three 50-cages plates numbered a, b, c, and a webcam that is connected to a computer for image registration. **B.** One plate consists 50 cages, each representing an experimental unit. **C.** Profile view of one plate covered with two transparent glasses that shows larvae feeding on leaf disks during the run of an experiment.

An open-source software for image analysis: the analysis of the image stacks (1920 x 1080 pixels; RGB 24 bits) is performed with 2 plugins written in Java, and running under the open-source bio-imaging software, Icy [21]. The main steps of image analysis are described in Fig 2. A first plugin, **RoitoRoiArray** is used to help users creating areas defining the contour of each cage, and attributing a unique ID number to each one. A second plugin, **AreaTrack** is used to measure the leaf area at each time point. Leaves are isolated from the background, either with a set of pre-defined image filters transforming the image into a grey image on which a simple threshold is applied, or with user-defined arrays of colours (see Methods section). The number of pixels matching these filters is monitored over time and exported as a csv file. Each csv file contains the time in lines and 50 columns, with the pixels measured in each cage at each time point.

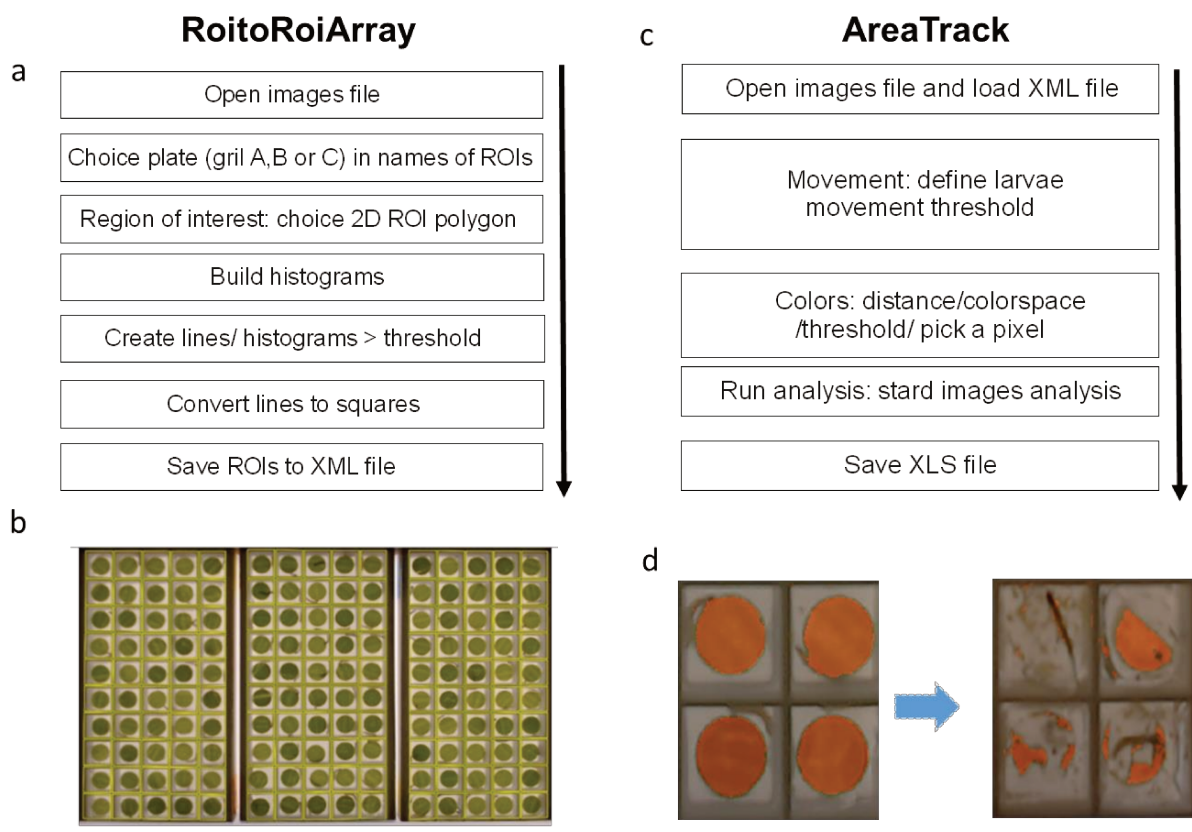


Fig 2. Image analysis plugins. **RoitoRoiArray** (left) automatically delimits the cages. **a.** Sequence of instructions in the plugin interface that need to be run step by step by the user. **b.** image of the three plates of a batch at the beginning of the experiment. **AreaTrack** (right) measures intact leaf disks area at each time point. **c.** Sequence of instructions in the plugin interface. **d.** Examples of intact leaf areas (in orange) detected in four cages at the beginning (left) and the end (right) of the experiment.

Freely-available R-scripts for data-processing and model-based data analysis: We propose a statistical method to compare treatments considering the variability of individual behaviours. One experiment may consist in several bioassays/batches. The statistical unit is a curve corresponding to the consumption of a single leaf disk measured over time (Fig 3.1). In this paper, we ran a total of four batches to compare the larvae responses to different concentrations of NeemAzal and quinine. Each batch consisted in one bioassay with two cameras monitoring a total of six plates (Table 1). Five concentrations of each of the two antifeedant product were tested. Controls consisted in a water treatment without any antifeedant. For each treatment, two plates were done and distributed among the batches (see Methods for details). Overall, we obtained 1200 consumption curves. Data analysis includes two steps. First, we define a typology of possible behaviours taking into account the whole dataset. Second, we compare the distribution of behavioural types between treatments of the same product. The different steps of the analysis, including data processing and data analysis were coded into R scripts that are freely available, along with the user manual [22].

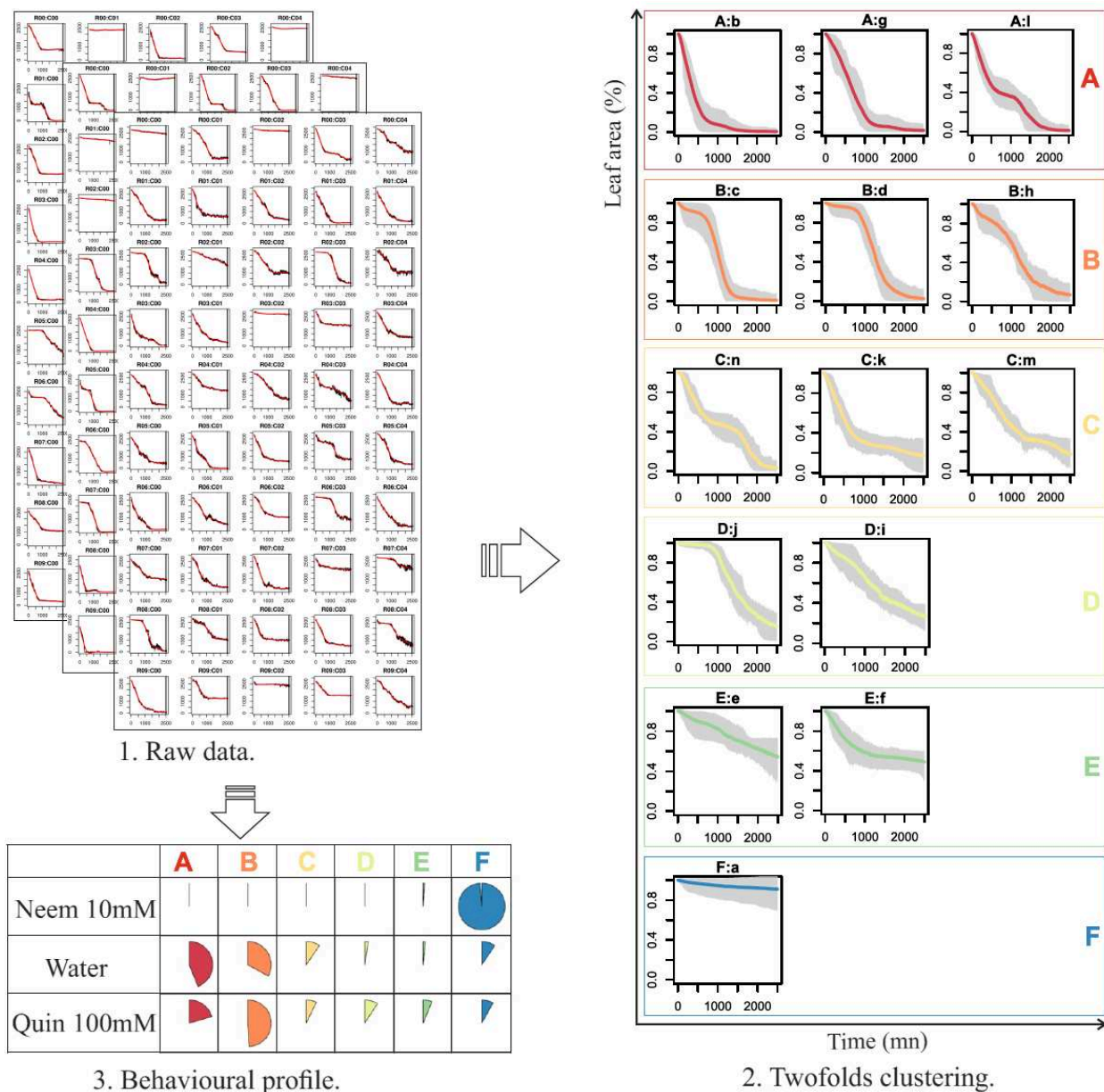


Fig 3. Data processing. 3.1 Raw data processing. Images are converted into (i) a pile of pdf files that allows the manual checking of the consumption curves and (ii) R data frames where each line corresponds to a cage and each column to a number of pixel at a time point. **3.2 Twofolds clustering.** First, SOTA classification results into 14 clusters. Each cluster is represented by a vignette showing the median consumption curve (color line) and the variations around the median at each time point (grey area). Second, SOTA clusters are grouped into six behavioural types using the median value of characteristic times t_{20} , t_{50} , t_{80} and total consumption representing the clusters. At the end, the consumption curve of each cage is attributed a behavioural type, between A and F. **3.3 Distribution of behavioural types for each treatment.** As an example, distribution of behavioural types in three treatments, NeemAzal 10mM, Water (control), and Quinine 100mM are represented as pie charts. Each line sums to one.

Consumption behaviours can be classified into 6 different types :the SOTA algorithm (Self Organizing Tree Algorithm) is an unsupervised neural network associated with a binary tree topology in which terminal nodes are the resulting clusters [23]. It is particularly adapted to the classification of temporal data. We ran this method on the 1200 consumption curves and it resulted in 14 different clusters of curves having similar profiles (Fig 3.2). As shown in Figure 3.2, variations of individual behaviours around the cluster median are moderate during the first 24h. The average within-cluster coefficient of variation ranges from 3% after one hour to 25% after 16 hours. It increases up to 125% at the end of the experiment. Each cluster was further characterized by behavioural traits like the time to consume 20%, 50% or 80% of the leaf disk (noted t20, t50, t80), as well as the total consumption at the end of the experiment. Median values of clusters behavioural traits were used to group the 14 clusters into six behavioural types (Fig 3.2):

- A-type larvae immediately start to feed (low t20), consume fast (low t50, t80) and finish the leaf disk before the end of the experiment.
- B-type larvae tend to wait before consuming (high t20) but consume fast after the waiting time and generally consume all the leaf disk.
- C-type larvae consume fast in the beginning (low t20) but reduce their consumption rate through time, resulting in low t50 but high t80.
- D-type larvae show a behaviour intermediate between B and C, with high t20 and high t50.
- E-type larvae are reluctant to start feeding, showing high t20, t50 and t80, but achieving a significant consumption at the end.
- F-type larvae do not consume the leaf disk.

Each individual curve can be assigned to a single behavioural type. The comparison between treatments result in comparisons between the proportions of each behavioural type within each treatment (Fig 3.3). Figure 3.3 shows that when maize leaves are treated with water, most larvae choose the A or B feeding behaviour and consume the maize disk fast. The treatment with 100mM quinine gives almost the same results. However, when maize leaves are treated with 10mM NeemAzal, most of the larvae do not consume the leaves and are classified into the F behavioural type.

Altogether, this analysis revealed the diversity of behavioural responses of ECB larvae when feeding on maize leaf disks. Notice that even with the water control treatment, a fraction of the larvae did not consume the leaf disk.

At the end, each individual curve can be assigned to a single behavioural type. The comparison between treatments result in comparisons between the proportions of each behavioural type within each treatment (Fig 3.3). Fig 3.3. shows that when maize leaves are treated with water, most larvae choose the A or B feeding behaviour and consume the maize disk fast. The treatment with 100mM quinine gives almost the same results. However, when maize leaves are treated with 10mM NeemAzal, most of the larvae do not consume the leaves and are classified into the F behavioural type. Finally, the classification of each individual observation into six behavioural types was analysed with a multinomial regression to compare the different treatments using statistical tests.

Altogether, our experimental design revealed the diversity of behavioural responses of ECB larvae when feeding on maize leaf disks. Notice that even with the water control treatment, a fraction of the larvae did not consume the leaf disk.

Bioassays confirm NeemAzal as an antifeedant for ECB larvae

After using the whole dataset to attribute a behavioural type to each individual (Fig 3), the effect of each treatment (i.e. antifeedant concentration) was analyzed separately for each antifeedant product by a multinomial regression (see Methods). Each analysis included the data of each dose of antifeedant and the controls, and resulted in the estimations of the probability distribution among behavioural types for each concentration of each product that are represented on Fig 4. A Wald test was used to test the significance of the comparisons between treatments (SI-Table 1 and SI-Table 2).

In the NeemAzal bioassays, an increasing concentration of the product is clearly associated with a decreasing proportion of A and B behavioural types, and an increasing proportion of E and F behavioural types, while intermediate concentrations correspond to a higher proportion of C, D, E behavioural types (Fig 4a). Without antifeedant, the high proportion of A and B behavioural types correspond to larvae that immediately start consuming (A-type) or wait a short time (B-type) but then fastly consume the whole leaf disk. For intermediate concentrations of the antifeedant, a large fraction of the larvae start consuming at a lower rate (C-type) or wait and consume slowly (D-type). They generally don't finish the leaf disk. Finally, with the highest NeemAzal concentration (10mM) 98% of the larvae are classified into the F behavioural type, that correspond to the absence of consumption.

These results are confirmed by contrast estimates relative to behavioural type E (SI-Table 1). A positive value of the contrast between treatments i and i' means that the proportion of behavioural type w (w being A, B, C, D or F) relative to behavioural type E is greater in treatment i than in treatment i' . All contrasts between 10 mM NeemAzal and lower concentrations are significantly negative for behavioural types A, C, D, and significantly positive for behavioural type F, indicating

a strong deficit of behavioural types A, C, D and a strong excess of behavioural type F in the 10mM NeemAzal treatment. Notice that for the B behavioural type, the comparisons lead to negative but non-significant contrasts. This may indicate a lack of power of the experimental design. NeemAzal treatments 0.1mM and 0.01mM are generally non-significantly different from the control, except for behavioural types A, B C. The negative value of the significant contrasts always indicate an excess of behavioural types A, C, and C in the control. Altogether, the analyses indicate that ECB larvae detect NeemAzal as an antifeedant, and change their feeding behaviour according to the concentration of the product.

In the quinine bioassay, we hardly saw any effect of the antifeedent concentration on the distribution of behavioural types, except for a slight excess of feeding types C, D, E in the 100mM treatment as compared to 10 mM (Fig 4b). This result is comforted by the contrasts that were hardly significant (SI-table 2). Even when leaf disks were treated with 100 mM quinine, the proportion of larvae showing an A/B feeding behaviour was still elevated. This indicates that quinine, when diluted with water, has no effect on larvae feeding behaviour and that most larvae consume the leaf disk entirely although a fraction do not start to consume immediately.

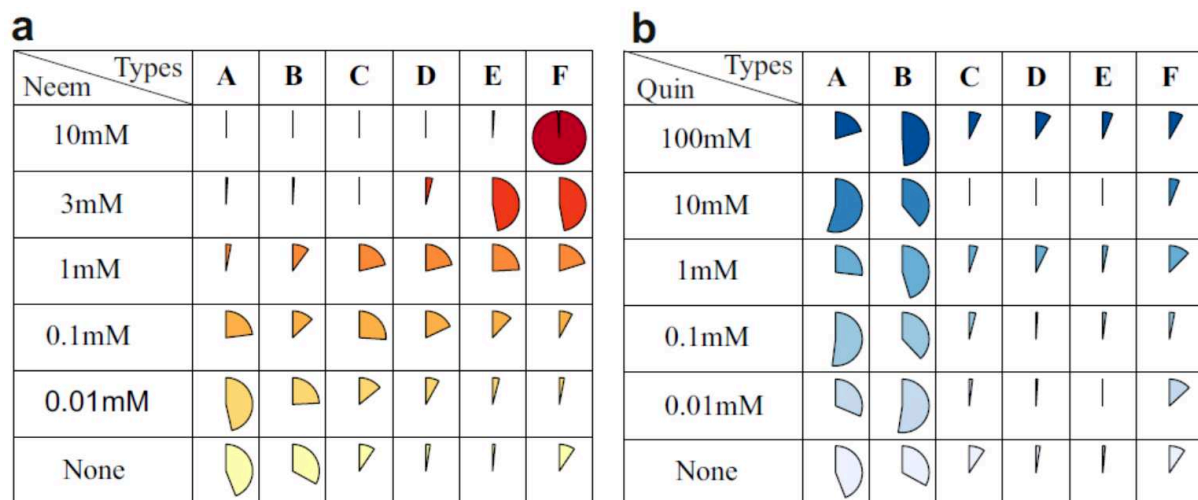


Fig 4. Distribution of behavioural types for the different treatments. For each treatment (row), the estimated probability of each behavioural type is represented as a pie. Each row sums to one. (a) **Neemazal treatments.** The Neemazal concentrations are indicated in the row names and represented by the red colour gradient. « None » corresponds to the control with water. (b) **Quinine treatments.** The Quinine concentrations are indicated in the row names and represented by the blue colour gradient. « None » corresponds to the control with water.

Discussion

Insect feeding bioassays are of importance for plant health, and particularly plant breeding programs. They allow to evaluate plant resistance against insects with chewing mouthparts by measuring the area of tissues consumed. Here, we propose a new fast and reliable feeding bioassay based upon measuring the consumption of leaf disks by insect larvae. We set-up a high-throughput semi-automated design able to follow the feeding activities and movements of 150 larvae at a time using a single webcam. This system was built with on-the-shelf readily available elements and can be duplicated and adapted to different situations [24]. While similar systems were proposed in the past, using videographic analyses to measure leaf consumption from a limited number of larvae, this is the first time such a system is demonstrated to run on such a large sample of insects. Such performances are made possible by the current evolution of the technology and because we chose to sample images at a relatively low frequency rate. Previously described approaches using videographic analyses were combining the measure of leaf areas with feeding phases and movements of the larvae, using movies acquired at 30 images per second from a single larva [19] or from a group of twelve larvae [17]. Our approach allows to monitor 150 larvae at a time. Actually, the limiting factor is the time to prepare the setups, and more specifically, the time to collect the larvae and to introduce them into individual cages. However, one operator can start two different batches a day, using two experimental devices. For example, the whole *NeemAzal* experiment (600 larvae) presented here was realized in two days, using four feeding bioassays devices in parallel.

One drawback of this method, is that the feeding activities are measured on excised tissue. This has three consequences. First, the excised tissue is deprived of its normal input of nutriment and it is prone to desiccation, changing its physiology and shape. Maintaining the moisture of leaf disks punched on the plant can limit desiccation during the experiment [16,19,25]. Second, the leaf disk characteristics changed over the course of the experiment, their colour sometimes turning yellowish or becoming paler. This is why we fill the cages with 1% agarose the day before the experiment [25], and sandwich them between two glass plates as shown in Fig 1. Lastly, leaf disks are mechanically excised, thus wounding the tissues, especially along the border of the disk. As reported in [9], several studies found no differences between detached/attached leaves and leaf disc assays. Nevertheless, the results obtained with leaf disks ought to be considered as a proxy precisely because of these limitations. Notice that the use of excised leaf disk allows a physical separation between the production of the plants and the location where the pest insects are held, and therefore minimizes the risks of contamination of the plant production site.

As a test case, we analysed here how European corn borer larvae modulate their feeding activities when leaf disks are treated with one potential antifeedant, either NeemAzal, which contains azadirachtin, or quinine, which an alkaloid detected as bitter by many organisms including humans. Azadirachtin is a triterpenoid, and a complex molecule, which is often considered as a universal antifeedant for insects [26,27]. NeemAzal is a commercial extract containing mainly azadirachtin and it was previously shown that it is indeed antifeedant for ECB larvae [10,15], showing both antifeedant and insecticide activities [10,26–28]. We found here that NeemAzal has a strong impact on the distribution of consumption curves (Fig 4a). As a second test compound, we tested the alkaloid quinine, which is found in the bark of *Cinchona* and *Remijia* trees [29]. This compound is used as an antimalarial agent and is used at low doses for its bitter taste to humans. It is an antifeedant for different animals, including *Drosophila* [30], and several Lepidoptera [31–34]. Interestingly, ECB larvae did not respond to quinine in our tests. Scattered observations in the literature reported the absence of bitterness of quinine in another Lepidoptera [35] and mantids [36]. While this observation is new for *O. nubilalis*, it remains to be tested whether the lack of response to quinine is species-specific. Actually, immature insect stages may exhibit different taste responses as shown in one Diptera [37] and one Lepidoptera [38]. This lack of sensitivity could concern only the specific larval stage (L2) tested here.

Our approach introduces original statistical analyses which are new for this field. We designed a rigorous statistical approach to compare the time course of feeding activities. Classical consumption tests usually rely upon comparing feeding after fixed interval(s) of time [10,11,16,39–43]. With the approach developed here, we can characterize properly the different feeding strategies adopted by several insects confronted to the same situation. While the classical approach and our approach may globally obtain comparable results, we will be able to better characterize whether plant resistance factors or externally applied chemicals have an immediate sensory effect or if they are the consequence of post-ingestive effects.

Lastly, the system described here, with its cutting edge methodology, its affordability and its possibility to test large number of insects opens up new possibilities to evaluate the variability of feeding behaviours within populations of insects.

Materials and Methods

Insect rearing

Ostrinia nubilalis Hbn. eggs were obtained from Bioline AgroSciences (France). Eclosed larvae were maintained in Petri dishes on an artificial diet (1.32 l water, 27 g agar powder, 224 g corn flour, 60 g dried yeast, 56 g wheat germ, 12 g L-ascorbic acid, 4 g vitamin mixture and minerals

(Réf.0155200), 0.8 g chlortetracycline, 2 g hydroxybenzoic acid methyl, 1.6 g sorbic acid and 4 g benzoic acid), under 16 :8 (light: dark) photoperiod at 70% humidity and at 26°C. Second instar larvae (10 days old) were used for the feeding bioassays.

Maize plants

Seeds from the maize inbred line MBS847_NLN14 were obtained from Saclay's Divergent Selection Experiments [44]. Seeds were pre-germinated in Sprouting Trays before being transferred into individual pots (4 l) containing Jiffy® premium substrate. Plants were grown in a greenhouse at 16 h light: 8 h darkness with the temperature between 21-24°C and 70% humidity. Leaf disks of 1 cm diameter were taken from mature leaves of the same leaf rank (rank 8). To obtain samples of 50 leaf disks, approximately 10 leaf disks were sampled on five different plants at the same developmental stage, so that the experiment is not destructive.

Bioassays

Each plate was designed as a plate of 10 x 5 square cages of (13 x 13 x 11 mm) separated by 1 mm walls [24]. The bottom of the plate was designed with two grooves to slide in a glass plate cut to the corresponding dimensions. The plate was first half-filled with 1% agar solution to maintain leaf disk moisture during the experiment [25]. One leaf disk and one larva (10 days old) was added in each cage [45]. The top of the plate was then covered with a second glass plate and maintained in place with two rubber bands, to prevent larvae to escape (Fig 1). The webcam was inserted into a stand made from MDF (Medium Density Fiberboard) cut by laser cutting (Fig 1). This stand enclosed an area fitting three plates, and ensured that images were taken at the same distance and under the same angle. The plates and the stand were placed on top of an A3 white LED light panel (white 4000K; Display Concept, Brussels, Belgium), lying flat on a table. In this paper, one bioassay consisted in setting-up two experimental systems at a time, with simultaneously monitoring six plates with two webcams.

Instructions for the making-up of the experimental system are deposited on a dataverse [24] and are freely available. Plates were designed with AutoCAD software with a 3D printer (Ultimaker 2+) using white PLA (polylactic acid) filament (Ref.RS Stock No. 134-8192), at a resolution of 0,6 mm [24].

Experimental system

Leaf disks were deposited on the 50-cages plates onto 1% agarose gel immediately after sampling to avoid dehydration. The bioassays consisted in testing the leaf consumption by the larvae in the absence or in the presence of an antifeedant. Two products at different concentrations were tested: an extract from neem seeds, NeemAzal (AMM n° 2140090 *) that contains azadirachtin, and

quinine hydrochloride (Sigma Aldrich; CAS number: 6119-47-7). Leaf disks were sprayed with 10 μ l (as spraying volume) of the substance with distilled water as solvent and kept 15 to 20 min at ambient temperature to let the solution dry before starting the experiment. This spraying has been done with repeater sprayer (Repeater [®] E3/E3x) on one side of leaf disk. Five concentrations were used for either NeemAzal and quinine according to experimental design (Table 1). One larva (second instar) was deposited in each cage. Plates were placed in the monitoring device and larvae were allowed to feed for 48 hours at ambient temperature. A treatment (i.e. one specific concentration of the product) was tested in two 50-cages plates with 50 leaf-disks treated with the same concentration of the product. For each product, we conducted two bioassays/batches that started on two consecutive days (Table 1). In each batch, treatments were randomly assigned to the plates. As we tested two antifeedant products, this experimental design led to the acquisition of 1200 *O. nubilalis* larvae feeding curves (2 products * 6 treatments * 2 replicates * 50 leaf disks).

Table 1. Experimental design. Each batch corresponds to an experiment performed on the same day with six different plates. One plate in a batch corresponds to one treatment. The plates are identified by letters corresponding to their position in the experimental set-up. Plates a, b, c are connected to the same camera, as well as plates d, e, f. Neem corresponds to NeemAzal treatment and Quin to Quinine treatment.

Antifeedant	Concentration	Batch			
		19-06-18	19-06-19	19-06-27	19-06-28
Control	00	d	e	a	b
Neem (mM)	0.01	a	c	-	-
	0.1	c	b	-	-
	1	e	d	-	-
	3	f	f	-	-
	10	b	a	-	-
Quin (mM)	0.01	-	-	d	f
	0.1	-	-	b	c
	1	-	-	f	d
	10	-	-	c	a
	100	-	-	e	e

Image acquisition and analysis

Image acquisition: Webcams (Logitech Pro C970) were connected to the USB port of a PC computer, with sufficient disk memory to store the images. Notice that one standard computer could easily control the 4 webcams, although we only used two webcams here. Time-lapse images were taken every minute by a video surveillance software (VisionGS BE 3.1.0.4; <http://www.visiongs.com>) as 1920 x 1080 pixels jpg files, named with a time stamp.

Image analysis: Image analysis of the stacks was performed semi-automatically, with the help of custom programs working within the bio-imaging open-source program ICY [21]. In order to follow the consumption of each leaf-disk, regions of interest (ROIs) must first be defined to locate each cage or disk. This is done semi-automatically with a plugin called RoitoRoiArray (<http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/roitoarray/>). The plugin automatically analyses the image stacks and makes a first proposal for the ROIs, that need to be refined by the user. Then, the plugin generates arrays of ROIs, gives them a unique ID and saves them into an XML file (Fig 2a&b). A second plugin, Areatrack (<http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/areatrack/>), allows users to load stacks of images, browse or display them as a time-lapse movie, and analyses them (Fig 2c&d). After loading the ROIs from the previous file, each image of the stack is filtered and thresholded to keep only the pixels corresponding to the leaf areas. Movements of the larvae can also be detected by performing image to image subtraction followed by thresholding. These measures can then be displayed or saved as a CSV file. As considerable variation of lightning and colour of the leaf disks occurred, two detection strategies were implemented. The first approach was to transform the RGB image by transforming it into a grey plane and applying a unique threshold. The filters implemented are: R, G, B, 2R-(G+B), 2G-(R+B), 2B-(R+G), (R+G+B)/3, or converting the image into the HSB space and extracting one component H (HSB), S(HSB) and B (HSB). Although this approach is satisfactory in most cases, some experiments could not be analysed this way. We introduced another approach, consisting in letting the user point at dots on the screen to build a matrix of colours. These colours were stored either in the RGB, HSV or H1H2H3 space. The user could threshold the image using a distance around these colours, L1 or L2. The distance L1 between colour c1 and c2 is defined in the RGB space as distance

$$L1 = |R_{c1} - R_{c2}| + |G_{c1} - G_{c2}| + |B_{c1} - B_{c2}|.$$

Distance L2 is defined as distance

$$L2 = \sqrt{((R_{c1} - R_{c2})^2 + (G_{c1} - G_{c2})^2 + (B_{c1} - B_{c2})^2)}.$$

Both approaches let the user display the thresholded image as an overlay over the original images and thus choose the best adapted threshold. As these experiments generate huge amount of data,

additional procedures were implemented behind the screen to fetch data from the disk in advance, and also to explore and analyse only a fraction of the data, for example one image under 10 or under 60. Once the detection was done, by analysing all images of the stack or a subset of them, the resulting data were exported as an excel file, including three type of measures: the raw data (i.e. the number of pixels over the threshold in each cage), a running average and a running median of the raw data using a user-defined span (usually $n=10$). While this analysis can be run on the three plates at once, it was found more convenient to perform the analysis plate by plate, so that the measures performed on each 50-cages plate were saved into one separate file. Although recordings were performed on longer time periods, this paper reports analyses made over a 48h period, corresponding to stacks of 2,880 images per plate.

Data analysis

Series of R scripts were written for data processing and statistical analysis. The scripts, along with the raw data and a documentation were deposited in a dataverse [22] and are freely available.

Metadata: raw files were stored using lab storage facilities on specific directories. Directories names contain information about the date of the experiment and the camera number. Csv filenames contained all the information about the experiment: date, camera ID, plate ID, insect population, plant genotype, plant environment, plant coordinates, substance name, substance concentration. After image analysis, all csv files to be analysed together were copied under a single sub-directory

Standardization: first, pdf images of leaf consumption through time are produced. Each pdf file corresponds to one plate and contains 50 plots, one for each cage. Cages that produced abnormal plots, identified by their row and column coordinates, were manually removed from the analysis. Then, we standardized the data by dividing the leaf area by the total leaf area at time t_0 . Hence, the basic measure became the fraction of intact leaf disk from each cage at each time-point. We defined $t_{max}=2500mn$ (40 hours), and only retained the data taken before t_{max} .

Data clustering: the whole dataset, comprising the experiments performed with NeemAzal quinine and the control (four batches, 24 plates, 1200 cages corresponding to 1200 consumption curves), was used to run unsupervised clustering algorithm SOTA [23] on the individual curves in order to obtain 14 clusters. The total number of clusters was empirically chosen to avoid having clusters containing only a couple of curves and proved to be robust over the different experiments.

Typology of feeding behaviour: each curve was characterized by the time after which 20%, 50% and 80% of the leaf disk was consumed, respectively noted t_{20} , t_{50} , t_{80} , and the fraction of the leaf disk consumed at t_{max} . When less than 20%, 50% or 80% of the leaf disk was consumed at t_{max} , the corresponding variable was given the value of t_{max} . Then, each cluster was characterized by the median t_{20} , t_{50} , t_{80} and total fraction consumed, using the values of the curves belonging

to the cluster (Fig 3.2). We then arranged the 14 clusters into 6 groups based on their median values for t20, t50, t80 and total fraction consumed using the K-means algorithm [45]. Each group corresponded to a different feeding behaviour named by a letter from A to F (Fig 3.2). All the curves belonging to the same behavioural group were assigned the same letter and are referred as “behavioural type” below and in the results section

Data transformation: at the end of the analysis, each cage l , corresponding to treatment i , batch j and plate k was characterized by the feeding behavioural type (A to F) of the group to which it belongs. Hence, the observations of a single cage can be summarized into a vector of zeros and ones $Z_{ijkl} = (Z_{ijkl}^1, \dots, Z_{ijkl}^w, \dots, Z_{ijkl}^W)$, (1) where w represents one feeding behaviour, with w in $\{A, B, C, D, E, F\}$, and $Z_{ijkl}^w = 1$ if the observed feeding behaviour is w , and $Z_{ijkl}^w = 0$ if else. For a given cage subscripted by $ijkl$, $\sum_{w=1}^W Z_{ijkl}^w = 1$

Statistical analysis: a separate analysis was conducted for each product (NeemAzal and Quinine). Z_{ijkl} is the result of one multinomial sampling in

$$Z_{ijkl} \equiv M(1, p_{ijk}^1, \dots, p_{ijk}^w, \dots, p_{ijk}^W) \quad (1)$$

where $p_{ijk}^w = P(Z_{ijkl}^w = w)$ is the probability that a single observation falls into the feeding behaviour w . We used the logistic multinomial regression [46] to estimate the probabilities. For a given

For a given product, the full model writes

$$\log\left(\frac{p_{ijk}^w}{p_{ijk}^W}\right) = \mu^w + \alpha_i^w + \beta_j^w + \gamma_{ik}^w$$

where α_i^w is the treatment effect, β_j^w is the batch effect, and γ_{ik}^w is the interaction between plate and treatment effects.

The experimental setting was highly imbalanced. For example, only control plates from the two quinine batches were added to the NeemAzal experiment, so that it was not possible to test for the batch effect. Similarly, because we used only two plates for each treatment (except for the controls), interactions between plates and treatments cannot be estimated. We therefore used the submodel (2) to infer the effects of the treatments, that writes:

$$\log\left(\frac{p_{ijk}^w}{p_{ijk}^W}\right) = \mu^w + \alpha_i^w \quad (2)$$

where μ^w is the average proportion of the feeding behaviour w , α_i^w is the effect of treatment i , and W is the reference feeding behaviour. Submodel (2) was compared to a model where the differences between the observations were only due to the plates, whatever the treatment

$$\log\left(\frac{p_{ijk}^w}{p_{ijk}^W}\right) = \mu^w + \gamma_k^w \quad (3)$$

Models (2) and (3) were compared using the Akaike Information Criterion (AIC) [47]. In the two experiments, model (2) was chosen by the AIC criterion, meaning that probabilities that one cage falls in one given behaviour group rather than another depends more on the treatment (product concentration) than the plate it belonged to.

The multinomial regression (2) provided an estimation of the probabilities associated with each treatment, using

$$p_i^w = \frac{e^{\beta^w + \alpha_i^w}}{1 + \sum_v e^{\beta^v + \alpha_i^v}}$$

that were used for the graphical representations (Fig 4).

A Wald test was performed to compare the treatments [48]. Contrasts between two treatments i and i' are computed as the differences $\alpha_i^w - \alpha_{i'}^w$. A positive value of the contrast means that the proportion of feeding type w relative to feeding type W is greater in treatment i than in treatment i' . With multinomial regression, the choice of the reference is tricky. The best reference is the category where the observations are equally distributed between the treatments. We chose the feeding type F as the reference for the quinine experiment, and the feeding behaviour E for the NeemAzal experiment.

Acknowledgments

This work was supported by a scholarship from the Islamic Bank of Development to Inoussa Sanane (N° BID: 600033174) and a grant from the BASC labex (ITEMAIZE project) supported by IDEX Paris-Saclay. We are grateful to Stephane Dallongeville (Institut Pasteur), for his constant help and support for the development of the ICY plugins. We warmly thank members of J Legrand's and F Marion-Poll's laboratories for discussion and support during this work and R Jeannette for his help for the insects rearing.

Reference

1. Battisti A, Larsson SA, Björkman C, Niemelä P. Climate change and insect pest distribution range. In 2015.
2. Castex V, Beniston M, Calanca P, Fleury D, Moreau J. Pest management under climate change : The importance of understanding tritrophic relations. *Science of The Total Environment*. 2018 ; 616–617 :397–407. [academia.edu/40167318](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.041).
3. Bradshaw CJA, Leroy B, Bellard C, Roiz D, Albert C, Fournier A, et al. Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications*. 2016 ;7(1) : 12986. [nature.com/articles/ncomms12986](https://doi.org/10.1038/ncomms12986).

4. Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, et al. The Population Biology of Invasive Species. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 2001 ;32(1) :305–32. doi : 10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114037.
5. Little CM, Chapman TW, Hillier NK. Plasticity Is Key to Success of *Drosophila suzukii* (Diptera : Drosophilidae) Invasion. *J Insect Sci*. 2020 ;20(3). doi : 20/3/5/5837529.
6. Goggin FL, Lorence A, Topp CN. Applying high-throughput phenotyping to plant–insect interactions : picturing more resistant crops. *Current Opinion in Insect Science*. 2015 ;9 :69–76. doi : S2214574515000334.
7. Jones CG, Coleman JS. Leaf disc size and insect feeding preference : implications for assays and studies on induction of plant defense. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1988 ;47(2) :167–72. doi :10.1111/j.1570-7458.1988.tb01132. x.
8. Nandy S, Chen Q, Yang J, Beasley D, Li H, Goettel M. Use of a detached leaf screening method for segregating Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) resistant *Solanum* hybrid lines. *Canadian journal of plant science Revue canadienne de phytotechnie*. 2008 ;88(4) :633—638. doi :10.4141/CJPS07047.
9. Visschers IGS, Dam NM van, Peters JL. An objective high-throughput screening method for thrips damage quantitation using Ilastik and ImageJ. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2018 ;166(6) :508–15. doi :10.1111/eea.12682.
10. Descoins C. Perception de substances antiappétentes par des chenilles de lépidoptères phytophages. *L'Année Biologique*. 2001 ;40 :55–73. doi : S0003501701720855.
11. Arnason JT, Philogène BJR, Donskov N, Hudon M, McDougall C, Fortier G, et al. Antifeedant and insecticidal properties of azadirachtin to the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1985 ;38(1) :29–34. doi :10.1111/j.1570-7458.1985.tb03494. x.
12. Belles X, Camps F, Coll J, Piulachs MD. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenoids against larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera). *J Chem Ecol*. 1985 ;11(10) :1439–45. doi :10.1007/BF01012143.
13. Yencho GC, Renwick JAA, Steffens JC, Tingey WM. Leaf surface extracts of *Solanum berthaultii* hawkes deter colorado potato beetle feeding. *J Chem Ecol*. 1994 ;20(5) :991–1007. doi :10.1007/BF02059737.
14. Shields VDC, Smith KP, Arnold NS, Gordon IM, Shaw TE, Waranch D. The effect of varying alkaloid concentrations on the feeding behaviour of gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera : Lymantriidae). *Arthropod-Plant Interactions*. 2008 ;2(2) :101–7. doi :10.1007/s11829-008-9035-6.
15. Guthrie WD, Dicke FF, Neiswander CR. Leaf and sheath feeding resistance to the European corn borer in eight inbred lines of dent corn. 1960 ; doi :1811/62651.
16. Isman MB, Koul O, Luczynski A, Kaminski J. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *J Agric Food Chem*. 1990 ;38(6) :1406–11. doi :10.1021/jf00096a024.
17. Escoubas P, Lajide L, Mitzutani J. An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1993 ;66(2) :99–107. doi :10.1111/j.1570-7458.1993.tb00697.x.
18. Alchanatis V, Navon A, Glazer I, Levski S. PA—Precision Agriculture : An Image Analysis System for measuring Insect Feeding Effects caused by Biopesticides. *Journal of Agricultural Engineering Research*. 2000 ;77(3) :289–96. doi : S0021863400906103.

19. Rowley M, Stitt J, Hanson F. Image analysis of small animal feeding behaviour. *Behaviour Research Methods, Instruments, & Computers*. 2003 ;35(3) :447–51. doi :10.3758/BF03195522.
20. Ji CW, Park C-G, Lee S-W, Kim J-H, Choi BR. Continuous measuring of leaf area for analyzing feeding behaviour of *Spodoptera litura* (Lepidoptera : Noctuidae) larva. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2017 ;20(2) :491–5. doi : S1226861516303508.
21. Chaumont F de, Dallongeville S, Chenouard N, Hervé N, Pop S, Provoost T, et al. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods*. 2012 ;9(7) :690–6. doi : nmeth.2075.
22. Sanane I, Dillmann C, Legrand J, Marion-Poll F. R scripts and datas for the analysis of Lepidoptera feeding bioassays. V1 ed. Portail Data INRAE ; 2020. doi :10.15454/CRIUDY.
23. Herrero J, Valencia A, Dopazo J. A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics*. 2001 ;17(2) :126–36. doi:17/2/126/182096.
24. Sanane I, Dillmann C, Marion-Poll F. Instructions for the building of the Sanane lepidoptera larvae feeding bioassay device. V1 ed. Portail Data INRAE ; 2020. doi :10.15454/UVXKDJ.
25. Jin S. Maize defense responses to caterpillars at the molecular, phenotypic and ecological scales. [PhD Thesis]. Pennsylvania State University ; 2017.
26. Schmutterer H. Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. *Journal of Insect Physiology*. 1988 ;34(7) :713–9. doi:0022191088900820.
27. Mordue (Luntz) AJ, Blackwell A. Azadirachtin : an update. *Journal of Insect Physiology*. 1993 ;39(11) :903–24. doi :0022191093900018.
28. Bezzar-Bendjazia R, Kilani-Morakchi S, Maroua F, Aribi N. Azadirachtin induced larval avoidance and antifeeding by disruption of food intake and digestive enzymes in *Drosophila melanogaster* (Diptera : Drosophilidae). *Pestic Biochem Physiol*. 2017 ;143 :135–40.
29. Ruiz-Mesia L, Ruiz-Mesía W, Reina M, Martínez-Díaz R, de Inés C, Guadaño A, et al. Bioactive Cinchona Alkaloids from *Remijia peruviana*. *J Agric Food Chem*. 2005 ;53(6) :1921–6. doi :10.1021/jf048880e.
30. Sellier M-J, Reeb P, Marion-Poll F. Consumption of bitter alkaloids in *Drosophila melanogaster* in multiple-choice test conditions. *Chem Senses*. 2011 ;36(4) :323–34.
31. Minnich DE. An experimental study of the tarsal chemoreceptors of two nymphalid butterflies. *Journal of Experimental Zoology*. 1921 ;33(1) :172–203. doi :10.1002/jez.1400330105.
32. Ramaswamy SB, Cohen NE, Hanson FE. Deterrence of feeding and oviposition responses of adult *Heliothis virescens* by some compounds bitter-tasting to humans. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1992 ;65(1) :81–93. doi :10.1111/j.1570-7458.1992.tb01630.x.
33. Shikano I, Akhtar Y, Isman MB, Rankin CH. Dishabituating long-term memory for gustatory habituation in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Behav Neurosci*. 2010 ;124(5) :701–5.
34. Salloum A, Colson V, Marion-Poll F. Appetitive and Aversive Learning in *Spodoptera littoralis* Larvae. *Chem Senses*. 2011 ;36(8) :725–31. doi :36/8/725/266361.
35. Pszczolkowski MA. Pharmacological analysis of the feeding response of codling moth (*Cydia pomonella* ; Lepidoptera : Tortricidae) neonates to bitter compounds. 2017 ;

36. Mebs D, Wunder C, Toennes SW. Coping with noxious effects of quinine by praying mantids (Mantodea) and spiders (Araneae). *Toxicon*. 2019 ;162 :57–60. doi : S0041010119300959.
37. Städler E, Schöni R. High sensitivity to sodium in the sugar chemoreceptor of the cherry fruit fly after emergence. *Physiological Entomology*. 1991 ;16(1) :117–29. doi :10.1111/j.1365-3032.1991.tb00548.x.
38. Sandoval M, Albert PJ. Chemoreception of sucrose and amino acids in second and fourth instars of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera : Tortricidae). *Journal of Insect Physiology*. 2007 ;53(1) :84–92. doi : S0022191006001855.
39. Menezes Jr. AO, Oliveira A, Mikami AY, Ide AK, Ventura MU. Feeding preferences of *Microtheca punctigera* (Achard) (Coleoptera : Chrysomelidae) for some Brassicaceae plants in multiple-choice assays. *Scientia Agricola*. 2005 ;62(1) :72–5. doi: S0103-90162005000100014&lng=en&nrm=iso&tlng=es.
40. Clark EL, Isitt R, Plettner E, Fields PG, Huber DPW. An Inexpensive Feeding Bioassay Technique for Stored-Product Insects. *Journal of Economic Entomology*. 2014 ;107(1) :455–61. doi:10.1603/EC13283.
41. O’Neal ME, Landis DA, Isaacs R. An Inexpensive, Accurate Method for Measuring Leaf Area and Defoliation Through Digital Image Analysis. *J Econ Entomol*. 2002 ;95(6) :1190–4. doi :95/6/1190/863513.
42. Huang J, Nuessly GS, McAuslane HJ, Nagata RT. Effect of screening methods on expression of romaine lettuce resistance to adult banded cucumber beetle, *Diabrotica balteata* (coleoptera : chrysomelidae). *Florida Entomologist*. 2003 ;86(2) :194–8. doi:10.1653/0015-4040(2003)086%5B0194:EOSMOE%5D2.0.CO%3B2.
43. Vigneault C, Barkiré B, Martel P. Méthode de mesure de surface de feuilles utilisée dans l’évaluation d’insecticides. *Cahiers Agricultures*. 1995 ;4(1) :53-55 (1). doi : 29868.
44. Aguirre-Liguori JA, Gaut BS, Jaramillo-Correa JP, Tenailon MI, Montes-Hernández S, García-Oliva F, et al. Divergence with gene flow is driven by local adaptation to temperature and soil phosphorus concentration in teosinte subspecies (*Zea mays parviglumis* and *Zea mays mexicana*). *Molecular Ecology*. 2019 ;28(11) :2814–30. doi :10.1111/mec.15098.
45. Júnior ALB, Souza BHSD, Costa EN, Ribeiro ZA, Stout MJ. Facteurs influençant l’expression de l’antixénose dans le soja à *Anticarsia gemmatalis* et *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. 2015 ;108(1) :317–25. doi :10.1093/jee/tou007
46. Hartigan JA, Wong MA. Algorithm AS 136 : A K-Means Clustering Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society Series C (Applied Statistics)*. 1979 ;28(1) :100–8. doi :2346830.
47. Venables WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with S* [Internet]. 4th ed. New York : Springer-Verlag; 2002. (Statistics and Computing). doi :9780387954578.
48. Akaike H. Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. In : Parzen E, Tanabe K, Kitagawa G, editors. *Selected Papers of Hirotugu Akaike*. New York, NY : Springer ; 1998. p. 199–213. (Springer Series in Statistics). doi :10.1007/978-1-4612-1694-0_15.
49. Davidson R, Mackinnon JG. ‘The Method of Maximum Likelihood : Fundamental Concepts and Notation’. *Estimation and Inference in Econometrics*. New York : Oxford University Press. p. 89. ISBN. 1993. doi : qed.econ.queensu.ca/ETM/etm-info.html.

Supplementary information

SI_Table 1: Contrasts between the different concentrations of NeemAzal treatments within each typology of feeding behaviour. Contrasts are exprimed on the logit scale, relative to the reference feeding behavioural category E. For each contrast and each behavioural type, the levels of significance is indicated by the colour filling. Darkgray = significant at the 1‰ risk level.1. Lightgrey = significant at the 1% risk level. White = non significant at the 1% risk level.

Contrast	A	B	C	D	F
neem_10-3mM	-10,84	-8,32	2,17	-12,11	4,59
neem_10-1mM	-12,61	-11,29	-15,31	-14,44	4,78
nem_10-0,1mM	-15,34	-12,25	-16,22	-14,98	5,00
neem_10-0,01mM	-17,13	-13,96	-16,70	-15,27	4,88
neem_10mM-Control	-18,07	-15,26	-17,29	-15,08	2,75
neem_3-1mM	-1,77	-2,97	-17,48	-2,33	0,18
neem_3-0,1mM	-4,50	-3,93	-18,39	-2,87	0,41
neem_3-0,01mM	-6,29	-5,64	-18,87	-3,16	0,29
neem_3mM-Control	-7,23	-6,94	-19,46	-2,97	-1,85
neem_1-0,1mM	-2,73	-0,96	-0,91	-0,54	0,22
neem_1-0,01mM	-4,52	-2,67	-1,39	-0,83	0,11
neem_1mM-Control	-5,46	-3,97	-1,98	-0,64	-2,03
neem_0,1-0,01mM	-1,79	-1,71	-0,48	-0,29	-0,12
neem_0,1mM-Contol	-2,73	-3,01	-1,07	-0,10	-2,25
neem_0,01mM-Control	-0,94	-1,30	-0,59	0,18	-2,13

SI-Table 2: Contrasts between the different concentrations of Quinine treatments within each typology of feeding behaviour. Contrasts are on the logit scale, relative to the reference behavioural type F. For each contrast and each behavioural type, the levels of significance is indicated by the colour filling. Darkgray = significant at the 1% risk level. Lightgrey = significant at the 1% risk level. White = non significant at the 1% risk level.

