



HAL
open science

Adaptation des systèmes olfactifs de mouches des fruits Tephritidae à leur gamme de fruits hôtes

Gaëlle Ramiaranjatovo

► **To cite this version:**

Gaëlle Ramiaranjatovo. Adaptation des systèmes olfactifs de mouches des fruits Tephritidae à leur gamme de fruits hôtes. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2023. Français. NNT : 2023LARE0003 . tel-04723163

HAL Id: tel-04723163

<https://theses.hal.science/tel-04723163v1>

Submitted on 7 Oct 2024

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.

Université de La Réunion

Ecole Doctorale Sciences, Technologie et Santé (STS, ED 542)

Unité Mixte de Recherche

Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (UMR PVBMT)

THESE

pour l'obtention du grade Docteur en Sciences

Spécialité : Ecologie et évolution

Par **Gaëlle RAMIARANJATOVO**

Adaptation des systèmes olfactifs de mouches des fruits Tephritidae à leur gamme de fruits hôtes

Thèse soutenue publiquement le 24 mars 2023 devant le jury composé de :

Anne Bialecki , Professeure Université de La Réunion	Présidente du jury
Anne-Marie Cortesero , Professeure Université de Rennes 1	Rapporteure
Emmanuelle Jacquin-Joly , Directrice de recherche, INRAE Versailles	Rapporteure
Sébastien Lebreton , IRSEA, Apt	Examineur
Bernard Reynaud , Professeur Université de La Réunion	Directeur de thèse
Vincent Jacob , CIRAD La Réunion	Co-encadrant de thèse

Cette thèse a reçu le soutien financier de la Région Réunion et de l'Union Européenne – Fonds européen de développement régional (FEDER), dans le cadre du Programme Opérationnel européen INTERREG V – 2014-2020



Remerciements

Par ces quelques lignes de remerciements, je tiens à exprimer mes sincères reconnaissances à toutes les personnes qui m'ont accompagné de près ou de loin, et qui ont rendu possible ce voyage de la thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier Anne-Marie Cortesero et Emmanuelle Jacquin-Joly d'avoir évalué mon travail et d'avoir accepté d'être rapporteuses de ma thèse. Je remercie également Sébastien Lebreton en sa qualité d'examineur et Anne Bialecki de présider le jury de la soutenance.

Je remercie Philippe Lucas, Nicolas Barthes, Pierre-François Duyck et Lala Harivelo Ravaomanarivo pour les échanges durant les comités de thèses.

Ensuite, je tiens particulièrement à témoigner ma gratitude à mes encadrants de thèse Bernard Reynaud et Vincent Jacob. Je remercie Bernard Reynaud de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Je suis également profondément reconnaissante envers Vincent Jacob pour sa patience infinie et le temps considérable qu'il a consacré à mon accompagnement et à ma formation durant ces années de thèse. Je le remercie pour sa générosité, notamment en matière de partage de connaissances et pour les nombreux moments d'apprentissage précieux qu'il m'a offerts. Notre collaboration a toujours été marquée par la bienveillance et le respect, ce qui m'a aidé à me surpasser pour arriver jusqu'ici.

Mes sincères remerciements à toute l'équipe de l'UMR PVBMT, CIRAD 3P de La Réunion où j'ai réalisé mes recherches. Je cite particulièrement, l'équipe de direction dont le directeur du laboratoire Bernard Reynaud, Samuel Nibouche et Hélène Delatte ; l'équipe administrative : Virginie Gache-Boulo, Magalie Leclair de Bellevue, Chantal Terrentroy et Océane Désiré. J'adresse également mes sincères remerciements à mes collègues Serge Glenac et Jim Payet d'avoir assuré l'élevage de mouches des fruits et de m'avoir mis à disposition des cohortes à chaque fois que j'en ai eu besoin. Merci aussi pour les bonnes discussions et votre aide pour les sorties terrains. Je remercie Antoine Franck pour la jolie photo de montage d'électroantennographie triple. Aussi, je remercie tous les stagiaires qui ont travaillé avec moi, je pense notamment à Robin Comte, Theodor Lieby, Théo Constantini et Eva Hoarau.

Je remercie également toute l'équipe de l'université de La Réunion et de l'école doctorale STS, en citant particulièrement Alain Bastide, directeur de l'école doctorale ainsi que Maria Mossadaq et Jessica Vellaidon.