	A	B	C	D	E
quin_100-10mM	-1,3	-0,08	16,06	16,47	15,12
quin_100-1mM	0,14	0,49	0,742	0,657	1,099
quin_100-0,1mM	-1,94	-0,75	-0,42	1,216	0,118
quin_100-0,01mM	0,05	0,41	1,738	2,683	15,17
quin_100mM-Control	-0,62	0,55	-0,13	1,453	1,558
quin_10-1mM	1,44	0,57	-15,3	-15,8	-14
quin_10-0,1mM	-0,64	-0,67	-16,5	-15,3	-15
quin_10-0,01mM	1,35	0,49	-14,3	-13,8	0,054
quin_10mM-Control	0,68	0,63	-16,2	-15	-13,6
quin_1-0,1mM	-2,08	-1,24	-1,16	0,559	-0,98
quin_1-0,01mM	-0,1	-0,09	0,996	2,026	14,07
quin_1mM-Control	-0,76	0,05	-0,88	0,796	0,46
quin_0,1-0,01mM	1,98	1,15	2,16	1,467	15,05
quin_0,1mM-Control	1,32	1,29	0,288	0,237	1,441
quin_0,01mM-Control	-0,66	0,14	-1,87	-1,23	-13,6

2.2 Résultats complémentaires sur la mise au point des tests de consommation

En complément de l'article présenté dans ce chapitre, soumis à la revue *PLOS-Biology*, différents essais ont été réalisés pour la mise au point des tests de consommation et sont présentés ici. Tout d'abord, l'une des originalités du test de consommation que j'ai mis au point est de prendre en compte l'ensemble de la dynamique de consommation pour chaque larve, mais aussi la variabilité des comportements individuels des larves d'insecte soumises à un même traitement. Les tests de consommation pratiqués de façon courante n'utilisent en général qu'une seule information, le temps mis par une larve pour consommer 50% d'un disque foliaire (*t50*). Je présente ici les résultats du jeu de données utilisé pour l'article (Sanane *et al.*, 2020) en utilisant la variable *t50* pour comparer les traitements. Par ailleurs, j'ai également réalisé des tests pour évaluer l'effet de l'éthanol sur l'appétence des larves, dont je présente les résultats préliminaires.

2.2.1 Utilisation de la variable *t50* pour comparer les vitesses de consommation des larves

Le dispositif expérimental mis au point a été utilisé pour mesurer la réponse des larves de pyrale *Ostrinia nubilalis* (ECB) à différentes concentrations de deux molécules supposées antiappétentes : l'huile de neem (NeemAzal) et la quinine. Le prétraitement des données fournit un fichier contenant, pour chaque unité expérimentale (un puits d'une plaque de 50 puits soumis au même traitement), différentes statistiques décrivant la courbe de consommation, dont le temps mis par la larve pour consommer 50% de la surface du disque foliaire (*t50*), et aussi une lettre correspondant au type de consommation, appartenant à l'une des six catégories identifiées (*typo*). La variable *typo* est une variable qualitative, dont les variations peuvent être analysées en utilisant des méthodes de régression multinomiale (Sanane *et al.*, 2020). La variable *t50* est une variable quantitative, dont les variations peuvent être analysées par régression linéaire. Les résultats présentés ici, basés sur l'analyse du *t50* telle qu'elle est pratiquée classiquement, montrent pourquoi ce modèle de régression linéaire basé sur le *t50* n'est pas adapté pour analyser la consommation des larves de pyrale sur des disques foliaires de maïs.

Matériel et méthodes

Pour chaque expérience, des disques foliaires d'environ 1cm de diamètre ont été prélevés sur des feuilles matures de rang 8 de plants de maïs de la lignée MBS847_MLN14 cultivés en serre. Chaque réplicat consiste en 50 disques foliaires déposés sur une plaque et traités par pulvérisation de 10 µl de solution aqueuse pouvant contenir du NeemAzal (AMM n° 2140090 *) ou de la quinine (Sigma 295 Aldrich ; CAS number : 6119-47-7) à différentes concentrations. Pour chaque molécule et chaque concentration, deux réplicats sont réalisés. Les réplicats sont organisés en batch. Chaque batch comprend un ensemble de six plaques étudiées le même jour dans les mêmes conditions. Le plan d'expérience est résumé dans le tableau 1. Une unité expérimentale est identifiée de façon unique par le batch, la plaque, et les coordonnées du puits. Les unités expérimentales d'une même plaque et d'un même batch ont reçu le même traitement. Au début de l'expérience, une larve est déposée dans chaque puits. Les larves sont issues d'une population d'élevage maintenue par Bioline AgroSciences (France). Pour chaque expérience, des larves au stade L2 et de taille similaire sont choisies dans la population pour être déposées dans chaque puits. L'enregistrement débute lorsque toutes les plaques d'un même batch sont disposées à leur place dans le dispositif.

Tableau 1. Plan d'expérience. Chaque batch correspond à une expérience réalisée le même jour avec six plaques différentes. Une plaque d'un batch correspond à un traitement. Les plaques sont identifiées par des lettres correspondant à leur position dans le dispositif expérimental. Les plaques a, b, c sont reliées à une même caméra, de même que les plaques d, e, f.

Traitement			Batch			
Neem (mM)	Quin (mM)	Label	19-06-18	19-06-19	19-06-27	19-06-28
0	0	Control	d	e	a	b
0.01	0	n1	a	c		
0.1	0	n2	c	b		
1	0	n3	e	d		
3	0	n4	f	f		
10	0	n5	b	a		
0	0.01	q1			d	f
0	0.1	q2			b	c
0	1	q3			f	d
0	10	q5			c	a
0	100	q6			e	e

Les images sont enregistrées chaque minute durant 24h. Les étapes d'analyse d'image et de prétraitement des données permettent d'obtenir un fichier .csv avec une mesure par puit. Pour le t50, la variable aléatoire est Y_{ijk} correspondant à la mesure du t50 pour le traitement i , dans le batch j et le puits k . Les sources de variation prises en compte sont l'effet fixe traitement t_i et l'effet aléatoire de la plaque P_{ij} :

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + P_{ij} + E_{ijk}$$

Dans ce modèle, les effets aléatoires de la plaque sont supposés identiquement et indépendamment distribués selon une loi normale de moyenne nulle et de variance σ_p^2 .

Les résidus sont supposés identiquement et indépendamment distribués selon une loi normale de moyenne nulle et de variance σ^2 . Le package R nlme (Pinheiro, Bates, & DebRoy, 2018) a été utilisé pour l'étude du modèle à effet aléatoire. La significativité des effets plaque et des effets traitement a été mesurée par comparaison de modèles emboîtés : Confère tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Modèles emboîtés utilisés pour tester l'effet du traitement et l'effet de la plaque.

La comparaison entre les modèles M1 et M2 permet de tester l'effet traitement. La comparaison entre les modèles M2 et M3 permet de tester l'effet plaque.

Modèle	Décomposition	Description
M1	$Y_{ijk} = \mu + t_i + P_{ij} + E_{ijk}$	Modèle complet avec un effet du traitement et un effet plaque
M2	$Y_{ijk} = \mu + P_{ij} + E_{ijk}$	Modèle sans effet traitement
M3	$Y_{ijk} = \mu + t_i + E_{ijk}$	Modèle sans effet plaque

Le modèle M1 a été utilisé pour estimer la moyenne du t50 pour chaque concentration, et son intervalle de confiance. Les deux traitements NeemAzal et Quinine ont été étudiés séparément. Un graphe des résidus a été produit pour chaque traitement pour valider l'hypothèse d'indépendance des résidus.

Résultats

Chaque traitement, NeemAzal et Quinine, a été analysé séparément. Cependant, pour augmenter la puissance des tests, les données correspondant au contrôle (eau) des expériences Quinine ont été agrégées au traitement NeemAzal, et inversement. Les principaux résultats sont représentés de façon graphique sur la figure 1.

Forte variabilité des comportements individuels des larves. Les figures 1a (NeemAzal) et 1d (Quinine) représentent les données brutes sous forme de boxplot en fonction de la concentration du traitement. On peut constater une forte dispersion des valeurs autour de la médiane, à l'exception du traitement 10mM de NeemAzal (n5), pour lequel le t50 est presque toujours égal à la durée maximale d'enregistrement. Pour cette concentration de NeemAzal, les disques de maïs ne sont en général pas consommés par les larves. Dans les autres cas, on constate que la médiane est rarement au centre de l'intervalle entre les quantiles à 5% et 95%, ce qui indique que les données, pour une concentration donnée, ont une distribution asymétrique. Pour une concentration donnée du traitement, la dispersion des points autour de la médiane peut être due à des effets résiduels générés par la variabilité du comportement des larves, ou des différences entre plaques.

Des effets significatifs de la concentration de chaque molécule. Pour chaque traitement, l'analyse de variance permet de tester globalement l'effet de la concentration de la molécule et l'effet de la plaque. Les résultats sont résumés dans le tableau 3. On trouve un effet significatif de la concentration pour les deux traitements. L'effet plaque n'est significatif que dans les expériences avec la quinine au seuil 1%. Il faut noter que l'interprétation des tests statistiques n'est valable que si les hypothèses des modèles sous-jacents sont satisfaites, en particulier, l'hypothèse d'indépendance des résidus.

Tableau 3. Synthèse de l'analyse de variance. Pour chaque traitement, les p-values sont associées au test de l'effet concentration et au test de l'effet plaque.

Traitement	Effet concentration	Effet plaque
NeemAzal	<0.0001	0.9989
Quinine	0.0101	0.0194

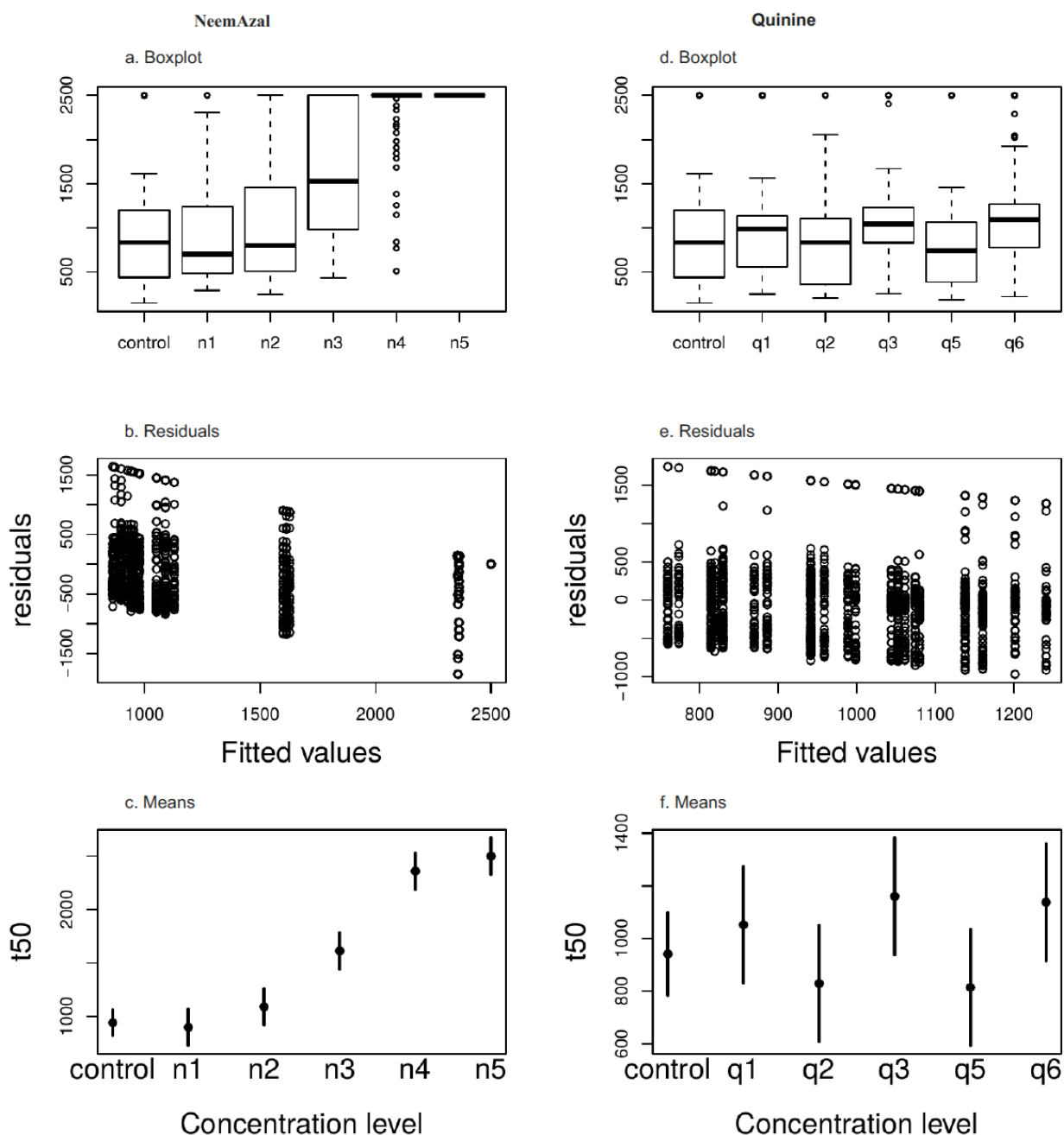


Figure 1. Principaux résultats de l'analyse du t50. A gauche (a, b, c) les données du traitement NeemAzal. A droite (d, e, f) les données du traitement Quinine. **a, d.** Boxplot des données brutes selon le niveau de concentration du traitement. **b, e.** Graphe des résidus en fonction des valeurs prédites. **c, f.** Moyennes estimées par concentration (points). Les barres représentent l'intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne.

Non indépendance des résidus. Les figures 1b et 1e représentent la relation entre valeurs prédites par le modèle et les résidus. Quel que soit le traitement, on constate que lorsque la concentration du produit augmente, les résidus ont tendance à devenir négatifs. L'hypothèse d'indépendance des résidus n'est donc pas satisfaite.

Interprétation des différences de moyennes. Les figures 1c et 1f montrent, pour chaque concentration, la valeur moyenne estimée du t50 et son intervalle de confiance. On constate que la concentration de NeemAzal a un effet très clair sur le temps t50 mis par les larves pour consommer 50% de la surface d'un disque foliaire. Ce temps augmente avec la concentration de NeemAzal. Pour la quinine, le niveau de concentration de la molécule ne semble pas avoir d'effet sur le t50. Les différences significatives sont trouvées entre les concentrations 1mM et 100mM par rapport aux concentrations 0.1mM et 10mM et ne sont pas interprétables en termes d'effet répulsif des molécules.

Discussion

Le comportement des larves face à différentes concentrations de molécules supposées antiappétentes a été étudié ici en utilisant une variable communément utilisée dans la littérature pour quantifier la consommation des larves, à savoir le temps t50 mis par une larve pour consommer 50% de la surface d'un disque foliaire. Nos résultats montrent qu'il est difficile d'utiliser les outils statistiques classiques en utilisant cette variable pour des tests de comparaison, pour deux raisons principales : d'une part, sur de larges gammes de concentrations de molécules antiappétentes, la distribution du t50 n'est pas continue. D'autre part, la forte variabilité des comportements individuels des larves brouille le signal.

Les tests de comparaison de moyenne s'appliquent pour des variables aléatoires quantitatives dont la distribution est supposée continue. Le dispositif expérimental proposé enregistre la consommation d'un disque foliaire de maïs par une larve de pyrale sur une période de temps fixée à l'avance. Les valeurs possibles de t50 sont donc comprises dans un intervalle borné entre 0 et tmax, la longueur de l'enregistrement. Si moins de 50% de la surface du disque ont été consommés à l'issue de la période d'enregistrement, la valeur de t50 est fixée à tmax. Il est donc difficile de considérer la mesure comme résultant d'un échantillonnage d'une variable aléatoire continue.

L'une des hypothèses cruciales pour déterminer la distribution de la statistique de test sous l'hypothèse H0 et la valeur de la pvalue est l'indépendance des résidus par rapport aux valeurs prédites, qui peut être validée par l'examen du graphe des résidus. Les Fig 1b et 1e montrent

clairement une relation négative entre le résidu et la prédiction et invalident l'utilisation du modèle linéaire pour la comparaison des traitements.

Le résultat du modèle linéaire est représenté en figures 1c et 1f. En l'absence des étapes de validation (Figs 1ab et Figs 1de), on pourrait conclure faussement à un effet de la concentration de NeemAzal sur l'allongement du *t50*, et à l'absence d'effet de la concentration de quinine sur le *t50*.

En conclusions, l'analyse de la variable *t50* sur ce jeu de données conduit à des résultats comparables à ceux présentées dans l'article, mais non interprétables du fait de la non indépendance des résidus. L'analyse statistique présentée dans l'article modélise correctement l'ensemble du comportement alimentaire des larves et doit être préférée.

2.2.2 L'évaluation de l'effet éthanol sur l'appétence des larves

Lors des premiers essais réalisés pour valider le test de consommation, nous avons utilisé l'éthanol à 95% comme solvant des molécules supposées antiappétentes, la quinine et le NeemAzal. Nous avons également testé différentes concentrations d'éthanol comme seul traitement des disques foliaires. Les résultats présentés ici montrent que l'éthanol semble avoir un effet antiappétent pour les larves de pyrale.

Matériel et méthodes

Trois expériences différentes ont été réalisées, en utilisant comme traitement la quinine, le NeemAzal, ou l'éthanol seul. Chaque traitement est étudié dans un seul batch. Le plan d'expérience est donné dans le tableau 4. Les 50 disques foliaires dans chacune des plaques ont été poinçonnés à partir des rangs foliaires 9^{ème}, 10^{ème} et 11^{ème} sur 3 plantes de maïs de la lignée MBS847_MLN14 cultivées en serre. Ensuite, les disques foliaires ont été traités avec 10µl des différentes concentrations d'antiappétents (tableau 4) à l'aide d'une multipette manuelle (multipette ® E3/E3x). Les contrôles ont été réalisés en déposant 10µl d'eau sur chaque disque foliaire. Une larve L2 de pyrale a été déposée dans chaque puit, suivant le protocole du dispositif de test de consommation (Sanane *et al.*, 2020). La typologie des comportements alimentaires a été réalisée en utilisant l'ensemble des données (Fig 2). Par la suite, les trois traitements ont été analysés séparément. Le modèle logit de régression multinomiale permettant de tester, pour chaque traitement, un effet de la concentration (Sanane *et al.*, 2020) a permis de comparer les comportements alimentaires des larves. Le traitement contrôle (eau) du batch avec le traitement éthanol n'a pas été pris en compte car le profil de consommation était atypique, par rapport à tous les autres contrôles.

Tableau 4. Plan d'expérience. Chaque batch correspond à une expérience réalisée le même jour avec six plaques différentes. Une plaque d'un batch correspond à un traitement. Les plaques sont identifiées par des lettres correspondant à leur position dans le dispositif expérimental. Les plaques a, b, c sont reliées à une même caméra, de même que les plaques d, e, f. Dans ces expériences, la quinine et le NeemAzal sont dilués dans de l'alcool à 95%.

Traitement				Batch		
Neem (mM)	Quin (mM)	Ethanol (%)	Label	19-02-22	19-02-08	19-04-07
0	0	0	w	a	e	
0	0	0	e0			c
0	0	95	e5	e		
0,01	0	95	n1	c		
0,1	0	95	n2	f		
0,5	0	95	n3	d		
1	0	95	n4	b		
0	0	95	e5		a	
0	0,01	95	q1		b	
0	0,1	95	q2		d	
0	0,5	95	q3		c	
0	1	95	q4		f	
0	0	25	e1			b
0	0	50	e2			a
0	0	70	e3			f
0	0	85	e4			e
0	0	95	e5			d

Résultats

Les courbes de consommation des trois expériences ont été utilisées pour réaliser la typologie des comportements alimentaires des larves. Les résultats sont résumés sur la Figure 2. Les types de comportement sont nommés par une lettre majuscule. Le type A correspond à une consommation immédiate et complète du disque foliaire. Le type B correspond à une consommation moins rapide et souvent incomplète. Le type C correspond aux situations où les larves attendent avant de commencer à consommer. Pour le type D, la consommation est lente et toujours incomplète. Pour le type E, la consommation est encore plus lente. Enfin, le type F correspond à la quasi absence de consommation.

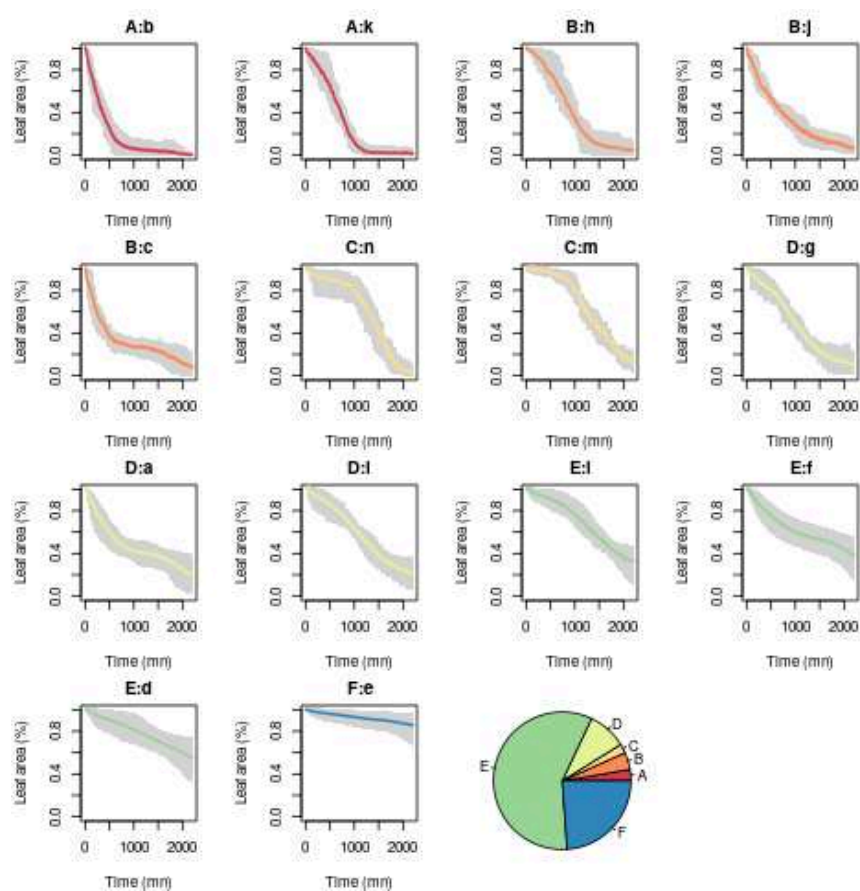


Figure 2 : Typologie des comportements alimentaires. Chaque vignette représente un ensemble de courbes d'allure similaire regroupées par l'algorithme SOTA et identifiée par une lettre minuscule. Les ensembles ont ensuite été agrégés en types de comportements, identifiés par une lettre majuscule. Sur chaque vignette, la courbe en gras représente le pourcentage moyen de surface restante de disque foliaire en fonction du temps. A chaque pas de temps, les intervalles grisés comprennent 95% des courbes individuelles. La dernière vignette représente le pourcentage de chaque type de comportement sur l'ensemble du jeu de données.

Par la suite, les trois expériences, correspondant chacune au test d'une molécule, ont été analysées séparément. Les deux réplicats du contrôle (eau) des expériences NeemAzal et quinine ont été inclus dans le jeu de données de chaque expérience. Sur la figure 3 sont résumées les proportions moyennes estimées de chaque type de comportement alimentaire en fonction des concentrations des substances antiappétentes.

Les comparaisons de moyennes correspondant au traitement au NeemAzal sont données dans le tableau 5. Pour le NeemAzal dilué dans l'éthanol à 95%, on observe un déficit de comportements alimentaires de types A, B, C et D pour toutes les concentrations de l'antiappétent, par rapport au contrôle (w = eau). Le même déficit est observé lorsque les disques foliaires sont traités avec un contrôle éthanol à 95%. Pour les traitements e5 (éthanol 95%) et n4 (NeemAzal 1mM), on trouve aussi un déficit significatif de comportements alimentaires de type E : pour ces deux traitements, la plupart des larves ne consomment pas les disques foliaires et le type F est majoritaire (Fig 3A). Lorsque l'on compare les traitements NeemAzal au traitement éthanol, on trouve quelques différences significatives pour les proportions des types A, B, C, D : par exemple, il y a un déficit de types C et D dans le traitement éthanol 95% par rapport au traitement NeemAzal 1mM, un déficit de type A dans le traitement 0,1mM de NeemAzal, et un déficit de type B dans le traitement 0,01mM de NeemAzal. Enfin, il y a un excès de types C et D dans les traitements n1, n2, n3 par rapport au traitement n4 qui pourrait indiquer un effet de la dose de NeemAzal.

Concernant les traitements à la quinine, des résultats similaires sont observés (Fig 3B et Tableau 6). On retrouve un déficit de types alimentaires A, B, D pour tous les traitements contenant de l'éthanol, quelle que soit la concentration de quinine. Dans les comparaisons entre éthanol 95% et les traitements contenant de la quinine, il y a un déficit des comportements alimentaires de type B pour les traitements éthanol 95%. Enfin, on trouve un excès significatif des types C et D lorsque l'on compare de fortes concentrations de quinine (q4, q3) à la concentration la plus faible.

Nous avons aussi comparé le comportement des larves sur des disques foliaires soumis à différentes concentrations d'éthanol (Figure 3C et Tableau 7). Une fois encore, quelle que soit la concentration d'éthanol, on trouve un déficit de comportements alimentaires de types A, B, C ou D sur les feuilles traitées à l'éthanol par rapport à l'eau. On trouve aussi des différences entre la plus forte concentration d'éthanol (e5, éthanol à 95%) et les autres concentrations (e0-e4) : lorsque l'éthanol est moins concentré, on trouve plus de comportements alimentaires de types A, et C, et moins de comportements alimentaires de types E et F. A noter que dans ce batch, le contrôle sans éthanol (e0) ne se comporte pas comme les autres contrôles et présente un fort excès de comportements alimentaires de type E.

En résumé, pour toutes les concentrations de NeemAzal et de quinine diluées dans de l'éthanol, et pour tous les traitements éthanol, les comportements alimentaires sont similaires, avec une surreprésentation des types E et F, qui correspondent à des larves s'alimentant très peu (E), voire pas du tout (F). Lorsque l'on compare les traitements éthanol entre-deux, on trouve toujours une plus forte proportion de larves ne s'alimentant pas du tout (type F) avec la plus forte concentration d'éthanol. Il semble donc que l'éthanol en soi ait un effet antiappétent sur les larves de pyrale.

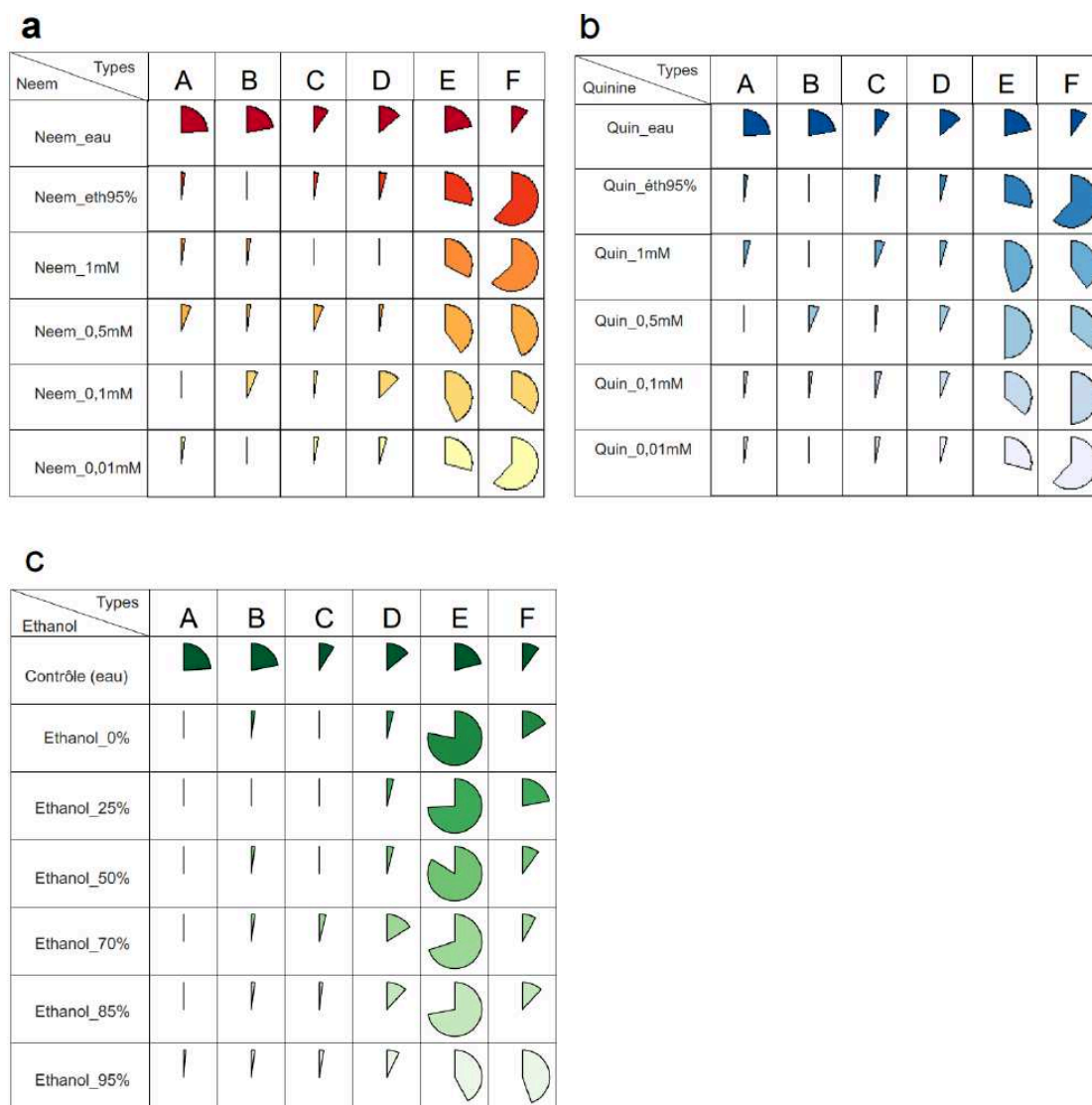


Figure 3 : Répartition des comportements alimentaires en fonction de la concentration des antiappétents. Les valeurs représentées par des camemberts sont les proportions estimées. Chaque ligne correspond à un traitement. La somme de chaque ligne vaut un. Les colonnes correspondent aux types de comportement alimentaires notés de A à F (Fig 2). Les amplitudes de couleur, de jaune à rouge, de bleu clair à foncé et de vert clair à vert bleu foncé symbolisent la concentration de l'antiappétent. **A**-Disques foliaires traités avec le NeemAzal. **B**-Disques foliaires traités avec la quinine. e5 est le traitement à l'éthanol 95% et w, le traitement à l'eau. **C**-Disques foliaires traités avec l'éthanol.

Tableau 5 : Comparaisons de moyennes entre traitements par type de comportement alimentaire pour le batch NeemaZal. Les différences de moyennes sont exprimées sur l'échelle logit par rapport au comportement alimentaire de type F, utilisé comme référence. Les couleurs de la cellule représentent le niveau de significativité par contraste pour chaque type. Gris sombre = significatif au seuil de 1%. Gris clair = significatif à 1%. Blanc = non-significatif à 1%. Les niveaux de concentration de chaque molécule sont indiqués par des lettres (Tableau 4).

	A	B	C	D	E
neem_e5-w	-4,3095	-17,9417	-2,9232	-3,0773	-1,5018
neem_n4-w	-4,3094	-4,2224	-21,5399	-19,4416	-1,4033
neem_n3-w	-2,8679	-3,8795	-1,8871	-3,4275	-0,8372
neem_n2-w	-21,6627	-2,5231	-2,7279	-1,3779	-0,5306
neem_n1-w	-4,0109	-20,7739	-21,5422	-1,6802	-0,9330
neem_n4-e5	0,0000	13,7192	-18,6167	-16,3643	0,0984
neem_n3-e5	1,4416	14,0622	1,0361	-0,3502	0,6645
neem_n2-e5	-17,3533	15,4186	0,1953	1,6994	0,9712
neem_n1-e5	0,2985	-2,8323	-18,6190	1,3971	0,5688
neem_n4-n3	-1,4415	-0,3429	-19,6528	-16,0141	-0,5661
neem_n4-n2	17,3533	-1,6994	-18,8120	-18,0637	-0,8727
neem_n4-n1	-0,2985	16,5515	0,0024	-17,7614	-0,4703
neem_n3-n2	18,7948	-1,3564	0,8408	-2,0496	-0,3066
neem_n3-n1	1,1430	16,8945	19,6551	-1,7473	0,0957

Tableau 6 : Comparaisons de moyennes entre traitements par type de comportement alimentaire pour le batch quinine. Les différences de moyennes contrastes sont exprimées sur l'échelle en logit par rapport au comportement alimentaire de type F, utilisé comme référence. Les couleurs de la cellule représentent le niveau de significativité par contraste pour chaque type. Gris sombre = significatif au seuil de 1%. Gris clair = significatif à 1%. Blanc = non-significatif à 1%. Les niveaux de concentration de chaque molécule sont indiqués par des lettres (Tableau 4).

	A	B	C	D	E
quin_e5-w	-4,3094	-22,3107	-2,9231	-3,0773	-1,5017
quin_q4-w	-3,1780	-20,6458	-1,7916	-2,6391	-0,6021
quin_q3-w	-22,0607	-2,5802	-2,7849	-2,1282	-0,4134
quin_q2-w	-4,0944	-4,0072	-2,4203	-2,4567	-1,0704
quin_q1-w	-16,9275	-3,9240	-21,3350	-20,7313	-0,6585
quin_q4-e5	1,1314	1,6649	1,1314	0,4382	0,8996
quin_q3-e5	-17,7513	19,7305	0,1382	0,9491	1,0884
quin_q2-e5	0,2150	18,3035	0,5028	0,6206	0,4313
quin_q1-e5	-12,6181	18,3867	-18,4119	-17,6540	0,8432
quin_q4-q3	18,8827	-18,0657	0,9933	-0,5109	-0,1888
quin_q4-q2	0,9164	-16,6386	0,6286	-0,1824	0,4683
quin_q4-q1	13,7495	-16,7219	19,5433	18,0922	0,0564
quin_q3-q2	-17,9663	1,4271	-0,3646	0,3285	0,6570
quin_q3-q1	-5,1332	1,3438	18,5501	18,6031	0,2451

Tableau 7 : Comparaisons de moyennes entre traitements par type de comportement alimentaire pour le batch éthanol. Les différences de moyennes contrastes sont exprimées sur l'échelle en logit par rapport au comportement alimentaire de type F, utilisé comme référence. Les couleurs de la cellule représentent le niveau de significativité par contraste pour chaque type. Gris sombre = significatif au seuil de 1%. Gris clair = significatif à 1%. Blanc = non-significatif à 1%. Les niveaux de concentration de chaque molécule sont indiqués par des lettres (Tableau 4).

	A	B	C	D	E
eth_e0-w	-16,8269	-2,8680	-17,2051	-1,7228	0,8421
eth_e1-w	-16,4253	-16,9785	-17,2736	-2,0412	0,4710
eth_e2-w	-17,4601	-2,3980	-17,0703	-1,2528	1,3862
eth_e3-w	-17,4158	-2,1747	-0,5877	0,3567	1,4271
eth_e4-w	-17,1094	-2,5804	-1,6865	-0,3366	1,0497
eth_e5-w	-4,3871	-3,8946	-2,7131	-2,1433	-0,8035
eth_e4-e5	12,7223	-1,3142	-1,0266	-1,8067	-1,8533
eth_e3-e5	13,0288	-1,7199	-2,1253	-2,5000	-2,2307
eth_e2-e5	13,0730	-1,4966	14,3572	-0,8905	-2,1898
eth_e1-e5	12,0383	13,0840	14,5605	-0,1020	-1,2746
eth_e0-e5	12,4398	-1,0265	14,4920	-0,4205	-1,6457
eth_e3-e4	-0,3065	0,4057	1,0987	0,6933	0,3774
eth_e2-e3	-0,0443	-0,2233	-16,4825	-1,6095	-0,0409
eth_e1-e2	1,0348	-14,5805	-0,2033	-0,7884	-0,9152
eth_e0-e1	-0,4016	14,1105	0,0685	0,3184	0,3711

Discussion

Lors de la mise au point du test de consommation, les premiers essais de molécules antiappétentes ont été réalisés avec des molécules diluées dans l'alcool à 95%. Les différences très importantes entre le comportement des larves traitées avec des concentrations très faibles de substances antiappétentes et leur comportement sur des feuilles non traitées nous ont amenés à suspecter un effet répulsif du solvant lui-même. Les données présentées ici correspondent aux trois expériences qui visaient à établir cet effet répulsif de l'éthanol. Comme ce n'était pas l'objet principal de la thèse, nous n'avons pas répliqué ces expériences. Ces résultats restent donc préliminaires. Néanmoins, ils nous semblent suffisamment clairs pour conclure à un effet répulsif de l'éthanol pour les larves de *O. nubilalis*. En effet, lorsque le NeemAzal ou la quinine sont dilués dans l'eau, on trouve d'une part un effet antiappétent très clair du NeemAzal associé à un effet dose, et d'autre part, une absence d'effet de la quinine (Sanane *et al.*, 2020), Fig 3). Lorsque les mêmes molécules sont diluées dans l'éthanol 95%, on trouve, quelle que soit leur concentration, une majorité de comportements de types E ou F, soit des larves qui consomment très peu ou pas du tout les disques foliaires de maïs (Fig 3). Le même comportement de refus de consommation est observé lorsque les disques foliaires sont traités à l'éthanol seul, quelle que soit sa concentration, dans les gammes de concentrations testées.

Dans la littérature, l'effet de l'éthanol sur la consommation des animaux semble contrasté. Il est possible que la concentration d'éthanol utilisée ici (95%) soit trop élevée et masque l'effet antiappétent du NeemAzal sur les larves de *O. nubilalis* (Descoins, 2001). Chez les diptères, on a observé que la mouche *Drosophila melanogaster* a une préférence pour des aliments contenant 10% d'éthanol (Pohl *et al.*, 2012). Par contre, l'éthanol à 0,2% a un effet insecticide dans l'alimentation du lepidoptère *Spodoptera frugiperda* Smith (Noctuidae) et du diptère *Aedes aegypti* L., (Culicidae) (Silva *et al.*, 2017). Il commence à devenir toxique à partir d'une concentration de 1% chez le poisson zèbre (Vera *et al.*, 2018).

Dans notre étude, l'effet antiappétent de l'éthanol pour les larves d'*O. nubilalis* est observé quelle que soit la concentration d'éthanol. Cependant, l'unique expérience du batch éthanol constitue seulement un résultat préliminaire. Ainsi, un excès de comportements de types E et F est aussi observé dans la plaque contrôle (e0) traitée avec de l'eau. Il est probable que l'évaporation de l'éthanol dans les cinq autres plaques du batch a perturbé la consommation des larves. Pour tester correctement l'effet de la concentration en éthanol sur la consommation des larves, il faudrait réaliser des expériences avec plusieurs batchs, comportant chacun une majorité de plaques traitées

avec de l'eau, et une ou deux plaques traitées à l'éthanol. Nous avons choisi de ne pas poursuivre ces expériences, qui s'écartaient du sujet principal de la thèse.

En conclusion, l'éthanol semble se comporter comme un antiappétant pour les larves de pyrale, au moins dans les conditions de notre étude. Il masque l'effet des molécules antiappétentes sur la consommation des larves. Cette étude préliminaire justifie le choix de diluer ces molécules dans l'eau pour la validation de notre dispositif.

2.3 Conclusions

Dans ce chapitre de ma thèse, je présente un dispositif original permettant de mesurer l'appétence de larves d'insectes pour des disques foliaires de plantes. Les insectes herbivores constituant des ravageurs importants des plantes cultivées, ce type de test de consommation permet de comparer le comportement des larves d'insectes face à différents traitements des disques foliaires, mais aussi de comparer des variétés différentes de plantes d'une même espèce et pourrait être utilisé en amélioration des plantes. L'approche développée ici est originale pour deux raisons :

- ✓ D'une part, elle permet des comparaisons à relativement grande échelle (suivi de 150 larves d'insecte dans la même expérience) grâce à un dispositif innovant et des programmes dédiés semi-automatisés d'analyse d'images.
- ✓ D'autre part, la dynamique de consommation des larves est analysée par des méthodes statistiques adaptées, qui prennent en compte la diversité des comportements individuels des larves soumises à un même traitement.

Les tests de consommations sont souvent réalisés avec des populations d'élevage d'insecte. La population de larves de pyrale que nous avons utilisée provient d'un élevage de la société BioLine. Bien que cette population soit probablement partiellement consanguine, nous observons une forte diversité des comportements individuels. Même en l'absence de traitement, on observe presque toujours sur une même plaque l'ensemble des types de comportements que nous avons identifiés. Cette variabilité de comportements individuels explique que la caractérisation du comportement par une seule mesure comme le temps t_{50} mis pour consommer la moitié du disque foliaire n'est pas pertinente, car la dispersion autour de la moyenne est trop forte dans les traitements témoins, et trop faible dans les traitements pour lesquels le comportement majoritaire est l'absence de consommation. Je montre dans cette étude que ce qui varie réellement d'un traitement à l'autre est le pourcentage de chaque type de comportement alimentaire, qui peut être comparé par régression multinomiale. Cette méthode permet de réaliser des comparaisons fiables de différents traitements. En particulier, j'ai pu mettre en évidence l'effet antiappétent du NeemAzal pour les larves de pyrales *Ostrinia nubilalis*, qui augmente avec la concentration de la molécule. J'ai aussi montré l'effet antiappétent de l'éthanol, et un comportement neutre des larves vis-à-vis de la quinine. Dans les chapitres suivants, j'ai utilisé la méthode pour mettre en évidence des différences significatives de comportement de nourrissage des larves de pyrales mises en présence de différentes variétés de maïs.

Au terme de ces 3 années de travaux, nous avons essayé de comprendre les mécanismes liés aux défenses chez le maïs. Cela nous a amené à mettre en place un dispositif de test de consommation

robuste et accessible à la communauté scientifique. Cependant, certaines interrogations n'ont pas été bien élucidées. D'abord, lors de la mise en place et la validation du dispositif de test de consommation on a constaté que l'éthanol se comporte comme un antiappétent. Par ailleurs, c'est un des solvants utilisés dans l'extraction et/ou la dilution de certaines molécules destinées à des tests de consommation. Nous aurions voulu réaliser des essais plus exhaustifs pour comprendre l'effet de l'éthanol sur les substances antiappétentes.

Dans ce chapitre 3, on a testé l'existence d'un compromis entre croissance et défense chez maïs. Selon cette théorie, les plantes à croissance plus lente devraient être plus résistantes aux ravageurs que celles à croissance rapide parce qu'elles auraient accumulé plus de substances chimiques et/ou renforcé leurs défenses physiques au cours du temps. Nous avons utilisé un matériel génétique original issu des expériences de sélection divergente du Plateau de Saclay pour la date de floraison. Des comparaisons deux à deux entre familles précoces et tardives issues d'un même fonds génétique ont permis de caractériser certaines composantes de la résistance du maïs contre la pyrale *Ostrinia nubilalis* Hübner. Au total, trois approches ont été utilisées :

- ✓ Le test de consommation des larves sur disques foliaires à partir de plantes ayant poussé au champ.
- ✓ L'évaluation de la prévalence des larves issues d'infestation naturelle sur des plantes au champ pendant deux années consécutives (2018 et 2019).
- ✓ Des analyses biochimiques sur toute les parties vertes de plants de maïs récoltés au champ (2019).

A l'issue de ces essais, on a trouvé que les lignées précoces issues du fonds génétique MBS sont plus appétentes pour les larves que leurs homologues tardives. Également ces familles précoces sont non seulement plus attaquées par les larves au champ mais se démarquent des familles tardives par leur tendreté et de leur teneur élevée en eau. L'ensemble des résultats sont en faveur de l'existence d'un compromis entre croissance et défense. Pour le fonds génétique F252, les différences entre familles précoces et tardives sont moins importantes pour tous les caractères, y-compris la date de floraison, et les résultats sont plus difficile à interpréter. Les analyses biochimiques ont été réalisées en collaboration avec des collègues de la Plateforme « Observatoire du végétal » de l'IJPB (Versailles). L'ensemble des résultats de nos travaux ont été présentés sous forme de projet d'article qui sera soumis ultérieurement à une revue scientifique.

Compromis entre croissance et défense pour la précocité de floraison chez le maïs

Inoussa Sanane^{1&2}, Christine Dillmann¹, Frédéric Marion-Poll^{2&4}, Matthieu Reymond³, Valérie Méchin³, Nathalie Galic¹, Judith Legrand¹

(1) Université Paris-Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech, GQE - Le Moulon, 91190, Gif-sur-Yvette, France.

(2) Université Paris-Saclay, CNRS, IRD, UMR Évolution, Génomes, Comportement et Écologie, 91198, Gif-sur-Yvette, France.

(3) Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, 78000, Versailles, France.

(4) Université Paris-Saclay, AgroParisTech, Paris, France.

3.1 Introduction

Au cours de leur développement les plantes doivent faire face aux attaques de ravageurs et aux agents pathogènes. Pour mieux résister à ces derniers, elles mettent en place plusieurs stratégies de défense dont l'évitement, la production de défenses physiques et chimiques, ou la tolérance (Belsky *et al.*, 1993 ; Pagare *et al.*, 2015 ; Ahmed, Arshad, & Khan, 2017). La mise en place de ces stratégies est probablement coûteuse pour la plante, car elle implique la synthèse de composés ou d'organes, ou des décalages des périodes de croissance. Les ressources étant limitées, les plantes doivent faire un choix dans l'allocation de leurs ressources entre différentes fonctions. Plusieurs auteurs font ainsi l'hypothèse de l'existence d'un compromis entre croissance et défense (Stamp, 2003 ; Garland, 2014 ; Züst & Agrawal, 2017). Ce compromis peut se mettre en place de différentes façons, et des hypothèses non exhaustives ont été avancées. L'hypothèse de la défense optimale (Alba, Bowers, & Hufbauer, 2012) suppose que l'allocation des ressources à la défense est limitée à certains organes ou à certaines phases du développement des plantes. L'hypothèse du ratio carbone/azote ou des contraintes environnementales (Mata, Gaspar, & Santos, 2012 ; Royer *et al.*, 2013) suppose que l'environnement détermine, à travers le ratio carbone/azote, la nature chimique des défenses. L'hypothèse taux de croissance (Coley, Bryant, & Stuart Chapin, 1985 ; Coley, 1988) suppose que le taux de croissance de la plante régule le niveau des ressources et donc l'investissement possible dans la défense. Enfin, l'hypothèse du compromis entre croissance et différenciation (Herms & Mattson, 1992 ; Stamp, 2004) propose que la différenciation des organes de défense ne peut se produire que lorsque le différentiel entre assimilation photosynthétique et croissance est important, c'est-à-dire lorsque les métabolites produits par la photosynthèse ne sont

pas entièrement consommés pour la croissance. De façon plus générale, l'existence d'un compromis entre croissance et défense devrait entraîner des différences de niveaux de résistance des plantes selon la vitesse de croissance. Les plantes résistantes devraient croître moins vite et celles à croissance rapide devraient être plus susceptibles aux ravageurs.

L'existence d'un tel compromis entre croissance et défense est bien documenté par des comparaisons entre espèces. Ainsi, dans une étude impliquant 700 populations de 500 espèces de plantes de prairies observées dans 39 habitats différents (Lind *et al.*, 2013), les auteurs mesurent l'aptitude des populations à bénéficier de suppléments de ressource par le gain en croissance suite à l'apport d'éléments nutritifs. Ils mesurent aussi la vulnérabilité face aux mammifères herbivores par le gain en croissance après la pose de barrières protectrices. Ils démontrent de façon indirecte la corrélation négative entre croissance et défense en montrant que les espèces qui profitent le plus des suppléments de ressources sont aussi les plus vulnérables face aux herbivores.

Au niveau intra-spécifique, la persistance d'un polymorphisme génétique au sein des collections mondiales d'*Arabidopsis thaliana* au locus ACD6 est également en faveur de l'existence d'un tel compromis. L'allèle Est-1 confère aux plantes une meilleure résistance à différents pathogènes, comme une bactérie, *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 et un champignon comme *Golovinomyces orontii* T1, mais entraîne une réduction de la biomasse. L'autre allèle, col-0, confère une meilleure croissance mais une sensibilité à ces différents pathogènes (Todesco *et al.*, 2010). Ces travaux ont aussi démontré que la résistance de *A. thaliana* aux différents pathogènes ci-dessus serait liée à l'activation des défenses constitutives par l'acide salicylique chez la plante. La synthèse de cet acide phénolique est souvent liée aux facteurs environnementaux chez certaines espèces de *A. thaliana* (Todesco *et al.*, 2010 ; Janda *et al.*, 2014 ; Ding & Ding, 2020). Cela suggère que le niveau du compromis entre croissance et défense chez *A. thaliana* pourrait être modulé par l'environnement.

Chez le maïs, Kaan *et al.* (1983) ont rapporté que la résistance à la pyrale *Ostrinia nubilalis* Hbn (Lepidoptera : Crambidae) est corrélée à la tardiveté de floraison et à la maturité du grain chez certaines lignées. Cette corrélation n'est pas retrouvée dans des expériences de sélection divergente pour le passage de la transition juvénile à la phase végétative chez le maïs (Revilla *et al.*, 2005).

Après trois cycles de sélection pour une transition juvénile-adulte (JA) plus précoce ou plus tardive, les auteurs observent des changements importants de la date de transition JA, qui passe de la feuille 7 dans la population synthétique de départ, à la feuille 6 dans les populations précoces, et à la feuille 10 dans les populations tardives. Pourtant, aucune différence n'est observée entre

populations précoces et tardives pour la résistance à des infestations contrôlées par la pyrale *O. nubilalis* ou la sésamie *S. nonagrioides*, que ce soit au niveau de la prévalence des larves dans les plantes, ou des composantes du rendement.

Dans notre étude, nous disposons d'un matériel génétique tout à fait original pour tester les relations entre croissance et défense au sein d'une même espèce. Ce matériel est issu des expériences de sélection divergente de Saclay pour la date de floraison. Chacune de ces expériences, conduites depuis plus de 20 ans sur le Plateau de Saclay, a permis de créer des lignées contrastées pour leur phénologie, mais descendant par autofécondations successives d'un unique lot de semence (Durand *et al.*, 2010, 2012). Nous disposons ainsi de génotypes précoces et tardifs issus de la lignée F252, et de génotypes précoces et tardifs issus de la lignée MBS et nous avons montré que la sélection pour la date de floraison a entraîné des modifications importantes de la phénologie des plantes, avec des décalages de la date de transition florale (Tenailon *et al.*, 2019). Nous proposons d'utiliser ce matériel génétique pour étudier l'interaction entre les plants de maïs et l'un de leurs ravageurs, le lépidoptère foreur de tige *O. nubilalis*, la pyrale du maïs. La comparaison entre les génotypes précoces et tardifs issus d'une même lignée ancestrale permettra de voir si la sélection pour changer la date de floraison a également modifié l'appétence des larves de pyrale. Selon certaines hypothèses liées au compromis entre croissance et défense, on s'attend à ce que les génotypes précoces, pour lesquels la période de croissance est plus courte, aient accumulé moins de défenses constitutives et que les larves montrent plus d'appétence pour ces génotypes.

Nous avons évalué la défense des génotypes issues de l'expérience de sélection divergente de trois façons différentes. Tout d'abord, nous avons mis à profit l'existence d'un test de consommation permettant de mesurer l'appétence des larves de pyrale pour des disques foliaires de maïs (Sanane *et al.*, 2020) et comparé des lignées précoces et tardives dans chaque fonds génétique. Puis, nous avons utilisé les dispositifs de l'expérience de sélection divergente implantés en 2018 (génération 22) et 2019 (génération 23) sur le Plateau de Saclay et soumis à l'infestation naturelle de pyrales pour 1) mesurer la prévalence des larves sur les différents génotypes et 2) caractériser les plantes pour leur phénologie, mais aussi pour des caractéristiques biochimiques des parois des tiges grâce à la spectrométrie proche infra-rouge.

A l'issue de ces évaluations, avons démontré que les génotypes les plus contrastés pour la date de floraison présentent des différences importantes à la fois pour l'appétence des larves pour les feuilles de maïs, pour la prévalence des larves sur les plantes au champ, et pour la qualité des parois cellulaires. Ces résultats sont conformes à la théorie du compromis entre croissance et

défense. En particulier, les génotypes issus de la population MBS847 précoce sont particulièrement attaqués au champ, leurs feuilles sont consommées rapidement par les larves. Ils présentent une paroi cellulaire plus mince et une teneur en eau plus importante, qui rendent probablement les tiges et les feuilles plus tendres et plus appétentes pour les larves de pyrales.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Matériel animal

La population artificielle de pyrales de maïs (*Ostrinia nubilalis* H.) utilisée pour les tests de consommation provient des œufs de l'élevage de Bioline AgroSciences (France). Les œufs sont gardés dans une étuve jusqu'à l'émergence des larves à $26\pm 1^\circ\text{C}$, avec une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit et 70% d'humidité. Dès l'émergence, les larves sont nourries avec un milieu artificiel (composition 1.32l d'eau, 27g d'agar, 224g de farine de maïs, 60g de levure de bière, 56g de germe de blé, 12g d'acide ascorbique, 4 g de mélange vitaminé (Réf.0155200), 0.8g d'Auréomycine/Tétracycline, 2g de Nipagine, 1.6g d'acide sorbique et 4 g d'acide benzoïque). Les larves âgées de 10 jours après émergence sont utilisées pour réaliser les tests de consommation. Pour les mesures de prévalence au champ, les populations de pyrale sont les populations infestant naturellement les champs de maïs du Plateau de Saclay.

3.2.2 Matériel végétal

Le matériel végétal est issu des expériences de sélection divergente du Plateau de Saclay pour la date de floraison (Durand *et al.*, 2010). Ces expériences ont été initiées à partir de deux lignées pures, F252 et MBS. Les résultats de cette expérience sont la production dans chaque fonds génétique de deux populations, une population précoce et une population tardive qui diffèrent principalement pour la date de floraison. Dans chaque population, les plantes extrêmes sont autofécondées pour former la génération suivante avec comme contrainte de conserver dans chaque population des descendants de deux plantes différentes de la génération G1. Ainsi, chaque population précoce ou tardive est elle-même composée de deux familles indépendantes. Chaque famille dérive par autofécondation et sélection d'une unique plante de la génération G1. Pour F252, les familles précoces sont FP036 et FP039 et les familles tardives sont FT317 et FT318 (Fig 1). Pour MBS, les familles précoces sont MP049 et MP052 et les familles tardives MT040 et MT053 (Fig 1). Pour les tests de consommation, nous avons profité de l'implantation, en 2018 et 2019 d'une expérience d'évaluation du progrès génétique. Quatre génotypes de la génération G18, issus respectivement des familles FP036 (F252 précoce), FT317 (F252 tardif), MP052 (MBS précoce) et MT040 (MBS tardif) étaient implantés sur le Plateau de Saclay en 2018 et 2019. Des

prélèvements non destructifs de disques foliaires ont été réalisés à différentes périodes, au cours de la saison, sur les plantes représentant chacune de ces quatre familles. Par ailleurs, les générations G22 (2018) et G23 (2019) du dispositif de sélection ont été utilisées pour caractériser les huit familles des expériences de sélection de Saclay. A chaque génération, des descendants par autofécondation de l'ensemble des plantes sélectionnées à la génération précédente sont évalués dans un dispositif en blocs. Pour chaque génotype sélectionné, quatre lignes de 25 plantes sont semées. Un bloc est constitué de 11 lignes correspondant aux 10 génotypes de la même population et d'une ligne témoin semée avec des graines de la lignée ancestrale correspondante. Ainsi, chacune des quatre populations F252 précoce, F252 tardif, MBS précoce, MBS tardif est représentée par quatre blocs de 11 lignes.

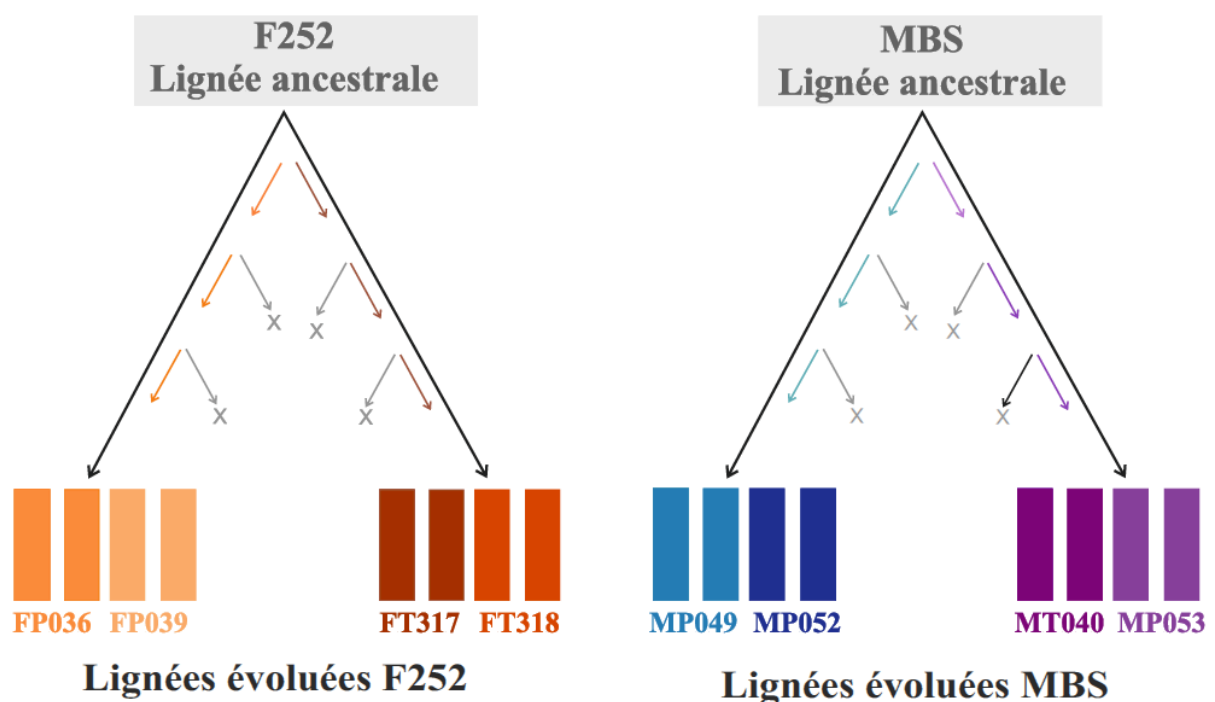


Figure1 : Représentation schématique des lignées évoluées des expériences de sélection divergente du Plateau de Saclay. Les couleurs indiquent les différentes familles évoluées par fonds génétique. Les flèches indiquent le sens de sélection.

3.2.3 Tests de consommation

Le test de consommation (Sanane *et al.*, 2020) a été utilisé pour comparer l'appétence de larves L2 de pyrales, issues d'élevage, pour quatre génotypes représentant quatre familles différentes de la génération G18 des expériences de sélection de Saclay. Pour chaque génotype de maïs, des disques foliaires ont été prélevés à différents stades de développement des plants de maïs et utilisés dans le dispositif créé pour le test de consommation. Les dates de prélèvement étaient les mêmes pour tous les génotypes :

- ✓ En 2018 des disques foliaires ont été prélevés quatre fois, respectivement sur les rangs foliaires 8, 10, 12 et 14. Le premier prélèvement a eu lieu avant la floraison, le second au moment de la floraison du témoin F252, le troisième au moment de la floraison du témoin MBS, et le quatrième prélèvement après la floraison de tous les génotypes.
- ✓ En 2019, les disques foliaires ont été prélevés six fois, respectivement sur les rangs foliaires 9 à 14 à deux semaines d'intervalle. La date du premier prélèvement a été choisie pour caractériser les plantes avant floraison.

Tableau 1 : Date de prélèvements des disques foliaires au champ en fonction des stades de développement

Stades de prélèvement	2018		2019	
	Date	Rang foliaire	Date	Rang foliaire
Stade 1	22 juin	8	10 juillet	9
Stade 2	-	-	16 juillet	10
Stade 3	12 juillet	10	23 juillet	11
Stade 4	-	-	30 juillet	12
Stade 5	23 juillet	12	6 août	13
Stade 6	8 août	14	12 août	14

A chaque date de prélèvement, 50 disques foliaires d'environ 1cm de diamètre ont été prélevés sur au moins cinq plantes différentes de chaque génotype. Les mêmes plantes ont été utilisées pour les prélèvements successifs.

3.2.4 Obtention des données

Les disques foliaires prélevés sont immédiatement placés dans une plaque de 50 puits (5x10) sur de l'agarose à 1% pour éviter le dessèchement des disques foliaires (Jin, 2017). Cette partie a été réalisée au champ avec les plaques préparées la veille. Puis au retour au laboratoire, les plaques sont utilisées pour le test de consommation décrit au Chapitre 2. Brièvement, une larve L2 est placée dans chaque puits sur chaque disque foliaire (Júnior *et al.*, 2015). Les plaques sont prises en sandwich entre 2 plaques de verre transparents pour maintenir les larves dans leur puits pendant l'expérience. Le dispositif équipé d'une caméra enregistre une image toutes les minutes pendant 48 heures. Les piles d'images ont été analysées à l'aide de deux programmes (RoitoRoiArray et Areatrack) développés à cet effet par et installés comme plugins dans le logiciel d'analyse d'images Icy (Chaumont *et al.*, 2012). Les plugins permettent de délimiter les puits et les disques foliaires de façon semi-automatique, puis de suivre dans la pile d'images les changements de nombre de pixels attribués à chaque disque foliaire. L'analyse génère des mesures en pixels par minute pour chaque disque foliaire dans un puits, qui sont exportées dans un fichier Excel, converti ensuite en fichier de format CSV pour être traités sous R.

3.2.5 Analyse de données

Un script R permet de tracer les courbes de consommation de chaque larve par puits (Fig 2.1), montrant l'existence d'une variabilité de comportement entre larves soumises aux mêmes conditions. Les courbes de consommation sont ensuite regroupées en 14 clusters classés par une lettre *a* à *n* (Fig 2.2). Chaque cluster est caractérisé par différentes variables comme les temps moyens T20, T50 et T80 mis par les larves pour consommer respectivement 20, 50 et 80% du disque foliaire dans chaque puits, ou la consommation totale moyenne. Pour réduire le nombre de clusters, l'algorithme Kmeans est appliqué sur la matrice décrivant chaque cluster par les valeurs moyennes des différentes statistiques résumées. Le choix du nombre de groupes est déterminé en utilisant le critère du coude, de façon à minimiser la part de variance intra-groupe dans la variance totale, sans augmenter de façon trop importante le nombre de groupes. On obtient alors six groupes, nommés de A à F. Chaque groupe correspond à un type de comportement alimentaire des larves (Fig 2.3). A l'issue de cette étape de prétraitement des données, on attribue à chaque puits, qui constitue l'unité expérimentale de base, un type de comportement alimentaire, selon le groupe [A-F] auquel il appartient. Soit Y_{ijlm} dans {A, B, C, D, E, F} le type de comportement alimentaire mesuré dans le puits correspondant à un disque foliaire prélevé sur le progéniteur *i*, au stade *j*, mesuré dans le puits *m* de la plaque *l*. On appelle $P_{ijlm}^k = P(Y_{ijlm} = k)$ la probabilité que le comportement alimentaire de la larve soit de type *k*. Un modèle de régression logistique multinomiale a été utilisé pour tester les différences entre génotypes précoces et tardifs d'une même lignée ancestrale et l'effet du stade de prélèvement. Le modèle utilise la fonction logit :

$$\ln\left(\frac{P_{ij}^k}{P_{ij}^K}\right) \quad (1)$$

pour comparer les probabilités relatives de chaque type de comportement alimentaire. Ici, l'indice *k* représente la catégorie [A à F] et *K* est la catégorie de référence choisie. Chaque probabilité relative est décomposée selon un modèle linéaire qui dépend des conditions définies par les indices. Par exemple, le modèle suivant :

$$\ln\left(\frac{P(Y_{ij}=k)}{P(Y_{ij}=K)}\right) = \mu^k + \alpha_i^k + \beta_j^k \quad (2)$$

prend en compte un effet du génotype et de la date de prélèvement, sans interactions entre le génotype et la date. Différents modèles ont été comparés en utilisant le critère AIC. Quel que soit le fonds génétique, le meilleur modèle était toujours un modèle avec un effet de la date de prélèvement et un effet du génotype, mais sans interactions (2).

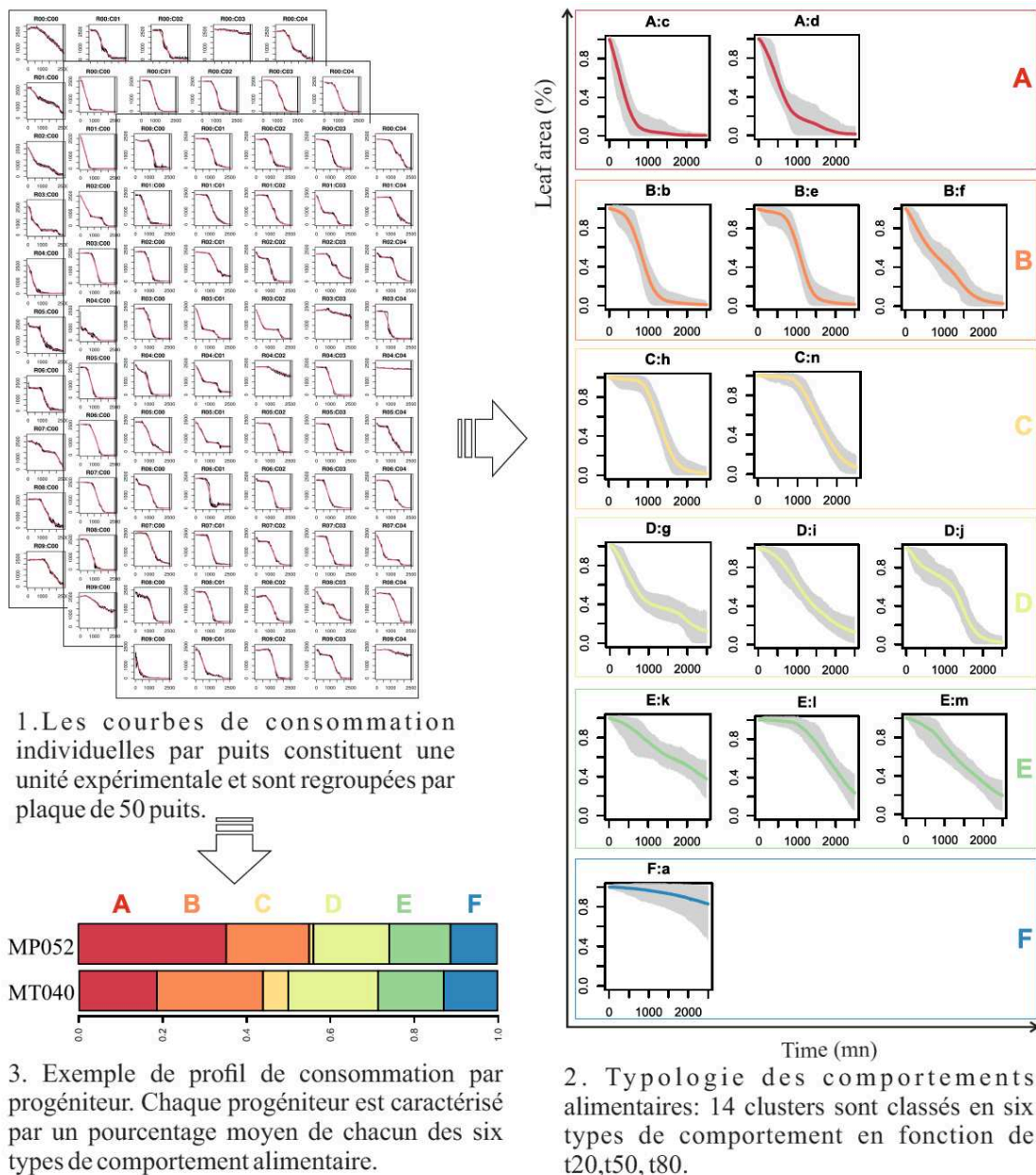


Figure 2 : Représentation des différentes étapes permettant la classification des courbes de consommation en six types de comportement alimentaire des larves. **1.** Représentation graphique des courbes de consommation individuelles, regroupées par plaque (50 courbes/ plaque) et montrant la variabilité des comportements alimentaires des larves au sein d'une même plaque ; **2.** Classification des courbes en 14 clusters à l'aide de l'algorithme SOTA, et regroupement des clusters en six types de comportements alimentaires à l'aide de la fonction Kmeans sous R. **3.** Chaque condition peut être caractérisée par une table de contingence mesurant le nombre de courbes individuelles pour chaque type de comportement alimentaire. Cette distribution peut être représentée graphiquement sous la forme de camemberts. A titre d'exemple, sont représentées les proportions de chaque type de comportement alimentaire trouvées pour les progéniteurs MP052 et MP040, tous stades de prélèvement confondu.

Un test de Wald a été utilisé pour les comparaisons de moyennes. Ensuite, les proportions des différentes catégories ont été estimées à chaque stade de prélèvement et pour chaque génotype.

3.2.6 Prévalence de la pyrale au champ

Les différences entre les génotypes des expériences de sélection de Saclay pour la résistance à la pénétration des larves de pyrale ont été mesurées sous infestation naturelle au champ. Les observations ont été conduites 2 années successives (2018 et 2019), sur les 22^{ème} et 23^{ème} générations (G22 et G23) de l'expérience de sélection divergente pour la précocité de floraison. Un suivi hebdomadaire plante à plante des dégâts causés par les larves de pyrale a été réalisé tout au long de la saison. Les dégâts ont été notés sur toutes les parties aériennes de la plante (Velasco *et al.*, 2007). Les criblures sur les feuilles, ou coups de fusil, sont notées vers la fin du mois de juin et début juillet. Puis, les trous dans les tiges et les panicules sont notés au cours du mois de juillet jusqu'à mi-août. Ensuite, les dégâts sur les épis et les cassures des tiges sont notés en fin de cycle, de fin août à début septembre. Au cours de chaque passage, la présence de larves à la base des plantes est également vérifiée ainsi que les signes de pénétration dans la tige. En 2018, la prévalence a été évaluée par un comptage régulier de toutes les plantes présentant les dégâts. Une légère modification du protocole en 2019 a permis de mettre des bagues de différentes couleurs autour des plantes attaquées sur la génération G23 de sorte à ne plus repasser sur les plantes déjà attaquées. Chaque semaine est représentée par une couleur différente, puis un relevé de toutes les couleurs est fait toutes les 4 semaines. Les données ont ensuite été rangées au même format pour faciliter les analyses statistiques à l'aide d'un modèle binomial. L'individu statistique est une ligne d'environ 25 plantes. Les variables mesurées sur chaque ligne et à chaque date sont le nombre de plantes infestées sur la ligne (entre zéro et nbtot) et le nombre total de plantes (nbtot).

Le modèle binomial $Y_{ijklm} \approx \beta(N_{ijklm}, P_{ijklm})$ avec une fonction de lien logit a été utilisé pour évaluer la prévalence des plantes attaquées par la pyrale au champ. Pour chaque ligne du dispositif et à chaque date d'observation, Y_{ijklm} représente le nombre de plantes attaquées, N_{ijklm} le nombre total de plantes et P_{ijkl} la probabilité que la plante soit attaquée. Y_{ijklm} est le nombre de plantes attaquées sur le bloc m, pour le progéniteur l, appartenant à la famille k, issue de la population j et de la lignée i. Un modèle emboîté a permis de tester la significativité globale des différents effets à chaque date de mesure. Les comparaisons de moyennes deux à deux ont été réalisées pour chaque fonds génétique séparément : le fonds génétique F252 d'une part et le fonds génétique MBS d'autre part. Le modèle complet décrivant les données est le suivant :

$$\log\left(\frac{P_{ijklm}}{1-P_{ijklm}}\right) = \mu_i + \text{lin}_i + \text{pop}_{ij} + \text{fam}_{ijk} + \text{PROGE}_{ijkl} + B_{ijklm} \quad (1)$$

Ce modèle prend en compte deux effets aléatoires, le bloc et le progéniteur. Dans ce modèle, le progéniteur (3 à 5 génotypes par famille) est emboîté dans une famille (huit familles), une population (tardif ou précoce) et une lignée (F252 ou MBS), aussi appelée fonds génétique. Les variantes de ce modèle complet sont les suivantes :

$M1 = \mu_1 + fam_{ijk} + PROGE_{ijkl} + B_{ijklm}$ (1) Dans cette variante du modèle complet, les effets fonds génétique et population ne sont pas distingués, et sont inclus dans l'effet famille.

$M2 = \mu_2 + popfond_{ij} + PROGE_{ijkl} + B_{ijklm}$ (2) Ce modèle suppose des différences entre populations issues de chaque fonds génétique, mais pas de différences entre familles à l'intérieur des populations.

$M3 = \mu_3 + fond_i + PROGE_{ijkl} + B_{ijklm}$ (3) Ce modèle suppose des différences entre lignées, mais suppose qu'il n'y a pas de différence entre populations, le progéniteur et bloc sont en effets aléatoires.

$M4 = \mu_4 + PROGE_{ijkl} + B_{ijklm}$ (4) Ce modèle prend en compte uniquement des effets progéniteur et bloc.

$M5 = \mu_5 + fam_{ijk} + B_{ijklm}$ (5) Ce modèle suppose que les différences entre progéniteurs ne sont dues qu'à des différences entre famille c'est-à-dire que les progéniteurs d'une même famille ont la même valeur.

$M6 = \mu_6 + fam_{ijk} + PROGE_{ijkl}$ (6) Ce dernier modèle ne prend pas en compte l'effet aléatoire du bloc.

Ensuite les différents modèles ont été comparés 2 à 2 pour tester la significativité des différents effets du modèle complet.

M1/M6 : $H_0 B_m = B_{m'} = 0$ pour tous les m et m', les effets bloc sont nuls, on teste l'effet bloc.

M1/M5 : $H_0 PROGE_{ijk} = PROGE_{i'j'k'} = 0$ Les effets progéniteurs sont nuls.

M1/M2 : $H_0 fam_{ijk} = fam_{ijk'} = 0$ On teste l'effet famille intra-population d'un même fonds génétique.

M2/M3 : $H_0 popfond_{ij} = popfond_{ij'} = 0$ pour tous les j et j', on teste l'effet entre populations d'un même fonds génétique.

M3/M4 : $H_0 fond_i = fond_{i'} = 0$ pour tous i et i', on teste l'effet fonds génétique (différences entre MBS et F252).

Le modèle complet (M1) a été validé graphiquement d'une part, pour vérifier l'indépendance des résidus (Fig_S1), et d'autre part, pour vérifier que les effets blocs étaient indépendants du type de population (précoce ou tardive). Les moyennes des familles ont été estimées et comparées deux à deux, pour chaque fonds génétique indépendamment. Nous avons aussi estimé les moyennes pour chaque progéniteur à chaque date.

3.2.7 Caractérisation des plantes de l'expérience de sélection divergente

Les plantes de la 23^{ème} génération de l'expérience de sélection divergente pour la précocité de floraison ont été caractérisées pour différentes variables dont la date de floraison, la hauteur des plantes au champ et différentes caractéristiques biochimiques.

3.2.8 Date de floraison et hauteur des plantes

Le nombre de plantes fleuries a été relevé par ligne, chaque jour à partir du 17 juillet, date à laquelle la première plante fleurie a été observée, et jusqu'au 30 août. Les données journalières ont été agrégées pour obtenir la médiane de la date de floraison pour chaque ligne. Pour la hauteur des plantes, elle a été mesurée du sol à la panicule (cm) sur toutes les plantes autofécondées. Les données par plante ont été agrégées pour obtenir une valeur moyenne par ligne.

3.2.9 Analyses biochimiques

Des échantillons de tige ont été prélevés au stade de la récolte ensilage (Tableau 2). Au préalable, trois plantes non attaquées par les pyrales représentatives de chaque ligne ont été choisies et marquées par une étiquette au mois d'août. Deux lignes (parmi les quatre) ont été choisies au hasard pour chaque génotype. Lors du prélèvement, chaque plante est coupée entre la base des racines aériennes et la panicule, et les épis sont éliminés. Chaque échantillon a été broyé puis séché dans une étuve à 60°C pendant 48h (Zhang *et al.*, 2019). La poudre de matière sèche a été analysée à l'IJPB selon le protocole utilisé par El Hage *et al.* (2018). Les analyses biochimiques et les spectres NIRS ont porté sur une vingtaine de variables incluant les constituants de la paroi cellulaire et la digestibilité de la plante entière.

Tableau 2 : Date de prélèvements et caractéristiques des plantes prélevées pour les analyses biochimiques.

Lignée	Prélèvements	Matière sèche (%)	Floraison (degré/jour)	Floraison-prélèvement (degré/jour)
F252-précoce	09/09/2019	32,2	74	47
F252-témoin	09/09/2019	33,4	77	44
F252-témoin	17/09/2019	36,6	76	53
F252-tardif	17/09/2019	33,4	82	46
MBS-précoce	17/09/2019	26,7	85	43
MBS-témoin	01/10/2019	29,4	87	41
MBS-témoin	10/10/2019	28	88	50
MBS-tardif	21/10/2019	33,3	100	47

3.2.10 Analyses statistiques

Toutes les données des notations au champs et des analyses biochimiques ont été regroupées en un jeu de données pour les analyses statistiques, constituant un jeu de données issu de 172 observations sur la 23^{ème} génération de l'expérience de sélection divergente de Saclay, et comprenant 64 variables, dont 17 descripteurs (variables qualitatives) et 45 variables quantitatives. Tout d'abord, nous avons réalisé une analyse de variance pour tester l'effet global des différentes sources de variation en utilisant le modèle mixte suivant :

$$Y_{ijklm} = line_i + pop_{ij} + fam_{ijk} + proge_{ijkl} + B_m + E_{ijklm} \quad (1)$$

Pour chaque variable, une ligne correspond à une mesure Y_{ijklm} dans le bloc m pour le progéniteur l de la famille k, appartenant à la population j et issue de la lignée ancestrale i. Les lettres minuscules sont des effets fixes, et les lettres majuscules (effet bloc B et résiduelle E) des effets aléatoires. Un test du maximum de vraisemblance a permis de comparer les modèles emboîtés, et tester la significativité des effets lignée, population, famille et progéniteur. Le modèle complet a été validé par l'examen manuel des graphes des résidus. Il a été utilisé pour estimer la valeur moyenne de chaque progéniteur et son intervalle de confiance. L'héritabilité au sens large de chaque caractère a été calculée à partir de la variable qui correspond à la valeur de la variable après en avoir soustrait les effets moyens du bloc $Z_{ijklm} = Y_{ijklm} - B_m$.

Les composantes de la variance génétique (entre progéniteurs) et résiduelle (entre plantes d'un même progéniteur) ont été estimées à l'aide du modèle suivant :

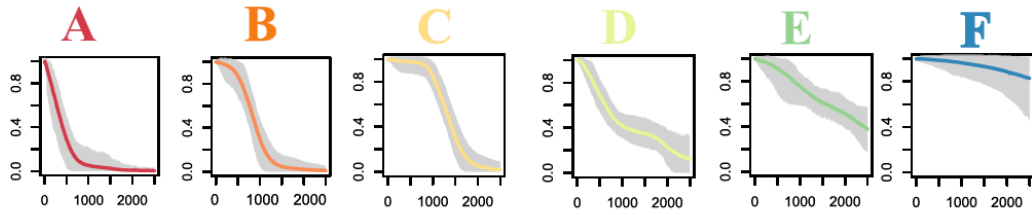
$$Z_{ijklm} = PROGE_{ijkl} + E_{ijklm} \quad (2).$$

L'héritabilité au sens large de chaque caractère est calculée comme

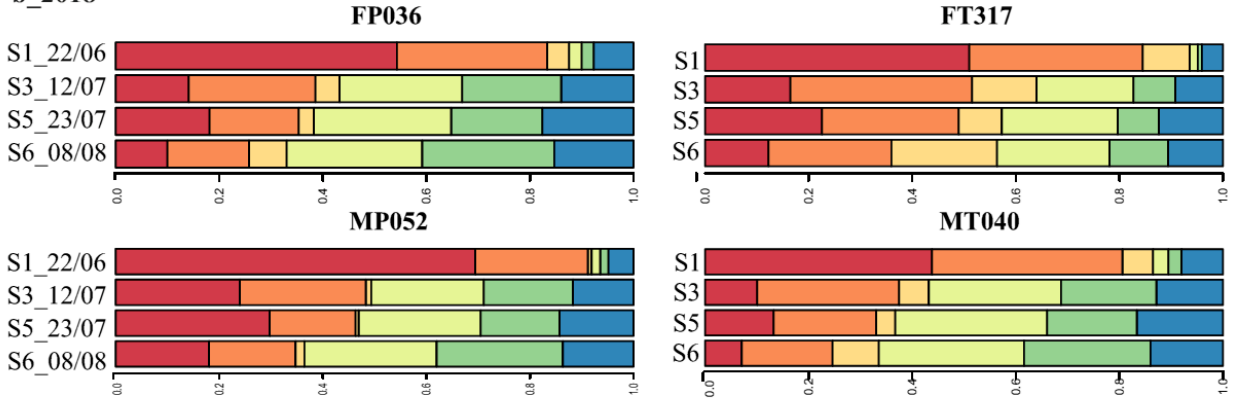
$$H^2 = \frac{\sigma^2_{PROGE}}{\sigma^2_{PROGE} + \sigma^2_E}$$

Pour finir, les moyennes estimées par progéniteur pour chaque caractère ont été utilisées pour étudier les corrélations génétiques entre caractères par une analyse en composantes principales.

a_Types



b_2018



c_2019

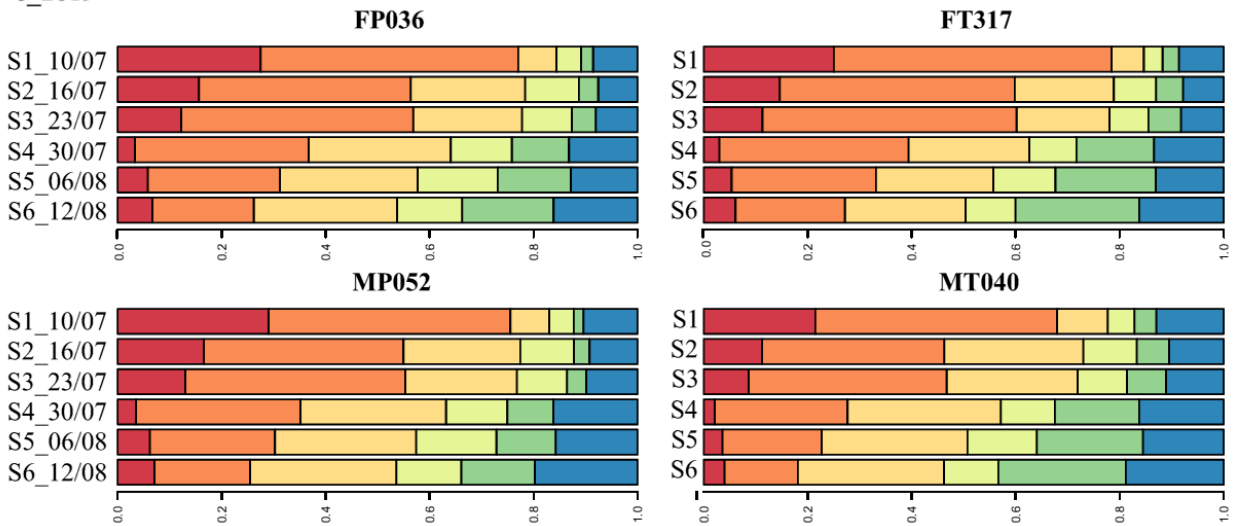


Figure 3 : Répartition des comportements alimentaires selon le stade de développement des plantes pour chaque progéniteur. Pour chaque progéniteur représenté par une famille, les proportions estimées de chaque type de comportement alimentaire [A-F] sont représentées sur le barplot. Les barplots sont organisés selon le stade de prélèvement de S1 à S6. **a.** rappel de la dynamique de consommation moyenne pour chaque type de comportement alimentaire, l'aire en grisée représente la variabilité de la consommation au sein de chaque type. **b.** Données 2018. **c.** Données 2019.

3.3 Résultats

3.3.1 Appétence des larves de pyrales pour des disques foliaires de plants de maïs prélevés au champ

Nous avons suivi, à l'aide d'un dispositif original (Sanane *et al.*, 2020) la consommation des larves de pyrale sur des disques foliaires prélevés au champ sur des plants représentatifs de familles précoces et tardives de chaque fonds génétique, à différents stades de développement, durant deux années consécutives. Chaque échantillon a été caractérisé par un type de comportement alimentaire des larves, parmi six catégories nommées par des lettres de A à F et mesurant le degré d'appétence des larves pour les disques foliaires. La lettre A correspond à une consommation rapide de l'ensemble du disque foliaire. La lettre F correspond à l'absence de consommation. Les lettres intermédiaires correspondent à des comportements intermédiaires (Sanane *et al.*, 2020). Le modèle d'analyse utilisé permet de tester, pour chaque année, les effets du stade de développement et du progéniteur sur la répartition des comportements entre les six types alimentaires. Dans tous les cas, on observe l'absence d'effets d'interaction entre le progéniteur et les différents stades de prélèvements des disques foliaires. Les différences observées pour les stades de prélèvement sont indépendantes du progéniteur, et les différences entre les progéniteurs sont indépendantes du stade de prélèvement.

Effet du stade de prélèvement : le tableau 3 montre le résultat des tests de comparaison de moyennes deux à deux entre stades de prélèvement. Les proportions estimées de chaque type de comportement alimentaire pour chaque génotype et à chaque stade de prélèvement sont représentées par des barplots (Fig 3).

Tableau 3 : P-value des contrastes entre les différents stades de prélèvement des disques foliaires pour chaque type de comportement alimentaires des larves. A noter que seuls les stades S1, S3, S5 et S6 ont été évalués en 2018 (Tableau 1). Dans chaque case, « - » indique une comparaison impossible, « R » est la catégorie de référence utilisée pour l'année correspondante. Les cases grisées correspondent à des comparaisons significatives au seuil 5%.

	A		B		C		D		E		F	
	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019
S1 - S2	-	0,0201	-	0,1153	-	0,1876	-	0,5477	-	R	R	0,2113
S1 - S3	0	0,0007	0,0154	0,0571	0,2698	0,4328	0,0005	0,9548	0,0032	R	R	0,1104
S1 - S6	0	0	0,0001	0	0,7302	0,0909	0,0005	0,0245	0,0008	R	R	0,0008
S2 - S3	-	0,4694	-	0,8455	-	0,6941	-	0,6976	-	R	R	0,8268
S3 - S4	-	0,0008	-	0,0389	-	0,3331	-	0,3335	-	R	R	0,5479
S3 - S5	0,9702	0,0026	0,193	0,0027	0,2906	0,1552	0,8607	0,3441	0,6594	R	R	0,2959
S4 - S5	-	0,6269	0,9111	0,3326	0,1019	0,6412	0,8519	0,9748	0,4765	R	R	0,6434
S5 - S6	0,3209	0,8957	-	0,368	-	0,7603	-	0,5151	-	R	R	0,9865

En 2018, nous avons réalisé des prélèvements aux stades S1, S3, S5 et S6. On observe un excès des types de consommation A et B au stade S1, et un excès des types de consommation C, D, E et F aux stades S3-S6. Les différences observées sont toutes significatives (Tableau 3). En 2019, nous avons réalisé des prélèvements aux stades S1 à S6. On observe, comme en 2018, un excès de types de consommation A au stade S1 par rapport aux autres stades, et un déficit de types de comportement D, E, F (Tableau 3). En particulier, le comportement alimentaire de type F est plus important au stade S6 qu'au stade S1. L'excès de types de consommation A et B perdure jusqu'au stade S3, avec des comparaisons significatives entre S3 et S4, S3 et S5 (Tableau 3), et aussi S3 et S6.

En résumé, on observe clairement des changements du comportement alimentaire des larves en fonction de l'âge des plantes, quel que soit leur génotype. La fréquence des comportements alimentaires A et/ou B diminue au cours du temps, alors que la fréquence des comportements intermédiaires C, D, E, augmente, ainsi que la proportion de larves refusant de se nourrir (type F).

Ces résultats montrent que les larves ont une préférence de consommation pour les jeunes plantes. On observe aussi des différences entre les deux années d'expérimentation. En 2019, les excès de comportements de types A ou B sont observés aux stades S1, S2, S3, alors qu'ils ne sont observés qu'au stade S1 en 2018.

Effet du génotype : En plus des différences dans la préférence des larves en fonction du stade de la plante, on observe des différences entre génotypes précoces et tardifs dans les deux fonds génétiques (Tableau 4).

Tableau 4 : Comparaisons de moyennes entre les familles précoces et tardives par type de comportement alimentaire. Les différences de moyennes sont exprimées sur l'échelle logit par rapport au comportement alimentaire de types F (2018) et E (2019), utilisés comme référence. Les couleurs de la cellule représentent le niveau de significativité par contraste pour chaque type. Gris sombre = significatif au seuil de 1%. Gris clair = significatif à 1%. Blanc = non-significatif à 1%. « R » est la catégorie de référence utilisée pour l'année correspondante.

	A		B		C		D		E		F	
	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019
FP036- FT317	-0,57	0,40	-0,78	0,23	-1,40	0,47	-0,18	0,57	0,44	R	R	0,30
MP052 - MT040	0,96	1,12	-0,03	0,82	-1,63	0,55	-0,07	0,73	0,02	R	R	0,6

Dans le fonds génétique MBS, se trouve il y a un excès de comportement alimentaire de type A pour la famille précoce MP052 par rapport à celle tardive MT040 quelle que soit l'année (Tableau 4). En 2018, on a un excès significatif de comportements de type A chez MP052, associé à un déficit de comportements de type B, C, D (contrastes négatifs). En 2019, on observe un excès significatif de comportements de type A et B chez MP052, alors que le comportement majoritaire chez le génotype tardif MT040 est le type E.

Dans le fonds génétique F252, on trouve également des différences significatives entre génotypes. En 2018, la famille tardive FT317 présente un excès de comportements de type A, B, C et D par rapport à la famille précoce FP036, bien que seuls les excès des types B et C soient significatifs. En 2019, c'est la famille précoce FP036 qui présente un excès de comportements de type A, B, C,

D, les excès des types C et D étant significatifs. Pour le fonds génétique F252, les préférences des larves semblent donc dépendre de l'année d'expérimentation.

En résumé, cette expérience montre que les larves de pyrales ont une préférence significative pour le génotype précoce de la lignée MBS par rapport à son homologue tardif. Par contre, il est difficile de conclure pour ce qui concerne les deux génotypes précoces et tardifs issus de la lignée F252.

3.3.2 Prévalence des dégâts de pyrale

La prévalence de la pyrale a été évaluée par un suivi hebdomadaire dans les parcelles pour relever le nombre de nouvelles plantes infectées entre début juillet et fin septembre en 2018 et 2019. La figure 4 représente l'évolution des moyennes par famille de la prévalence à chaque date de mesure. Globalement la prévalence augmente, mais on n'a pas les mêmes résultats d'une année à l'autre. En 2018, le nombre de plantes attaquées augmente à partir du début du mois de juillet puis plafonne autour de 30% avant d'augmenter brutalement à nouveau, dès la fin du mois d'août. A la mi-septembre, la prévalence moyenne atteint presque 100% dans certaines familles. En 2019, la prévalence augmente entre le 19 juillet et le 23 août, où elle atteint un plateau autour de 20 à 30% selon les familles. On observe une légère augmentation de la prévalence à la dernière mesure du mois de septembre. Ces observations sont compatibles avec l'existence de deux générations successives de pyrales. Une première au printemps, avec des dégâts observables sur les plantes dès juillet. Une seconde génération à la fin de l'été, dont les larves colonisent les plants de maïs entre fin-août (2018) et mi-septembre (2019). La seconde génération de pyrale a clairement été plus précoce en 2018 qu'en 2019.

Sur la figure 4 les différentes familles sont représentées par des codes couleurs. On voit clairement que pour chacune des deux années, la prévalence est toujours plus importante chez les familles précoces et témoins MBS que chez les autres familles. L'analyse de variance, dont les résultats sont résumés dans le tableau 5, permet de décomposer les sources de variation entre les différents facteurs explicatifs. L'effet planche est souvent significatif mais il est général assez faible (Fig_S2). Pour toutes les dates de mesure, on trouve chaque année des différences significatives entre les deux fonds génétiques F252 et MBS. On trouve aussi, pour différentes dates de mesure, des différences significatives entre populations précoces et tardives d'un même fonds génétique. En 2018, les différences sont significatives vers la fin de l'été, lors de la l'invasion de la seconde génération. En 2019, les différences sont significatives en juillet et début août, lors de l'invasion par la première génération. Dans tous les cas, cet effet population est dû à des différences entre les populations précoces et tardives du fonds génétique MBS (Fig 4). L'effet famille n'est jamais significatif : les deux familles d'une même population montrent des niveaux de prévalence

similaire. Par contre, on trouve des différences significatives entre progéniteurs d’une même famille lors de la seconde génération de pyrales, c’est-à-dire fin août/début septembre en 2018, et le 24 septembre en 2019. Ces différences entre progéniteurs concernent surtout la famille FP036 (F252 précoce) en 2018, et toutes les familles en 2019 (Fig_S3). En 2018, les progéniteurs de la famille FP036 sont plus attaqués que les autres progéniteurs du fonds génétique F252 en fin de saison (Fig 4 et Fig_S3).

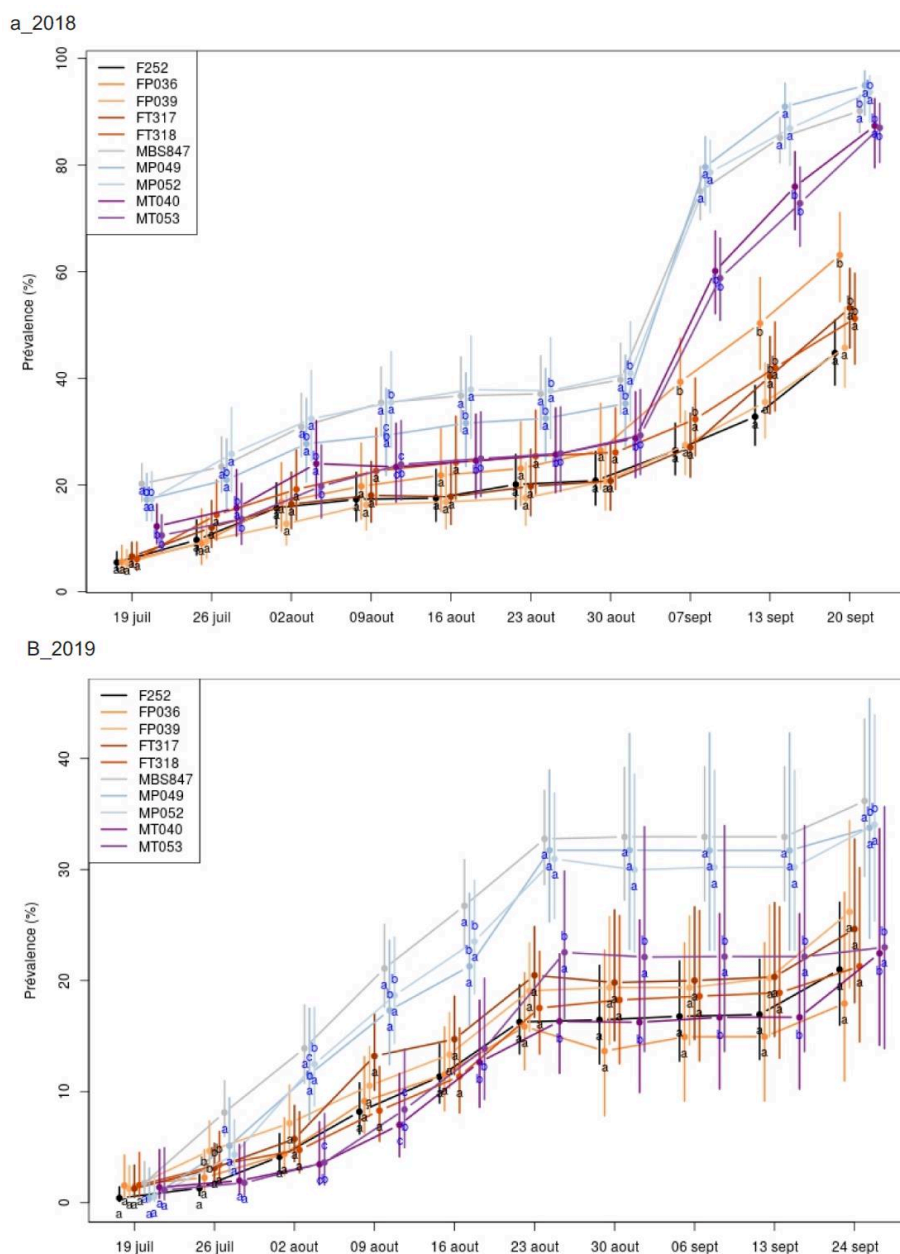


Figure 4 : Prévalence des dégâts de pyrale par famille au cours du temps en 2018 (a) et 2019 (b) : prévalence sur l’axe des ordonnées et temps sur abscisses. Les axes abscisses sont les jours de notation de la prévalence. En ordonnées on a les moyennes par famille plus les intervalles de confiance (lignes verticales). Chaque famille est représentée par une couleur. Les lettres correspondent à la comparaison des moyennes 2 à 2 entre famille (Tableaux S4&S5).

En résumé, l'évaluation de la prévalence au champ montre que les familles précoces MBS semblent être plus susceptibles que les familles tardives face aux attaques de pyrale. Pour F252, on ne trouve pas de différence significative entre populations, mais certains progéniteurs de la famille précoce FP036 sont plus attaqués que les autres progéniteurs du même fonds génétique. Ces observations au champ sont en accord avec nos résultats de consommation qui ont montré une préférence des larves de pyrale pour les mêmes familles précoces MBS.

Tableau 5 : Résultats de l'analyse de variance pour la prévalence des dégâts au champ. La p-value correspondant au test de chaque effet planche, progéniteur, famille, population et fonds génétique, est donnée pour chaque année et chaque semaine de mesure. Les valeurs significatives à 5% sont indiquées par un fond grisé. Le symbole « - » indique que le test n'a pas pu être réalisé.