I would like to thank Teun Dekker and Sebastian Larsson Herrera for your warm welcome in your laboratory at the Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Alnarp, Sweden. It was a pleasure to work with you and I thank you for giving me opportunity to learn about multi-channel olfactometer. I also thank Chaymae Fennine for your kindness and all your help in the lab and during my stay in Sweden.

Sur le plan un peu plus personnel, je tiens à remercier tous mes amis pour leur soutien et les bons moments passés ensemble. Gaëlle, je te remercie pour toute ton aide depuis que je suis à La Réunion, et surtout pour cette belle amitié que l'on a développée. Je te remercie pour tes encouragements et aussi ta relecture de mon manuscrit. On se soutient depuis le début de la thèse et nous voilà enfin à la fin de l'aventure. Emma, je suis tellement heureuse que nous ayons développé une amitié forte en plus d'être collègues. Je te souhaite à ton tour plein de succès pour ta thèse. Christelle, ma coloc et ma grande sœur de cœur, merci pour ton soutien et les bons moments qu'on a passés ensemble à Mont-Vert. A Mirana, Cathucia, Hasina et Véronique, un grand merci pour votre amitié et aussi pour nos bonnes discussions de la vie en malgache, « soa ny fiarahantsika ! ». Je remercie également mes amis et collègues doctorants Benoît, Marine, Roxanne et Sélim.

Un remerciement spécial pour mes parents et mon frère, pour leur amour inconditionnel malgré la distance. Vos sacrifices et vos encouragements sans réserve m'ont donné la force de persévérer dans les moments les plus difficiles et je vous en suis très reconnaissante. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est en grande partie grâce à vous.

Enfin, je ne peux terminer mes remerciements sans adresser toute ma gratitude à toi Thibaud. Tout ton amour et ta compréhension sont inestimables pour moi. Tu m'as apporté tout ton soutien sur tous les plans dans la réalisation de cette thèse et tes encouragements au quotidien ont vraiment signifié beaucoup pour moi. Aussi, je suis tellement reconnaissante d'avoir une personne merveilleuse dans ma vie qui croit en moi. Je t'aime plus que les mots ne peuvent le dire.

Table des matières

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale..... 2

CHAPITRE 1

Le rôle de la perception olfactive de l'environnement chimique dans l'écologie des insectes 7

1.1. Présentation du chapitre 7

1.2. Processus de la sélection d'hôte chez les insectes phytophages 8

1.3. Les substances sémiachimiques, signaux olfactifs pour les insectes 9

1.3.1. Substances sémiachimiques impliquées dans les interactions intraspécifiques. 10

1.3.2. Substances sémiachimiques impliquées dans les interactions interspécifiques. 12

1.4. Le système olfactif périphérique des insectes : description et mécanismes évolutifs... 14

1.4.1. Description anatomique et fonctionnelle des organes olfactifs périphériques... 14

1.4.1.1. Les antennes 14

1.4.1.2. Les sensilles..... 16

1.4.1.3. Les neurones récepteurs olfactifs (ORNs) 20

1.4.2. Les récepteurs membranaires des neurones récepteurs olfactifs..... 20

1.4.2.1. Les récepteurs olfactifs (ORs)..... 20

1.4.2.2. Les récepteurs ionotropiques (IRs) 21

1.4.3. Processus de perception des molécules au niveau périphérique 21

1.4.4.	Mécanisme d'évolution du système olfactif.....	22
1.4.4.1.	Diversité morphologiques des antennes et des sensilles olfactives	23
1.4.4.2.	Evolution des récepteurs olfactifs	24

CHAPITRE 2

Les mouches des fruits Tephritidae, ravageurs des cultures fruitières et maraichères nécessitant une gestion intégrée

28

2.1.	Présentation du chapitre	28
2.2.	Biologie et écologie des mouches des fruits	29
2.2.1.	Systématique	29
2.2.2.	Cycle de vie	29
2.2.3.	Implication des substances sémiochimiques dans le cycle de vie des mouches des fruits	32
2.3.	Les mouches des fruits dans la zone SOOI et à La Réunion.....	35
2.3.1.	Les espèces invasives dans la zone SOOI.....	35
2.3.2.	Les espèces invasives à La Réunion	35
2.3.2.1.	Description des espèces étudiées.....	35
2.3.2.2.	Recouvrement des gammes d'hôtes des mouches des fruits à La Réunion	41
2.4.	Méthodes de lutte contre les mouches des fruits.....	42
2.4.1.	Méthodes basées sur la lutte chimique conventionnelle	43
2.4.2.	Méthodes de lutte basées sur l'olfaction des insectes	43
2.4.2.1.	Attract and kill.....	44
2.4.2.2.	Push pull ou la stratégie de détournement stimulo-dissuasif	45
2.4.2.3.	Confusion sexuelle	46