	Planche		Progéniteur		Famille		Population		Fonds génétique	
	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019
5 juil.	1	-	1	-	0,1649	-	0,043	-	0,0000	-
12 juil.	1	1	1	1	0,1494	0,9923	0,1566	0,8426	0,0000	0,0000
19 juil.	0,1405	0,0316	1	0,4174	0,9587	0,9862	0,0656	0,3823	0,0000	0,0000
26 juil.	0,1205	0,5435	0,5939	1	0,4536	0,4867	0,0647	0,0066	0,0000	0,0000
2 août	0,0175	0,0516	0,1583	1	0,288	0,5485	0,1755	0,0008	0,0000	0,0000
9 août	0,0023	0,2184	0,1143	0,1306	0,274	0,5606	0,1373	0,0074	0,0000	0,0000
16 août	0,0001	0,2582	0,2633	0,0913	0,0797	0,8348	0,1091	0,0602	0,0000	0,0000
23 août	0,0001	0,2844	0,0191	1	0,23	0,3896	0,1992	0,0215	0,0000	0,0000
30 août	0,0008	0,4153	0,0455	1	0,2117	0,3978	0,2213	0,0095	0,0000	0,0000
6 sept	-	0,3373	-	1	-	0,4959	-	0,0091	-	0,0000
7 sept	0,1906	-	0,0502	-	0,0762	-	0,0000	-	0,0000	-
13 sept	0,0101	0,3315	0,0001	1	0,16	0,3974	0,0031	0,0149	0,0000	0,0000
20 sept	0,0146	-	0,0012	-	0,0722	-	0,02	-	0,0000	-
24 sept	-	0,0015	-	0,0127	-	0,6691	-	0,1779	-	0,0000

3.3.3 Composition chimique des plantes

En 2019, les plantes de la génération G23 de l'expérience de sélection divergente ont également été caractérisées par un ensemble de mesures phénotypiques comprenant la date de floraison, la hauteur des plantes, et des variables mesurant la composition chimique des tiges de maïs. Comme pour la prévalence des dégâts de pyrales, une analyse de variance a permis d'identifier, pour chaque caractère, les principales sources de variation. Les résultats de l'ANOVA sont contenus dans le tableau 6. Les caractères sont ordonnés selon leur héritabilité (H^2), qui varie entre 0,20 (Digestibilité de la paroi calculée *in vitro*) et 0,92 (hauteur des plantes et date de floraison). On peut noter cependant que la plupart des variables biochimiques sont très héritables. La majorité des caractères mesurés montre des différences significatives entre fonds génétiques (lignées) et entre populations. Seules les variables biochimique pH et Faest, ainsi que le poids frais des feuilles et de tiges (pds_{green}) montrent des différences significatives entre F252 et MBS, mais pas entre populations tardives et précoces d'un même fonds génétique. Ainsi, la sélection pour la date de floraison semble avoir accentué les différences entre populations pour la plupart des variables mesurées. Les caractères les plus héritables montrent aussi, pour la plupart, des différences significatives entre familles et, pour certains, des différences significatives entre progéniteurs (Tableau 6).

Pour étudier les corrélations entre ces caractères et voir comment ils différencient les progéniteurs, nous avons réalisé une analyse en composante principale (ACP) à partir des moyennes estimées par progéniteur.

Tableau 6 : Résultats de l'analyse de variance. Les variables ont été classées en groupes sur la base d'un clustering hiérarchique pour l'héritabilité au sens large (H2) et les p-value des effets lignée (pvallig), population (pvalpop), famille (pvalfam) et progéniteur (pvalproge). La significativité de l'effet bloc est indiquée de façon qualitative (*). La moyenne (μ) et l'écart-type résiduel (σ) sont indiqués pour chaque caractère. Les noms des différentes variables biochimiques sont expliqués dans la page iii dans la liste des abréviations.

trait	Mu	sigma	H2	Pvallig	pvalpop	pvalfam	pvalproge	bloc
medflo	89,88	2,65	0,92	0	0	0	0	**
mhau	117,39	5,82	0,91	0	0	0	0,10	**
H	14,85	0,74	0,91	0	0	0	0	**
pS	47,19	0,94	0,88	0	0	0	0,03	**
SoverG	0,96	0,04	0,88	0	0	0	0,01	**
pG	50,28	0,95	0,84	0	0	0	0,01	**
NDF	53,54	1,62	0,82	0,17	0	0	0,05	ns
ADF	27,11	1,02	0,81	0,09	0	0	0,14	*
cellulose_ms	24,69	0,91	0,80	0,12	0	0	0,14	*
cwr	62,00	1,86	0,79	0,06	0	0	0,20	ns
IVDMD	49,85	1,73	0,79	0,02	0	0	0,05	*
kl_ms	9,32	0,39	0,77	0,01	0	0	0,13	**
ADL	2,55	0,15	0,75	0,02	0	0	0,03	**
pH	1,69	0,34	0,73	0	0,44	0	0	**
S	286,96	18,31	0,72	0,59	0,03	0	0	**
cendre_ms	6,96	0,66	0,70	0	0,01	0,15	0,35	*
ms	31,43	1,90	0,69	0	0	0	0,05	*
HGS	614,57	45,71	0,69	0,12	0	0	0	**
Faeth	2,68	0,05	0,68	0,01	0	0	0,04	**
G	302,06	26,65	0,68	0,01	0	0	0	**
Hemicellulose_ms	26,57	0,87	0,65	0,97	0	0	0,21	ns
KLADL_NDF	4,48	0,20	0,61	0	0	0,54	0,68	**
pdstot	1170,81	202,61	0,60	0	0	0	0,39	ns
mpdsel	40,04	9,96	0,58	0	0	0,02	0	*
pdsgreen	513,37	82,71	0,57	0	0,16	0	0,2	ns
PCAest	10,79	0,59	0,56	0	0	0,08	0,29	ns
hemicellulose_NDF	49,77	0,80	0,47	0	0	0,86	0,87	**
abl_cwr	16,76	0,41	0,46	0,02	0	0,23	0,21	**
IVCWRDm	38,76	1,25	0,46	0	0,03	0,03	0,04	*
Faest	4,33	0,24	0,41	0,01	0,59	0	0,01	**
kl_cwr	15,00	0,33	0,37	0	0	0,38	0,29	*
Fatot	6,81	0,26	0,35	0,10	0,50	0	0	**
cellulose_NDF	45,91	0,66	0,35	0	0,01	0,77	0,70	**
IVCWRDc	20,61	1,28	0,20	0	0,01	0,01	0,23	ns

Les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) montrent que les trois premiers axes expliquent 87% de l'inertie totale (Fig 5). Les corrélations des variables avec les axes sont données dans le tableau 7.

L'axe 1 de l'ACP permet de différencier les lignées F252 et MBS, et les populations précoces et tardives de chaque lignée. Les variables positivement corrélées à l'axe 1 sont la date de floraison (medflo), la hauteur des plantes (mhau), le poids des parties vertes (pdsgreen), et les variables biochimiques telles que la teneur totale en lignine par matière sèche (Kl_ms), lignine de la paroi (kl_cwr), acide p-coumarique estérifié (PACest), l'acide férulique étherifié (FAeth) et de cellulose par matière sèche (cellulose-ms), le taux de silice par gramme de matière sèche (cendre_ms) et les sous-ensembles lignine + cellulose (ADF), hémicellulose + lignine + cellulose (NDF). La digestibilité de la paroi (IVDMD ou IVCWRD) est corrélée négativement à l'axe 1. Ainsi, l'axe un de l'ACP sépare les progéniteurs selon leur précocité de floraison, mais aussi pour des variables biochimiques liées à la digestibilité de la paroi. Les progéniteurs de la population MBS tardive fleurissent le plus tard, ont une teneur élevée en lignine et cellulose et sont moins digestibles. A l'inverse, les progéniteurs de la population F252 précoce fleurissent le plus tôt, ont des plantes plus courtes, de faibles teneurs en lignine et cellulose, et des parois plus digestibles. Les progéniteurs des populations F252 tardive et MBS précoce sont intermédiaires. Comme pour les analyses précédentes, on trouve moins de différences entre les populations F252 précoces et tardives qu'entre les populations MBS précoces et tardives.

L'axe 2 de l'ACP isole la population de MBS précoce des autres populations (Fig 5). On observe que les populations précoces MBS se démarquent par leur poids total des plantes plus élevé (pdstot) et leur faible teneur en matière sèche (ms) d'une part, et leur faible teneur en lignine dans la paroi (abl_cwr) d'autre part (Tableau 7). Cela montre que ces populations sont les moins lignifiées et présentent une teneur d'eau plus élevée, par conséquent sont plus tendres que leur homologue tardives ou que les populations issues du fonds génétique F252.

L'axe 3 de l'ACP montre des différences entre progéniteurs au sein même des familles issues du fonds génétique F252 (Fig 5). Les différences sur l'axe 3 sont expliquées par des différences pour les variables biochimiques comme la somme des sous-unités de la lignine (HGS) et l'acide férulique estérifié l'acide férulique total (estérifié + étherifié) et la sous-unité S de la lignine. Pour tous ces caractères, Les progéniteurs de MBS ont des valeurs identiques et intermédiaires. Par contre, on trouve de fortes différences entre progéniteurs d'une même famille dans le fonds génétique F252. On notera que les 4 variables qui expliquent l'axe 3 de l'ACP sont les moins héritables.

En résumé, ces résultats montrent qu'il existe une différence de la teneur en lignine et en cellulose totale entre les progéniteurs issus de MBS et F252 selon le gradient de précocité. Cette différence existe non seulement entre les populations précoces et tardives, mais aussi entre les progéniteurs d'une même population. Par contre, les populations précoces MBS se démarquent en particulier par leur tendreté et leur forte teneur en eau.

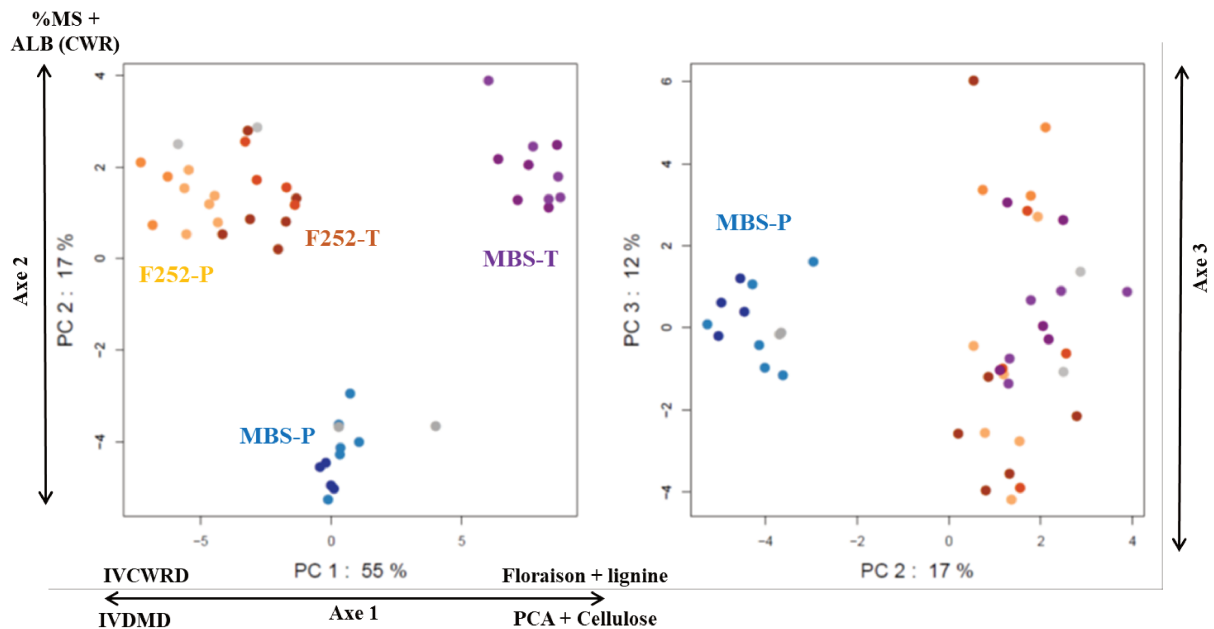


Figure 5 : Analyse en composantes principales (ACP). Les couleurs indiquent les familles. Les témoins F252 sont en gris, et les témoins MBS en gris clair. F252 précoce en orange, tardif rouge-orange, MBS précoce en bleu et MBS tardif en violet.

Tableau 7 : Résultats des variables explicatives sur les trois axes principaux de l'ACP. Les variables corrélées sont décroissantes sur les axes, 1,2 et 3 ; (-) représente lorsque la corrélation inférieure à 50% en valeur absolue pour cet axe.

Variables	Axe 1	Axe 2	Axe 3
medflo	0,95	-	-
pS	0,95	-	-
SoverG	0,94	-	-
KLADL_NDF	0,93	-	-
PCAest	0,92	-	-
ADL	0,90	-	-
mhau	0,89	-	-
kl_cwr	0,87	-	-
cwr	0,87	-	-
ADF	0,87	-	-
cellulose_ms	0,85	-	-
cellulose_NDF	0,85	-	-
NDF	0,82	-	-
cendre_ms	0,82	-	-
Faeth	0,81	-	-
pdsgreen	0,62	-	-
hemicellulose_ms	0,60	-	-
pG	-0,92	-	-
H	-0,92	-	-
kl_ms	0,92	-	-
hemicellulose_NDF	-0,91	-	-
IVDMD	-0,91	-	-
pH	-0,75	-	-
IVCWRDm	-0,71	-	-
G	-0,55	-	-
ms	-	0,88	-
abl_cwr	-	0,85	-
pdstot	-	-0,88	-
IVCWRDc	-	-	0,56
Fatot	-	-	-0,92
S	-	-	-0,92
HGS	-	-	-0,87
Faest	-	-	-0,86

3.4 Discussion

Nous avons ici utilisé un matériel végétal original pour caractériser les différences génétiques entre lignées de maïs pour différentes composantes de l'interaction avec la pyrale *Ostrinia nubilalis* Hbn. Les tests de consommation permettent de mesurer l'appétence des larves pour les feuilles. La mesure de la prévalence au champ caractérise la sensibilité des différentes plantes attaquées lors des infestations naturelles. Enfin, les variables biochimiques permettent de mesurer les défenses physiques et/ou chimiques de la plante. Pour tous ces caractères, on trouve des différences importantes entre les familles issues des populations précoces de MBS et celles issues des populations tardives. Les plantes des familles MBS précoces ont des feuilles plus appétentes lors des tests de consommation, elles présentent une prévalence des larves au champ plus élevée, et se caractérisent par une teneur en matière sèche plus faible et un taux de lignine plus faible dans les parois cellulaires. Ces résultats sont en faveur de l'existence d'un compromis entre croissance et défense dans le fonds génétique MBS.

De telles différences entre familles précoces et tardives ne sont pas retrouvées pour le fonds génétique F252. Il faut noter que pour cette lignée, les différences de date de floraison entre les familles issues des populations précoces et celles issues des populations tardives sont relativement faibles (5 jours de temps thermique) alors que plus de 15 jours de temps thermique séparent en moyenne les familles MBS précoces et tardives (Fig_S6). Les mutations intervenues au cours de la sélection divergente (Durand *et al.*, 2010) peuvent induire des modifications dans la physiologie et la morphologie de certaines lignées (Santiago *et al.*, 2016). Elger *et al.* (2009) ont observé que les changements physiologiques durant le développement permettent de renforcer les défenses physiques et chimiques des plantes de certaines espèces. Etant donné que les familles MBS précoces sont restées très proches de la lignée de départ (témoin MBS), on peut faire l'hypothèse que dans le fonds génétique MBS la sélection pour la tardiveté de floraison, en ralentissant la vitesse de développement des plantes, a permis l'accumulation de réserves et la constitution de parois végétales plus riches en lignine et en matière sèche, et moins appétentes pour les larves de pyrales.

Les tests de consommation montrent clairement une préférence des larves pour les feuilles plus tendres de plantes jeunes par rapport aux plantes plus âgées. A un même stade de prélèvement, la préférence des larves pour les plantes MBS précoces, présentant une plus forte teneur en eau et des parois plus minces corrobore cette observation. Cela porte à croire que les jeunes larves sont plutôt sélectives dans leur alimentation (Guthrie, Dicke, & Neiswander, 1960). Chez *O. nubilalis* la qualité de l'aliment des larves peut améliorer la fitness de l'espèce (Saad *et al.*, 2012). Plusieurs

facteurs peuvent influencer les choix des larves, dont la texture de l'aliment (sa dureté, la présence de silice, la teneur en lignine), la qualité des tissus (sa teneur en éléments assimilables, en sucres), et la présence de composés antinutritionnels (tanins, autres composés secondaires). C'est le cas des larves de pyrales qui préfèrent les jeunes feuilles tendres à celles âgées (Bergvinson, Hamilton, & Arnason, 1995), du fait de la morphologie de leurs mandibules moins développées (Bernays *et al.*, 1991).

Contrairement à ce qui est attendu, nous n'observons pas de relation claire entre teneurs en lignine totale par matière sèche (Kl_ms), en acide p-coumarique estérifié (PACest), en acide férulique éthérifié (FAeth), en silice par matière sèche (cendre_ms) et en cellulose par matière sèche (cellulose-ms) et la prévalence des larves au champ ou l'appétence des larves. Pourtant, ces variables sont le plus souvent liées à la rigidité de la paroi cellulaire (Coors, 1987) et peuvent permettre le renforcement des barrières physiques des plantes (Buendgen *et al.*, 1990 ; Bergvinson *et al.*, 1994 ; Barros-Rios *et al.*, 2011, 2012 ; Santiago *et al.*, 2016, 2017). Elles ont permis d'augmenter la résistance de certaines variétés contre les dégâts de lépidoptères (Bergvinson, 1993 ; Barros-Rios *et al.*, 2012 ; Santiago *et al.*, 2016) et d'autres pathogènes (Santiago, Barros-Rios, & Malvar, 2013). On notera que, dans notre étude, toutes ces variables sont très corrélées à la précocité de floraison. Les génotypes les plus précoces présentent moins de barrières physiques que les génotypes les plus tardifs.

Cependant, notre dispositif ne nous permet pas de tirer de conclusion générale concernant la résistance des plantes. D'une part, parce que la quantité de plante consommée n'est pas forcément un bon indice de la qualité de la plante. Les travaux de Farrar, Lawrence, & Blackburn (2014) ont montré que les larves de *Plutella xylostella* améliorent plutôt leur efficacité digestive en consommant des lignées résistances de *Arabidopsis thaliana*. Cela leur permet d'avoir la même croissance que leur homologue consommant des plantes de lignées susceptibles de la même espèce. D'autre part, nous avons mesuré dans notre étude la prévalence des dégâts, mais pas leur importance, ni le nombre de larves par plante attaquée. De plus, les mesures de prévalence ont été faites sous infestation naturelle. Ainsi, la prévalence des larves au champ était plus élevée en 2018 qu'en 2019. On observe environ 2 semaines de différence dans l'apparition des premiers dégâts entre 2018 (5 juillet) et 2019 (19 juillet) (Fig3 a, b). De plus, l'invasion des plantes par la seconde génération de pyrales est précoce (mi-août) et très visible en 2018, alors qu'elle n'intervient que mi-septembre en 2019. Velasco *et al.* (2007) ont trouvé que la dynamique de la population de *O. nubilalis* peut varier d'une année à l'autre et que cela pourrait être lié à plusieurs facteurs dont la durée du jour, les précipitations et d'autres paramètres du climat.

Concernant les analyses biochimiques, on trouve des spécificités pour les MBS précoces notamment le pourcentage de matière sèche (%ms). Cependant, les prélèvements visaient le stade ensilage à des dates fixes (Tableau 2). Les MBS précoces ont plus de matière sèche que les F252 tardifs à la même période de prélèvement. Donc la tendreté des MBS précoces est due à un ralentissement du développement, ils présentent une paroi cellulaire mince, un poids frais élevé et un faible pourcentage de matière sèche. A la même date de prélèvement, les F252 tardifs avaient atteint le stade ensilage, mais les MBS précoces ne l'avaient pas atteint.

En conclusion, l'ensemble des observations réalisées dans cette étude montre des différences importantes entre familles précoces et tardives du fonds génétique MBS, avec une préférence des larves de pyrales pour les plantes MBS précoces, à la fois au champ et lors de tests de consommation. Cette préférence pourrait s'expliquer par une plus forte teneur en eau et la tendreté de la paroi cellulaire des génotypes précoces par rapport aux génotypes tardifs du même fonds génétique. Les génotypes tardifs, bénéficiant d'un temps de développement plus long, pourraient accumuler plus de matière sèche et consolider leur paroi cellulaire. Par ailleurs, nous montrons qu'il existe une corrélation positive très forte entre la précocité de floraison et le niveau de défense des plantes, mesurée par des variables biochimiques liées à la digestibilité des parois. Toutes ces observations sont en faveur de l'existence d'un compromis entre croissance et défense chez le maïs, et de l'existence d'une variabilité génétique importante pour le niveau de défense contre les lépidoptères foreurs de tige au sein de l'espèce.

Dans ce travail, nous avons principalement étudié le comportement des larves. Cependant, chez les lépidoptères comme *O. nubilalis*, le choix de ponte est le fait des femelles qui sont attirées par les composés volatils émis par la plante. Il serait donc intéressant de caractériser les composés volatils impliqués dans cette interaction entre *O. nubilalis* et les lignées des expériences de sélection divergente du Plateau de Saclay pour la date de floraison.

3.5 Reference

- AHMED, E., ARSHAD, M. & KHAN, M.Z. (2017) Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *J Pharmacogn Phytochem JPP* **205**, 205–214.
- ALBA, C., BOWERS, M.D. & HUFBAUER, R. (2012) Combining optimal defense theory and the evolutionary dilemma model to refine predictions regarding plant invasion. *Ecology* **93**, 1912–1921.
- BARROS-RIOS, J., MALVAR, R.A., JUNG, H.-J.G., BUNZEL, M. & SANTIAGO, R. (2012) Divergent selection for ester-linked diferulates in maize pith stalk tissues. Effects on cell wall composition and degradability. *Phytochemistry* **83**, 43–50.

- BARROS-RIOS, J., MALVAR, R.A., JUNG, H.-J.G. & SANTIAGO, R. (2011) Cell wall composition as a maize defense mechanism against corn borers. *Phytochemistry* **72**, 365–371.
- BELSKY, A.J., CARSON, W.P., JENSEN, C.L. & FOX, G.A. (1993) Overcompensation by plants : Herbivore optimization or red herring ? *Evolutionary Ecology* **7**, 109–121.
- BERGVINSON, D. (1993) Role of phenolic acids in maize resistance to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Huebner). Thesis, University of Ottawa (Canada).
- BERGVINSON, D.J., ARNASON, J.T., HAMILTON, R., MIHM, J.A. & JEWELL, D.C. (1994) Determining Leaf Toughness and Its Role in Maize Resistance to the European Corn Borer (Lepidoptera : Pyralidae). *Journal of Economic Entomology* **87**, 1743–1748.
- BERGVINSON, D.J., HAMILTON, R.I. & ARNASON, J.T. (1995) Leaf profile of maize resistance factors to European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Chemical Ecology* **21**, 343–354.
- BERNAYS, E.A., JARZEMBOWSKI, E.A., MALCOLM, S.B., CHALONER, W.G., HARPER, J.L. & LAWTON, J.H. (1991) Evolution of insect morphology in relation to plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences* **333**, 257–264.
- BUENDGEN, M.R., COORS, J.G., GROMBACHER, A.W. & RUSSELL, W.A. (1990) European Corn Borer Resistance and Cell Wall Composition of Three Maize Populations. *Crop Science* **30**, 505–510.
- CHAUMONT, F. DE, DALLONGEVILLE, S., CHENOUD, N., HERVE, N., POP, S., PROVOOST, T., MEAS-YEDID, V., PANKAJAKSHAN, P., LECOMTE, T., MONTAGNER, Y.L., LAGACHE, T., DUFOUR, A. & OLIVO-MARIN, J.-C. (2012) Icy : an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods* **9**, 690–696.
- COLEY, P.D. (1988) Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia* **74**, 531–536.
- COLEY, P.D., BRYANT, J.P. & STUART CHAPIN, I.I.I.F. (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* **230**, 895–900.
- COORS, J.G. (1987) Resistance to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner), in maize, *Zea mays* L., as affected by soil silica, plant silica, structural carbohydrates, and lignin. In *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition* pp. 445–456. Springer, Dordrecht.
- DING, P. & DING, Y. (2020) Stories of Salicylic Acid : A Plant Defense Hormone. *Trends in Plant Science* **25**, 549–565.
- DURAND, E., BOUCHET, S., BERTIN, P., RESSAYRE, A., JAMIN, P., CHARCOSSET, A., DILLMANN, C. & TENAILLON, M.I. (2012) Flowering Time in Maize : Linkage and Epistasis at a Major Effect Locus. *Genetics* **190**, 1547–1562.
- DURAND, E., TENAILLON, M.I., RIDEL, C., COUBRICHE, D., JAMIN, P., JOUANNE, S., RESSAYRE, A., CHARCOSSET, A. & DILLMANN, C. (2010) Standing variation and new mutations both contribute to a fast response to selection for flowering time in maize inbreds. *BMC Evolutionary Biology* **10**, 2.
- EL HAGE, F. (2018) Impact du déficit hydrique sur la dégradabilité, la biochimie pariétale et la répartition des tissus lignifiés chez l'entre-nœud de maïs et déterminisme génétique de ces caractères. thesis, Université Paris-Saclay (ComUE).
- EL HAGE, F., LEGLAND, D., BORREGA, N., JACQUEMOT, M.-P., GRIVEAU, Y., COURSOLO, S., MECHIN, V. & REYMOND, M. (2018) Tissue Lignification, Cell Wall p-Coumaroylation and Degradability of Maize Stems Depend on Water Status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**, 4800–4808.

- ELGER, A., LEMOINE, D.G., FENNER, M. & HANLEY, M.E. (2009) Plant ontogeny and chemical defence : older seedlings are better defended. *Oikos* **118**, 767–773.
- FARRAR, R.R., LAWRENCE, S.D. & BLACKBURN, M.B. (2014) Arabidopsis Genotypes Resistant and Susceptible to Diamondback Moth (Lepidoptera : Plutellidae) : No Net Effects on Insect Growth. *Journal of Entomological Science* **49**, 285–289.
- GARLAND, T. (2014) Trade-offs. *Current Biology* **24**, R60–R61. Elsevier.
- GUTHRIE, W.D., DICKE, F.F. & NEISWANDER, C.R. (1960) Leaf and sheath feeding resistance to the European corn borer in eight inbred lines of dent corn. Ohio Agricultural Experiment Station.
- HERMS, D.A. & MATTSON, W.J. (1992) The Dilemma of Plants : To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology* **67**, 283–335.
- JANDA, T., GONDOR, O.K., YORDANOVA, R., SZALAI, G. & PAL, M. (2014) Salicylic acid and photosynthesis : signalling and effects. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**, 2537–2546.
- JIN, S. (2017) Maize defense responses to caterpillars at the molecular, phenotypic and ecological scales. PhD Thesis, Pennsylvania State University.
- JUNIOR, A.L.B., SOUZA, B.H.S.D., COSTA, E.N., RIBEIRO, Z.A. & STOUT, M.J. (2015) Facteurs influençant l'expression de l'antixénose dans le soja à *Anticarsia gemmatilis* et *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* **108**, 317–325.
- KAAN, F., ANGLADE, P., BOYAT, A., PANOUILLE, A., VIBLE, J.-C., DUPIN, M., BEDERE, M. & COGNOT, J. (1983) La résistance à la pyrale, *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lep. Pyralidae) dans un diallèle de 14 lignées précoces de maïs, *Zea mays* L. *Agronomie, EDP Sciences*, **3**, 507–512.
- LIND, E.M., BORER, E., SEABLOOM, E., ADLER, P., BAKKER, J.D., BLUMENTHAL, D.M., CRAWLEY, M., DAVIES, K., FIRN, J., GRUNER, D.S., STANLEY HARPOLE, W., HAUTIER, Y., HILLEBRAND, H., KNOPS, J., MELBOURNE, B., ET AL. (2013) Life-history constraints in grassland plant species : a growth-defence trade-off is the norm. *Ecology Letters* **16**, 513–521.
- MATA, L., GASPAR, H. & SANTOS, R. (2012) Carbon/nutrient balance in relation to biomass production and halogenated compound content in red alga *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniaceae). *Journal of Phycology* **48**, 248–253.
- PAGARE, S., BHATIA, M., TRIPATHI, N., PAGARE, S. & BANSAL, Y.K. (2015) Secondary Metabolites of Plants and their Role : Overview.
- REVILLA, P., MALVAR, R.A., VELASCO, P., BUTRON, A., TRACY, W.F., ABEDON, B.G. & ORDAS, A. (2005) Effects of Selection for the Timing of Vegetative Phase Transition on Corn Borer (Lepidoptera : Noctuidae and Crambidae) Damage. *Journal of Economic Entomology* **98**, 982–987.
- ROYER, M., LARBAT, R., LE BOT, J., ADAMOWICZ, S. & ROBIN, C. (2013) Is the C : N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato ? *Phytochemistry* **88**, 25–33.
- SAAD, A.S.A., MOURAD, A.K.K., MASOUD, M.A. & GHORAB, M. A. S. (2012) Comparative studies of semi-artificial diets on the biology and the bionomics of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Or. : Lepidoptera, Fam. : Pyralidae). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* **77**, 567–576.

- SANANE, I., LEGRAND, J., DILLMANN & MARION-POLL, F. (2020) A semi-automated design for high-throughput Lepidoptera larvae feeding bioassays. *BIORXIV/2020/232256*.
- SANTIAGO, R., BARROS-RIOS, J., ALVAREZ, A. & MALVAR, R.A. (2016) Agronomic performance of maize populations divergently selected for diferulate cross-linkage. *The Journal of Agricultural Science* **154**, 1270–1279.
- SANTIAGO, R., BARROS-RIOS, J. & MALVAR, R.A. (2013) Impact of Cell Wall Composition on Maize Resistance to Pests and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 6960–6980.
- SANTIAGO, R., CAO, A., BUTRON, A., LOPEZ-MALVAR, A., RODRIGUEZ, V.M., SANDOYA, G.V. & MALVAR, R.A. (2017) Defensive changes in maize leaves induced by feeding of Mediterranean corn borer larvae. *BMC plant biology* **17**, 44.
- STAMP, N. (2003) Out of the Quagmire of Plant Defense Hypotheses. *The Quarterly Review of Biology* **78**, 23–55.
- STAMP, N. (2004) Can the growth–differentiation balance hypothesis be tested rigorously? *Oikos* **107**, 439–448.
- TENAILLON, M.I., SEDIKKI, K., MOLLION, M., LE GUILLOUX, M., MARCHADIER, E., RESSAYRE, A. & DILLMANN, C. (2019) Transcriptomic response to divergent selection for flowering time in maize reveals convergence and key players of the underlying gene regulatory network, bioRxiv, 461947, ver. 5 peer-reviewed and recommended by Peer Community in Evolutionary Biology. 10.1101/461947.
- TODESCO, M., BALASUBRAMANIAN, S., HU, T.T., TRAW, M.B., HORTON, M., EPPLE, P., KUHN, C., SURESHKUMAR, S., SCHWARTZ, C., LANZ, C., LAITINEN, R.A.E., HUANG, Y., CHORY, J., LIPKA, V., BOREVITZ, J.O., ET AL. (2010) Natural allelic variation underlying a major fitness trade-off in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **465**, 632–636.
- VELASCO, P., REVILLA, P., MONETTI, L., BUTRON, A., ORDAS, A. & MALVAR, R.A. (2007) “Corn borers (Lepidoptera : Noctuidae ; Crambidae) In northwestern Spain : Population dynamics and distribution”, 195–203.
- ZHANG, Y., LEGLAND, D., HAGE, F.E., DEVAUX, M.-F., GUILLON, F., REYMOND, M. & MECHIN, V. (2019) Changes in cell walls lignification, feruloylation and p-coumaroylation throughout maize internode development. *PLOS ONE* **14**, e0219923. Public Library of Science.
- ZÜST, T. & AGRAWAL, A.A. (2017) Trade-Offs Between Plant Growth and Defense Against Insect Herbivory : An Emerging Mechanistic Synthesis. *Annual Review of Plant Biology* **68**, 513–534.

3.6 Données supplémentaires

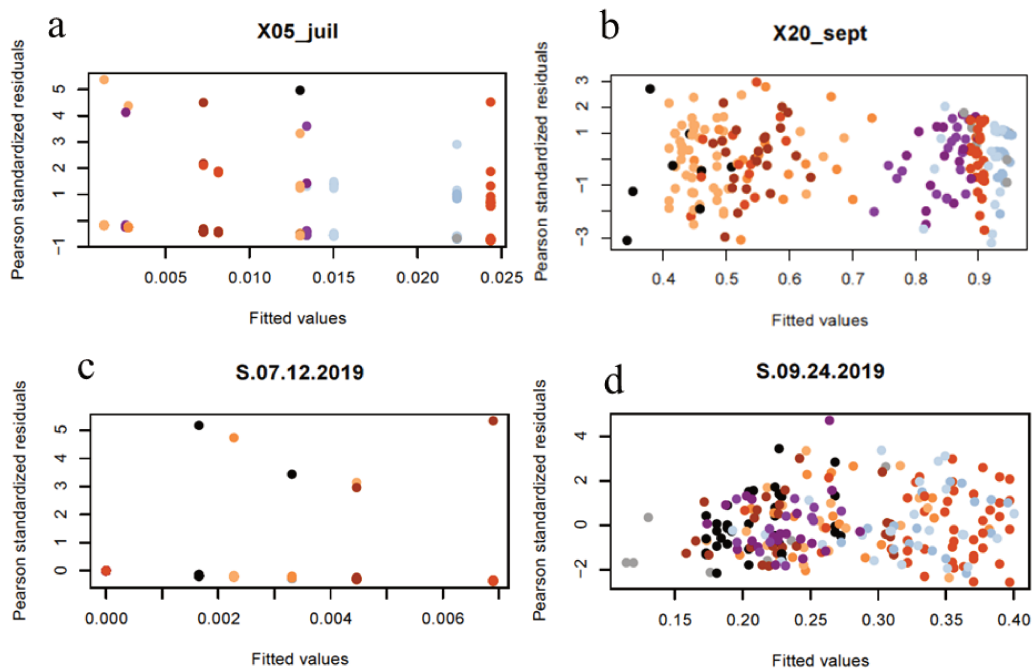


Figure-S1 : Graphe des résidus en fonction des valeurs prédites du modèle 1 (M1) avec la famille en effet fixe, le progéniteur et le bloc en effet aléatoire : Les couleurs indiquent les familles. Les témoins F252 sont en gris, et les témoins MBS847 en gris clair. F252 précoce en orange, tardif rouge-orange, MBS847 précoce en bleu et MBS847 tardif en violet. Les graphes a et b correspondent à deux dates de prélèvement en 2018. Les graphes c et d, à deux dates de prélèvement en 2019.

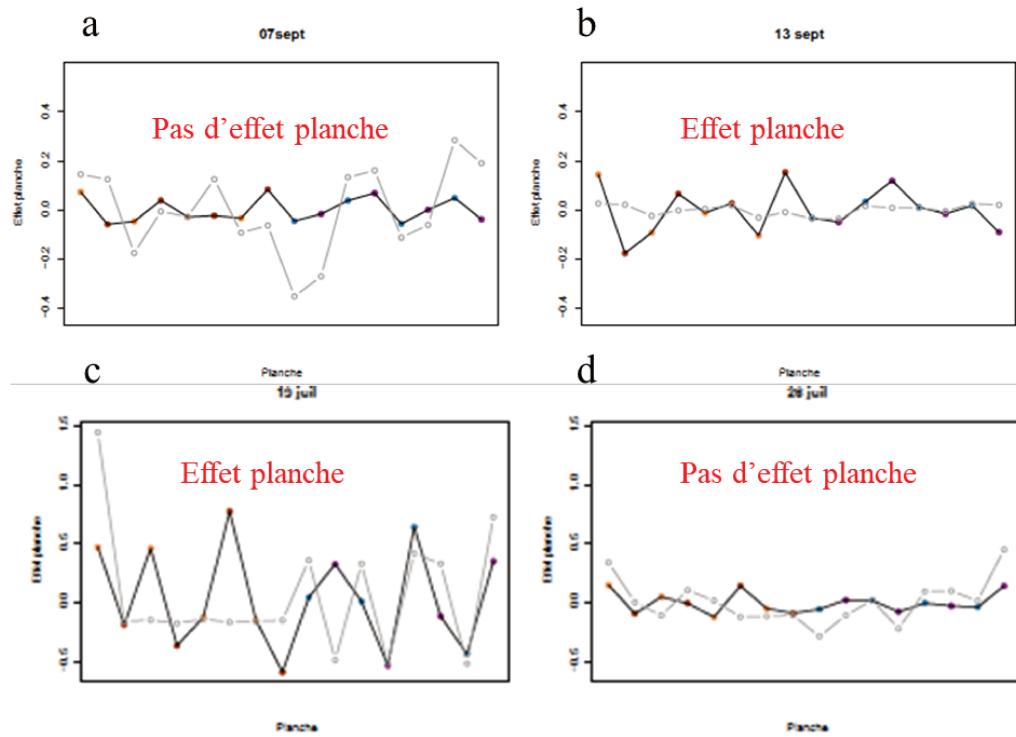


Figure-S2 : Estimation de l'effet bloc en fonction de la position du bloc dans le dispositif expérimental. En abscisse, le numéro du bloc indique sa position dans le dispositif. Les huit premiers blocs contiennent des progéniteurs précoces (orange) ou tardifs (rouge-orange) de F252. Les huit blocs suivants contiennent des progéniteur précoces (bleu) ou tardifs (violet) de MBS. En gris, la valeur de l'effet bloc mesuré sur la ligne témoin. En couleurs, la valeur de l'effet bloc estimée sur les progéniteurs de l'expérience de sélection. Les graphes a et b correspondent à deux dates de mesure en 2018. Les graphes c et d correspondent à deux dates de mesure en 2019.

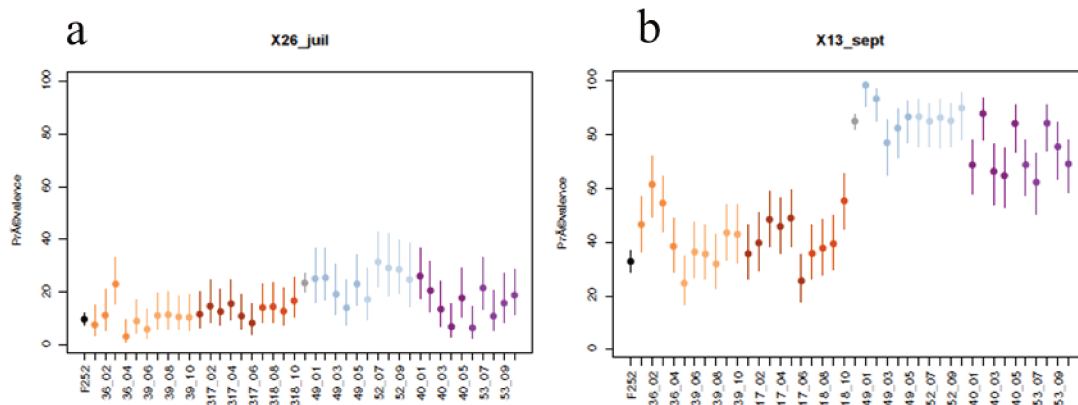


Figure-S3 : Prévalence moyenne des dégâts de pyrale par progéniteur au cours du temps en 2018_(a)26 juillet 2018 ;(b) 13 septembre 2018. Les progéniteurs sont représentés sur l'axe des abscisses. En ordonnée, la valeur moyenne est représentée par un point, et l'intervalle de confiance par un segment de droite. Les couleurs indiquent les différents progéniteurs. Les témoins F252 sont en gris, et les témoins MBS847 en gris clair. F252 précoce en orange, tardif rouge-orange, MBS847 précoce en bleu et MBS847 tardif en violet.

Tableau-S4 : Résultats des comparaisons de moyennes entre les familles de chaque fonds génétique pour la prévalence de pyrale en 2018.

	19-juil	26-juil	2-août	9-août	16-août	23-août	30-août	7-sept	13-sept	20-sept
F252-FP036	1	1	0,9999	0,9875	0,7704	0,9710	0,4896	0,0007	0	0
F252-FP039	1	1	0,8401	0,9999	1	0,9707	1	1	0,983	1
F252-FT317	0,9938	0,898	1	1	1	1	1	1	0,1248	0,0773
F252-FT318	0,9999	0,2705	0,8614	0,4381	0,1751	0,5264	0,5384	0,4601	0,0689	0,5068
FP036-FP039	1	1	0,7026	0,9051	0,5931	0,4828	0,4865	0,0051	0,0003	0
FP036-FT317	0,9994	0,9338	1	0,9997	0,9339	0,9804	0,7057	0,0097	0,1743	0,1824
FP036-FT318	1	0,4963	0,9973	0,9944	0,999	0,9993	1	0,6002	0,4906	0,0826
FP039-FT317	0,9958	0,9313	0,7998	0,9989	1	0,9971	1	1	0,8757	0,4486
FP039-FT318	0,9999	0,4012	0,2461	0,4213	0,2916	0,2371	0,7461	0,8368	0,69	0,8719
FT317-FT318	1	0,9693	0,9696	0,6724	0,2292	0,441	0,5512	0,6763	0,9999	0,9994
MBS847-MP049	0,9624	0,9922	0,9785	0,5688	0,7962	0,879	0,9005	0,7518	0,4092	0,2593
MBS847-MP052	0,9731	0,9959	0,9999	1	1	1	1	0,9371	0,998	0,6456
MBS847-MT040	0,03	0,1053	0,3137	0,0037	0,0043	0,0107	0,019	0	0,0108	0,9405
MBS847-MT053	0,0023	0,0085	0,0065	0,0063	0,0065	0,0129	0,0287	0	0,0001	0,806
MP049-MP052	1	0,8201	0,9001	0,68	0,6808	0,8597	0,8006	1	0,8536	0,9989
MP049-MT040	0,6385	0,7388	0,9801	0,7745	0,6358	0,6943	0,7511	0	0,0013	0,07
MP049-MT053	0,2088	0,2598	0,3475	0,8459	0,7068	0,7276	0,8234	0	0,0001	0,0329
MP052-MT040	0,6397	0,0769	0,37	0,0474	0,0299	0,076	0,0707	0	0,0213	0,229
MP052-MT053	0,2137	0,0087	0,0195	0,0674	0,0401	0,0863	0,0951	0	0,001	0,1228
MT040-MT053	0,9972	0,9968	0,8862	1	1	1	1	1	0,9851	1

Pour chaque contraste, la pvalue du test de comparaison de moyennes est donnée à chaque date de mesure. Les cellules sont grisées lorsque la différence est significative entre les familles.

Tableau-S5 : Résultats des ANOVA comparaisons de moyennes entre les familles de chaque fonds génétique pour la prévalence de pyrale en 2019.

	19-juil	24-juil	2-août	9-août	16-août	23-août	30-août	6-sept	13-sept	24-sept
F252-FP036	0,6067	0,9667	1	0,9999	1	1	0,9888	0,9991	0,9985	0,9889
F252-FP039	0,7781	0,0321	0,4035	0,9112	0,9832	0,9489	0,9391	0,9707	0,8958	0,5838
F252-FT317	0,7943	0,4584	0,9435	0,1423	0,7443	0,6634	0,8786	0,9068	0,8825	0,8992
F252-FT318	0,6227	0,4060	1	1	1	0,9999	0,9987	0,9986	0,9977	1
FP036-FP039	1	0,6613	0,7484	0,9991	0,9972	0,9552	0,6817	0,8640	0,724	0,2946
FP036-FT317	1	0,9981	0,9966	0,7356	0,9353	0,8067	0,6441	0,8083	0,7565	0,7006
FP036-FT318	1	0,9924	1	1	1	0,9998	0,9120	0,9714	0,9557	0,9937
FP039-FT317	1	0,9579	0,9965	0,9525	0,9996	0,9999	1	1	1	1
FP039-FT318	1	0,9959	0,9337	0,9840	0,9967	0,9998	1	1	1	0,9057
FT317-FT318	1	1	0,9994	0,4172	0,8991	0,9796	0,9998	0,9999	0,9999	0,9716
MBS847-MP049	0,8571	0,8732	0,9941	0,9583	0,8104	1	1	1	1	0,9995
MBS847-MP052	0,8044	0,4187	0,9996	0,9937	0,9773	0,9998	0,9918	0,9955	0,9955	0,9995
MBS847-MT040	1	0,0792	0,0041	0,0004	0,0017	0,0005	0,0005	0,0007	0,0007	0,0227
MBS847-MT053	0,9996	0,1230	0,0147	0,0066	0,0163	0,1935	0,2006	0,2086	0,2083	0,0774
MP049-MP052	1	1	1	1	0,9995	1	1	1	1	1
MP049-MT040	0,9751	0,7313	0,0789	0,0485	0,3207	0,0125	0,0123	0,0189	0,0189	0,3339
MP049-MT053	0,9942	0,7296	0,1502	0,2150	0,6200	0,5570	0,5518	0,5691	0,5683	0,4949
MP052-MT040	0,9840	0,8693	0,0296	0,0110	0,0638	0,0095	0,0192	0,0256	0,0255	0,2243
MP052-MT053	0,9981	0,8592	0,0694	0,0747	0,2199	0,5751	0,7124	0,6953	0,6946	0,3813
MT040-MT053	1	1	1	0,9998	1	0,8106	0,8813	0,9213	0,9214	1

Pour chaque contraste, la pvalue du test de comparaison de moyennes est donnée à chaque date de mesure. Les contrastes entre les familles dans la première colonne, chaque cellule représente la pvalue du contraste pour ce pas de temps et les cellules sont grisées lorsque la différence est significative entre les familles

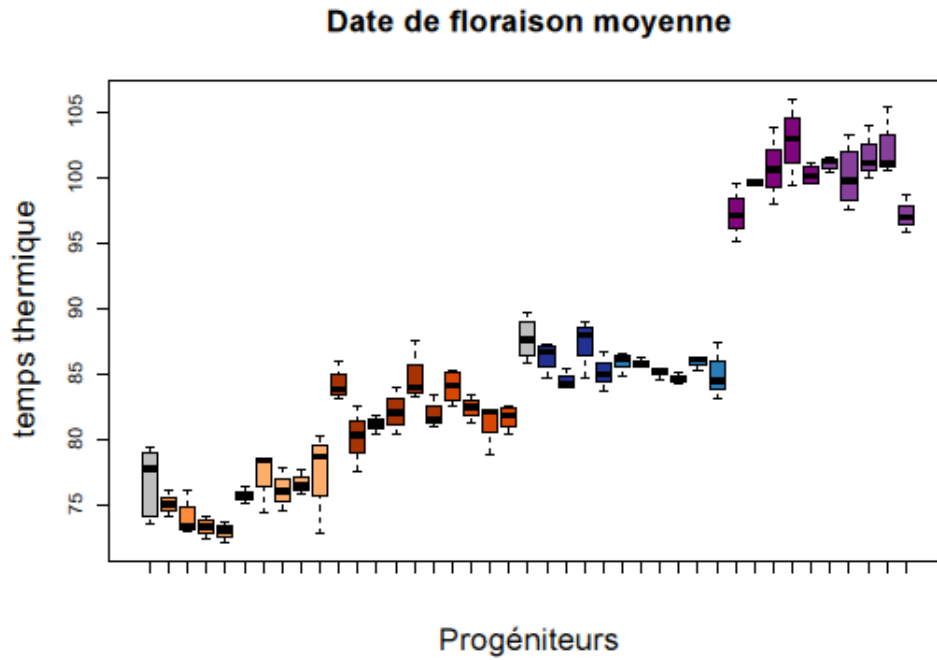


Figure-S6 : Boxplot des dates de floraison des 8 familles des deux fonds génétiques ainsi que leurs témoins. Les différents progéniteurs sont représentés sur l'axe des abscisses. En ordonnée le nombre de jours avant floraison en temps thermique. Chaque boxplot correspond à un progéniteur. Les familles sont représentées par les différentes couleurs.

Dans ce chapitre 4, on a testé la variabilité génétique d'un core-panel de 18 lignées représentant la diversité génétique des variétés de maïs de cultivés en Amérique du Nord et en Europe pour leur appétence aux larves de pyrale *Ostrinia nubilalis* Hübner. Ces lignées étant très variables pour leur date floraison (20 jours de décalage en temps thermique entre la lignée la plus précoce et la plus tardive), nous avons réalisé des semis décalés afin de conduire les tests de consommation avec des disques foliaires prélevés sur des plantes à un même stade de développement.

Les résultats mettent en évidence l'existence de différences importantes entre lignées du panel pour l'appétence des larves de pyrale, et confirment, pour certaines lignées, des données de la littérature concernant leur résistance ou leur tolérance face aux insectes foreurs de tige. Ils suggèrent aussi que les lignées les plus précoces seraient plutôt moins appétentes que certaines lignées plus tardives.

Pour 12 des lignées du panel, les résultats des tests de consommation ont pu être comparés avec des données enzymatiques et métaboliques existantes, ce qui nous a permis d'explorer les corrélations entre les caractéristiques métaboliques des plantes et leur appétence pour les larves de pyrale. Nous avons identifié une dizaine de variables liées au métabolisme des feuilles corrélées à certains types de comportements alimentaires des larves.

Ces travaux ont été réalisés grâce à un financement de l'IDEEV (Institut Diversité, Ecologie, Evolution du Vivant) et ont impliqué des collaborations avec des collègues de l'UMR GQE-Le Moulon pour le choix des lignées du core-panel et leur description, l'obtention des semences et des données métaboliques, et les analyses préliminaires. L'ensemble des résultats de nos travaux sont aussi présentés sous forme de projet d'article qui sera ultérieurement soumis à une revue scientifique.

Evaluation d'un panel de 18 lignées de maïs d'Europe et d'Amérique pour l'appétence à *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera : Crambidae)

Inoussa Sanane^{1&2}, Stéphane Nicolas¹, Cyril Bauland¹, Frédéric Marion-Poll^{2&3} & Christine Dillmann¹

- (1) Université Paris-Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech, GQE - Le Moulon, 91190, Gif-sur-Yvette, France.
- (2) Université Paris-Saclay, CNRS, IRD, UMR Évolution, Génomes, Comportement et Écologie, 91198, Gif-sur-Yvette, France.
- (3) Université Paris-Saclay, AgroParisTech, Paris, France.

4.1 Introduction

Le maïs est la céréale la plus produite dans le monde devant le blé et riz. Il fait l'objet d'attaques parasitaires, et les lépidoptères foreurs de tige constituent l'une des contraintes majeures à sa production (Meihls, Kaur, & Jander, 2012). La pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* (Hübner) est le ravageur le plus néfaste du fait de la spécificité des dégâts occasionnés. A elle seule, la pyrale peut occasionner jusqu'à 93% de dégâts sur la plante (galeries dans la tige, trous dans les feuilles) et 76% au niveau des épis (Beres, 2012). Chez certains hybrides commerciaux, une seule larve de *O. nubilalis* peut entraîner jusqu'à 6,05% de perte de rendement grain (Bohn *et al.*, 1999). Selon les mêmes auteurs, une perte de 0,28% sur le rendement grain correspond à 1% de dégâts occasionnés par les larves.

Sous la pression des ravageurs, les plantes peuvent mettre en place des mécanismes de défense. Ceux-ci peuvent être physiques par l'élaboration de structures particulières dissuasives, ou chimiques par la production de métabolites contre ces ravageurs (Ođjakova, Hadjiivanova, & Tsankov, 2001 ; Fatima *et al.*, 2018 ; Tariq & Saleem, 2018). Dans le cas du maïs, certaines variétés sélectionnées pour leur capacité de synthèse de DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one) sont plus résistantes aux attaques de la pyrale (Cambier, Hance, & De Hoffmann, 2000). Par ailleurs, la composition de la paroi cellulaire (lignines, acides p-coumarique) (Barros-Rios *et al.*, 2011 ; Santiago, Barros-Rios, & Malvar, 2013) permet d'augmenter leur résistance contre ce ravageur (Bergvinson, 1993).

Une façon d'évaluer la résistance des plantes aux insectes phytophages est de mesurer l'appétence des larves sur disques foliaires. On peut aussi évaluer l'effet antiappétent de certaines molécules sur les larves de lépidoptères à partir de cette méthode (Magrini *et al.*, 2015 ; Ningombam *et al.*,

2017 ; Sanane *et al.*, 2020). Elle a non seulement permis de phénotyper des plantes de Brassicaceae pour leur appétence par des larves de *Microtheca punctigera* (Menezes Jr. *et al.*, 2005) mais aussi d'identifier des variétés résistantes du riz au lépidoptères *Cnaphalocrocis medinaset* (Bentur & Kalode, 1990).

Pour caractériser une espèce ou un groupe génétique par ces méthodes, il faut dans l'idéal pouvoir disposer d'un petit nombre de variétés représentatives de la diversité génétique ou du groupe considéré. Une core-collection est un sous-ensemble de variétés qui représente la diversité génétique existant au sein d'une espèce ou d'une collection (Brown, 1989 ; Diwan, McIntosh, & Bauchan, 1995). Par exemple, l'évaluation d'un panel de 85 lignées représentant la collection de maïs de toute l'Europe a permis d'identifier les lignées non seulement résistantes à la *Sesamia nonagrioides* et à *O. nubilalis* en infestation artificielle (Malvar *et al.*, 2004) mais aussi celles qui produisent mieux sous la pression de ces ravageurs (Malvar *et al.*, 2007).

Dans notre étude, nous avons évalué à l'aide d'un dispositif de test de consommation (Sanane *et al.*, 2020) la variabilité de l'appétence des larves de pyrales pour des disques foliaires de maïs au sein d'un panel de 18 lignées choisies pour représenter la diversité génétique des variétés cultivées en Europe et en Amérique du Nord (Bouchet *et al.*, 2013), mais aussi pour leur variabilité concernant la résistance à la pyrale (Anglade *et al.*, 1998 ; Willmot *et al.*, 2004), et la digestibilité des parois (El Hage *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2019). Nous avons confronté les résultats des tests de consommation à des données physiologiques, métaboliques et enzymatiques obtenues sur une partie du panel dans une étude précédente (Cañas *et al.*, 2017).

A la suite de cette évaluation, nous montrons qu'il existe une variabilité génétique au sein du panel pour l'appétence des larves de pyrales pour les feuilles de maïs, qui peut être corrélée à des différences liées au métabolisme. Nos résultats laissent entrevoir des marges de progrès génétique concernant la résistance des variétés de maïs à la pyrale.

4.2 Matériel et Méthode

4.4.1 Matériel animal

La population de pyrale de maïs (*Ostrinia nubilalis*) utilisée pendant notre thèse provient des œufs de l'élevage de Bioline AgroSciences (France). Les œufs sont gardés dans une étuve jusqu'à l'émergence des larves à $26\pm 1^\circ\text{C}$, avec une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit et 70% d'humidité. Dès l'émergence, les larves sont nourries avec un milieu artificiel (composition 1,32l d'eau, 27g d'agar, 224g de farine de maïs, 60g de levure de bière, 56g de germe de blé, 12g d'acide ascorbique, 4 g de mélange vitaminé (Réf.0155200), 0,8g d'Auréomycine/Tétracycline, 2g de Nipagine, 1,6g d'acide sorbique et 4 g d'acide benzoïque). Les larves âgées de 10 jours après émergence (stade L2) sont utilisées pour réaliser les tests de consommation.

4.4.2 Matériel végétal

Construction de la core-collection : Le matériel végétal utilisé comprend 18 lignées au total (Tableau1). 12 lignées sont issues d'une core-collection de 19 lignées de maïs représentant la diversité génétique de variétés cultivées en Amérique du Nord et en Europe (Camus-Kulandaivelu *et al.*, 2006 ; Bouchet *et al.*, 2013). Ces lignées ont été caractérisées à deux stades de développement pour leur variabilité enzymatique et en métabolites secondaires dans les feuilles ainsi que pour différents caractères physiologiques (Cañas *et al.*, 2017). Nous avons ajouté à ce panel trois lignées (F66, F271, CM484) présentant des différences pour la digestibilité des parois (El Hage *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2019), et trois lignées connues pour leur sensibilité ou leur résistance à la pyrale : Mo17 et B73 sensibles (Willmot *et al.*, 2004), F618 tolérante (Anglade *et al.*, 1998), et F918 également tolérante et dérivée de la lignée F618 (INRA, 2001). Toutes les lignées sont maintenues au Centre de Ressources Biologique INRAE de Saint-Martin de Hinx (France).

Réalisation de semis décalés : Dans le but de comparer les différentes lignées au même stade de développement, des semis décalés ont été réalisés en se basant sur les données connues de date de la floraison femelle. Nous disposons pour une partie des lignées de la date de floraison femelle mesurée en degré-jours (Bouchet *et al.*, 2013), et pour une autre partie de la date de floraison mesurée en temps thermique (nombre de jours à 20°C avant floraison) à la station expérimentale de Saint-Martin de Hinx. Les données de floraison en temps thermique étant incomplètes, nous avons réalisé une régression linéaire entre les dates de floraison mesurées en degré-jours et en temps thermique pour prédire, pour chaque lignée, la date de floraison en temps thermique. Nous avons constitué quatre groupes de précocité (*GRP*, Tableau 1) sur la base des prédictions de la date de floraison en temps thermique (*flopred*, Tableau 1).

Tableau 1. Caractéristiques des lignées du core-panel et dates de semis. Les lignées ont été ordonnées en fonction de leur précocité de floraison de la plus tardive à la plus précoce d'après le temps thermique prédit. **FFLW** : date de floraison femelle en degré-jours (Bouchet *et al.*, 2013). **floF_SMH** : date de floraison femelle en temps thermique (C. Bauland, comm. pers.). **flopred** : date de floraison prédite en temps thermique. **LFNB**= nombre de total de feuilles. **GRP** = groupe de semis. **dec** = nombre de jours de décalage de semis réalisés pour chaque groupe de semis. Dans les colonnes « Date de semis », une case de couleur indique les jours de semis du mois d'octobre de la lignée correspondante. Chaque couleur correspond à un réplicat.

Lignée	Description	Groupe génétique	FFLW	floF_SMH	LFNB	flopred	GRP	dec	Date de Semis (Octobre)								
									1	4	7	11	14	18	21	25	
F64	PI-186.223 (Argentine)	European flint	218	79	19	79	A	0									
SA24U	Pop-corn (South American)	Corn belt dent	220	NA	20	77,3	A	0									
HP301	Pop-corn (Super Gold)	European flint	218	NA	20	75,91	A	0									
F918	F618 ² tolérant pyrale1 x F630 ² tolérant pyrale 2 - 137.4.2.4.5	Stiff Stalk	NA	75	20	75	A	0									
B73	BSSC5	Stiff Stalk	217	74	21	74	A	0									
L032	Isola Basso	European flint	215	74	17	74	A	0									
Mo17	CII87-2 x C103	Corn belt dent	217	73	17	73	B	3									
MBS847	Pioneer 3901	Corn belt dent	210	71	18	71	B	3									
L03	Nostrano dell'Isola(PPS686, Cécile Rebourg PhD)	European flint	209	71	17	71	B	3									
F618	Lignée tolérante à la pyrale	Stiff Stalk	NA	70	18	70	B	3									
NYS302	Black Mexican	Northern flint	207	66	15	66	C	6									
C105	Purple Flour x Early Yellow Dent	Northern flint	204	66	18	66	C	6									
Fv252	F186xCo125-8.2.3.3.4	Corn belt dent	199	63	16	63	D	10									
F271	CO125xW103 (19.3x8.5)-4.4.1.1.1.1	Corn belt dent	198	NA	15	62,02	D	10									
Cm484	(Canada-Morden-1989) 200 - 2 - 1	NA	NA	62	NA	62	D	10									
Fv2	Lacaune 2.9.1.1.3 (PPS 15, PHD CR)	European flint	196	61	14	61	D	10									
F66	Sost-15.8 (PPS 11, PHD CR)	European flint	NA	61	NA	61	D	10									
ND36	Manitoba Yellow Flint	Northern flint	194	NA	13	59,25	D	10									

En utilisant la date moyenne de floraison prédite dans chaque groupe, nous avons déterminé le nombre de jours de décalage de semis à réaliser pour chaque groupe (*dec*, Tableau 1). L'objectif était de pouvoir évaluer l'ensemble des 18 lignées au même stade de développement. Au total, nous avons réalisé pour chaque lignée, trois semis de trois graines, à une semaine d'intervalle, de façon à obtenir trois réplicats. Les semis se sont échelonnés du 1^{er} au 25 octobre 2019. Les plantes ont été cultivées en serre (16h de lumière et 8h d'obscurité) à une température comprise entre 21 et 24 ° C et à 70% l'humidité. Les graines ont été pré-germées dans des plaques de semis, puis les plantules repotées au stade 3-4 feuilles dans des pots de 4 L avec du substrat Jiffy® premium. Les plantes ont été arrosées à raison de deux fois par semaine dans un tablar permettant de maintenir une certaine quantité d'eau. Pour chaque réplicat, les pots des trois plantes d'un même génotype sont disposés de façon randomisée sur un tablar contenant les 3 plantes de chacune des 18 lignées (photo 1).



Photo1 : Un réplicat est constitué de trois plantes de chacune des 18 lignées disposées sur un même tablar et semées de façon décalée. On peut constater qu'à la date de la photo (entre 4 et 5 feuilles ligulées), toutes les plantes sont à peu près au même stade de développement. (Photo Inoussa Sanane)

4.4.3 Obtention de données de consommation

Pour chaque réplicat, les prélèvements ont été réalisés environ au même stade de développement, lorsque l'ensemble des plantes du tablar avaient entre 5 et 7 feuilles ligulées. Le nombre moyen de feuilles ligulées des trois plantes de chaque lignée et chaque réplicat est indiqué dans le tableau 2 (nblig). Pour chaque réplicat et chaque lignée, 50 disques foliaires ont été poinçonnés sur la 6^{ème} feuille des 3 plantes, qu'elle soit ligulée ou non. Pour des raisons de capacité du dispositif de test de consommation, chaque réplicat a été réparti en trois batchs de six lignées, à raison d'un batch par jour, suivant le plan d'expérience décrit dans le Tableau 2. Chaque jour de prélèvement, les disques foliaires prélevés sont immédiatement placés dans une plaque de 50 puits (5x10) sur de l'agarose à 1% pour éviter le dessèchement des disques foliaires (Jin, 2017). Ensuite, une larve L2 est placée dans chaque puits sur chaque disque foliaire (Júnior *et al.*, 2015) suivant le dispositif de test de consommation (Sanane *et al.*, 2020). La consommation des larves dans chaque puits est enregistrée pendant 48h dans le dispositif. Puis, les piles d'images ont été analysées à l'aide de deux programmes (RoitoRoiArray et Areatrack) développés à cet effet et installés comme plugins dans le logiciel d'analyse d'images Icy (Chaumont *et al.*, 2012). Les plugins permettent de délimiter les puits et les disques foliaires de façon semi-automatique, puis de suivre dans la pile d'images les changements de nombre de pixels attribués à chaque disque foliaire. L'analyse génère des mesures en pixels par minute pour chaque disque foliaire dans un puits, qui sont exportées dans un fichier Excel, converti ensuite en fichier de format CSV pour être traité sous R.

Tableau 2. Plan d'expérience réalisé pour mesurer l'appétence des lignées de la core collection pour les larves de pyrale. Chaque réplicat correspond à trois batchs de six lignées, réalisés à un jour d'intervalle. Un batch comprend six plaques de 50 disques foliaires d'une même lignée monitorées par deux caméras, une pour les plaques a, b, c, et une autre pour les plaques d, e, f (Sanane *et al.*, 2020). La date de prélèvement au mois de novembre est indiquée dans les colonnes **Batch**. **Nblig** = nombre total de feuilles ligulées au moment des prélèvements de disques foliaires. **JAS** = date du prélèvement en nombre de jours après semis. 13-11 = 13 novembre 2020 pour la date de prélèvement.

Lignée	1 ^{er} réplicat					2 ^{ème} réplicat					3 ^{ème} réplicat				
	nblig	JAS	Batch			nblig	JAS	Batch			nblig	JAS	Batch		
			13-11	14-11	15-11			20-11	21-11	22-11			27-11	28-11	29-11
F64	5	44		d		6	45		c		6	44	D		
SA24U	6	43	e			6	44	a			7	44	A		
HP301	6	43	f			6	44	d			6	44	C		
F918	6	43	d			6	44	f			7	44	B		
B73	6	43	c			6	44	b			7	44	E		
L032	6	43	a			6	44	e			6	44	F		
M017	5	41		c		5	42		e		5	42			b
MBS847	6	41		b		6	42		a		6	41		e	
L03	5	41		e		6	42		b		5	41		d	
F618	6	41		a		6	42		f		7	41		c	
NYS302	6	38		f		6	39		d		6	41		b	
C105	7	37	b			7	38	c			7	39		f	
Fv252	5	35			d	5	36			e	6	39		a	
F271	5	35			b	5	36			d	5	36			d
Cm484	5	35			e	5	36			c	5	36			e
Fv2	5	35			c	5	36			f	5	36			a
F66	5	35			f	5	36			b	5	36			c
ND36	5	35			a	5	36			a	5	36			f

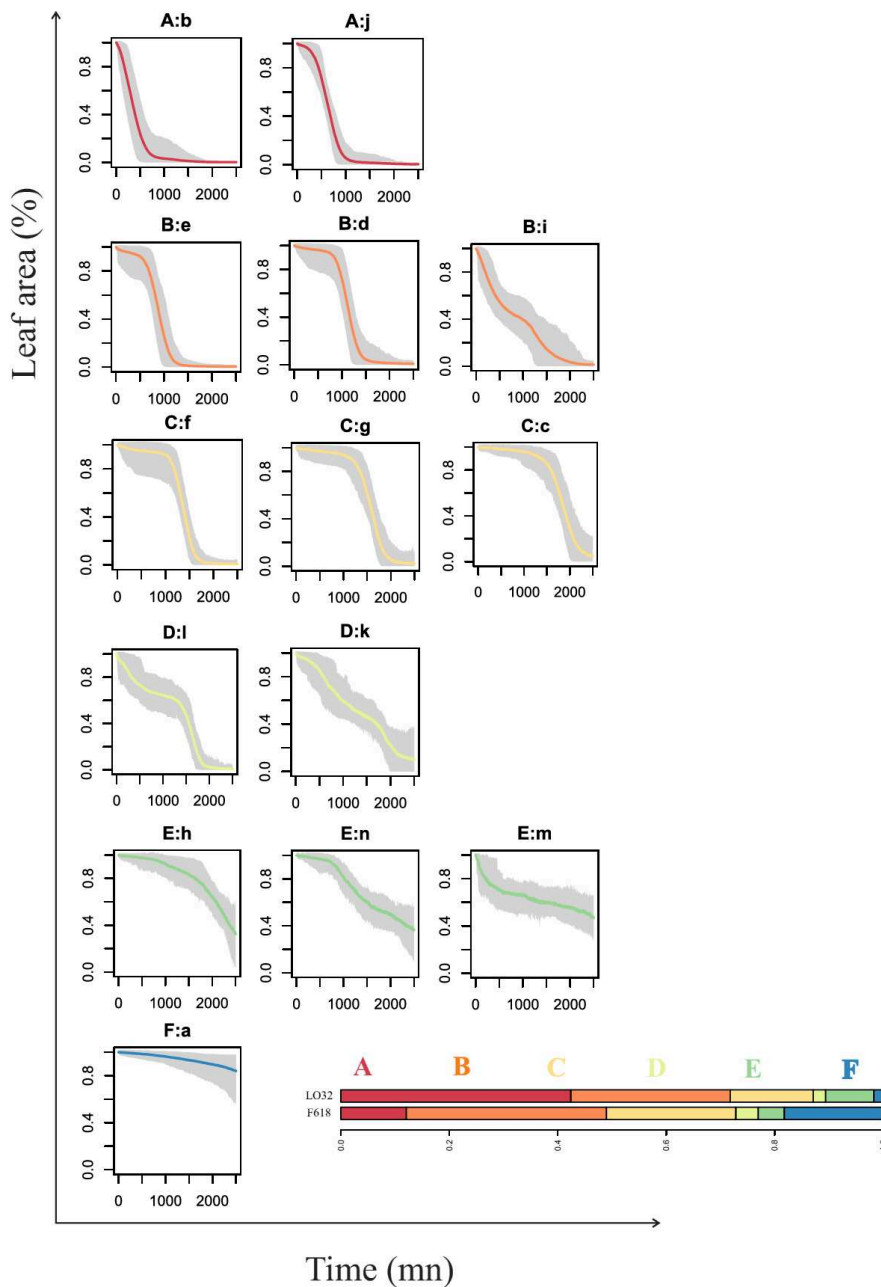


Figure 1 : Typologie de comportements alimentaires des larves. Chaque vignette représente la courbe de consommation moyenne (en gras) et son intervalle de variation (zones grisées comprenant 90% des courbes à chaque pas de temps) d'un cluster identifié par l'algorithme SOTA (lettre de « a » à « n »). Les 14 clusters SOTA sont ensuite regroupés en six types A, B, C, D, E, F, de comportements alimentaires à l'aide de l'algorithme Kmeans. Chaque type de comportement alimentaire est représenté par une couleur, et permet d'associer à chaque traitement, une proportion de comportements alimentaires de chaque type. En bas, un barplot représente les proportions de chaque type de comportement alimentaire pour les deux lignées les plus extrêmes du panel, F618 et L032.

4.4.4 Analyse de données de consommation

L'analyse des données de consommation s'effectue en deux temps (Sanane *et al.*, 2020). Dans un premier temps, un script R permet de tracer les courbes de consommation de chaque larve par puits. Pour prendre en compte l'existence d'une variabilité de comportement entre larves soumises aux mêmes conditions, les 2700 courbes de consommation correspondant aux 3 réplicats des 18 lignées sont regroupées en 14 clusters identifiés par une lettre de **a** à **n** par l'algorithme SOTA (Herrero, Valencia, & Dopazo, 2001) qui réalise une analyse non supervisée. Pour diminuer le nombre de groupes, chaque cluster est ensuite caractérisé par différentes variables comme les temps moyens T20, T50 et T80 mis par la larve pour consommer respectivement 20, 50 et 80% du disque foliaire dans chaque puits, ou sa consommation totale. Les clusters sont ensuite regroupés en 6 types de comportement alimentaire [de A à F] en utilisant l'algorithme Kmeans (Hartigan & Wong, 1979). A la suite de cette analyse préliminaire, on peut attribuer à chaque courbe de consommation, correspondant à un puits d'une plaque, un type de comportement alimentaire, et estimer la proportion de chaque type de comportement alimentaire pour chaque réplicat et/ou chaque lignée (Fig 1).

Dans un second temps, nous avons utilisé un modèle de régression multinomiale pour identifier les sources de variation et comparer les lignées. Soit Y_{ijlm} dans $\{A, B, C, D, E, F\}$ le type de comportement alimentaire mesuré dans le puits correspondant à un disque foliaire prélevé sur la lignée i , pour le réplicat j , mesuré dans le puits m de la plaque l . On appelle $P_{ijlm}^k = P(Y_{ijlm} = k)$ la probabilité que le comportement alimentaire de la larve soit de type k . Un modèle de régression logistique multinomiale a été utilisé pour tester 2 à 2 les différences entre les lignées. Le modèle utilise la fonction logit :

$$\ln\left(\frac{P_{ij}^k}{P_{ij}^K}\right) \quad (1)$$

pour comparer les probabilités relatives de chaque type de comportement alimentaire. Ici, l'indice k représente la catégorie [A à F] et K est la catégorie de référence choisie. Chaque probabilité relative est décomposée selon un modèle linéaire qui prend en compte les effets de la lignée, du réplicat, et l'interaction entre lignées et réplicats. Différents modèles ont été comparés en utilisant le critère AIC. Le meilleur modèle, retenu par le critère AIC est le modèle sans interactions :

$$\ln\left(\frac{P(Y_{ij}=k)}{P(Y_{ij}=K)}\right) = \mu^k + \alpha_i^k + \beta_j^k \quad (2)$$

où μ est la moyenne, α l'effet de la lignée, et β , l'effet du réplicat. Un test de Wald a été utilisé pour les comparaisons de moyennes entre les lignées. Ensuite, les proportions des différentes catégories ont été estimées pour chaque lignée de maïs.

4.4.5 Corrélations avec le métabolisme des plantes

Douze des lignées de notre panel étaient caractérisées à deux stades de développement pour différentes variables physiologiques, enzymatiques, et métaboliques : au stade végétatif (V), à l'apparition de la sixième feuille, et 15 jours après floraison femelle (15DAS) (Cañas *et al.*, 2017). On notera que le stade de prélèvement utilisé dans notre étude est proche, mais ultérieur au stade V choisi par Cañas *et al.* (2017). En effet, le stade « 6ème feuille ligulée » choisi dans notre étude est bien antérieur à la floraison, mais correspond à l'apparition de la 8^{ème} ou 9^{ème} feuille. Nous avons néanmoins utilisé ces données liées au métabolisme pour étudier leur corrélation avec les proportions estimées de chaque type de comportement alimentaire. Le jeu de données comprenait l'activité enzymatique (V_{max}) de 29 enzymes du métabolisme carboné central et la concentration relative de 155 métabolites aux deux stades de développement (V et 15DAS). Il comprenait également la mesure de variables physiologiques : le rendement, le nombre de grains par épi, et le poids de 1000 grains à maturité, ainsi que le taux de matière sèche, le ratio C/N, la teneur en carbone, azote et nitrates durant la phase végétative (V) et au remplissage des grains (15DAS). Au total, 399 variables ont été mesurées, dont 242 présentaient un écart-type non-nul entre lignées. Parmi ces 242 variables, nous avons recherché celles qui présentaient une corrélation significative avec un type de comportement alimentaire, ou avec la date de floraison au seuil 5%.

4.3 Résultats

Nous avons évalué, à l'aide d'un dispositif de test de consommation (Sanane *et al.*, 2020) l'appétence des larves de pyrale *Ostrinia nubilalis* Hbn sur un core-panel de 18 lignées de maïs représentant la diversité génétique des variétés de maïs cultivés en Amérique du Nord et en Europe, et couvrant une large gamme de précocité de floraison (Tableau 1). A partir des courbes individuelles de consommation des disques foliaires mesurées pour chaque lignée, nous avons classé les comportements alimentaires des larves de pyrale en six classes au moyen d'une méthode de clustering non-supervisé (SOTA) aboutissant à 14 clusters, puis en agrégeant les groupes formés par la méthode des Kmeans, sur la base de statistiques résumées. Les 14 clusters de types de courbes sont présentés sur la Figure 1, de même que les six groupes de comportements alimentaires. Le type A correspond à une consommation immédiate et complète du disque foliaire avant 24h. Le type B correspond à une consommation moins rapide et souvent incomplète. Le type C correspond aux situations où les larves attendent avant de commencer à consommer. Les type D à E sont des comportements alimentaires intermédiaires et correspondent aux situations où les larves attendent avant de commencer à consommer lentement et terminent rarement le disque foliaire. Enfin, le type F correspond à la quasi-absence de consommation. Ainsi, malgré la variabilité inter-individuelle importante de comportement des pyrales, nous avons pu comparer les lignées entre elles.

4.3.1 Les larves de pyrales ont des préférences pour certaines lignées

Les proportions estimées de chaque type de comportement alimentaire pour chaque lignée sont représentées sur la figure 2, sur laquelle les lignées sont ordonnées selon leur proportion de comportements de type A. La proportion de comportement de type A (consommation rapide et immédiate par les larves) diminue de manière significative entre la lignée LO32 (42%), et la lignée F618 (12%) tolérante à la pyrale. A l'inverse, la proportion de comportements de type F (absence de consommation) augmente significativement entre la lignée L032 (2%) et la lignée F618 (18%). On notera que la lignée F918, avec 29% de comportements de type A et 9% de comportements de type F semble être plus appétente que la lignée F618 dont elle est issue par croisement. Pour les comportements intermédiaires (B, C, D, E), les classements des lignées sont différents, avec par exemple une proportion importante de comportements de type B pour les lignées ND36 et FV2, et une très faible proportion de comportements de type D pour les lignées B73 et C105. Les différences de moyennes deux à deux et leur significativité sont données sur l'échelle logit dans le tableau S1 pour le type A, et dans le tableau S2 pour le type F. Concernant le type A, les différences de moyennes sont significatives entre L032 et les lignées les moins appétentes, à partir de la lignée

F918, excepté ND36 et FV2 (Tableau S1). On trouve aussi des différences significatives entre B73 et les lignées LO3, NYS302, Cm848 et F618, qui se situent en fin de classement, et aussi entre les lignées SA24U et Cm848. Pour le type F, les différences de moyennes sont significatives entre les lignées B73 et LO32, et entre la lignée B73 et les lignées FV2, F618, NYS302, ND36, F66, FV252 et MO17, avec un excès de comportements de type F pour LO32 et B73. Pour les types de consommation intermédiaires D, on observe une différence significative uniquement entre les lignées B73 et F271 pour le type D ($p\text{-value} = 0,0338 < 0,05$). Il n'y a pas de différence significative entre les lignées pour la proportion de larves avec un comportement alimentaire de type B, C, ou E.

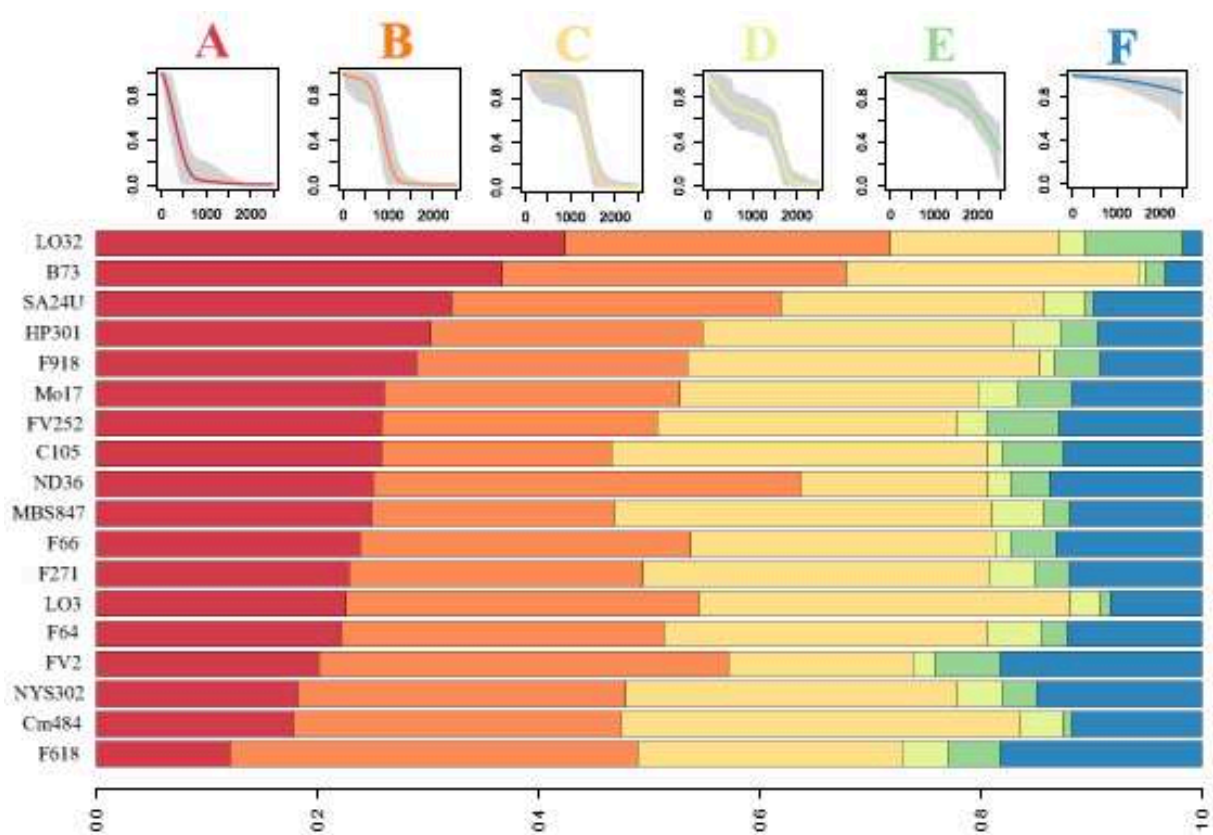


Figure 2 : Répartition des proportions de chaque type de comportement alimentaire pour les différentes lignées du panel. Pour chaque lignée, les proportions estimées de chaque type de comportement alimentaire [A-F] sont représentées sur le barplot. Les lignées sont ordonnées selon leur proportion alimentaire de type A. Les vignettes du haut montrent des courbes de consommation caractéristiques de chaque type. Chaque type de consommation est associé à une couleur.

Au total, les 18 lignées du panel présentent globalement des différences génétiques pour leur appétence pour les larves de pyrales. Elles se différencient essentiellement par la fréquence des comportements de types A et F, qui sont très négativement corrélés ($r = -0,87$, $p\text{-value}=0,005$, Fig 3) : les lignées pour lesquelles la proportion des larves consommant rapidement et entièrement le disque foliaire (type A) est élevée montrent aussi une faible proportion de larves qui refusent de s'alimenter (type F), et inversement. Sur la base de ces deux types de comportement et de l'examen de la figure 3, on peut classifier les lignées en 3 groupes d'appétences : a) les lignées les moins appétentes : F618, FV2 et NYS302, b) les lignées les plus appétentes : LO32 et B73, c) celles montrant une appétence intermédiaire.

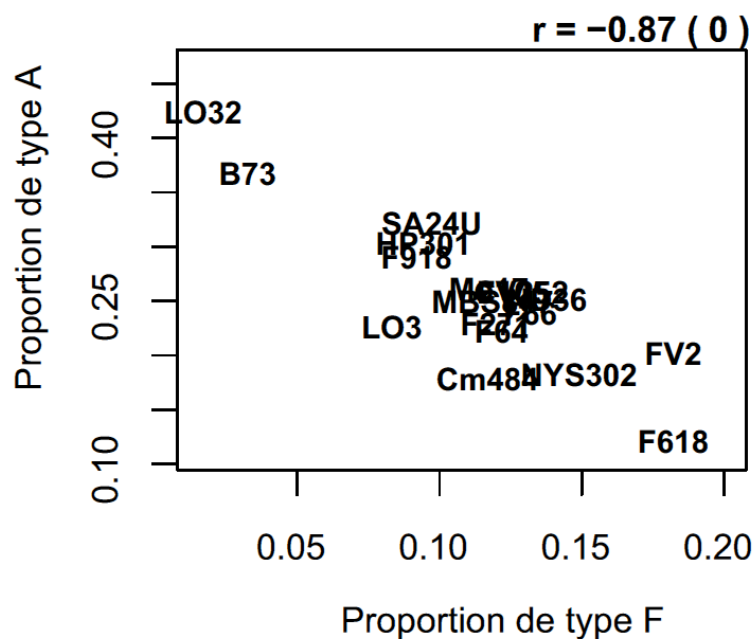


Figure 3 : Corrélation entre les types A et F. Les lignées sont représentées par les différentes couleurs. Le pourcentage type A est représenté par l'axe des abscisses et celui du type F sur l'axe des ordonnées. R représente le coefficient entre les deux types A et F. La parenthèse () : la significativité de la corrélation. Les lignées situées vers le haut de l'axe des ordonnées sont les moins appétentes et celles situées à proximité des abscisses les plus appétentes.

4.3.2 L'appétence des larves est faiblement corrélée avec la précocité de floraison

Les fréquences des types de comportements alimentaires A et F sont faiblement corrélées avec la précocité de floraison des lignées (Fig4 b & c). Cette corrélation avec la précocité de floraison est positive mais non significative pour le type A ($r = 0,46$, ns) et légèrement significative entre la fréquence des types F ($r = -0,52$, $p\text{-value} = 0,03$).

Ainsi, les lignées les plus précoces (floraison < 70 jours après semis en temps thermique) sont plutôt moins appétentes, avec une faible proportion de comportements de type A ($\approx 20\%$), et une proportion élevée de comportements de type F ($\approx 15\%$). Par contre, parmi les lignées plus tardives (floraison > 70 jours après semis en temps thermique), on observe des différences plus marquées pour les proportions de comportements de type A et F. On retrouve en effet dans ce groupe à la fois les lignées les plus appétentes, comme LO32 et B73, et la lignée la moins appétente F618, mais aussi des lignées intermédiaires comme F64 et Mo17.

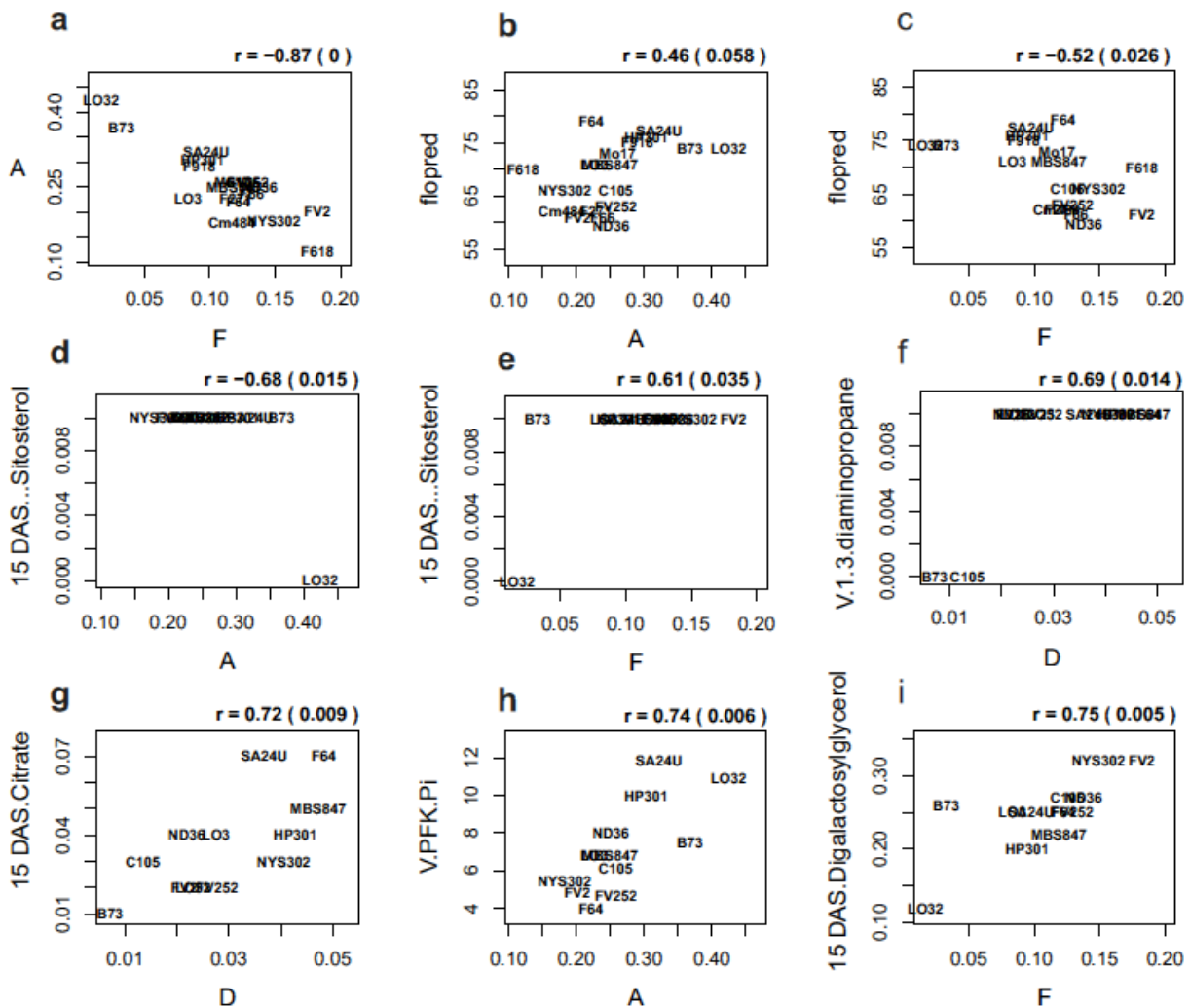


Figure 4 : Exemples de corrélations entre les proportions de types de consommation A, D ou F et différents caractères métaboliques, enzymatiques, et physiologiques. Chaque vignette représente la corrélation entre deux caractères sous la forme d'un nuage de points. Chaque point relie les valeurs moyennes des deux caractères pour une lignée. Les lignées sont identifiées par leur noms et un code de couleur représentant le groupe génétique. Pour chaque paire de caractères, la valeur du coefficient de corrélation (r) est indiquée, ainsi que la p-value (entre parenthèses).

4.3.3 Les différences d'appétence peuvent être reliées aux caractéristiques biochimiques des lignées

Pour finir, nous avons analysé la corrélation entre les variables étudiées par Cañas *et al.* (2017) et les proportions des différents types de comportements alimentaires des larves d'*O. nubilalis*. Quinze variables parmi les 242 présentent une corrélation significative au seuil 2% avec la proportion d'un type de comportement alimentaire : A, F ou D (Tableau 3). Parmi ces quinze variables, une seule est également corrélée à la précocité de floraison : l'activité de l'enzyme alanine-aminotransférase au stade végétatif, mais deux autres sont corrélées à la précocité de floraison aux seuils de 3% (activité de la malate déshydrogénase) et 6% (activité de l'enzyme malique). Plusieurs types de corrélations sont observés, et sont illustrés sur la figure 4. On trouve des corrélations significatives du fait de valeurs extrêmes prises par une ou deux lignées. C'est le cas pour la concentration en sitostérol après floraison, qui est non détectable pour la lignée LO32 et associée à la forte appétence (proportion élevée de type A et faible de type F) de cette lignée. C'est aussi le cas pour la concentration en diaminopropane, qui est nulle chez les lignées B73 et C105 et associée à une faible proportion de comportements de type D. Toutes les autres corrélations sont de type linéaire, avec toutes les réserves à apporter du fait de la faible taille de l'échantillon. Trois exemples sont représentés sur la figure 4 : la corrélation positive entre la fréquence des comportements de type D et la concentration en citrate après floraison, la corrélation positive entre l'activité de la phosphofructokinase au stade végétatif et la proportion de comportements de type A, la corrélation positive entre la concentration en digalactosylglycérol après floraison et la fréquence des comportements de type F. Si l'on considère les métabolites, on observe que les métabolites corrélés avec la fréquence de comportements de type D sont plutôt associés au métabolisme des acides aminés (Tableau 3). Les métabolites corrélés avec les fréquences des comportements de type A et F font partie du métabolisme secondaire : le tocophérol est un antioxydant, le digalactosylglycérol est un intermédiaire du métabolisme des lipides, et la caffeoylquinone est un phénylpropanoïde. Concernant l'activité des enzymes, on peut noter que l'activité de la phosphofructokinase au stade végétatif est corrélée positivement à la fréquence des comportements de type A, et négativement à la fréquence des comportements de type F, indépendamment de la date de floraison des lignées.

Tableau 3 : Corrélations entre les variables métaboliques et les variables de consommation.

Pour chacune des 15 variables du jeu de données de Cañas *et al.* (2017) sont indiquées les corrélations avec la proportion des types de consommation A, F et D, ainsi qu'avec la date de floraison femelle des lignée (flopred). Les métabolites sont en caractère normal, et les activités d'enzymes en italique. Les stades de prélèvement des plantes pour les caractères métaboliques sont le stade végétatif (V) ou 15 jours après floraison femelle (15DAS). La fonction métabolique est indiquée dans la colonne **Fonction**. Les cellules grisées correspondent à des corrélations significatives au seuil de 5%.

Name	Fonction	Corrélation			
		A	F	D	flopred
15DAS_Sitosterol	sterol, kernel development	-0,68	0,61	0,16	-0,2
15DAS_Tocopherol	vitamine E, antioxydant	-0,73	0,68	-0,15	-0,58
15DAS_Digalactosylglycerol	lipids, fatty acids	-0,77	0,75	-0,11	-0,52
<i>15DAS_NADH.ME : Malic Enzyme</i>	C4 photosynthesis	-0,74	0,61	0	-0,55
15DAS_Aspartate	Amino-acid	-0,32	0,14	0,72	0,32
15DAS_Caffeate	lignin biosynthesis	-0,3	0,07	0,66	0,6
15DAS_Citrate	Acetyl-CoA and flavonoids biosynthesis	-0,23	0,18	0,72	0,49
<i>15DAS_NADPH.MDH : Malate deshydrogenase</i>	C4 photosynthesis	-0,61	0,7	-0,1	-0,61
15DAS_Unk.3193.5.333		0,7	-0,65	-0,26	0,44
V_5. Caffeoylquininate. trans :	Caffeoylglucarate biosynthesis (phenylpropanoids comme ac. Ferulique)	0,68	-0,61	-0,16	0,2
<i>V_PFK.Pi : phosphofructokinase</i>	Glycolyse	0,74	-0,6	-0,02	0,42
<i>V_AlaAT : Alanine-aminotransferase</i>	N	0,68	-0,8	-0,27	0,65
<i>V_NADH.GDH : glutamate deshydrogenase</i>	N	0,14	0	-0,69	-0,42
V_Phosphate	Cofactor	-0,48	0,3	0,68	0,25
V_1.3.diaminopropane	Amino-acids biosynthesis	-0,27	0,28	0,69	-0,01

4.4 Discussion

Dans notre étude, nous avons utilisé un nouveau dispositif de test de consommation (Sanane *et al.*, 2020) sur disques foliaires pour évaluer l'appétence des larves de *Ostrinia nubilalis* Hbn au sein d'un core-panel de 18 lignées tempérées de maïs. La plupart des tests de consommation classiques caractérisent la courbe de consommation d'un disque foliaire par une larve par un paramètre instantané comme le temps mis par la larve pour consommer 50% du disque foliaire (Menezes Jr. *et al.*, 2005 ; Shields *et al.*, 2008 ; Clark *et al.*, 2014) restent peu puissants, du fait de la variabilité du comportement individuel des larves (Bentur & Kalode, 1990), mais aussi parce que les larves d'insectes n'ont pas toujours un comportement linéaire au cours du temps (Ji *et al.*, 2017). Notre dispositif à haut débit (chaque répétition pour une lignée est caractérisée par 50 courbes de consommations différentes), allié à une méthode originale de classification des courbes de consommation, nous permet d'identifier six grands types de comportements alimentaires des larves, nommés par des lettres de A à F, et allant de la consommation immédiate et rapide de l'ensemble du disque foliaire (type A), à l'absence de consommation (type F). Il nous permet également de caractériser chaque lignée par une proportion de chaque type de comportement.

On observe, au sein du panel de lignées de maïs, une variabilité importante pour le comportement alimentaire des larves. Notre étude confirme ainsi l'existence de variabilité génétique au sein des lignées de maïs pour un caractère possiblement lié à la tolérance contre les insectes ravageurs du maïs. Par exemple, Badji *et al.* (2020) ont identifié, en utilisant une approche de génétique d'association à l'échelle du génome dans une population de plus de 350 lignées de maïs, des QTLs impliqués dans la variabilité de résistance au lépidoptère *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera : Noctuidae) et au coléoptère *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera/ Curculionidae).

Les lignées de notre panel se différencient particulièrement par la fréquence de deux types de comportement : le type A (consommation rapide et totale du disque foliaire), et le type F, (absence de consommation). Les fréquences respectives de ces deux types de comportements permettent de mesurer l'appétence des larves de pyrale pour une lignée. Une lignée est considérée comme appétente si elle présente une proportion élevée de comportements de type A, et une faible proportion de comportements de type F. Cette mesure qualitative de l'appétence peut refléter en partie la sensibilité des lignées aux attaques de larves de pyrale. Ainsi, la lignée F618, réputée tolérante à la pyrale (Anglade *et al.*, 1998), est la lignée la moins appétente du panel, tandis que la lignée B73, réputée sensible (Willmot *et al.*, 2004) fait partie des lignées les plus appétentes. Nous trouvons aussi un classement relatif de trois lignées B73 (37% de type A et 3% de types F),

HP301 (30% de types A et 9% de types F) et Mo17 (26% de types A et 12% de types F) comparable à celui obtenu en mesurant la vitesse de croissance de larves de *S. frugiperda* Smith sur des disques foliaires de ces trois lignées.

De même, nous ne trouvons pas de corrélation très nette entre la date de floraison des lignées et l'appétence des larves. Pour éviter la confusion entre des effets génétiques et des effets de la phénologie, nous avons comparé les lignées au même stade de développement. On observe que les lignées génétiquement les plus précoces font partie des lignées les moins appétentes, et qu'il existe une diversité plus importante au sein des lignées génétiquement tardives. Ces différences peuvent être dues à des pertes ou gains aléatoires de fonctions, liées à l'histoire démographique des lignées du panel, ou alors à un effet d'adaptation locale entre la phénologie des plantes et celle des insectes. On pourrait imaginer par exemple que dans des environnements favorables à la culture de lignées précoces de maïs, les insectes aient adapté leur phénologie en attaquant les plantes plus précocement, les conduisant ainsi à mobiliser des ressources pour leur défense à un stade de développement plus précoce. Pour aller plus loin, il eût été intéressant de réaliser les tests de consommations à différents stades de développement des plantes. Dans une autre étude (Chap 3), nous avons montré que le comportement des larves pouvait changer selon le rang foliaire des feuilles de maïs. Ici, l'étude a été réalisée sur des plantes relativement jeunes (stade 6 feuilles ligulées), ce qui explique peut-être la prédominance des comportements alimentaires des larves de type A et B. Une étude à des stades plus tardifs et sur des feuilles de rang foliaire plus élevé aurait peut-être été plus discriminante.

Indépendamment de la précocité de floraison, notre étude nous a permis de relier des variations du comportement alimentaire des larves de pyrale à des variations du métabolisme des plantes. Nous avons identifié un petit nombre de métabolites ou d'activités d'enzymes corrélés négativement (sitostérol, tocophérol, digalactosylglycérol, trans-caffeoylquinone, enzyme malique) ou positivement (Unk.3193.5.333, malate déshydrogénase, phosphofructokinase, alanine-aminotransférase) à l'appétence des larves. Il est cependant difficile d'établir, dans notre étude, des relations causales. D'une part, les caractéristiques métaboliques et les tests de consommation n'ont pas été mesurés aux mêmes stades de développement des plantes. D'autre part, l'analyse corrélative réalisée dans le cadre de cette étude ne permet pas d'établir de liens de causalité. Tout au plus permet-elle de suggérer des candidats pour des études fonctionnelles. Il aurait été intéressant de disposer dans notre étude de la concentration de métabolites connus comme impliqués dans la résistance du maïs contre *O. nubilalis*, comme le 2,4-dihydroxy-7-méthoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) (Wouters *et al.*, 2016), ou de l'activité d'enzymes comme le 2-oxoglutarate, qui serait impliquée dans la voie de synthèse du DIMBOA (Frey *et al.*, 2003), ou

l'oxalate oxydase qui régule la voie de synthèse du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et réduit la consommation des larves de *O. nubilalis* sur les feuilles de maïs (Ramputh *et al.*, 2002). Ces métabolites/enzymes auraient permis de valider notre approche.

En conclusion, le dispositif de test de consommation utilisé ici nous a permis de mettre en évidence l'existence d'une variabilité pour l'appétence des larves de pyrales au sein d'un core-panel de lignées de maïs. Nos résultats semblent être en accord avec les données existantes sur la tolérance et la susceptibilité de certaines lignées et suggèrent que cette méthode pourrait être utilisée pour identifier des lignées tolérantes contre la pyrale du maïs. Nos résultats montrent aussi que les différences d'appétence entre lignées peuvent être reliées avec leurs caractéristiques métaboliques. Nous proposons ici quelques voies métaboliques candidates dont le lien avec la tolérance à la pyrale pourrait être exploré par des études fonctionnelles chez le maïs.

4.5 Bibliographie

- ANGLADE, P., BOYAT, A., GOUESNARD, B., VIBLE, J.C. & DUPIN, B. (1998) Assessment of 10 years of maize pedigree breeding for European corn borer tolerance and high-yielding combining ability. *Agronomie* **18**, 299–308.
- BADJI, A., KWEMOI, D.B., MACHIDA, L., OKII, D., MWILA, N., AGBAHOUNGBA, S., KUMI, F., IBANDA, A., BARARYENYA, A., SOLEMANEGY, M., ODONG, T., WASSW, P., OTIM, M., ASEA, G., OCHWO-SSEMAKULA, M., ET AL. (2020) Genetic Basis of Maize Resistance to Multiple-Insect Pests : Integrated Genome-Wide Comparative Mapping and Candidate Gene Prioritization. Preprints.
- BARROS-RIOS, J., MALVAR, R.A., JUNG, H.-J.G. & SANTIAGO, R. (2011) Cell wall composition as a maize defense mechanism against corn borers. *Phytochemistry* **72**, 365–371.
- BENTUR, J.S. & KALODE, M.B. (1990) A feeding test to identify rice varieties resistant to the leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee). *Proceedings : Animal Sciences* **99**, 483–491.
- BERES, P.K. (2012) Damage caused by *Ostrinia nubilalis* Hbn. to fodder maize (*Zea mays* L.), sweet maize (*Zea mays* Var. *saccharata* [Sturtev.] I.H. Bailey) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) near Rzeszow (south-eastern Poland) in 2008-2010. *Acta Scientiarum Polonorum. Agricultura* **11**. -.
- BERGVINSON, D. (1993) Role of phenolic acids in maize resistance to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Huebner). Thesis, University of Ottawa (Canada).
- BOHN, M., KREPS, R.C., KLEIN, D. & MELCHINGER, A.E. (1999) Damage and Grain Yield Losses Caused by European Corn Borer (Lepidoptera : Pyralidae) in Early Maturing European Maize Hybrids. *Journal of Economic Entomology* **92**, 723–731. Oxford Academic.
- BOUCHET, S., SERVIN, B., BERTIN, P., MADUR, D., COMBES, V., DUMAS, F., BRUNEL, D., LABORDE, J., CHARCOSSET, A. & NICOLAS, S. (2013) Adaptation of Maize to Temperate Climates : Mid-Density Genome-Wide Association Genetics and Diversity Patterns Reveal Key Genomic Regions, with a Major Contribution of the Vgt2 (ZCN8) Locus. *PLOS ONE* **8**, e71377. Public Library of Science.

- BROWN, A. (1989) Core collections : A practical approach to genetic resource management. *Genome* **31**, 818–824.
- CAMBIER, V., HANCE, T. & DE HOFFMANN, E. (2000) Variation of DIMBOA and related compounds content in relation to the age and plant organ in maize. *Phytochemistry* **53**, 223–229.
- CAMUS-KULANDAIVELU, L., VEYRIERAS, J.-B., MADUR, D., COMBES, V., FOURMANN, M., BARRAUD, S., DUBREUIL, P., GOUESNARD, B., MANICACCI, D. & CHARCOSSET, A. (2006) Maize adaptation to temperate climate : relationship between population structure and polymorphism in the Dwarf8 gene. *Genetics* **172**, 2449–2463.
- CAÑAS, R.A., YESBERGENOVA-CUNY, Z., SIMONS, M., CHARDON, F., ARMENGAUD, P., QUILLERE, I., CUKIER, C., GIBON, Y., LIMAMI, A.M., NICOLAS, S., BRULE, L., LEA, P.J., MARANAS, C.D. & HIREL, B. (2017) Exploiting the Genetic Diversity of Maize Using a Combined Metabolomic, Enzyme Activity Profiling, and Metabolic Modeling Approach to Link Leaf Physiology to Kernel Yield. *The Plant Cell* **29**, 919–943.
- CHAUMONT, F. DE, DALLONGEVILLE, S., CHENOUEAU, N., HERVE, N., POP, S., PROVOOST, T., MEAS-YEDID, V., PANKAJAKSHAN, P., LECOMTE, T., MONTAGNER, Y.L., LAGACHE, T., DUFOUR, A. & OLIVO-MARIN, J.-C. (2012) Icy : an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods* **9**, 690–696.
- CLARK, E.L., ISITT, R., PLETTNER, E., FIELDS, P.G. & HUBER, D.P.W. (2014) An Inexpensive Feeding Bioassay Technique for Stored-Product Insects. *Journal of Economic Entomology* **107**, 455–461.
- DEGEN, T., DILLMANN, C., MARION-POLL, F. & TURLINGS, T.C.J. (2004) High Genetic Variability of Herbivore-Induced Volatile Emission within a Broad Range of Maize Inbred Lines. *Plant Physiology* **135**, 1928–1938.
- DIWAN, N., MCINTOSH, M.S. & BAUCHAN, G.R. (1995) Methods of developing a core collection of annual Medicago species. *Theoretical and Applied Genetics* **90**, 755–761.
- EL HAGE, F., LEGLAND, D., BORREGA, N., JACQUEMOT, M.-P., GRIVEAU, Y., COURSOLO, S., MECHIN, V. & REYMOND, M. (2018) Tissue Lignification, Cell Wall p-Coumaroylation and Degradability of Maize Stems Depend on Water Status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**, 4800–4808.
- FATIMA, M., ABBAS, S., AHMAD, Z., SHARIF, Y., UMAIR, M., BAHADAR, K. & ZAYNAB, M. (2018) Plants Defense System Resist against the Pathogen Attack : Transcription Factors in Focus.
- FREY, M., HUBER, K., PARK, W.J., SICKER, D., LINDBERG, P., MEELEY, R.B., SIMMONS, C.R., YALPANI, N. & GIERL, A. (2003) A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase is integrated in DIMBOA-biosynthesis. *Phytochemistry* **62**, 371–376.
- HARTIGAN, J.A. & WONG, M.A. (1979) Algorithm AS 136 : A K-Means Clustering Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* **28**, 100–108.
- HERRERO, J., VALENCIA, A. & DOPAZO, J. (2001) A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* **17**, 126–136.
- INRA (2001) Fiche technique F918. Catalogue des lignées de maïs INRA, fichier Lignées INRA 2001. MONTPELLIER et SAINT MARTIN DE HINX. 1 p.
- JI, C.W., PARK, C.-G., LEE, S.-W., KIM, J.-H. & CHOI, B.R. (2017) Continuous measuring of leaf area for analyzing feeding behaviour of *Spodoptera litura* (Lepidoptera : Noctuidae) larva. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **20**, 491–495.

- JIN, S. (2017) Maize defense responses to caterpillars at the molecular, phenotypic and ecological scales. PhD Thesis, Pennsylvania State University.
- JUNIOR, A.L.B., SOUZA, B.H.S.D., COSTA, E.N., RIBEIRO, Z.A. & STOUT, M.J. (2015) Facteurs influençant l'expression de l'antixénose dans le soja à *Anticarsia gemmatalis* et *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* **108**, 317–325.
- MAGRINI, F.E., SPECHT, A., GAIO, J., GIRELLI, C.P., MIGUES, I., HEINZEN, H., SALDAÑA, J., SARTORI, V.C. & CESIO, V. (2015) Antifeedant activity and effects of fruits and seeds extracts of *Cabralea canjerana canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) on the immature stages of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera : Noctuidae). *Industrial Crops and Products* **65**, 150–158.
- MALVAR, R.A., BUTRON, A., ALVAREZ, A., ORDAS, B., SOENGAS, P., REVILLA, P. & ORDAS, A. (2004) Evaluation of the European Union Maize Landrace Core Collection for Resistance to *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera : Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae). *Journal of Economic Entomology* **97**, 628–634.
- MALVAR, R.A., BUTRON, A., ALVAREZ, A., PADILLA, G., CARTEA, M.E., REVILLA, P. & ORDAS, A. (2007) Yield performance of the European Union Maize Landrace Core Collection under multiple corn borer infestations. *Crop Protection* **26**, 775–781.
- MEIHLS, L.N., KAUR, H. & JANDER, G. (2012) Natural Variation in Maize Defense against Insect Herbivores. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **77**, 269–283.
- MENEZES JR., A.O., OLIVEIRA, A., MIKAMI, A.Y., IDE, A.K. & VENTURA, M.U. (2005) Feeding preferences of *Microtheca punctigera* (Achard) (Coleoptera : Chrysomelidae) for some Brassicaceae plants in multiple-choice assays. *Scientia Agricola* **62**, 72–75.
- NINGOMBAM, A., AHLUWALIA, V., SRIVASTAVA, C. & WALIA, S. (2017) Antifeedant activity and phytochemical investigation of *Millettia pachycarpa* extracts against Tobacco Leaf Eating Caterpillar, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* **20**, 381–385.
- ODJAKOVA, M., HADJIIVANOVA, C. & TSANKOV, D. (2001) THE COMPLEXITY OF PATHOGEN DEFENSE IN PLANTS.
- RAMPUATH, A.I., ARNASON, J.T., CASS, L. & SIMMONDS, J.A. (2002) Reduced herbivory of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) on corn transformed with germin, a wheat oxalate oxidase gene. *Plant Science* **162**, 431–440.
- SANANE, I., LEGRAND, J., DILLMANN, C. & MARION-POLL, F. (2020) A semi-automated design for high-throughput Lepidoptera larvae feeding bioassays. *BioRxiv*, 2020.08.02.232256.
- SANTIAGO, R., BARROS-RIOS, J. & MALVAR, R.A. (2013) Impact of Cell Wall Composition on Maize Resistance to Pests and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 6960–6980.
- SHIELDS, V.D.C., SMITH, K.P., ARNOLD, N.S., GORDON, I.M., SHAW, T.E. & WARANCH, D. (2008) The effect of varying alkaloid concentrations on the feeding behaviour of gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera : Lymantriidae). *Arthropod-Plant Interactions* **2**, 101–107.
- TARIQ, S. & SALEEM, K. (2018) Plant Defenses vs Pathogen Weapons : A Continuation of Battlefield : A Mini-review.
- WILLMOT, D.B., HIBBARD, B.E., DARRAH, L.L., POLLAK, L.M., MONTGOMERY, K., PRATT, R.C., ABEL, C.A., HAWK, J.A., WELDEKIDAN, T. & FOSTER, J.E. (2004) Effect of Environment

on Resistance to the European Corn Borer (Lepidoptera : Crambidae) in Maize. *Journal of Economic Entomology* **97**, 1745–1751. Oxford Academic.

WOUTERS, F.C., BLANCHETTE, B., GERSHENZON, J. & VASSÃO, D.G. (2016) Plant defense and herbivore counter-defense : benzoxazinoids and insect herbivores. *Phytochemistry Reviews* **15**, 1127–1151.

ZHANG, Y., LEGLAND, D., HAGE, F.E., DEVAUX, M.-F., GUILLON, F., REYMOND, M. & MECHIN, V. (2019) Changes in cell walls lignification, feruloylation and p-coumaroylation throughout maize internode development. *PLOS ONE* **14**, e0219923. Public Library of Science.

4.6 Données supplémentaires

Tableau-S1 : Comparaisons de moyennes entre les lignées pour le type de comportement alimentaire A. Les différences de moyennes sont exprimées sur l'échelle logit par rapport au comportement alimentaire de type C, utilisé comme référence. Les couleurs de la cellule représentent le niveau de significativité par contraste pour chaque type. Gris sombre = significatif au seuil de 1%. Gris clair = significatif à 1%. Blanc = non-significatif à 1%.

	L032	B73	SA24U	HP301	F918	Mo17	C105	FV252	ND36
L032		0,6902	0,7201	0,9498	1,1184	1,0530	1,0747	1,3007	0,6287
B73	-0,6902		0,0299	0,2596	0,4282	0,3628	0,3844	0,6105	-0,0615
SA24U	-0,7201	-0,0299		0,2298	0,3983	0,3329	0,3546	0,5806	-0,0914
HP301	-0,9498	-0,2596	-0,2298		0,1686	0,1031	0,1248	0,3508	-0,3211
F918	-1,1184	-0,4282	-0,3983	-0,1686		-0,0654	-0,0438	0,1823	-0,4897
Mo17	-1,0530	-0,3628	-0,3329	-0,1031	0,0654		0,0217	0,2477	-0,4243
C105	-1,0747	-0,3844	-0,3546	-0,1248	0,0438	-0,0217		0,2260	-0,4459
FV252	-1,3007	-0,6105	-0,5806	-0,3508	-0,1823	-0,2477	-0,2260		-0,6720
ND36	-0,6287	0,0615	0,0914	0,3211	0,4897	0,4243	0,4459	0,6720	
MBS847	-1,3387	-0,6485	-0,6187	-0,3889	-0,2203	-0,2858	-0,2641	-0,0381	-0,7100
F66	-1,1660	-0,4757	-0,4459	-0,2161	-0,0475	-0,1130	-0,0913	0,1347	-0,5372
F271	-1,3348	-0,6446	-0,6147	-0,3850	-0,2164	-0,2818	-0,2602	-0,0342	-0,7061
L03	-1,4177	-0,7275	-0,6976	-0,4679	-0,2993	-0,3647	-0,3431	-0,1170	-0,7890
F64	-1,3008	-0,6106	-0,5807	-0,3509	-0,1824	-0,2478	-0,2261	-0,0001	-0,6721
FV2	-0,8323	-0,1421	-0,1122	0,1176	0,2861	0,2207	0,2424	0,4684	-0,2036
NYS302	-1,5185	-0,8283	-0,7984	-0,5687	-0,4001	-0,4655	-0,4438	-0,2178	-0,8898
Cm484	-1,7252	-1,0350	-1,0051	-0,7754	-0,6068	-0,6722	-0,6506	-0,4246	-1,0965
F618	-1,7004	-1,0102	-0,9803	-0,7505	-0,5820	-0,6474	-0,6257	-0,3997	-1,0717

Tableau-S1 suite :

	MBS847	F66	F271	L03	F64	FV2	NYS302	Cm484	F618
LO32	1,3387	1,1660	1,3348	1,4177	1,3008	0,8323	1,5185	1,7252	1,7004
B73	0,6485	0,4757	0,6446	0,7275	0,6106	0,1421	0,8283	1,0350	1,0102
SA24U	0,6187	0,4459	0,6147	0,6976	0,5807	0,1122	0,7984	1,0051	0,9803
HP301	0,3889	0,2161	0,3850	0,4679	0,3509	-0,1176	0,5687	0,7754	0,7505
F918	0,2203	0,0475	0,2164	0,2993	0,1824	-0,2861	0,4001	0,6068	0,5820
M017	0,2858	0,1130	0,2818	0,3647	0,2478	-0,2207	0,4655	0,6722	0,6474
C105	0,2641	0,0913	0,2602	0,3431	0,2261	-0,2424	0,4438	0,6506	0,6257
FV252	0,0381	-0,1347	0,0342	0,1170	0,0001	-0,4684	0,2178	0,4246	0,3997
ND36	0,7100	0,5372	0,7061	0,7890	0,6721	0,2036	0,8898	1,0965	1,0717
MBS847		-0,1728	-0,0039	0,0790	-0,0380	-0,5065	0,1797	0,3865	0,3616
F66	0,1728		0,1689	0,2518	0,1348	-0,3337	0,3525	0,5593	0,5344
F271	0,0039	-0,1689		0,0829	-0,0341	-0,5026	0,1837	0,3904	0,3655
L03	-0,0790	-0,2518	-0,0829		-0,1169	-0,5854	0,1008	0,3075	0,2827
F64	0,0380	-0,1348	0,0341	0,1169		-0,4685	0,2177	0,4245	0,3996
FV2	0,5065	0,3337	0,5026	0,5854	0,4685		0,6862	0,8930	0,8681
NYS302	-0,1797	-0,3525	-0,1837	-0,1008	-0,2177	-0,6862		0,2067	0,1819
Cm484	-0,3865	-0,5593	-0,3904	-0,3075	-0,4245	-0,8930	-0,2067		-0,0248
F618	-0,3616	-0,5344	-0,3655	-0,2827	-0,3996	-0,8681	-0,1819	0,0248	

Tableau-S2 : Comparaisons de moyennes entre les lignées pour le type de comportement alimentaire F. Les différences de moyennes sont exprimées sur l'échelle logit par rapport au comportement alimentaire de type C, utilisé comme référence. Les couleurs de la cellule représentent le niveau de significativité par contraste pour chaque type. Gris sombre = significatif au seuil de 1%. Gris clair = significatif à 1%. Blanc = non-significatif à 1%.

	FV2	F618	NYS302	ND36	F66	FV252	C105	F64	F271
FV2		0,3592	0,7883	0,2954	0,8234	0,8322	1,0913	0,9714	1,0463
F618	-0,3592		0,4291	-0,0638	0,4642	0,4730	0,7321	0,6122	0,6871
NYS302	-0,7883	-0,4291		-0,4929	0,0351	0,0439	0,3030	0,1831	0,2580
ND36	-0,2954	0,0638	0,4929		0,5280	0,5368	0,7959	0,6760	0,7509
F66	-0,8234	-0,4642	-0,0351	-0,5280		0,0088	0,2679	0,1480	0,2229
FV252	-0,8322	-0,4730	-0,0439	-0,5368	-0,0088		0,2591	0,1391	0,2141
C105	-1,0913	-0,7321	-0,3030	-0,7959	-0,2679	-0,2591		-0,1200	-0,0451
F64	-0,9714	-0,6122	-0,1831	-0,6760	-0,1480	-0,1391	0,1200		0,0749
F271	-1,0463	-0,6871	-0,2580	-0,7509	-0,2229	-0,2141	0,0451	-0,0749	
MBS847	-1,1515	-0,7923	-0,3632	-0,8561	-0,3281	-0,3193	-0,0602	-0,1801	-0,1052
M017	-0,9181	-0,5590	-0,1298	-0,6227	-0,0948	-0,0859	0,1732	0,0532	0,1281
Cm484	-1,2154	-0,8562	-0,4271	-0,9200	-0,3920	-0,3832	-0,1241	-0,2440	-0,1691
SA24U	-0,9846	-0,6255	-0,1963	-0,6892	-0,1613	-0,1524	0,1067	-0,0133	0,0616
HP301	-1,1834	-0,8242	-0,3951	-0,8880	-0,3600	-0,3512	-0,0921	-0,2120	-0,1371
F918	-1,3337	-0,9746	-0,5454	-1,0383	-0,5104	-0,5015	-0,2424	-0,3624	-0,2875
L03	-1,4844	-1,1252	-0,6961	-1,1890	-0,6610	-0,6522	-0,3930	-0,5130	-0,4381
B73	-2,1752	-1,8161	-1,3869	-1,8798	-1,3519	-1,3430	-1,0839	-1,2039	-1,1290
L032	-2,2860	-1,9269	-1,4977	-1,9906	-1,4627	-1,4538	-1,1947	-1,3147	-1,2398

Tableau-S2 suite :

	MBS847	Mo17	Cm484	SA24U	HP301	F918	LO3	B73	LO32
FV2	1,1515	0,9181	1,2154	0,9846	1,1834	1,3337	1,4844	2,1752	2,286
F618	0,7923	0,5590	0,8562	0,6255	0,8242	0,9746	1,1252	1,8161	1,9269
NYS302	0,3632	0,1298	0,4271	0,1963	0,3951	0,5454	0,6961	1,3869	1,4977
ND36	0,8561	0,6227	0,9200	0,6892	0,8880	1,0383	1,1890	1,8798	1,9906
F66	0,3281	0,0948	0,3920	0,1613	0,3600	0,5104	0,6610	1,3519	1,4627
FV252	0,3193	0,0859	0,3832	0,1524	0,3512	0,5015	0,6522	1,3430	1,4538
C105	0,0602	-0,1732	0,1241	-0,1067	0,0921	0,2424	0,3930	1,0839	1,1947
F64	0,1801	-0,0532	0,2440	0,0133	0,2120	0,3624	0,5130	1,2039	1,3147
F271	0,1052	-0,1281	0,1691	-0,0616	0,1371	0,2875	0,4381	1,1290	1,2398
MBS847		-0,2334	0,0639	-0,1669	0,0319	0,1822	0,3329	1,0237	1,1345
Mo17	0,2334		0,2973	0,0665	0,2653	0,4156	0,5662	1,2571	1,3679
Cm484	-0,0639	-0,2973		-0,2307	-0,0320	0,1184	0,2690	0,9599	1,0707
SA24U	0,1669	-0,0665	0,2307		0,1988	0,3491	0,4997	1,1906	1,3014
HP301	-0,0319	-0,2653	0,0320	-0,1988		0,1503	0,3010	0,9918	1,1026
F918	-0,1822	-0,4156	-0,1184	-0,3491	-0,1503		0,1506	0,8415	0,9523
LO3	-0,3329	-0,5662	-0,2690	-0,4997	-0,3010	-0,1506		0,6909	0,8017
B73	-1,0237	-1,2571	-0,9599	-1,1906	-0,9918	-0,8415	-0,6909		0,1108
LO32	-1,1345	-1,3679	-1,0707	-1,3014	-1,1026	-0,9523	-0,8017	-0,1108	

Discussion et perspectives

L'objectif de la thèse était d'étudier la dynamique des interactions entre le maïs et les lépidoptères foreurs de tiges. L'hypothèse centrale de notre travail est que l'adaptation à une date de floraison tardive ou précoce modifie les capacités de défense de ces plantes à l'encontre de la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* Hbn.

Nous avons tout d'abord développé un nouveau dispositif de test de consommation semi-automatique sur disque foliaire ; puis nous avons utilisé ce nouveau dispositif pour comparer des génotypes précoces et tardifs de maïs issus des expériences de sélection divergente de Saclay pour la précocité de floraison. Les résultats des tests de consommation ont aussi été comparés à des observations de dégâts de pyrale au champ à la suite d'infestations naturelles, et à des analyses biochimiques de la composition des tiges de maïs. Nos résultats renforcent l'hypothèse de l'existence d'un compromis entre croissance et défense chez le maïs. Enfin, nous avons utilisé le test de consommation pour tester la variabilité de l'appétence des larves de pyrales *Ostrinia nubilalis* au sein d'un panel de 18 lignées représentant la diversité génétique des variétés cultivées en Europe et en Amérique du Nord. Pour le test de consommation, notre hypothèse est que la mesure de la vitesse de consommation des larves permet d'évaluer l'état physiologique d'une plante, à travers l'appétence des feuilles.

Nous avons tenu à développer ce nouveau dispositif de test de consommation semi-automatisé afin d'en faire un outil en libre accès pour tout utilisateur (Sanane, Dillmann, & Marion-Poll, 2020b). Des outils d'analyse d'images (RoitoRoiArray & Areatrack) sont implémentés sous forme de plugins dans le logiciel d'analyse d'images ICY (Chaumont *et al.*, 2012). Les étapes d'analyse des données, à l'aide de scripts R, sont documentées (Sanane *et al.*, 2020a). Les différentes étapes de l'analyse sont semi-automatisées et adaptables à différents plans d'expérience. L'analyse nécessite des interventions de l'utilisateur pour vérifier la qualité des courbes de consommation individuelle, organiser les profils de consommation, et déclarer le modèle pour l'analyse statistique différentielle. Le manuel d'utilisation et les commentaires des scripts facilitent l'analyse.

Ce nouveau dispositif de test de consommation des larves a d'abord été validé avec un extrait de plante antiappétente, le NeemAzal (AMM n° 2140090 *), et une molécule généralement amère, la quinine (Sigma 295 Aldrich ; CAS number : 6119-47-7). Le NeemAzal est extrait des graines de neem (*Azadirachta indica*) ou mangousier, et contient de l'azadirachtine qui est antiappétent et un biopesticide contre beaucoup de ravageurs. La quinine est un alcaloïde connu pour son goût amer pour plusieurs organismes. Les larves de pyrales ont montré une grande sensibilité aux fortes concentrations de NeemAzal et n'ont pas présenté de réaction à la quinine. Nous avons également

noté que l'éthanol que nous comptons utiliser pour diluer des produits faiblement solubles dans l'eau, s'est révélé fortement répulsif lorsqu'il est appliqué sur les disques foliaires. Ces observations avec ces molécules antiappétentes nous ont permis de valider ce nouveau dispositif qui donne des résultats répétables.

La plupart des tests classiques de consommation des larves produisent des courbes individuelles de consommation, mais les caractérisent par une mesure ponctuelle, souvent le temps t50 mis par la larve pour consommer la moitié du disque foliaire (Menezes Jr. *et al.*, 2005 ; Shields *et al.*, 2008 ; Clark *et al.*, 2014). Cette approche est insuffisante car les larves de lépidoptères peuvent avoir des comportements alimentaires discontinus dans le temps. Par exemple, les larves de *Spodoptera litura* consomment en alternant les périodes d'activité et de repos (Ji *et al.*, 2017). La dynamique de consommation peut aussi dépendre du stade de développement larvaire. Dans les tests de consommation on ne choisit pas toujours les larves du même stade parce qu'il est un peu difficile de séparer les œufs avant leur émergence.

Plutôt que de mesurer la consommation après un temps donné comme dans la plupart des expériences de ce type, nous avons suivi au cours du temps la consommation des disques foliaires de maïs par les larves. Cette approche nous a conduits à proposer une nouvelle approche statistique consistant à comparer des courbes de consommation, en classant les comportements en 6 catégories (A à F). Ces catégories de comportements alimentaires sont observables quel que soit le matériel végétal, mais la proportion d'individus de chaque classe varie selon les traitements, les variétés de maïs, ou l'âge des feuilles. Il est probable que la variabilité des comportements alimentaires soit d'origine génétique et reflète la diversité des larves que nous avons utilisées, larves qui sont issues de populations naturelles. Cette variabilité comportementale est généralement négligée mais décroît fortement lorsque les insectes sont élevés dans des conditions artificielles pendant de nombreuses générations.

Les travaux de Bentur & Kalode (1990) ont démontré que la variabilité de consommation individuelle des larves de *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) sur le riz peut être maintenue à une limite acceptable en utilisant au minimum 5 réplicats. Notre modèle d'analyse, basé sur la dynamique d'évolution des courbes de consommation, est probablement plus complet et pourrait être un bon outil pour étudier la variabilité de comportement alimentaire des larves.

Le dispositif que j'ai développé a été appliqué à un ensemble de génotypes de maïs sélectionnés pour leur différence de date de floraison. Il nous a permis de tester certaines hypothèses du compromis entre croissance et défense, et d'étudier les mécanismes de défense impliqués dans la résistance à la pyrale *O. nubilalis* (Menezes Jr. *et al.*, 2005). La prévalence des dégâts de pyrale

au champ montre que les génotypes précoces issus de la lignée MBS sont toujours moins attaqués par rapport au témoin et à leurs homologues tardifs. De même, les tests de consommation réalisés sur des feuilles prélevées sur des plantes au champ montrent une appétence plus forte des larves de pyrale pour les génotypes MBS précoces. L'analyse de la composition biochimique des tiges a permis de montrer que cette préférence des larves pour les génotypes MBS précoces pourrait être due au fait que les parois cellulaires sont plus tendres et contiennent plus d'eau. Chez les lépidoptères, la qualité de l'hôte peut effectivement déterminer son niveau d'attractivité pour les larves (Goldstein, Mason, & Pesek, 2010). Cependant, cette étude ne nous permet pas de démontrer un lien direct entre l'importance des dégâts de pyrale au champ, l'appétence des larves, et la qualité nutritive des feuilles.

Pour montrer le lien entre l'appétence des larves et la qualité nutritive des feuilles, il aurait fallu réaliser des tests de choix entre les génotype précoces et tardifs (Menezes Jr. *et al.*, 2005). En effet, il n'y a pas toujours de lien entre le choix des larves et leur préférence de consommation (Farrar, Lawrence, & Blackburn, 2014 ; Franks *et al.*, 2018). De plus, nous n'avons pas réalisé les tests de consommation et les analyses biochimiques sur les mêmes parties de la plante, ni aux mêmes stades. Les tests de consommation ont été réalisés sur des prélèvements foliaires autour de la période de floraison, alors que les analyses biochimiques ont été réalisés sur des extraits broyés des parties vertes des plantes lors de la maturation des grains au stade ensilage.

De même, le lien entre prévalence des dégâts au champ et appétence des larves pour les feuilles n'est probablement pas causal. En effet, le choix préférentiel des génotypes précoces MBS lors des infestations naturelles au champ est sans doute directement lié aux choix de site de ponte des femelles qui ne s'alimentent pas sur ces feuilles. Chez la pyrale *O. nubilalis*, le choix de ponte des femelles est influencé par les composés volatils émis par la plante hôte (Fiala, Derridj, & Jolivet, 1985 ; Udayagiri & Mason, 1997). Ces variables n'ont pas été mesurées dans notre étude. Par ailleurs, l'appétence des feuilles mesurée dans les tests de consommation ne représente pas forcément l'appétence de la plante entière. Comme nous l'avons montré, l'appétence dépend de l'âge de la feuille au moment du prélèvement, et de son rang foliaire.

Malgré ces réserves, les différentes caractéristiques mesurées constituent un faisceau d'indices tendant à montrer que les génotypes MBS précoces sont plus sensibles à la pyrale que les autres génotypes de l'étude, et en particulier, de leurs homologues tardifs. Si l'on considère la précocité de floraison comme un proxy de la vitesse de croissance, ce résultat est en faveur de l'existence d'un compromis entre croissance et niveau de défense. Par ailleurs, on trouve, en considérant l'ensemble des génotypes testés, une corrélation très forte entre la précocité de floraison et un

ensemble de caractéristiques liées à la digestibilité des plantes pour les mammifères herbivores comme la teneur en lignines, en hémicelluloses ou en acides p-coumariques. Les génotypes les plus précoces de l'étude, issus de la lignée F252 sont moins attaqués par les pyrales au champ, bien qu'ils possèdent a priori des niveaux de défense plus faibles car moins de parois cellulaires et moins lignifiées. Cela s'explique peut-être par un décalage entre la phénologie des plantes et le cycle de vie naturel des pyrales.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé le test de consommation sur un panel de 18 lignées de maïs différentes, montrant un gradient de précocité important, et des profils métaboliques des feuilles variables (Cañas *et al.*, 2017). Des semis décalés ont permis de comparer ces 18 lignées au même stade de développement. On montre des différences importantes pour l'appétence des larves entre les lignées du panel, mais une corrélation très faible entre appétence des larves et précocité de floraison, allant plutôt dans le sens contraire de l'attendu : dans les comparaisons au même stade de développement, les lignées les plus précoces sont moins appétentes. Ainsi, le lien entre précocité de floraison et tolérance à la pyrale n'est pas complètement clair. Par contre, nous trouvons dans cette étude des corrélations plus importantes entre l'appétence des larves et la composition biochimique des feuilles.

L'ensemble des résultats obtenus permet de mieux comprendre les mécanismes de défense des plantes contre la pyrale *O. nubilalis*. Ils montrent qu'il existe chez le maïs une forte variabilité génétique pour l'appétence des larves de pyrale, en partie en lien avec la précocité de floraison et le temps disponible pour l'accumulation de substances de défense par les plantes. A niveau de défenses chimiques égales, la tendreté et la teneur en eau des parois peuvent être des facteurs de sensibilité à la pyrale. Ensuite, nous avons pu démontrer que la sélection divergente pour la date de floraison chez le maïs a induit une modification des mécanismes de défense chez certaines lignées. Est-ce une relation causale ? Si oui, on pourrait envisager de mettre en place un dispositif inverse, consistant à sélectionner des maïs pour leur résistance à la pyrale et observer si les maïs les plus résistants sont ceux qui ont une date de floraison plus tardive. Enfin, la variabilité des comportements alimentaires des pyrales est un paramètre que nous n'avons pas étudié. Le test comportemental que nous avons développé pourrait nous permettre une étude à plus grande échelle afin d'étudier la variabilité du comportement alimentaire entre populations de pyrales et d'identifier les caractères comportementaux ou sensoriels qui sont transmis d'une génération à l'autre.

Bibliographie générale

Référence

- AGPM (2017) La physiologie du Maïs | Maïs Culture Durable. (Consulté le 2020-06-09 17 :30 :24). <https://www.maisculturedurable.com/patrimoine/la-physiologie-du-mais/>. <https://www.maisculturedurable.com/patrimoine/debouches/> [accessed 9 June 2020].
- AGUIRRE-LIGUORI, J.A., GAUT, B.S., JARAMILLO-CORREA, J.P., TENAILLON, M.I., MONTES-HERNANDEZ, S., GARCIA-OLIVA, F., HEARNE, S.J. & EGUIARTE, L.E. (2019) Divergence with gene flow is driven by local adaptation to temperature and soil phosphorus concentration in teosinte subspecies (*Zea mays parviglumis* and *Zea mays mexicana*). *Molecular Ecology* **28**, 2814–2830.
- AHMED, E., ARSHAD, M. & KHAN, M.Z. (2017) Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *J Pharmacogn Phytochem JPP* **205**, 205–214.
- AKAIKE, H. (1998) Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. In *Selected Papers of Hirotugu Akaike* (eds E. PARZEN, K. TANABE & G. KITAGAWA), pp. 199–213. Springer, New York, NY.
- ALBA, C., BOWERS, M.D. & HUFBAUER, R. (2012) Combining optimal defense theory and the evolutionary dilemma model to refine predictions regarding plant invasion. *Ecology* **93**, 1912–1921.
- ALCHANATIS, V., NAVON, A., GLAZER, I. & LEVSKI, S. (2000) PA—Precision Agriculture : An Image Analysis System for measuring Insect Feeding Effects caused by Biopesticides. *Journal of Agricultural Engineering Research* **77**, 289–296.
- ALMA, A., LESSIO, F., REYNERI, A. & BLANDINO, M. (2005) Relationships between *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae) feeding activity, crop technique and mycotoxin contamination of corn kernel in northwestern Italy. *International Journal of Pest Management* **51**, 165–173.
- ANGLADE, P., BOYAT, A., GOUESNARD, B., VIBLE, J.C. & DUPIN, B. (1998) Assessment of 10 years of maize pedigree breeding for European corn borer tolerance and high-yielding combining ability. *Agronomie* **18**, 299–308.
- ARNASON, J.T., PHILOGENE, B.J.R., DONSKOV, N., HUDON, M., MCDUGALL, C., FORTIER, G., MORAND, P., GARDNER, D., LAMBERT, J., MORRIS, C. & NOZZOLILLO, C. (1985) Antifeedant and insecticidal properties of azadirachtin to the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **38**, 29–34.
- ARVALIS (2017) Pyrale du maïs - Ravageur sur Maïs, ARVALIS Résultats 2013. *Les Fiches Accidents - ARVALIS-infos.fr*. <http://www.fiches.arvalis-infos.fr> [accessed 29 September 2017].
- ATTARAN, E., MAJOR, I.T., CRUZ, J.A., ROSA, B.A., KOO, A.J.K., CHEN, J., KRAMER, D.M., HE, S.Y. & HOWE, G.A. (2014) Temporal Dynamics of Growth and Photosynthesis Suppression in Response to Jasmonate Signaling. *Plant Physiology* **165**, 1302–1314. American Society of Plant Biologists.
- BADJI, A., KWEMOI, D.B., MACHIDA, L., OKII, D., MWILA, N., AGBAHOUNGBA, S., KUMI, F., IBANDA, A., BARARYENYA, A., SOLEMANEGY, M., ODONG, T., WASSW, P., OTIM, M., ASEA, G., OCHWO-SSEMAKULA, M., ET AL. (2020) Genetic Basis of Maize Resistance to Multiple-Insect Pests : Integrated Genome-Wide Comparative Mapping and Candidate Gene Prioritization. Preprints.

- BALDWIN, I.T. (1998) Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 8113–8118.
- BALLARE, C.L. (2014) Light Regulation of Plant Defense. *Annual Review of Plant Biology* **65**, 335–363.
- BARROS-RIOS, J., MALVAR, R.A., JUNG, H.-J.G., BUNZEL, M. & SANTIAGO, R. (2012) Divergent selection for ester-linked diferulates in maize pith stalk tissues. Effects on cell wall composition and degradability. *Phytochemistry* **83**, 43–50.
- BARROS-RIOS, J., MALVAR, R.A., JUNG, H.-J.G. & SANTIAGO, R. (2011) Cell wall composition as a maize defense mechanism against corn borers. *Phytochemistry* **72**, 365–371.
- BATTISTI, A., LARSSON, S.A., BJÖRKMAN, C. & NIEMELÄ, P. (2015) Climate change and insect pest distribution range.
- BEKAERT, M., EDGER, P.P., HUDSON, C.M., PIRES, J.C. & CONANT, G.C. (2012) Metabolic and evolutionary costs of herbivory defense : systems biology of glucosinolate synthesis. *New Phytologist* **196**, 596–605.
- BELLES, X., CAMPS, F., COLL, J. & PIULACHS, M.D. (1985) Insect antifeedant activity of clerodane diterpenoids against larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera). *Journal of Chemical Ecology* **11**, 1439–1445.
- BELSKY, A.J., CARSON, W.P., JENSEN, C.L. & FOX, G.A. (1993) Overcompensation by plants : Herbivore optimization or red herring ? *Evolutionary Ecology* **7**, 109–121.
- BENTUR, J.S. & KALODE, M.B. (1990) A feeding test to identify rice varieties resistant to the leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee). *Proceedings : Animal Sciences* **99**, 483–491.
- BERES P. K (2012) Damage caused by *Ostrinia nubilalis* Hbn. to fodder maize (*Zea mays* L.), sweet maize (*Zea mays* Var. *saccharata* [Sturtev.] I.H. Bailey) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) near Rzeszow (south-eastern Poland) in 2008-2010. *Acta Scientiarum Polonorum. Agricultura* **11**.
- BERES, P.K. (2010) Harmfulness of *Ostrinia nubilalis* Hbn. on some Non-bt Versus Genetically Modified Bt Maize (*Zea Mays* L.) Cultivars in Poland in 2006-2007. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/250166102_Harmfulness_of_Ostrinia_nubilalis_Hbn_on_some_Nonbt_Versus_Genetically_Modified_Bt_Maize_Zea_Mays_L_Cultivars_in_Poland_in_2006-2007 [accessed 25 September 2019].
- BERGVINSON, D. (1993) Role of phenolic acids in maize resistance to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Huebner). Thesis, University of Ottawa (Canada).
- BERGVINSON, D.J., ARNASON, J.T., HAMILTON, R., MIHM, J.A. & JEWELL, D.C. (1994a) Determining Leaf Toughness and Its Role in Maize Resistance to the European Corn Borer (Lepidoptera : Pyralidae). *Journal of Economic Entomology* **87**, 1743–1748.
- BERGVINSON, D.J., ARNASON, J.T. & PIETRZAK, L.N. (1994b) Localization and quantification of cell wall phenolics in European corn borer resistant and susceptible maize inbreds. *Canadian Journal of Botany* **72**, 1243–1249.
- BERGVINSON, D.J., HAMILTON, R.I. & ARNASON, J.T. (1995a) Leaf profile of maize resistance factors to European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Chemical Ecology* **21**, 343–354.
- BERGVINSON, D.J., LARSEN, J.S. & ARNASON, J.T. (1995b) Effect of light on change in maize resistance against the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *The Canadian Entomologist* **127**, 111–122.

- BERNAYS, E.A., JARZEMBOWSKI, E.A., MALCOLM, S.B., CHALONER, W.G., HARPER, J.L. & LAWTON, J.H. (1991) Evolution of insect morphology in relation to plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **333**, 257–264.
- BETHENOD, M.-T., THOMAS, Y., ROUSSET, F., FREROT, B., PELOZUELO, L., GENESTIER, G. & BOURGUET, D. (2005) Genetic isolation between two sympatric host plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner. II: assortative mating and host-plant preferences for oviposition. *Heredity* **94**, 264–270.
- BEZZAR-BENDJAZIA, R., KILANI-MORAKCHI, S., MAROUA, F. & ARIBI, N. (2017) Azadirachtin induced larval avoidance and antifeeding by disruption of food intake and digestive enzymes in *Drosophila melanogaster* (Diptera : Drosophilidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **143**, 135–140.
- BLANDINO, M., SCARPINO, V., VANARA, F., SULYOK, M., KRŠKA, R. & REYNERI, A. (2015) Role of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) on contamination of maize with 13 Fusarium mycotoxins. *Food Additives & Contaminants : Part A* **32**, 533–543.
- BOHN, M., KREPS, R.C., KLEIN, D. & MELCHINGER, A.E. (1999) Damage and Grain Yield Losses Caused by European Corn Borer (Lepidoptera : Pyralidae) in Early Maturing European Maize Hybrids. *Journal of Economic Entomology* **92**, 723–731. Oxford Academic.
- BOUCHET, S., SERVIN, B., BERTIN, P., MADUR, D., COMBES, V., DUMAS, F., BRUNEL, D., LABORDE, J., CHARCOSSET, A. & NICOLAS, S. (2013) Adaptation of Maize to Temperate Climates : Mid-Density Genome-Wide Association Genetics and Diversity Patterns Reveal Key Genomic Regions, with a Major Contribution of the Vgt2 (ZCN8) Locus. *PLOS ONE* **8**, e71377. Public Library of Science.
- BRADSHAW, C.J.A., LEROY, B., BELLARD, C., ROIZ, D., ALBERT, C., FOURNIER, A., BARBET-MASSIN, M., SALLES, J.-M., SIMARD, F. & COURCHAMP, F. (2016) Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications* **7**, 12986. Nature Publishing Group.
- BRATT, K. (2000) Secondary plant metabolites as defence against herbivores and oxidative stress : Synthesis, isolation and biological evaluation. *DIVA*.
- BRINDLEY, T.A. & DICKE, F.F. (1963) Significant Developments in European Corn Borer Research. *Annual Review of Entomology* **8**, 155–176.
- BROWN, A. (1989) Core collections : A practical approach to genetic resource management. *Genome* **31**, 818–824.
- BUENDGEN, M.R., COORS, J.G., GROMBACHER, A.W. & RUSSELL, W.A. (1990) European Corn Borer Resistance and Cell Wall Composition of Three Maize Populations. *Crop Science* **30**, 505–510.
- BUTRON, A., MALVAR, R.A., REVILLA, P. & ORDAS, R.A. (1998) Defense Mechanisms of Maize against Pink Stem Borer. *Crop Science* **38**, 1159–1163. Crop Science Society of America.
- CALCAGNO, V., MITOYEN, C., AUDIOT, P., PONSARD, S., GAO, G., LU, Z., WANG, Z., HE, K. & BOURGUET, D. (2017) Parallel evolution of behaviour during independent host-shifts following maize introduction into Asia and Europe. *Evolutionary Applications* **10**, 881–889.
- CAMBIER, V., HANCE, T. & DE HOFFMANN, E. (2000) Variation of DIMBOA and related compounds content in relation to the age and plant organ in maize. *Phytochemistry* **53**, 223–229.

- CAMERINI, G., GROPPALI, R., TSCHORSNIG, H.-P. & MAINI, S. (2016) Influence of *Ostrinia nubilalis* larval density and location in the maize plant on the tachinid fly *Lydella thompsoni*. *Bulletin of Insectology* **69**, 301–306.
- CAMPOS, F., ATKINSON, J., ARNASON, J.T., PHILOGENE, B.J.R., MORAND, P., WERSTIUK, N.H. & TIMMINS, G. (1989) Toxicokinetics of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Journal of Chemical Ecology* **15**, 1989–2001.
- CAMPOS, F., DONSKOV, N., ARNASON, T.J., PHILOGENE, B.J.R., ATKINSON, J., MORAND, P. & WERSTIUK, N.H. (1990) Biological Effects and Toxicokinetics of DIMBOA in *Diadegma terebrans* (Hymenoptera : Ichneumonidae), an Endoparasitoid of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Pyralidae). *Journal of Economic Entomology* **83**, 356–360.
- CAMPOS, M.L., YOSHIDA, Y., MAJOR, I.T., DE OLIVEIRA FERREIRA, D., WERADUWAGE, S.M., FROEHLICH, J.E., JOHNSON, B.F., KRAMER, D.M., JANDER, G., SHARKEY, T.D. & HOWE, G.A. (2016) Rewiring of jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth-defense tradeoffs. *Nature Communications* **7**, 1–10.
- CAMUS-KULANDAIVELU, L., VEYRIERAS, J.-B., MADUR, D., COMBES, V., FOURMANN, M., BARRAUD, S., DUBREUIL, P., GOUESNARD, B., MANICACCI, D. & CHARCOSSET, A. (2006) Maize adaptation to temperate climate : relationship between population structure and polymorphism in the Dwarf8 gene. *Genetics* **172**, 2449–2463.
- CAÑAS, R.A., YESBERGENOVA-CUNY, Z., SIMONS, M., CHARDON, F., ARMENGAUD, P., QUILLERE, I., CUKIER, C., GIBON, Y., LIMAMI, A.M., NICOLAS, S., BRULE, L., LEA, P.J., MARANAS, C.D. & HIREL, B. (2017) Exploiting the Genetic Diversity of Maize Using a Combined Metabolomic, Enzyme Activity Profiling, and Metabolic Modeling Approach to Link Leaf Physiology to Kernel Yield. *The Plant Cell* **29**, 919–943.
- CARDINAL, A.J. & LEE, M. (2005) Genetic relationships between resistance to stalk-tunneling by the European corn borer and cell-wall components in maize population B73×B52. *Theoretical and Applied Genetics* **111**, 1–7.
- CASTEX, V., BENISTON, M., CALANCA, P., FLEURY, D. & MOREAU, J. (2018) Pest management under climate change : The importance of understanding tritrophic relations. *Science of The Total Environment* **616–617**, 397–407.
- CHAUMONT, F. DE, DALLONGEVILLE, S., CHENOUEAU, N., HERVE, N., POP, S., PROVOOST, T., MEAS-YEDID, V., PANKAJAKSHAN, P., LECOMTE, T., MONTAGNER, Y.L., LAGACHE, T., DUFOUR, A. & OLIVO-MARIN, J.-C. (2012a) Icy : an open bioimage informatics platform
- CHEN, M.-S. (2008) *Inducible direct plant defense against insect herbivores : A review*.
- CIPOLLINI, D., WALTERS, D. & VOELCKEL, C. (2017) Costs of Resistance in Plants : From Theory to Evidence. In *Annual Plant Reviews online* pp. 263–307. American Cancer Society.
- CLARK, E.L., ISITT, R., PLETTNER, E., FIELDS, P.G. & HUBER, D.P.W. (2014) An Inexpensive Feeding Bioassay Technique for Stored-Product Insects. *Journal of Economic Entomology* **107**, 455–461.
- COLEY, P.D. (1987) Interspecific Variation in Plant Anti-Herbivore Properties : The Role of Habitat Quality and Rate of Disturbance. *The New Phytologist* **106**, 251–263.
- COLEY, P.D. (1988) Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia* **74**, 531–536.
- COLEY, P.D., BRYANT, J.P. & STUART CHAPIN, I.I.I.F. (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* **230**, 895–900.

- COLL, M. & BOTTRELL, D.G. (1992) Mortality of european corn borer larvae by natural enemies in different corn microhabitats. *Biological Control* **2**, 95–103.
- COLLANTES, H.G., GIANOLI, E. & NIEMEYER, H.M. (1998) Changes in growth and chemical defences upon defoliation in maize. *Phytochemistry* **49**, 1921–1923.
- COMPEAN, K. (2014) Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites : A Review. *Research Journal of Medicinal Plant* **8**, 204–213.
- COORS, J.G. (1987) Resistance to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner), in maize, *Zea mays* L., as affected by soil silica, plant silica, structural carbohydrates, and lignin. In *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition* pp. 445–456. Springer, Dordrecht.
- DAVIDSON, R. & MACKINNON, J.G. (1993) ‘The Method of Maximum Likelihood : Fundamental Concepts and Notation’. Estimation and Inference in Econometrics. New York : Oxford University Press. p. 89. ISBN. <http://qed.econ.queensu.ca/ETM/etm-info.html> [accessed 16 July 2020].
- DE VRIES, J., EVERS, J.B. & POELMAN, E.H. (2017) Dynamic Plant–Plant–Herbivore Interactions Govern Plant Growth–Defence Integration. *Trends in Plant Science* **22**, 329–337.
- DEGEN, T., DILLMANN, C., MARION-POLL, F. & TURLINGS, T.C.J. (2004) High Genetic Variability of Herbivore-Induced Volatile Emission within a Broad Range of Maize Inbred Lines. *Plant Physiology* **135**, 1928–1938.
- DERRON, J.O., GOY, G. & BREITENMOSER, S. (2009) Caractérisation biologique de la race de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) à deux générations présente dans le Bassin lémanique. *Revue suisse d’agriculture* **41**, 179–184.
- DESCOINS, C. (2001) Perception de substances antiappétentes par des chenilles de lépidoptères phytophages. *L’Année Biologique* **40**, 55–73.
- DING, P. & DING, Y. (2020) Stories of Salicylic Acid : A Plant Defense Hormone. *Trends in Plant Science* **25**, 549–565.
- DIWAN, N., MCINTOSH, M.S. & BAUCHAN, G.R. (1995) Methods of developing a core collection of annual Medicago species. *Theoretical and Applied Genetics* **90**, 755–761.
- DUFAÿ, M. (2003) Conflits d’intérêts et rencontres des partenaires du mutualisme : le cas du mutualisme palmier nain / pollinisateur. PhD Thesis.
- DURAND, E., BOUCHET, S., BERTIN, P., RESSAYRE, A., JAMIN, P., CHARCOSSET, A., DILLMANN, C. & TENAILLON, M.I. (2012) Flowering Time in Maize : Linkage and Epistasis at a Major Effect Locus. *Genetics* **190**, 1547–1562.
- DURAND, E., TENAILLON, M.I., RAFFOUX, X., THEPOT, S., FALQUE, M., JAMIN, P., BOURGAIS, A., RESSAYRE, A. & DILLMANN, C. (2015) Dearth of polymorphism associated with a sustained response to selection for flowering time in maize. *BMC Evolutionary Biology* **15**, 103.
- DURAND, E., TENAILLON, M.I., RIDEL, C., COUBRICHE, D., JAMIN, P., JOUANNE, S., RESSAYRE, A., CHARCOSSET, A. & DILLMANN, C. (2010) Standing variation and new mutations both contribute to a fast response to selection for flowering time in maize inbreds. *BMC Evolutionary Biology* **10**, 2.
- EDITE BEZERRA DA ROCHA, M., FREIRE, F. DA C.O., ERLAN FEITOSA MAIA, F., IZABEL FLORINDO GUEDES, M. & RONDINA, D. (2014) Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* **36**, 159–165.

- EL HAGE, F. (2018) Impact du déficit hydrique sur la dégradabilité, la biochimie pariétale et la répartition des tissus lignifiés chez l'entre-nœud de maïs et déterminisme génétique de ces caractères. Thesis, Université Paris-Saclay (ComUE).
- EL HAGE, F., LEGLAND, D., BORREGA, N., JACQUEMOT, M.-P., GRIVEAU, Y., COURSOL, S., MECHIN, V. & REYMOND, M. (2018) Tissue Lignification, Cell Wall p-Coumaroylation and Degradability of Maize Stems Depend on Water Status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**, 4800–4808.
- ELGER, A., LEMOINE, D.G., FENNER, M. & HANLEY, M.E. (2009) Plant ontogeny and chemical defence : older seedlings are better defended. *Oikos* **118**, 767–773.
- ESCOUBAS, P., LAJIDE, L. & MITZUTANI, J. (1993) An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **66**, 99–107.
- FAOSTAT (2018) Used filters : production/crops : Countries or regions : France ; Elements : area harvested and production quantity ; items aggregated : maize and maize green. Year : 2018. (Consulté le 2020-04-11 16 :44 :14) <http://www.fao.org/faostat/fr/#data>. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data> [accessed 11 April 2020].
- FARRAR, R.R., LAWRENCE, S.D. & BLACKBURN, M.B. (2014) Arabidopsis Genotypes Resistant and Susceptible to Diamondback Moth (Lepidoptera : Plutellidae) : No Net Effects on Insect Growth. *Journal of Entomological Science* **49**, 285–289.
- FATIMA, M., ABBAS, S., AHMAD, Z., SHARIF, Y., UMAIR, M., BAHADAR, K. & ZAYNAB, M. (2018) Plants Defense System Resist against the Pathogen Attack : Transcription Factors in Focus.
- FERRENBURG, S., KANE, J.M. & LANGENHAN, J.M. (2015) To grow or defend ? Pine seedlings grow less but induce more defences when a key resource is limited. *Tree Physiology* **35**, 107–111.
- FIALA, V., DERRIDJ, S. & JOLIVET, E. (1985) Influence de la teneur en glucides solubles des feuilles de *Zea mays* L. sur le choix du site de ponte de la pyrale, *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lepid. Pyralidae). *Hal*.
- FOYER, C.H., NOCTOR, G. & EMDEN, H.F. VAN (2007) An evaluation of the costs of making specific secondary metabolites : Does the yield penalty incurred by host plant resistance to insects result from competition for resources ? *International Journal of Pest Management* **53**, 175–182. Taylor & Francis.
- FRANETA, F., MIKIC, S., MILOVAC, Ž., MITROVIC, B., INDIC, D. & VUKOVIC, S. (2019) Maize defence mechanisms against the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera : Crambidae). *International Journal of Pest Management* **65**, 23–32. Taylor & Francis.
- FRANKS, S.J., GENOVESE, N., STOCKDALE, M., WEBER, J.J., ANSALDI, B.H. & VAN WILGENBURG, E. (2018) The Effects of Artificial Selection for Rapid Cycling in *Brassica rapa* on Herbivore Preference and Performance. *International Journal of Plant Sciences* **179**, 175–181.
- FREY, M., HUBER, K., PARK, W.J., SICKER, D., LINDBERG, P., MEELEY, R.B., SIMMONS, C.R., YALPANI, N. & GIERL, A. (2003) A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase is integrated in DIMBOA-biosynthesis. *Phytochemistry* **62**, 371–376.
- GARLAND, T. (2014) Trade-offs. *Current Biology* **24**, R60–R61. Elsevier.

- GOGGIN, F.L., LORENCE, A. & TOPP, C.N. (2015) Applying high-throughput phenotyping to plant–insect interactions : picturing more resistant crops. *Current Opinion in Insect Science* **9**, 69–76.
- GOLDSTEIN, J.A., MASON, C.E. & PESEK, J. (2010) Dispersal and Movement Behaviour of Neonate European Corn Borer (Lepidoptera : Crambidae) on Non-Bt and Transgenic Bt Corn. *Journal of Economic Entomology* **103**, 331–339. Oxford Academic.
- GULMON, S.L. & MOONEY, H.A. (1986) Costs of defense and their effects on plant productivity. *On the economy of plant form and function : proceedings of the Sixth Maria Moors Cabot Symposium, Evolutionary Constraints on Primary Productivity, Adaptive Patterns of Energy Capture in Plants, Harvard Forest, August 1983*. Cambridge [Cambridgeshire] : Cambridge University Press, c1986.
- GUTHRIE, W.D., DICKE, F.F. & NEISWANDER, C.R. (1960) Leaf and sheath feeding resistance to the European corn borer in eight inbred lines of dent corn. Ohio Agricultural Experiment Station.
- HAN, K. & LINCOLN, D.E. (1994) The Evolution of Carbon Allocation to Plant Secondary Metabolites : A Genetic Analysis of Cost in *Diplacus Aurantiacus*. *Evolution* **48**, 1550–1563.
- HARMON, J.P., WHITE, J.A. & ANDOW, D.A. (2003) Oviposition Behaviour of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae) in Response to Potential Intra- and Interspecific Interactions. *Environmental Entomology* **32**, 334–339. Oxford Academic.
- HARTIGAN, J.A. & WONG, M.A. (1979) Algorithm AS 136 : A K-Means Clustering Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* **28**, 100–108.
- HERMS, D.A. & MATTSON, W.J. (1992a) The dilemma of plants : To grow or defend. *The Quarterly Review of Biology* **67**, 283–335.
- HERMS, D.A. & MATTSON, W.J. (1992b) The Dilemma of Plants : To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology* **67**, 283–335.
- HERRERO, J., VALENCIA, A. & DOPAZO, J. (2001) A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* **17**, 126–136.
- HIDDING, B., KLAASSEN, M., DE BOER, T., DE VRIES, P.P. & NOLET, B.A. (2012) Aquatic plant shows flexible avoidance by escape from tuber predation by swans. *Basic and Applied Ecology* **13**, 50–58.
- HONG, S.C., WILLIAMSON, R.C. & HELD, D.W. (2012) Leaf biomechanical properties as mechanisms of resistance to black cutworm (*Agrotis ipsilon*) among *Poa* species. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **145**, 201–208.
- HOWE, G.A. & JANDER, G. (2008) Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 41–66.
- HUANG, J., NUSSLY, G.S., MCAUSLANE, H.J. & NAGATA, R.T. (2003) Effect of screening methods on expression of romaine lettuce resistance to adult banded cucumber beetle, *Diabrotica balteata* (coleoptera : chrysomelidae). *Florida Entomologist* **86**, 194–198.
- HÜBNER, J. (1805) Sammlung europäischer Schmetterlinge, recueil de planches colorées., Jacob (1761-1826). *Sammlung europäischer Schmetterlinge*. Augsburg : [chez l'autSammlung europäischer Schmetterlinge, recueil de planches colorées.eur 1796-]1805[-1838]. https://www.christies.com/lotfinder/lot_details.aspx?intObjectID=563207 [accessed 15 April 2020].

- HUOT, B., YAO, J., MONTGOMERY, B.L. & HE, S.Y. (2014) Growth–Defense Tradeoffs in Plants : A Balancing Act to Optimize Fitness. *Molecular Plant* **7**, 1267–1287.
- HUSSEIN, H.S. & BRASEL, J.M. (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **167**, 101–134.
- INRA (2001) Fiche technique F918. Catalogue des lignées de maïs INRA, fichier Lignées INRA 2001. MONTPELLIER et SAINT MARTIN DE HINX. 1 p.
- ISMAN, M.B., KOUL, O., LUCZYNSKI, A. & KAMINSKI, J. (1990) Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 1406–1411.
- JANDA, T., GONDOR, O.K., YORDANOVA, R., SZALAI, G. & PAL, M. (2014) Salicylic acid and photosynthesis : signalling and effects. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**, 2537–2546.
- JEAN, C. & BOISCLAIR, J. (2001) *Ravageurs et maladies du maïs sucré : Manuel de l'observateur. Institut de recherche et développement en agroenvironnement (IRDA), Sainte-Foy, Québec.*
- JEAN, C. & BOISCLAIR, J. (2009) *Les insectes nuisibles et utiles du maïs sucré : mieux les connaître. Institut de recherche et de développement en agroenvironnement inc. (IRDA). Québec.*
- JI, C.W., PARK, C.-G., LEE, S.-W., KIM, J.-H. & CHOI, B.R. (2017) Continuous measuring of leaf area for analyzing feeding behaviour of *Spodoptera litura* (Lepidoptera : Noctuidae) larva. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **20**, 491–495.
- JIN, S. (2017) Maize defense responses to caterpillars at the molecular, phenotypic and ecological scales. PhD Thesis, Pennsylvania State University.
- JONES, C.G. & COLEMAN, J.S. (1988) Leaf disc size and insect feeding preference : implications for assays and studies on induction of plant defense. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **47**, 167–172.
- JOST, J.-P. & JOST-TSE, Y.-C. (2016) *Stratégie de défense des plantes contre les maladies et les parasites (et : quelques applications prat.* Editions Publibook.
- JUNIOR, A.L.B., SOUZA, B.H.S.D., COSTA, E.N., RIBEIRO, Z.A. & STOUT, M.J. (2015) Facteurs influençant l'expression de l'antixénose dans le soja à *Anticarsia gemmatilis* et *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* **108**, 317–325.
- KAAN, F., ANGLADE, P., BOYAT, A., PANOUILLE, A., VIBLE, J.-C., DUPIN, M., BEDERE, M. & COGNOT, J. (1983) La résistance à la pyrale, *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lep. Pyralidae) dans un diallèle de 14 lignées précoces de maïs, *Zea mays* L. *Agronomie, EDP Sciences*, **3**, 507–512.
- KAWAGOE, T. & KUDOH, H. (2010) Escape from floral herbivory by early flowering in *Arabidopsis halleri* subsp. *gemmaifera*. *Oecologia* **164**, 713–720.
- KONSTANTOPOULOU, M.A., KROKOS, F.D. & MAZOMENOS, B.E. (2004) Chemical composition of corn leaf essential oils and their role in the oviposition behaviour of *Sesamia nonagrioides* females. *Journal of Chemical Ecology* **30**, 2243–2256.
- KORTH, K.L., DOEGE, S.J., PARK, S.-H., GOGGIN, F.L., WANG, Q., GOMEZ, S.K., LIU, G., JIA, L. & NAKATA, P.A. (2006) *Medicago truncatula* Mutants Demonstrate the Role of Plant Calcium Oxalate Crystals as an Effective Defense against Chewing Insects. *Plant Physiology* **141**, 188–195.

- KRAKOWSKY, M.D., LEE, M., WOODMAN-CLIKEMAN, W.L., LONG, M.J. & SHAROPOVA, N. (2004) QTL Mapping of Resistance to Stalk Tunneling by the European Corn Borer in RILs of Maize Population B73 × De8 1. *Crop Science* **44**, 274–282. Crop Science Society of America.
- LE GUYADER, H. (2020) Comment la mouche de l'aubépine est passée à la pomme. Pour la Science. *Pourlascience.fr*. <https://www.pourlascience.fr/sr/chroniques-de-levolution/comment-la-mouche-de-laubepine-est-passee-a-la-pomme-18863.php> [accessed 1 March 2020].
- LI, K., WANG, H., HU, X., LIU, Z., WU, Y. & HUANG, C. (2016) Genome-Wide Association Study Reveals the Genetic Basis of Stalk Cell Wall Components in Maize. *PLoS ONE* **11**.
- LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F., GUTHRIE, W.D., BARRY, D., MCMILLIAN, W.W. & WIDSTROM, N.W. (1982) Aflatoxin accumulation in preharvest maize kernels : Interaction of three fungal species, european corn borer and two hybrids. *Plant and Soil* **65**, 95–102.
- LIND, E.M., BORER, E., SEABLOOM, E., ADLER, P., BAKKER, J.D., BLUMENTHAL, D.M., CRAWLEY, M., DAVIES, K., FIRN, J., GRUNER, D.S., STANLEY HARPOLE, W., HAUTIER, Y., HILLEBRAND, H., KNOPS, J., MELBOURNE, B., ET AL. (2013) Life-history constraints in grassland plant species : a growth-defence trade-off is the norm. *Ecology Letters* **16**, 513–521.
- LITTLE, C.M., CHAPMAN, T.W. & HILLIER, N.K. (2020) Plasticity Is Key to Success of *Drosophila suzukii* (Diptera : Drosophilidae) Invasion. *Journal of Insect Science* **20**. Oxford Academic.
- LORANT, A., ROSS-IBARRA, J. & TENAILLON, M. (2020) Genomics of Long-and Short-Term Adaptation in Maize and Teosintes. In *Statistical Population Genomics* pp. 289–311. Humana, New York, NY.
- LUPOLI, R., MARION-POLL, F., PHAM-DELEGUE, M.H. & MASSON, C. (1990) Effect of maize leaf volatiles on the oviposition preferences of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Pyralidae). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Series 3, Sciences de la Vie* **311**, 225–230.
- MACHADO, R.A.R., BALDWIN, I.T. & ERB, M. (2017) Herbivory-induced jasmonates constrain plant sugar accumulation and growth by antagonizing gibberellin signaling and not by promoting secondary metabolite production. *New Phytologist* **215**, 803–812.
- MAGG, T., MELCHINGER, A.E., KLEIN, D. & BOHN, M. (2002) Relationship between European corn borer resistance and concentration of mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in grains of transgenic Bt maize hybrids, their isogenic counterparts, and commercial varieties. *Plant Breeding* **121**, 146–154.
- MAGRINI, F.E., SPECHT, A., GAIO, J., GIRELLI, C.P., MIGUES, I., HEINZEN, H., SALDAÑA, J., SARTORI, V.C. & CESIO, V. (2015) Antifeedant activity and effects of fruits and seeds extracts of *Cabralea canjerana canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) on the immature stages of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera : Noctuidae). *Industrial Crops and Products* **65**, 150–158.
- MALAUSA, T., PELISSIE, B., PIVETEAU, V., PELISSIER, C., BOURGUET, D. & PONSARD, S. (2008) Differences in oviposition behaviour of two sympatric sibling species of the genus *Ostrinia*. *Bulletin of Entomological Research* **98**, 193–201.
- MALVAR, R.A., BUTRON, A., ALVAREZ, A., ORDAS, B., SOENGAS, P., REVILLA, P. & ORDAS, A. (2004) Evaluation of the European Union Maize Landrace Core Collection for Resistance to *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera : Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae). *Journal of Economic Entomology* **97**, 628–634.

- MALVAR, R.A., BUTRON, A., ALVAREZ, A., PADILLA, G., CARTEA, M.E., REVILLA, P. & ORDAS, A. (2007) Yield performance of the European Union Maize Landrace Core Collection under multiple corn borer infestations. *Crop Protection* **26**, 775–781.
- MATA, L., GASPAR, H. & SANTOS, R. (2012) Carbon/nutrient balance in relation to biomass production and halogenated compound content in red alga *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniaceae). *Journal of Phycology* **48**, 248–253.
- MCCALL, A.C. & FORDYCE, J.A. (2010) Can optimal defence theory be used to predict the distribution of plant chemical defences ? *Journal of Ecology* **98**, 985–992.
- MEBS, D., WUNDER, C. & TOENNES, S.W. (2019) Coping with noxious effects of quinine by praying mantids (Mantodea) and spiders (Araneae). *Toxicon* **162**, 57–60.
- MEIHLS, L.N., KAUR, H. & JANDER, G. (2012) Natural Variation in Maize Defense against Insect Herbivores. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **77**, 269–283.
- MENEZES JR., A.O., OLIVEIRA, A., MIKAMI, A.Y., IDE, A.K. & VENTURA, M.U. (2005) Feeding preferences of *Microtheca punctigera* (Achard) (Coleoptera : Chrysomelidae) for some Brassicaceae plants in multiple-choice assays. *Scientia Agricola* **62**, 72–75.
- MIHM, J.A. (1997) Insect Resistant Maize : Recent Advances and Utilization ; Proceedings of an International Symposium held at the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) 27 November-3 December, 1994. Mexico, D.F. : CIMMYT.
- MINNICH, D.E. (1921) An experimental study of the tarsal chemoreceptors of two nymphalid butterflies. *Journal of Experimental Zoology* **33**, 172–203.
- MOOSE, S.P., DUDLEY, J.W. & ROCHEFORD, T.R. (2004) Maize selection passes the century mark : a unique resource for 21st century genomics. *Trends in Plant Science* **9**, 358–364.
- MORDUE (LUNTZ), A.J. & BLACKWELL, A. (1993) Azadirachtin : an update. *Journal of Insect Physiology* **39**, 903–924.
- MRAJA, A., UNSICKER, S.B., REICHEL, M., GERSHENZON, J. & ROSCHER, C. (2011) Plant Community Diversity Influences Allocation to Direct Chemical Defence in *Plantago lanceolata*. *PLoS ONE* **6**.
- MUMM, R. & HILKER, M. (2006) *Mumm R, Hilker M. Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. Trends Plant Sci 11 : 351-358.*
- MUSSER, F.R. & SHELTON, A.M. (2003) Predation of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae) Eggs in Sweet Corn by Generalist Predators and the Impact of Alternative Foods. *Environmental Entomology* **32**, 1131–1138.
- MUTUURA, A. & MUNROE, E. (1970) Taxonomy and distribution of the european corn borer and allied species : genus *Ostrinia* (Lepidoptera : Pyralidae). *Memoirs of the Entomological Society of Canada* **102**, 1–112.
- NANDY, S., CHEN, Q., YANG, J., BEASLEY, D., LI, H. & GOETTEL, M. (2008) Use of a detached leaf screening method for segregating Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) resistant Solanum hybrid lines. *Canadian journal of plant science. Revue canadienne de phytotechnie* **88**, 633–638.
- NIEMEYER, H.M. (2009) Hydroxamic acids derived from 2-hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H) - one : key defense chemicals of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 1677–1696.
- NINGOMBAM, A., AHLUWALIA, V., SRIVASTAVA, C. & WALIA, S. (2017) Antifeedant activity and phytochemical investigation of *Milletia pachycarpa* extracts against Tobacco Leaf Eating

- Caterpillar, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* **20**, 381–385.
- ODJAKOVA, M., HADJIVANOVA, C. & TSANKOV, D. (2001) THE COMPLEXITY OF PATHOGEN DEFENSE IN PLANTS.
- O'NEAL, M.E., LANDIS, D.A. & ISAACS, R. (2002) An Inexpensive, Accurate Method for Measuring Leaf Area and Defoliation Through Digital Image Analysis. *Journal of Economic Entomology* **95**, 1190–1194.
- ORDAS, B., ALVAREZ, A., REVILLA, P., BUTRON, A. & MALVAR, R.A. (2013) Relationship Between Time to Flowering and Stalk and Ear Damage by Second Generation Corn Borers. *Journal of Economic Entomology* **106**, 1234–1239. Oxford Academic.
- PAGARE, S., BHATIA, M., TRIPATHI, N., PAGARE, S. & BANSAL, Y.K. (2015) Secondary Metabolites of Plants and their Role : Overview.
- PAINTER, R.H. (1951) Insect Resistance in Crop Plants. *Soil Science* **72**, 481.
- PARACHNOWITSCH, A.L., CARUSO, C.M., CAMPBELL, S.A. & KESSLER, A. (2012) *Lobelia siphilitica* Plants That Escape Herbivory in Time Also Have Reduced Latex Production. *PLOS ONE* **7**, e37745. Public Library of Science.
- PARK, S.-H., DOEGE, S.J., NAKATA, P.A. & KORTH, K.L. (2009) *Medicago truncatula*-derived calcium oxalate crystals have a negative impact on chewing insect performance via their physical properties. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **131**, 208–215.
- PIESIK, D., ROCHAT, D., DELANEY, K.J. & MARION-POLL, F. (2013) Orientation of European corn borer first instar larvae to synthetic green leaf volatiles. *Journal of Applied Entomology* **137**, 234–240.
- PINHEIRO, J., BATES, D. & DEBROY, S. (2018) R Core Team. nlme : Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-148, <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- POHL, J.B., BALDWIN, B.A., DINH, B.L., RAHMAN, P., SMEREK, D., PRADO, F.J., SHERAZEE, N. & ATKINSON, N.S. (2012) Ethanol preference in *Drosophila melanogaster* is driven by its caloric value. *Alcoholism, clinical and experimental research* **36**, 1903–1912.
- PSZCZOLKOWSKI, M.A. (2017) Pharmacological analysis of the feeding response of codling moth (*Cydia pomonella* ; Lepidoptera : Tortricidae) neonates to bitter compounds.
- RAMASWAMY, S.B., COHEN, N.E. & HANSON, F.E. (1992) Deterrence of feeding and oviposition responses of adult *Heliothis virescens* by some compounds bitter-tasting to humans. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **65**, 81–93.
- RAMPUTH, A.I., ARNASON, J.T., CASS, L. & SIMMONDS, J.A. (2002) Reduced herbivory of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) on corn transformed with germin, a wheat oxalate oxidase gene. *Plant Science* **162**, 431–440.
- RAZZE, J.M. & MASON, C.E. (2012) Dispersal Behaviour of Neonate European Corn Borer (Lepidoptera : Crambidae) on Bt Corn. *Journal of Economic Entomology* **105**, 1214–1223. Oxford Academic.
- REDDY, K.R.N., SALLEH, B., SAAD, B., ABBAS, H.K., ABEL, C.A. & SHIER, W.T. (2010) An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews* **29**, 3–26.
- REGNAULT-ROGER, C., PHILOGENE, B.J. & VINCENT, C. (2008) Biopesticides d'origine végétale (2e éd.).

- REVILLA, P., MALVAR, R.A., VELASCO, P., BUTRON, A., TRACY, W.F., ABEDON, B.G. & ORDAS, A. (2005) Effects of Selection for the Timing of Vegetative Phase Transition on Corn Borer (Lepidoptera : Noctuidae and Crambidae) Damage. *Journal of Economic Entomology* **98**, 982–987.
- RHARRABE, K., JACQUI-JOLY, E. & MARION-POLL, F. (2014) Electrophysiological and behavioural responses of *Spodoptera littoralis* caterpillars to attractive and repellent plant volatiles. *Ecology and Evolution* **2**, 9.
- ROBINSON, J.F., KLUN, J.A. & BRINDLEY, T.A. (1978) European Corn Borer : A Nonpreference Mechanism of Leaf Feeding Resistance and Its Relationship to 1,4-Benzoxazin-3-One Concentration in Dent Corn Tissue. *Journal of Economic Entomology* **71**, 461–465.
- ROELOFS, W.L., DU, J.-W., TANG, X.-H., ROBBINS, P.S. & ECKENRODE, C.J. (1985) Three European corn borer populations in New York based on sex pheromones and voltinism. *Journal of Chemical Ecology* **11**, 829–836.
- ROSENTHAL, J.P. & DIRZO, R. (1997) Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defence against insects : Evidence from maizes and wild relatives. *Evolutionary Ecology* **11**, 337–355.
- ROSS, S.E. & OSTLIE, K.R. (1990) Dispersal and Survival of Early Instars of European Corn Borer (Lepidoptera : Pyralidae) in Field Corn. *Journal of Economic Entomology* **83**, 831–836.
- ROWLEY, M., STITT, J. & HANSON, F. (2003) Image analysis of small animal feeding behaviour. *Behaviour Research Methods, Instruments, & Computers* **35**, 447–451.
- ROYER, M. (2013) Relations between growth, concentrations of primary and secondary metabolites and resources availability on tomato plant with or without pests. Theses, Université de Lorraine.
- ROYER, M., LARBAT, R., LE BOT, J., ADAMOWICZ, S. & ROBIN, C. (2013) Is the C : N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato ? *Phytochemistry* **88**, 25–33.
- RUIZ-MESIA, L., RUIZ-MESIA, W., REINA, M., MARTINEZ-DIAZ, R., DE INES, C., GUADAÑO, A. & GONZALEZ-COLOMA, A. (2005) Bioactive Cinchona Alkaloids from *Remijia peruviana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1921–1926. American Chemical Society.
- SAAD, A.S.A., MOURAD, A.K.K., MASOUD, M.A. & GHORAB, M. A. S. (2012) Comparative studies of semi-artificial diets on the biology and the bionomics of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Or. : Lepidoptera, Fam. : Pyralidae). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* **77**, 567–576.
- SAKAI, A.K., ALLENDORF, F.W., HOLT, J.S., LODGE, D.M., MOLOFSKY, J., WITH, K.A., BAUGHMAN, S., CABIN, R.J., COHEN, J.E., ELLSTRAND, N.C., MCCAULEY, D.E., O'NEIL, P., PARKER, I.M., THOMPSON, J.N. & WELLER, S.G. (2001) The Population Biology of Invasive Species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**, 305–332.
- SALLOUM, A., COLSON, V. & MARION-POLL, F. (2011) Appetitive and Aversive Learning in *Spodoptera littoralis* Larvae. *Chemical Senses* **36**, 725–731. Oxford Academic.
- SANANE, I., DILLMANN, C., LEGRAND, J. & MARION-POLL, F. (2020a) R scripts and datas for the analysis of Lepidoptera feeding bioassays. Portail Data INRAE. <https://doi.org/10.15454/CRIUDY>.
- SANANE, I., DILLMANN, C. & MARION-POLL, F. (2020b) Instructions for the building of the Sanane lepidoptera larvae feeding bioassay device. Portail Data INRAE. <https://doi.org/10.15454/UVXKDJ>.

- SANANE, I., LEGRAND, J., DILLMANN, C. & MARION-POLL, F. (2020c) A semi-automated design for high-throughput Lepidoptera larvae feeding bioassays. *bioRxiv*, 2020.08.02.232256.
- SANDOVAL, M. & ALBERT, P.J. (2007) Chemoreception of sucrose and amino acids in second and fourth instars of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera : Tortricidae). *Journal of Insect Physiology* **53**, 84–92.
- SANTIAGO, R., BARROS-RIOS, J., ALVAREZ, A. & MALVAR, R.A. (2016) Agronomic performance of maize populations divergently selected for diferulate cross-linkage. *The Journal of Agricultural Science* **154**, 1270–1279.
- SANTIAGO, R., BARROS-RIOS, J. & MALVAR, R.A. (2013) Impact of Cell Wall Composition on Maize Resistance to Pests and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 6960–6980.
- SANTIAGO, R., CAO, A., BUTRON, A., LOPEZ-MALVAR, A., RODRIGUEZ, V.M., SANDOYA, G.V. & MALVAR, R.A. (2017a) Defensive changes in maize leaves induced by feeding of Mediterranean corn borer larvae. *BMC plant biology* **17**, 44.
- SANTIAGO, R., CAO, A., BUTRON, A., LOPEZ-MALVAR, A., RODRIGUEZ, V.M., SANDOYA, G.V. & MALVAR, R.A. (2017b) Defensive changes in maize leaves induced by feeding of Mediterranean corn borer larvae. *BMC Plant Biology* **17**, 44.
- SANTIAGO, R. & MALVAR, R.A. (2010) Role of Dehydrodiferulates in Maize Resistance to Pests and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **11**, 691–703.
- SAUVION, N., CALATAYUD, P.-A., THIERY, D. & MARION-POLL, F. (2013) *Interactions insectes-plantes*. Editions Quae.
- SCHMUTTERER, H. (1988) Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. *Journal of Insect Physiology* **34**, 713–719.
- SELLIER, M.-J., REEB, P. & MARION-POLL, F. (2011) Consumption of bitter alkaloids in *Drosophila melanogaster* in multiple-choice test conditions. *Chemical Senses* **36**, 323–334.
- SHIELDS, V.D.C., SMITH, K.P., ARNOLD, N.S., GORDON, I.M., SHAW, T.E. & WARANCH, D. (2008) The effect of varying alkaloid concentrations on the feeding behaviour of gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera : Lymantriidae). *Arthropod-Plant Interactions* **2**, 101–107.
- SHIKANO, I., AKHTAR, Y., ISMAN, M.B. & RANKIN, C.H. (2010) Dishabituating long-term memory for gustatory habituation in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Behavioural Neuroscience* **124**, 701–705.
- SILVA, E.M. DA, ROEL, A.R.R.R., PORTO, K.R.A., FALCO, M.E.F.E. & MATIAS, R.M. (2017) Insecticidal effect of the ethanol extract of *Baccharis dracunculifolia* (Asterales : Asteraceae). *Revista de Biología Tropical* **65**, 517–523.
- SKOGSMYR, I. & FAGERSTRÖM, T. (1992) The Cost of Anti-Herbivory Defence : An Evaluation of Some Ecological and Physiological Factors. *Oikos* **64**, 451–457. [Nordic Society Oikos, Wiley].
- SLETVOLD, N., HUTTUNEN, P., HANDLEY, R., KÄRKKÄINEN, K. & ÅGREN, J. (2010) Cost of trichome production and resistance to a specialist insect herbivore in *Arabidopsis lyrata*. *Evolutionary Ecology* **24**, 1307–1319.

- SOBEK, E.A. & MUNKVOLD, G.P. (1999) European Corn Borer (Lepidoptera : Pyralidae) Larvae as Vectors of *Fusarium moniliforme*, Causing Kernel Rot and Symptomless Infection of Maize Kernels. *Journal of Economic Entomology* **92**, 503–509.
- STÄDLER, E. & SCHÖNI, R. (1991) High sensitivity to sodium in the sugar chemoreceptor of the cherry fruit fly after emergence. *Physiological Entomology* **16**, 117–129.
- STAMP, N. (2003) Out of the Quagmire of Plant Defense Hypotheses. *The Quarterly Review of Biology* **78**, 23–55.
- STAMP, N. (2004) Can the growth–differentiation balance hypothesis be tested rigorously? *Oikos* **107**, 439–448.
- STRAUSS, S.Y., RUDGERS, J.A., LAU, J.A. & IRWIN, R.E. (2002) Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 278–285.
- SUVERKROPP, B.P., DUTTON, A., BIGLER, F. & LENTEREN, J.C. VAN (2008) Oviposition behaviour and egg distribution of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, on maize, and its effect on host finding by *Trichogramma* egg parasitoids. *Bulletin of Insectology* **61**, 303–312. Università di Bologna, Department of Agricultural Sciences.
- TARIQ, S. & SALEEM, K. (2018) Plant Defenses vs Pathogen Weapons : A Continuation of Battlefield : A Mini-review.
- TASIN, M., LUCCHI, A., IORIATTI, C., MRAIHI, M., DE CRISTOFARO, A., BOGER, Z. & ANFORA, G. (2011) Oviposition Response of the Moth *Lobesia botrana* to Sensory Cues from a Host Plant. *Chemical Senses* **36**, 633–639.
- TENAILLON, M.I., SEDIKKI, K., MOLLION, M., LE GUILLOUX, M., MARCHADIER, E., RESSAYRE, A. & DILLMANN, C. (2019) Transcriptomic response to divergent selection for flowering time in maize reveals convergence and key players of the underlying gene regulatory network, bioRxiv, 461947, ver. 5 peer-reviewed and recommended by Peer Community in Evolutionary Biology. 10.1101/461947.
- THOMAS, Y., BETHENOD, M.-T., PELOZUELO, L., FREROT, B. & BOURGUET, D. (2003) Genetic Isolation Between Two Sympatric Host-Plant Races of the European Corn Borer, *Ostrinia Nubilalis* Hubner I. Sex Pheromone, Moth Emergence Timing, and Parasitism. *Evolution* **57**, 261–273.
- TIWARI, R. & RANA, C. (2015) Plant secondary metabolites : a review. *IJERGS* **3**, 661–670.
- TODESCO, M., BALASUBRAMANIAN, S., HU, T.T., TRAW, M.B., HORTON, M., EPPLE, P., KUHN, C., SURESHKUMAR, S., SCHWARTZ, C., LANZ, C., LAITINEN, R.A.E., HUANG, Y., CHORY, J., LIPKA, V., BOREVITZ, J.O., ET AL. (2010) Natural allelic variation underlying a major fitness trade-off in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **465**, 632–636.
- UDAYAGIRI, S. & MASON, C.E. (1997) Epicuticular Wax Chemicals in *Zea mays* Influence Oviposition in *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Chemical Ecology* **23**, 1675–1687.
- VELASCO, P., REVILLA, P., MONETTI, L., BUTRON, A., ORDAS, A. & MALVAR, R.A. (2007) “Corn borers (Lepidoptera : Noctuidae ; Crambidae) In northwestern Spain : Population dynamics and distribution”, 195–203.
- VENABLES, W.N. & RIPLEY, B.D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*, 4th edition. Springer-Verlag, New York.
- VERA, L.M., BELLO, C., PAREDES, J.F., CARMONA-ANTOÑANZAS, G. & SANCHEZ-VAZQUEZ, F.J. (2018) Ethanol toxicity differs depending on the time of day. *PLoS ONE* **13**.

- VERDUGO, J.A., FRANCIS, F. & RAMIREZ, C.C. (2017) The complexity of insect-plant interactions under varying levels of resources and host resistance : a review on the peach-aphid model. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **20**, 533–541.
- VIGNEAULT, C., BARKIRE, B. & MARTEL, P. (1995) Méthode de mesure de surface de feuilles utilisée dans l'évaluation d'insecticides. *Cahiers Agricultures* **4**, 53-55 (1).
- VISSCHERS, I.G.S., DAM, N.M. VAN & PETERS, J.L. (2018) An objective high-throughput screening method for thrips damage quantitation using Ilastik and ImageJ. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **166**, 508–515.
- VISSER, A., DU PLESSIS, H., ERASMUS, A. & VAN DEN BERG, J. (2020) Larval Migration Behaviour of *Busseola fusca* (Lepidoptera : Noctuidae) on Bt and Non-Bt Maize under Semi-Field and Field Conditions. *Insects* **11**, 16. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- WILLMOT, D.B., HIBBARD, B.E., DARRAH, L.L., POLLAK, L.M., MONTGOMERY, K., PRATT, R.C., ABEL, C.A., HAWK, J.A., WELDEKIDAN, T. & FOSTER, J.E. (2004) Effect of Environment on Resistance to the European Corn Borer (Lepidoptera : Crambidae) in Maize. *Journal of Economic Entomology* **97**, 1745–1751. Oxford Academic.
- WOUTERS, F.C., BLANCHETTE, B., GERSHENZON, J. & VASSÃO, D.G. (2016) Plant defense and herbivore counter-defense : benzoxazinoids and insect herbivores. *Phytochemistry Reviews* **15**, 1127–1151.
- YAN, F., LI, S., XU, C. & LIN, C. (1996) Antifeedant property of DIMBOA and its effect on growth and development of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (GUENEE). *Beijing da xue xue bao. Zi ran ke xue bao* **32**, 254–260.
- YENCHO, G.C., RENWICK, J.A.A., STEFFENS, J.C. & TINGEY, W.M. (1994) Leaf surface extracts of *Solanum berthaultii* hawkes deter colorado potato beetle feeding. *Journal of Chemical Ecology* **20**, 991–1007.
- ZALUCKI, M.P., CLARKE, A.R. & MALCOLM, S.B. (2002) Ecology and Behaviour of First Instar Larval Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* **47**, 361–393.
- ZHANG, Y., LEGLAND, D., HAGE, F.E., DEVAUX, M.-F., GUILLON, F., REYMOND, M. & MECHIN, V. (2019) Changes in cell walls lignification, feruloylation and p-coumaroylation throughout maize internode development. *PLOS ONE* **14**, e0219923. Public Library of Science.
- ZHANG, Y. & TURNER, J.G. (2008) Wound-Induced Endogenous Jasmonates Stunt Plant Growth by Inhibiting Mitosis. *PLOS ONE* **3**, e3699. Public Library of Science.
- ZÜST, T. & AGRAWAL, A.A. (2017) Trade-Offs Between Plant Growth and Defense Against Insect Herbivory : An Emerging Mechanistic Synthesis. *Annual Review of Plant Biology* **68**, 513–534.

Annexes

Annexe 1 : SANANE, I., DILLMANN, C. & MARION-POLL, F. (2020b) Instructions for the building of the Sanane lepidoptera larvae feeding bioassay device. Portail Data INRAE. <https://doi.org/10.15454/UVXKDJ>.

How to design the high-throughput larvae feeding bioassay devices

I. Sanane, F. Marion-Poll, C. Dillmann

August 1st, 2019

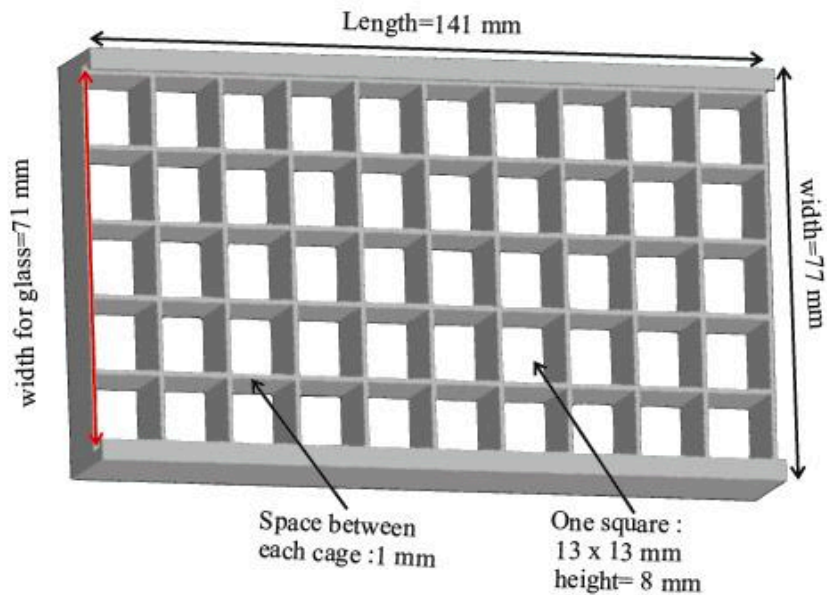
Here, we describe the design of the two devices used for the construction of the high-throughput larvae feeding bioassay described in

Sanane I., Legrand J., Dillmann C., Marion-Poll F. (2020) A semi-automated design for high-throughput Lepidoptera larvae feeding bioassays. Doi : *BioRxiv*, 2020.08.02.232256.

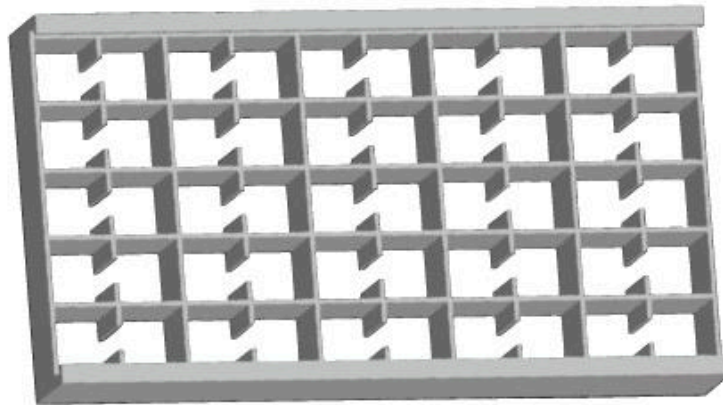
1. Plate designing

The experimental unit of the feeding-bioassay is a 3D printed 50-cages plastic plate with two transparent glasses, one for the bottom and another one to slide at the top.

50-cages plastic plate. The plate was designed using AutoCAD software and its total dimensions are L=14.1cm length, l=7.7 cm width, and h=1.1cm height. Each plate was designed as a plate of 10 x 5 square cages of (1,3 x 1,3 x 1,1 cm) separated by 1 mm walls. A thick spaces of 2,2 mm heigth was added on each top side of the plate to enable the the sliding of the top transparent glass. The plate file was transformed into 3D printing format Stereo-Lithography that are provided with in the dataset (slt format). The 3D printer (Ultimaker 2+) was used to print out each plate with white PLA (polylactic acid) filament (Ref.RS Stock No. 134- 8192), at a resolution of 0,6 mm. We designed to versions of the plate. Plates used in the article were designed for non-choice bioassays, with a single insect larvae per cage (Fig1.1 and stl file *non-choice_test_plate_design.stl*). A version to perform a choice bioassay was also built (Fig1.2 stl file *choice_test_plate_design.stl*). In this version, a single larvae can move between two adjacent cages and has the choice between two different leaf disks that can either come from different plant genotypes or be treated with different molecules.



1. Plate for non-choice feeding bioassay



2. Plate for choice feeding bioassay

Figure 1 : Experimental units. 3D AutoCAD representation of the two versions of the plates.

1.1 Non-choice feeding bioassay. Each cage is designed to contain a leaf disk and a single insect larva and is suitable for consumption tests. **2.2** Choice tests. Each pair of cages do communicate. The larvae can choose between two different leaf disks.

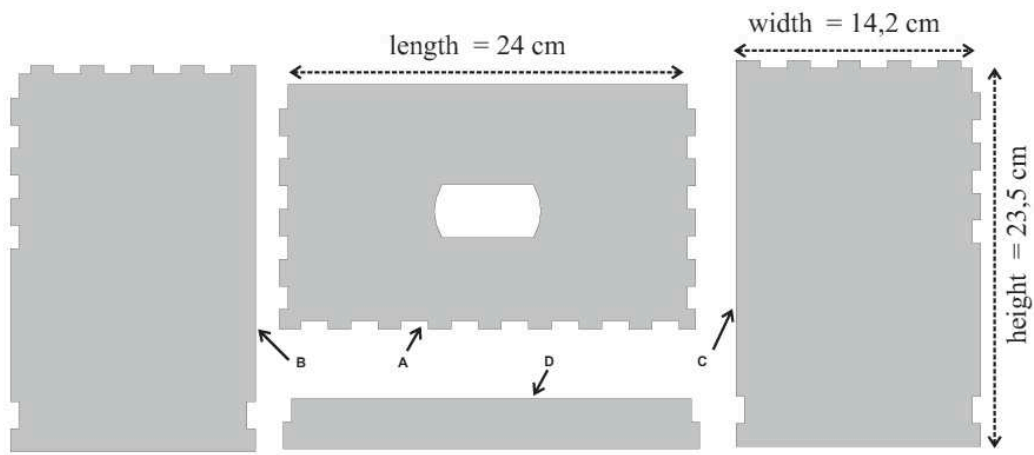
Transparent glasses. The plate comes with two transparent glasses cutted to the following dimensions :

Bottom glass : length $l=14.1$ cm, width $w=7.7$ cm and thickness $t=0.2$ cm

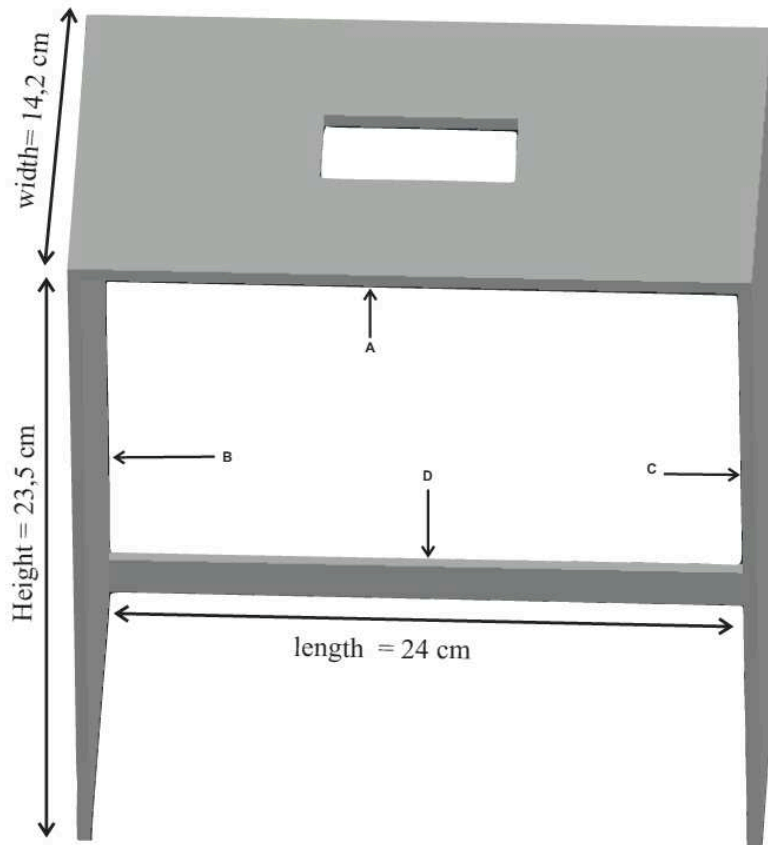
Top glass : length $l=14.1$ cm, width $w=7.1$ cm and thickness $t=0.2$ cm.

2. Monitoring device

The monitoring device was conceived to support the camera which can monitor three different plates that form a single experimental batch. It has been designed with Corel draw software and is represented in fig 2. The height of the device and the position of the camera was chosen to make sure that all images will be taken at the same distance and angle and depend on the resolution of the camera. Each device is 240 mm length, 142 mm width and 235 mm height. The material chosen was Medium-density Fiberboard (MDF) of 3mm thickness. The file .pdf provides with the pattern for laser cutting (fig 2.1). After laser-cutting, the different parts were put together with super glue (fig 2.2). Notice that the the device height strongly depend from the camera resolution and need to be adapted accordingly.



1. Device after laser cutting



2. Mounted device

Figure 2 : Fiberboard device for image acquisition. 2.1. Pattern for laser-cutting. The different pieces are identified by letters. 2.2. Mounting instructions. Pieces are put together using super-glue.

Annexe 2 : SANANE, I., DILLMANN, C., LEGRAND, J. & MARION-POLL, F. (2020a) R scripts and datas for the analysis of Lepidoptera feeding bioassays. Portail Data INRAE.
<https://doi.org/10.15454/CRIUDY>.

Statistical methods for analysing high-throughput Lepidoptera larvae feeding bioassays

Christine Dillmann, Judith Legrand, Inoussa Sanane

14 juillet 2020

This document describes the R scripts that allow data processing and statistical analyses of the Lepidoptera larvae feeding bioassays presented in (Sanane et al. 2020).

1. General organization of the data

Project directory

The project directory must contain five subdirectories:

- **DataCsv**: contains the raw csv files produced by the image analysis step. Be careful, this directory and all subdirectories must contain only the raw csv files of the project!
- **figs**: the figures produced during the analysis are stored in this subdirectory.
- **rawpdfs**: the pdf images of the raw data, that need to be checked manually.
- **RData**: intermediate tables generated by the analysis and stored as RData files + output csv files.
- **Rscripts**: the R scripts, along with input files for the estimations and contrasts.

The user must define the **Rscripts** directory as the R Working Directory.

Rawdatas from image analysis

For each plate monitored by the device, the image analysis step produces one csv file that contain the number of pixels left in the leaf disk at each time step and for each 50 cages. Each cage is identified by its row and column numbers in the plate (e.g R08:C03).

Encoding the experimental design into the rawdata filenames

Details about the experimental design are encoded into different items of the filename, separated by `_`:

`camera_plate_insectpopulation_plantenvironment_plantgenotype_date_product_concentration.csv`

where the different items are the following:

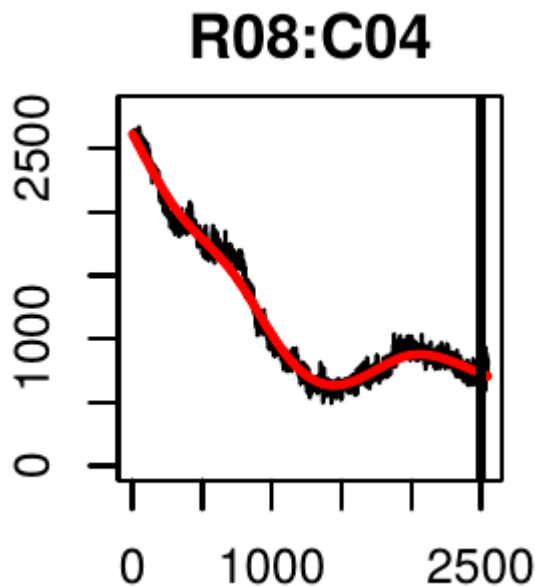
Item	Description	Example
camera	camera ID related to the device	Cam01
plate	name of the plate	f
insectpopulation	a single word describing the insect population	popbiol
plantenvironment	a single word describing the plant environment	greenhouse
plantgenotype	name or ID of the plant genotype	MBS-847
date	date of the experiment in the AAAA-MM-DD format	2019-06-20
product	leaf disk treatments	neemazal
concentration	concentration of the treatment product	0.001

2. Reading the raw data files and creating the aggregated data table

The R script `create_aggregated_data_table.R` automatically reads all the files contained in the `DataCsv` directory, including subdirectories.

2.01 Reading the raw data files

- The `fplot` function reads the data file and generates a pdf image stored in the `rawpdfs` directory that has exactly the same name as the csv file. The function also uses a smoothing algorithm and superpose the smoothed curves to the observations. The pdf images need to be checked manually. Below is one curve extracted from the file `Cam01_a_popbiol_serre_MBS-847_2019-06-18_neeme_0.00001.pdf`:



Graphical representation of a single experimental unit. The figure is extracted from one pdf image file. It shows the data obtained from the cage R08:C04. In black, the intact leaf disk area in pixels as a function of time. In red, the smoothed data. For some reason, the number of pixels increased after 1500mn, probably indicating that the caterpillar have been confounded with the leaf disk. This cage needs to be discarded from the analysis.

- The file `todrop.txt` is a text file that need to be created in the `Rscripts` directory and that lists the flames and the cage coordinates of the cages that need to be discarded:

```
tab <- readLines("todrop.txt")
print(tab)
```

```
## [1] "Cam01_a_popbiol_serre_MBS-847_2019-06-18_neeme_0.00001.csv;R08C04"
## [2] "Cam03_e_popbiol_serre_MBS-847_2019-06-18_neemc_0.001.csv;R04C01"
## [3] "Cam02_d_popbiol_serre_MBS-847_2019-06-28_quinc_0.001.csv;R01C02"
## [4] "Cam02_d_popbiol_serre_MBS-847_2019-06-28_quinc_0.001.csv;R02C02"
## [5] "Cam02_d_popbiol_serre_MBS-847_2019-06-28_quinc_0.001.csv;R03C02"
## [6] "Cam02_e_popbiol_serre_MBS-847_2019-06-28_quina_0.1.csv;R09C03"
## [7] "Cam02_f_popbiol_serre_MBS-847_2019-06-28_quine_0.00001.csv;R06C03"
## [8] "Cam03_e_popbiol_serre_MBS-847_2019-06-27_quina_0.1.csv;R09C03"
```

2.02 Making data-frames from raw data

The raw datas consist in a total of nbc different cages that correspond to the experimental units. For example, in a bioassay with one device and three plates, there are $3 \times 50 = 150$ experimental units. After reading all the datas, the script produces three data-frames. The metadata are the corresponding rawdata filenames.

- Z is a matrix ($nbc \times tmax$) that stores the pixels
- $tabZ$ ($nbc \times 3$) contains information about the lines of Z (metadata, cage ID, plate ID)
- $tabC$ ($nbc \times 9$) = metadata and summary statistics of the curves

For each curve, summary statistics are computed after smoothing. They contain characteristic times like $t20$, $t50$ and $t80$, as well as the percentage of leaf disk consumed at $tmax$. At the end of the procedure, pixels are normalized by the maximum value at $t0$ and leaf areas are expressed in percentage of the full leaf disk area at the beginning of the experiment.

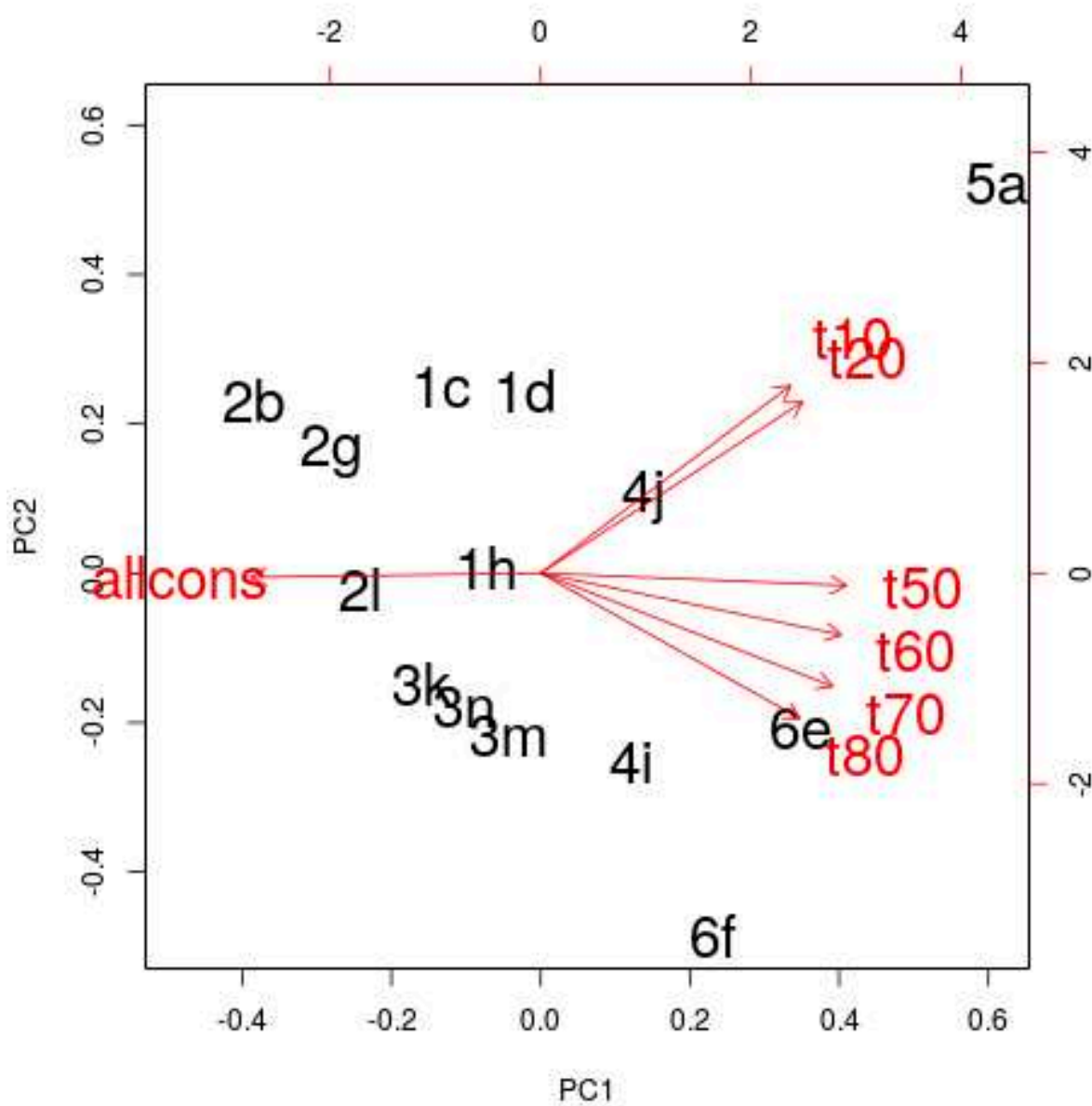
2.03 Clustering and grouping

The last step consists in running the SOTA algorithm to obtain the 14 clusters, describing each cluster by the average value of the summary statistics, and running the Kmeans algorithm to group the clusters into six different groups.

At the end of this step, the $tabC$ dataframe contains two additional columns that describe each experimental unit:

- $Stypo$ is the letter (from a to f) corresponding to the SOTA cluster
- $Mtypo$ is a number (from 1 to 6) corresponding to the Kmeans group.

The summary statistics that characterize each cluster are represented in the first two axes of a principal component analysis and allow the user to attribute a wise meaning letter (from A to F) to each Kmeans group:



PCA biplot showing the attributions of the SOTA clusters to Kmeans groups. Each point corresponds to a SOTA cluster identified by its letter and the number of the Kmeans group. The arrows indicate the contributions of the clusters summary statistics to the PCA axes.

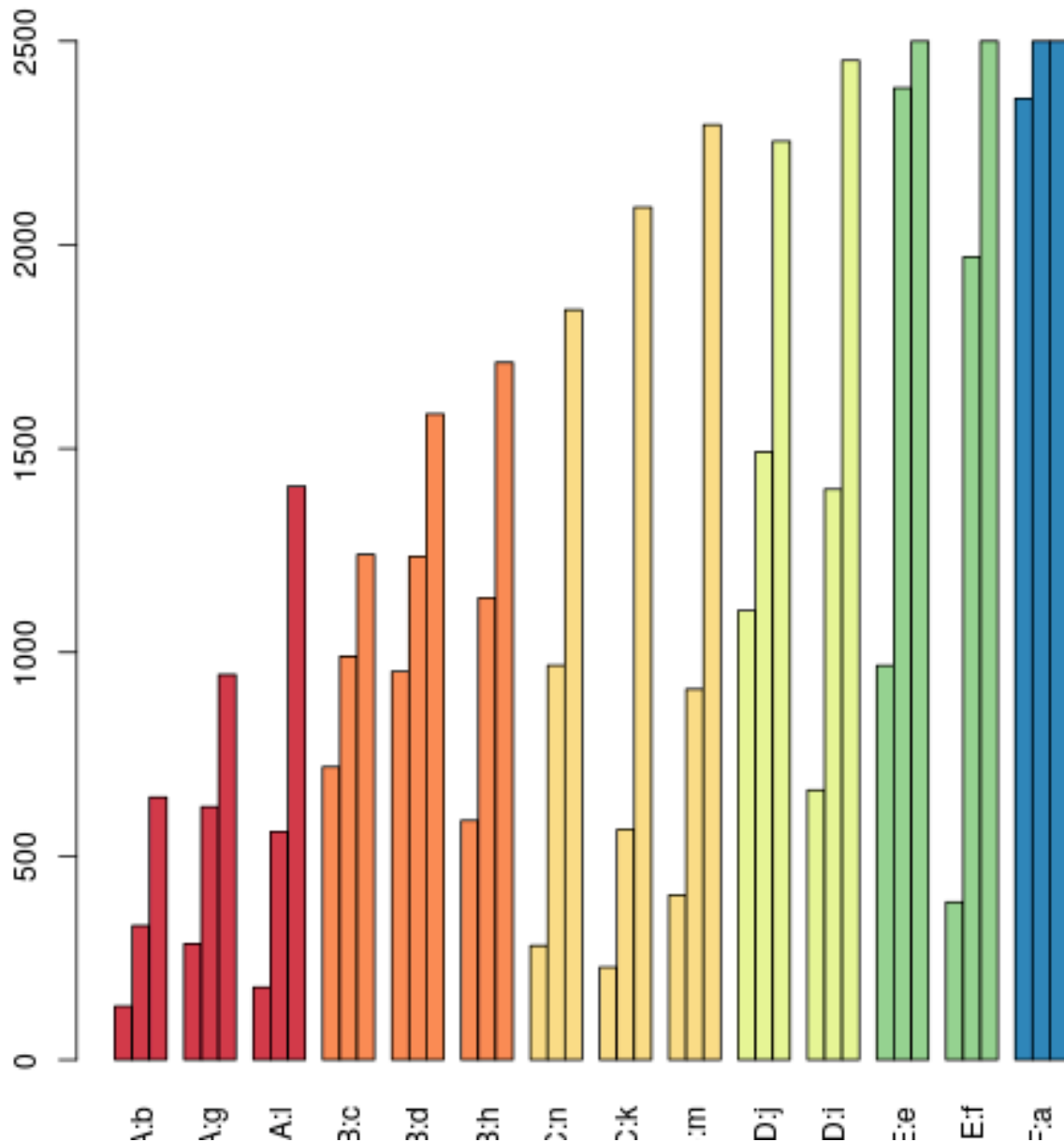
Because Kmeans is a stochastic algorithm, the group identifiers change each time the algorithm is run. The correspondance between Kmeans groups and letters needs to be done by the user. In the example above, the choice would be:

typo	Mtypo	Stypo	Description
A	2	b, g, l	full consumption and low t20, t50, t80
B	1	c, d, h	low t50 and t80 but higher t20
C	3	k, m, n	low t20 and t50 but higher t80
D	4	i, j	Intermediate values of summary statistics
E	6	e, f	High t50 and t80

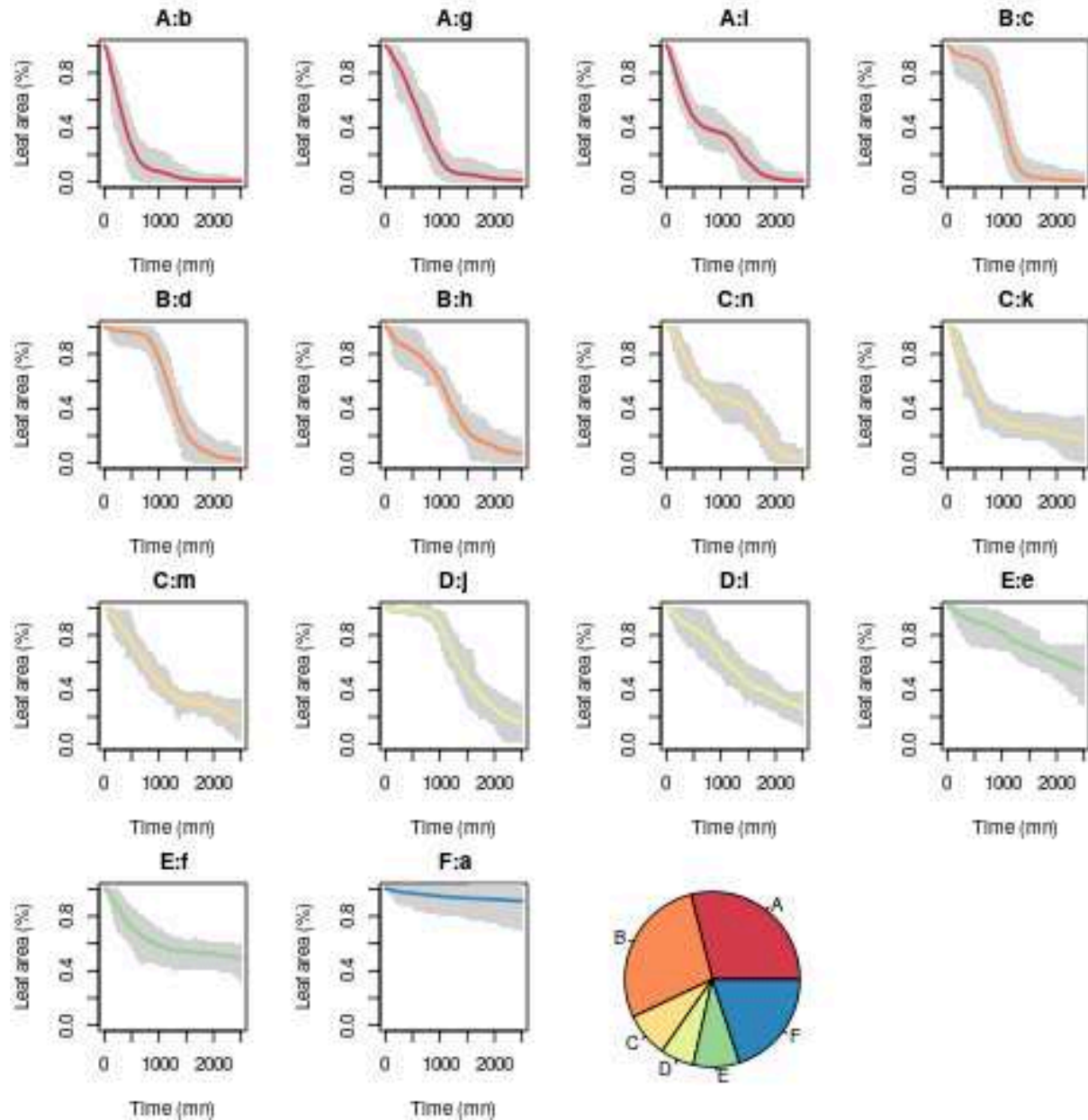
typo	Mtypo	Stypo	Description
F	5	a	High t20, t50, t80

3. Attribute wise meaning letters to Kmeans groups and perform graphical representations

The R script `02_attribute_wise_meanging_letters_to_groups.R` need to be changed by the user to define the letter associated with each Kmeans group. The script also produces graphical representations.



Barplot of the summary statistics associated with each cluster. For each cluster, the three bars are t_{20} , t_{50} and t_{80} . The colour is the colour attributed to the Kmeans group.



Feeding behaviour associated with each SOTA cluster. Each cluster is represented by a scatterplot where x-axis is the time, and y-axis is the percentage of leaf disk consumed. The cluster average feeding behaviour is represented by the colour line. Colour codes identify the Kmeans groups. For each plot and at each time point, the grey area represents the 5% and 95% quantile of the percentage of leaf disk consumed for all experimental units belonging to the cluster. The radar plot shows the distribution of experimental units between the six Kmeans groups.

Output

The end of the procedure consists in producing two separated data files, one for each treatment. Notice that to increase the number of replicates for the control, the controls used in the Neemazal bioassay were added to the Quinine dataframe, and the controls used in the Quinine bioassay were added to the Neemazal dataframe.

```

quindata <- c(grep("quin",as.character(tabC$cond)),grep("None",as.character(tabC$cond)) )
tabquin <- droplevels(tabC[quindata,])
save(tabquin,the colours, file="../RData/quin.RData")

neemdata <- c(grep("neem",as.character(tabC$cond)),grep("None",as.character(tabC$cond)) )
tabneem <- droplevels(tabC[neemdata,])
save(tabneem,the colours, file="../RData/neem.RData")

```

4 Multinomial regression

Here we describe the multinomial regression using the Neemazal bioassay. The aggregated data table is stored in the `neem.RData` file, and the corresponding R script is `03_multinomial_regression_neem.R`

4.01 Building-up predictor variables from the experimental design

The first step of the analysis consists in building-up the predictor variables from the experimental design and transform them into explanatory factors. To do this, we used the metadata embedded in the filenames of the raw data and stored in the column `tabC$cond` of the `tabC` dataframe.

```

temp <- matrix(unlist(strsplit(as.character(tabC$cond),"_")),ncol=nitems,byrow=TRUE)
head(temp)

```

```

##      [,1]  [,2] [,3]      [,4]      [,5]      [,6]      [,7]
## [1,] "Cam01" "a"  "popbiol" "serre" "MBS-847" "2019-06-18" "neeme"
## [2,] "Cam01" "a"  "popbiol" "serre" "MBS-847" "2019-06-18" "neeme"
## [3,] "Cam01" "a"  "popbiol" "serre" "MBS-847" "2019-06-18" "neeme"
## [4,] "Cam01" "a"  "popbiol" "serre" "MBS-847" "2019-06-18" "neeme"
## [5,] "Cam01" "a"  "popbiol" "serre" "MBS-847" "2019-06-18" "neeme"
## [6,] "Cam01" "a"  "popbiol" "serre" "MBS-847" "2019-06-18" "neeme"
##      [,8]
## [1,] "0.00001"
## [2,] "0.00001"
## [3,] "0.00001"
## [4,] "0.00001"
## [5,] "0.00001"
## [6,] "0.00001"

```

Here, two factors may be of interest.

- The Neemazal concentration (`temp[,8]`) which needs to be transformed into a factor. We used the following encoding for the concentration level, stored in `tabC` as a factor named `conc` :

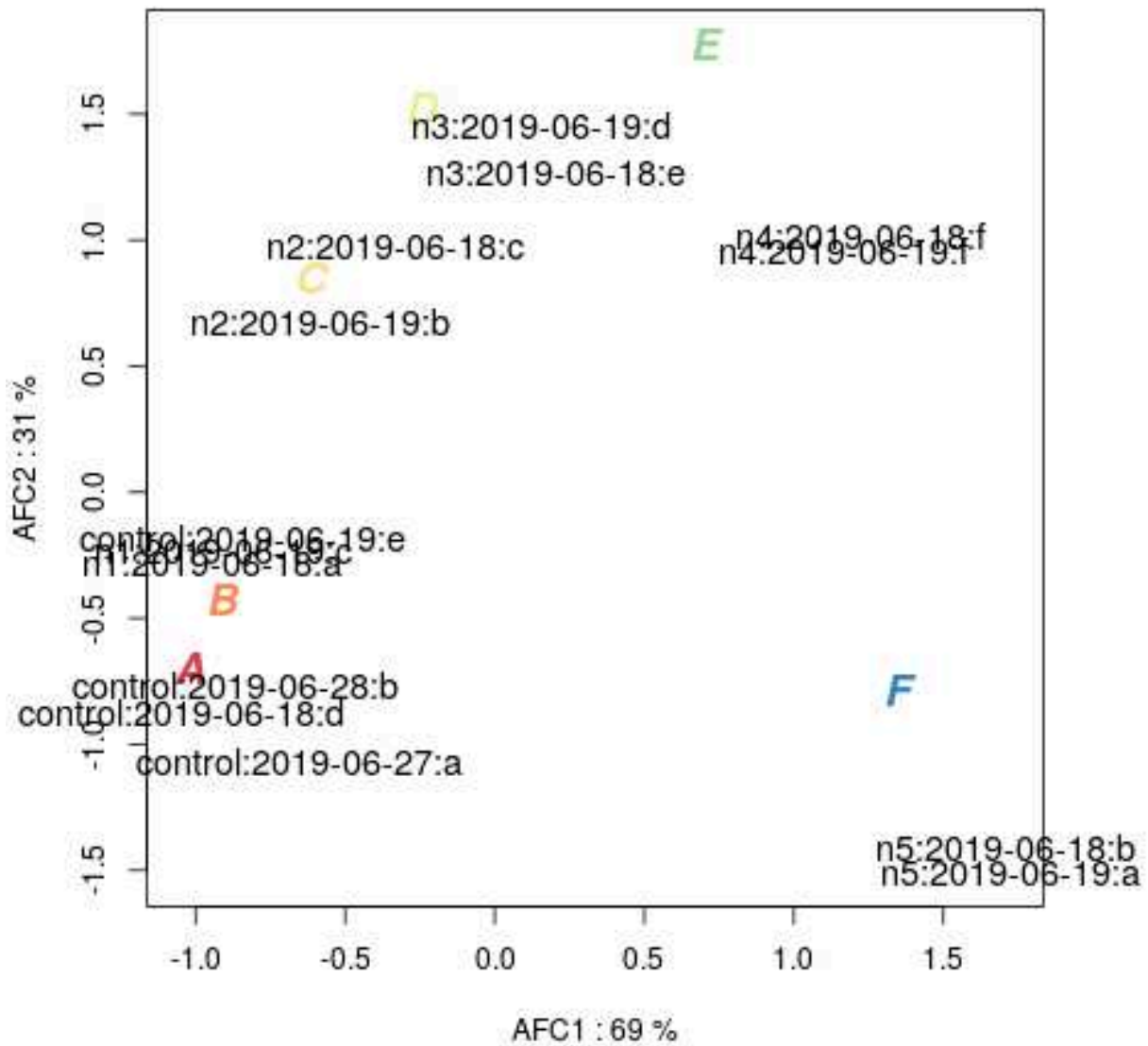
Metadata	Neemazal_concentration	conc_level
0.0000	Control (water)	control
0.00001	0.01mM	n1
0.0001	0.1mM	n2
0.001	1mM	n3
0.003	3mM	n4
0.01	10mM	n5

- The series of cages that belonged to the same plate at a single date of the experiments. This factor was called a `bloc` and built by merging the values of `plate` and `date` from the metadata.

- An additional factor called `grp` was created by merging the values of `conc` and `bloc`.

4.02 Visualizing the data : Factorial Correspondence Analysis

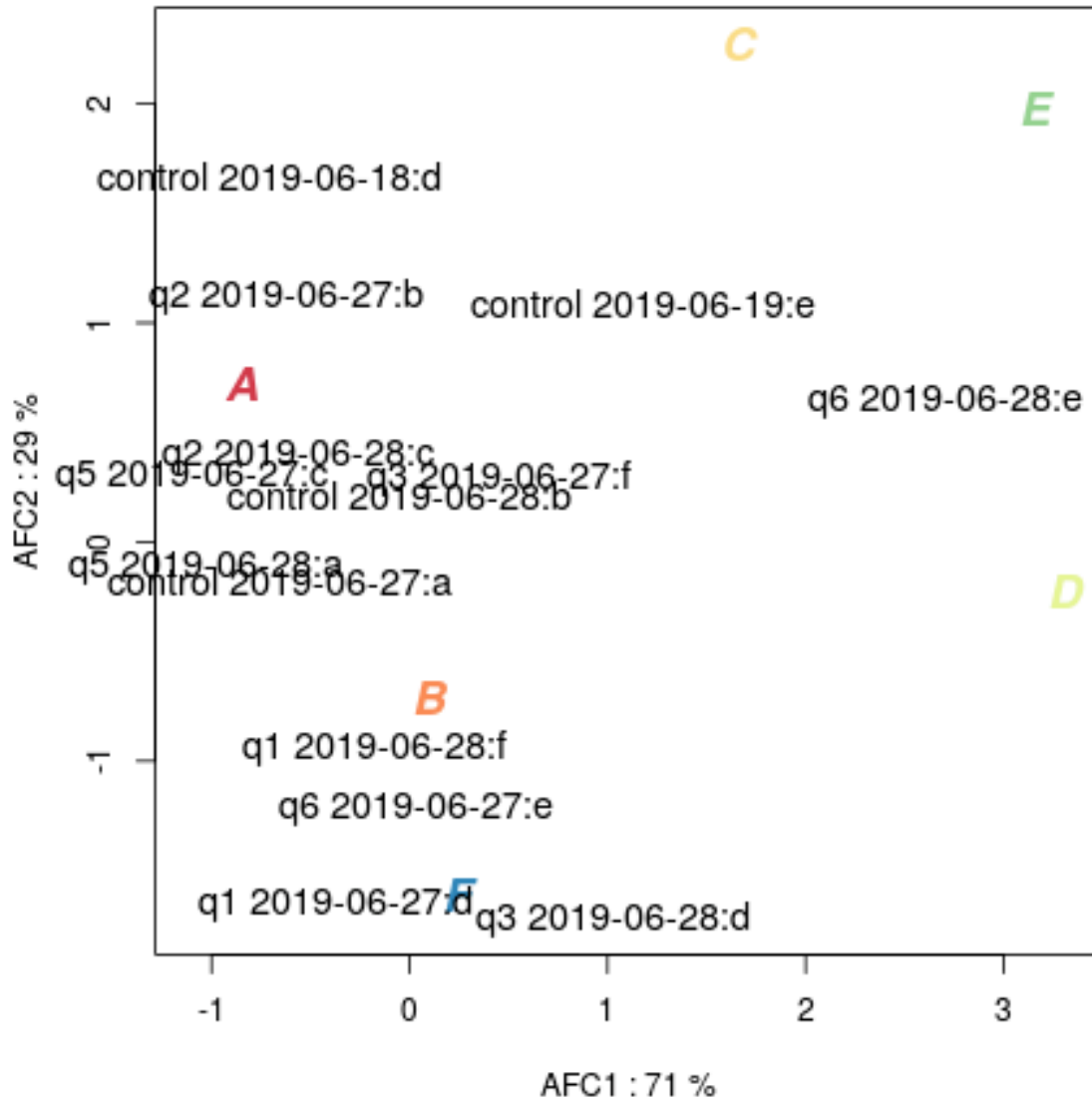
A factorial correspondence analysis (Escofier and Pagès 2008) was run to visualize the data, using the `corresp` function of the MASS library (Venables and Ripley 2002, Gower and Hand (1996)). Briefly, the method allows to represent a contingency table in a two-dimensional space where both grouping factors and categories are represented with the same metrics, which is the chi-squared distance. Whenever one level of the grouping factor is graphically close to one category, this means that the grouping factor is enriched in this category.



Representation of the Neemazal dataset in the two dimensions of the factorial correspondence analysis. The control and *n1* treatments are enriched in A and B feeding types. *n2* Neemazal treatment is enriched in C feeding behaviour, *n3* is enriched with D feeding behaviours, and the highest Neemazal concentration treatment *n5* is enriched with F feeding behaviours. The analysis also shows that the two

replicates of the same treatment are generally very close together.

As a matter of comparison, the Quinine dataset is also represented below :



Representation of the Quinine dataset in the two dimensions of the factorial correspondence analysis. As compared with the Neemazal dataset, the replicates of the same treatment are dispersed in the two-dimensional space, indicating that the treatment has a small effect on feeding behaviours. Notice however that the four control replicates tend to be enriched in A feeding behaviour.

4.03 Multinomial regression: model comparisons

The R scripts running multinomial regression were inspired from (UCLA 2020). Given the experimental design, differences between experimental units can be explained either by differences between treatments, *i.e.* an effect of the Neemazal concentration (model M1), or by chance differences between blocs *i.e.* the

experimental units measured in the same plate the same day (model M2). The two models were compared using the Akaike Information Criterion (AIC) (Hirotugu 1974). The smaller the AIC, the better the model fits the data.

```
tabC$typoref <- relevel(as.factor(tabC$typo), ref = "E")
regm <- multinom(typoref ~ conc, data = tabC)
```

```
## # weights: 42 (30 variable)
## initial value 1250.648110
## iter 10 value 891.172145
## iter 20 value 844.693172
## iter 30 value 841.379073
## iter 40 value 841.075860
## iter 50 value 841.071775
## final value 841.071755
## converged
```

```
reg0 <- multinom(typoref ~ bloc , data = tabC)
```

```
## # weights: 90 (70 variable)
## initial value 1250.648110
## iter 10 value 844.064072
## iter 20 value 820.574874
## iter 30 value 817.910679
## iter 40 value 817.505300
## iter 50 value 817.282127
## iter 60 value 817.228083
## iter 70 value 817.224523
## final value 817.224466
## converged
```

```
aic <- c(regm$AIC,reg0$AIC)
print(aic)
```

```
## [1] 1742.144 1774.449
```

The best model is here the model including a treatment effect. Notice that a reference feeding group need to be chosen to run the model. In the Neemazal Bioassay, we used the feeding group E, wich was represented in all treatments. The results for the two bioassays, Neemazal and Quinine are summarized in the table below:

nom	Neemazal	Quinine
M1	1742.144	1755.637
M2	1774.449	1759.197
Reference	E	B

For both bioassays, the best model was the one with a treatment effect. Notice however that for the Quinine bioassay, the difference between the two models is very small.

4.04 Treatment comparisons and contrasts

Multinomial regression provides with the estimation of the α_i^w coefficients associated to each feeding type category, relative to the reference category:

```
## (Intercept)      concn1      concn2      concn3      concn4      concn5
## A      3.3783103 -0.9358760 -2.7276476 -5.4576467 -7.227988 -18.066114
```

```
## B 3.0905840 -1.2987602 -3.0105379 -3.9661056 -6.941098 -15.258373
## C 1.8453844 -0.5925154 -1.0721768 -1.9789493 -19.458566 -17.293239
## D 0.5101908 0.1830350 -0.1046761 -0.6437429 -2.974064 -15.082215
## F 1.8453840 -2.1328507 -2.2507536 -2.0276948 -1.845370 2.749498
```

as well as with the variance-covariance matrix for the estimations.

Because the names of the concentration levels (treatment) were chosen according to the alphabetical order, (Intercept) corresponds to the coefficient associated with the control (water treatment). Comparisons between treatments can be performed by describing the contrast matrix C into a csv file. For the Neemazal treatment, the C matrix is contained into the `Cmat_neem.csv` file in the `Rscripts` directory. The R script reads the contrast matrix as:

```
Cmat <- read.table("Cmat_neem.csv",header=TRUE,sep=",")
rownames(Cmat) <- Cmat[,1]
Cmat <- Cmat[,-1]
colnames(Cmat) <- colnames(beta)
Cmat <- as.matrix(Cmat)
print(Cmat)
```

```
##          (Intercept) concn1 concn2 concn3 concn4 concn5
## neem_n5-n4          0         0         0         0        -1         1
## neem_n5-n3          0         0         0        -1         0         1
## neem_n5-n2          0         0        -1         0         0         1
## neem_n5-n1          0        -1         0         0         0         1
## neem_n5-I           0         0         0         0         0         1
## neem_n4-n3          0         0         0        -1         1         0
## neem_n4-n2          0         0        -1         0         1         0
## neem_n4-n1          0        -1         0         0         1         0
## neem_n4-I           0         0         0         0         1         0
## neem_n3-n2          0         0        -1         1         0         0
## neem_n3-n1          0        -1         0         1         0         0
## neem_n3-I           0         0         0         1         0         0
## neem_n2-n1          0        -1         1         0         0         0
## neem_n2-I           0         0         1         0         0         0
## neem_n1-I           0         1         0         0         0         0
```

Here, the first line of the C matrix estimates the difference between the $n5$ and the $n4$ concentration levels. Differences are stored and exported as a csv output file `contrasts_neem_refE.csv`

```
print(contrasts)
```

```
##          A          B          C          D          E
## neem_n5-n4 -20.2381461 -12.4550941 -3.42250880 -28.2398282 -4.5952286
## neem_n5-n3 -22.1916615 -15.6125883 -29.38219342 -30.7525497 -4.7775481
## neem_n5-n2 -25.1449081 -16.7911973 -30.51202065 -31.5146574 -5.0006485
## neem_n5-n1 -26.8188270 -18.3851010 -30.87376198 -31.6844842 -4.8827648
## neem_n5-I  -25.6215044 -17.5506629 -29.33308956 -29.3681160 -2.7490192
## neem_n4-n3 -1.9535154 -3.1574942 -25.95968462 -2.5127215 -0.1823196
## neem_n4-n2 -4.9067620 -4.3361032 -27.08951185 -3.2748292 -0.4054199
## neem_n4-n1 -6.5806809 -5.9300069 -27.45125318 -3.4446560 -0.2875363
## neem_n4-I  -5.3833583 -5.0955688 -25.91058076 -1.1282878 1.8462094
## neem_n3-n2 -2.9532466 -1.1786090 -1.12982723 -0.7621077 -0.2231004
## neem_n3-n1 -4.6271655 -2.7725127 -1.49156855 -0.9319345 -0.1052167
## neem_n3-I  -3.4298429 -1.9380746 0.04910387 1.3844337 2.0285290
## neem_n2-n1 -1.6739189 -1.5939037 -0.36174133 -0.1698268 0.1178837
## neem_n2-I  -0.4765963 -0.7594657 1.17893109 2.1465414 2.2516294
```

```
## neem_n1-I      1.1973226    0.8344381    1.54067242    2.3163682    2.1337457
```

The first lines of the contrasts matrix show that the n5 treatment is depleted in A and B feeding types, and enriched in F feeding type. The pvalues associated to the mean comparisons are also stored in the csv output file `pval_neem_refE.csv`:

```
print(pval)

##           A      B      C      D      E
## neem_n5-n4 0.0000 0.9715 0.0000 0.0000 0.0007
## neem_n5-n3 0.0000 0.9643 0.0000 0.0000 0.0005
## neem_n5-n2 0.0000 0.9616 0.0000 0.0000 0.0004
## neem_n5-n1 0.0000 0.9580 0.0000 0.0000 0.0015
## neem_n5-I  0.0000 0.9599 0.0000 0.0000 0.0200
## neem_n4-n3 0.1146 0.0058 0.0000 0.0072 0.8481
## neem_n4-n2 0.0000 0.0002 0.0000 0.0008 0.6885
## neem_n4-n1 0.0000 0.0000 0.0000 0.0019 0.8079
## neem_n4-I  0.0000 0.0000 0.0000 0.1191 0.0048
## neem_n3-n2 0.0003 0.0914 0.0999 0.3892 0.8294
## neem_n3-n1 0.0000 0.0006 0.0773 0.3657 0.9303
## neem_n3-I  0.0000 0.0000 0.9132 0.0193 0.0033
## neem_n2-n1 0.0381 0.0590 0.6819 0.8739 0.9249
## neem_n2-I  0.3229 0.1436 0.0229 0.0011 0.0035
## neem_n1-I  0.0644 0.2098 0.0310 0.0060 0.0302
```

Notice that the contrast involving the B category and the *n5* Neemazal concentration are hardly significant.

4.05 Estimating the proportions of each feeding type in each treatment

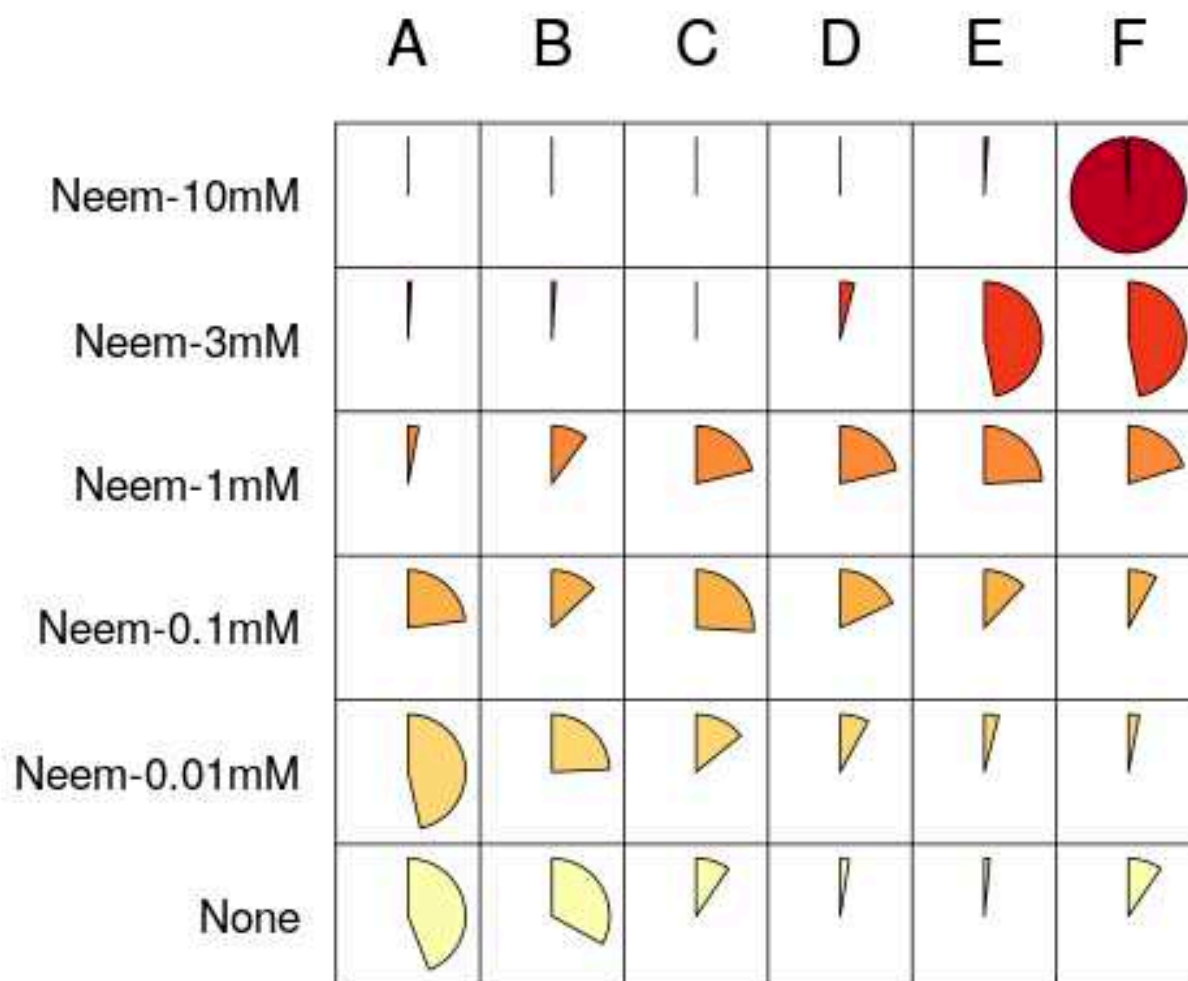
The estimation of the proportions of each feeding type in each treatment \hat{p}_i^w were performed as described in (Sanane et al. 2020) using the predicted mean values $\hat{I}^w + \hat{\alpha}_i^w$. Predicted mean values were computed by pre-multiplying the coefficient matrix $\hat{\beta}$ by the design matrix L . For the Neemazal treatment, the L matrix is contained into the `Lmat_neem.csv` file in the `Rscripts` directory. The R script reads the contrast matrix as:

```
Lmat <- read.table("Lmat_neem.csv",header=TRUE,sep=",")
rownames(Lmat) <- Lmat[,1]
Lmat <- Lmat[,-1]
colnames(Lmat) <- colnames(beta)
Lmat <- as.matrix(Lmat)
print(Lmat)

##           (Intercept) concn1 concn2 concn3 concn4 concn5
## Neem-10mM           1      0      0      0      0      1
## Neem-3mM            1      0      0      0      1      0
## Neem-1mM            1      0      0      1      0      0
## Neem-0.1mM          1      0      1      0      0      0
## Neem-0.01mM         1      1      0      0      0      0
## None                1      0      0      0      0      0

lsmeans <- Lmat%*%t(beta)
```

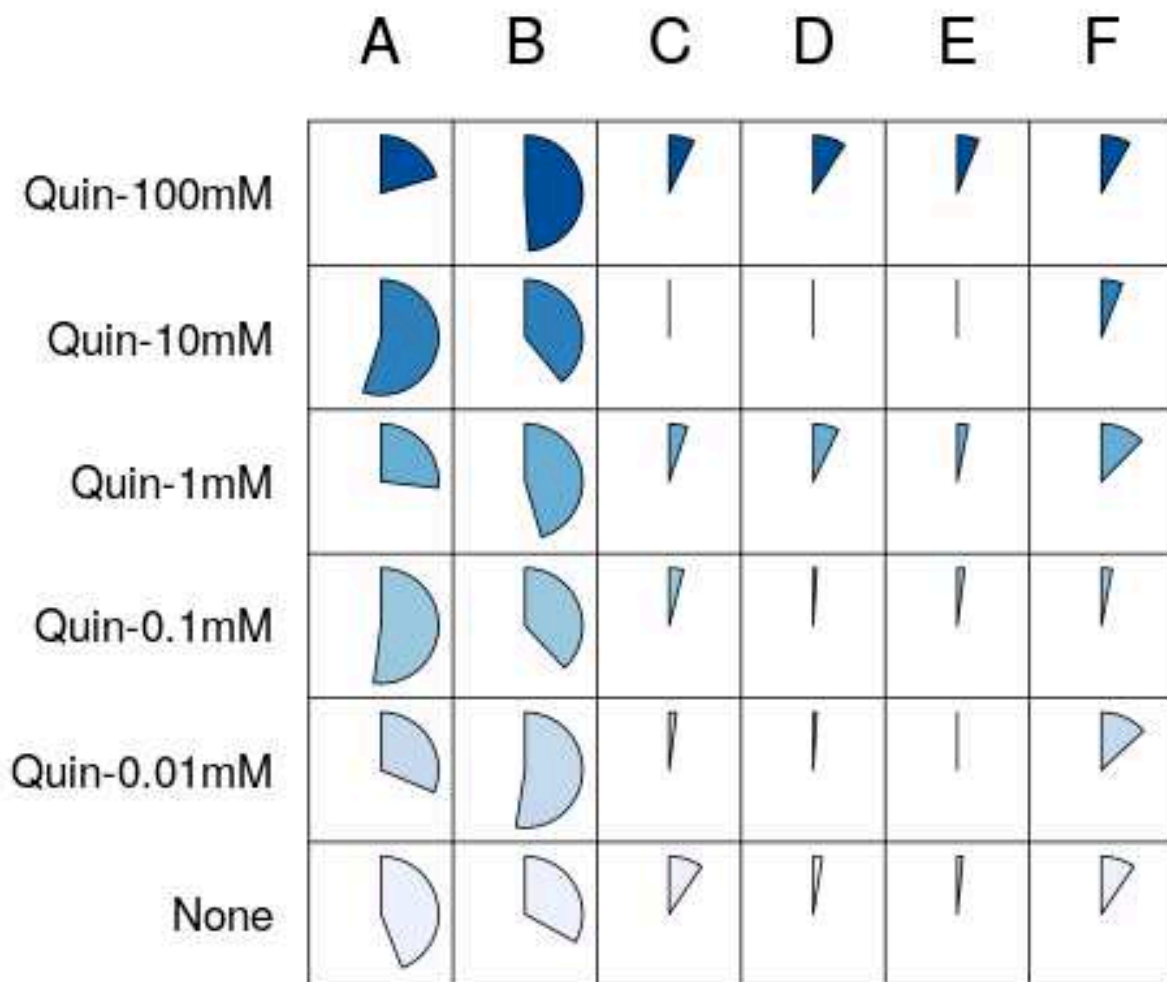
A graphical output is also embedded into the R script. It shows the estimated proportion of each feeding type for each treatment in the form of piecharts:



Estimated proportion of each lepidoptera larvae feeding type as a function of the Neemazal concentration in the maize leaf disks Each row corresponds to the treatment of maize leaf disks with one concentration of Neemazal diluted into water. The colour code, from yellow to red, indicates increasing Neemazal concentrations. Each column represents one feeding type. The A and B feeding types are *consumers*, while the E and F feeding types are *haters* and the C, D feeding types are *reluctants*.

For the Neemazal treatment, data clearly show that when the Neemazal concentration increases, the behaviour of the lepidoptera larvae changes, and they become more and more reluctant to feed on the maize leaf disk. At 10mM Neemazal, the feeding type of the larvae is almost exclusively E and F, with almost no feeding. The increase of intermediate feeding types at intermediate Neemazal concentrations shows that the bioassay can be used for a quantitative assessment of the feeding behaviour.

As a comparison, the results for the Quinine bioassay are reported below:



Estimated proportion of each lepidopera larvae feeding type as a function of the Quinine concentration in the maize leaf disks Each row corresponds to the treatment of maize leaf disks with one concentration of Quinine diluted into water. The colour code, from yellow to red, indicates increasing Neemazal concentrations. Each column represents one feeding type. The A and B feeding types are *consumers*, while the E and F feeding types are *haters* and the C, D feeding types are *reluctants*.

In the Quinine bioassay, the treatment effect is hardly significant, except that the treatment with highest concentration of Quinine (100 mM) seems to be enriched with intermediate feeding types. However, because of a too small number of replicates, differences are not significant.

References

- Escofier, Brigitte, and Jérôme Pagès. 2008. *Analyses Factorielles Simples et Multiples ; Objectifs, Méthodes et Interprétation*. Edited by Paris. Dunod.
- Gower, J. C., and D. J. Hand. 1996. *Biplots*. Edited by Chapman & Hall.
- Hirofugu, Akaike. 1974. “A New Look at the Statistical Model Identification.” *IEEE Transactions on Automatic Control* 19 (6): 716–23. doi:10.1109/TAC.1974.1100705.
- Sanane, Inoussa, Judith Legrand, Christine Dillmann, and Frédéric Marion-Poll. 2020. “An Semi-Automated Design for High-Throughput Lepidoptera Larvae Feeding Bioassays,” july. doi:en cours d’écriture.
- UCLA, Statistical Consulting Group. 2020. “Multinomial Logistic Regression | R Data Analysis Examples.” Accessed July 14. <https://stats.idre.ucla.edu/r/dae/multinomial-logistic-regression/>.
- Venables, W. N., and B. D. Ripley. 2002. *Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition*. Edited by Springer.

Titre : Composantes de la dynamique de l'interaction entre le maïs et les insectes lépidoptères foreurs de tige

Mots-clés : Relations insectes-plantes, traits d'histoire de vie, métabolisme et dynamique des populations.

Résumé : Les dégâts causés par les larves des lépidoptères foreurs de tige comme la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* Hbn constituent l'une des contraintes majeures à la production de maïs. La sélection de variétés résistantes ou tolérantes à ces ravageurs est l'un des moyens de lutte contre les infestations naturelles. Pour identifier ces variétés, j'ai mis au point une méthode originale permettant d'évaluer, à grande échelle et de façon non destructive, l'appétence des larves de pyrale pour des feuilles de maïs. La vitesse de consommation des larves, mesurée au laboratoire à partir de disques foliaires prélevés sur des plantes vivantes, est utilisée comme un proxy du niveau de défense des plantes. J'ai démontré que les larves de pyrale ont des comportements variables lorsqu'elles sont mises en présence d'un disque foliaire de maïs, et qu'il est possible d'établir une typologie de leurs comportements alimentaires, avec une graduation allant de la consommation rapide et entière du disque à l'absence totale de consommation. Chaque variété peut ainsi être caractérisée de façon reproductible par la fréquence de chacun des types de comportement alimentaire. Après avoir validé ce dispositif par l'étude des variations de comportements alimentaires des larves en présence de différentes concentrations de substances antiappétentes, je

l'ai utilisé sur différents jeux de données. Tout d'abord, j'ai comparé des génotypes précoces et tardifs issus d'une expérience de sélection divergente pour la précocité de floraison. Je montre que les génotypes les plus contrastés pour la date de floraison, descendants par sélection et autofécondation de la lignée de maïs MBS, présentent des différences importantes à la fois pour l'appétence des larves pour les feuilles, pour la prévalence des larves sur les plantes au champ, et pour la qualité des parois cellulaires. Les génotypes MBS précoces sont plus appétents, plus attaqués et plus tendres que leurs homologues tardifs. Ces résultats confortent l'existence chez le maïs, d'un compromis entre croissance et défense. Enfin, le test de consommation a été appliqué à panel de 18 lignées de maïs déjà décrites pour un ensemble de traits liés au métabolisme et à la physiologie des plantes. L'étude confirme l'existence, au sein du panel, d'une grande variabilité entre lignées pour l'appétence des larves de pyrale et permet d'identifier des caractéristiques métaboliques des lignées corrélées aux variations des types de comportements alimentaires. Dans l'ensemble, cette étude ouvre la voie vers de nouvelles approches pour mieux comprendre les interactions plantes-insectes ravageurs.

Title: Components of the dynamics of interaction between maize and lepidoptera stem borers

Key-words: Plant-insect relation, life-history traits, metabolism and population dynamics.

Abstract : Damages caused by maize stem borers like the corn borer *Ostrinia nubilalis* Hbn can engender considerable yield reductions. A way to reduce the damages is to select resistant or tolerant maize varieties. I set-up an original highthroughput and non-destructive method to screen maize varieties for the feeding of young insect larvae. It consists in monitoring the feeding of single larvae on fresh maize leaf disks, and using the consumption speed as a proxy for the level of plant defenses. I showed that larvae exhibit variable feeding behaviours, and developed a statistical method to establish a typology of feeding behaviours, with a graduation between the fast and full consumption of the leaf disk and the absence of consumption. Each maize variety can be reproductively characterized by the frequency of each feeding behaviour. The method was validated by studying the variations of feeding behaviours in response to different concentrations of a known antifeedant molecule, and applied on different datasets. First, I compared early and late maize genotypes resulting from a divergent selection experiment

for flowering time. I showed that the genotypes that differed the most for flowering time and that descended, through selection and selfing, from the inbred line MBS, also showed important differences concerning both feeding behaviours, larvae prevalence in the field, and the quality of plant cell walls. Early MBS genotypes are consumed faster in the feeding test, show a higher larvae prevalence in the field, and exhibit softer green parts than late genotypes from the same ancestor line. Those results strongly suggest the existence of a trade-off between growth and defense. Finally, the consumption test was applied to a diversity panel of 18 maize inbred lines, already described for series of traits linked to plant physiology and metabolism. I showed that the panel lines exhibited a large genetic variability for the feeding behaviour of corn-borer larvae and identified metabolic characteristics of the inbred lines that correlate with the variation of feeding behaviours. Altogether, those results open the way for a better-understanding of plant-insect relationships.