2.4.3. Méthodes de lutte non basées sur l'olfaction	46
2.4.3.1. Méthodes de lutte mécanique	46
2.4.3.2. Technique de l'insecte stérile ou lutte autocide (TIS).....	47
2.4.3.3. La lutte biologique	47

CHAPITRE 3

Les méthodes en écologie chimique pour étudier les réponses olfactives des mouches des fruits.....

3.1. Présentation du chapitre	50
3.2. Méthodes d'identification des composés sémiologiques	51
3.2.1. Méthodes d'échantillonnage des composés volatils.....	51
3.2.2. Technique d'analyse chromatographie en phase gazeuse couplée à spectromètre de masse	53
3.2.2.1. La séparation sur colonne.....	53
3.2.2.2. L'injecteur	54
3.2.2.3. Le détecteur	54
3.3. Mesure des réponses physiologiques antennaires aux composés volatils par électroantennographie	55
3.3.1. L'électroantennographie (EAG).....	55
3.3.2. Le couplage chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur d'électroantennographie	56
3.4. Mesure des réponses comportementales aux composés volatils.....	57
3.4.1. Tests comportementaux en conditions contrôlées.....	57
3.4.2. Tests comportementaux en conditions semi-contrôlées.....	62
3.4.3. Les essais en plein champs	62

3.5. Article 1 : Amélioration de la mesure des réponses antennaires des mouches des fruits par électroantennographie triple.....	63
3.5.1. Présentation et résumé de l'article.....	63
3.5.2. Article 1.....	65

CHAPITRE 4

Stratégies d'adaptation olfactive périphérique des mouches des fruits à leur gamme de fruits hôtes.....

77

4.1. Présentation du chapitre	77
4.2. Article 2 : Stratégie olfactive périphérique des mouches des fruits généralistes dans la perception de leurs fruits hôtes.....	78
4.2.1. Présentation et résumé de l'article.....	78
4.2.2. Article 2.....	82
4.3. Les corrélations phylogénétiques des émissions volatiles de fruits sont susceptibles de servir de base à la spécialisation chez les Tephritidae	107
4.3.1. Présentation de l'étude	107
4.3.2. Démarches méthodologiques et analytiques	108
4.3.3. Résultats	109
4.3.3.1. Phylogénie des fruits et degré de corrélation phylogénétique.....	109
4.3.3.2. Les composés corrélés à la phylogénie sont identifiés.....	112
4.3.4. Discussion	116

CHAPITRE 5

Discussion générale et perspectives.....	120
---	------------

5.1. Adaptation du système olfactif des mouches des fruits à la gamme d'hôte, à la polyphagie	120
5.1.1. Evolution moléculaire des systèmes olfactifs périphériques.....	120
5.1.1.1. La pression de sélection associée à la gamme d'hôte modifie les comportements olfactifs	121
5.1.1.2. La pression de sélection associée à la gamme d'hôte modifie les systèmes olfactifs périphériques	122
5.1.2. Evolution fonctionnelle des systèmes olfactifs	124
5.2. Les méthodologies qui se développent actuellement, susceptibles de faire ouvrir de nouveaux champs de recherches	125
5.3. Stratégie de recherche de leurre de mouche des fruits en se basant sur les mécanismes évolutifs de leur système olfactif	127
5.3.1. Intérêt et limite de l'étude du système olfactif pour la recherche de leurre	128
5.3.2. Intérêt de l'étude de l'évolution du système olfactif pour la recherche de leurre ..	129
Références bibliographiques	133
Annexes	168
Annexe 1 : Article sur les phéromones de la mouche du melon <i>Zeugodacus cucurbitae</i> ..	168
Annexe 2 : Signal phylogénétique des composés des fruits intacts et fruits coupés selon les indices C_{mean} d'Abouheif, λ de Pagel et K de Bloomberg.....	206
Annexe 3 : Analyse GC-EAD ₃ sur les différentes espèces de mouches des fruits étudiées avec l'émission volatile de mangues mûres et de goyaviers.	207
Annexe 4 : Valorisation des résultats de recherche.....	208

Résumé 210

Abstract 211

Liste des figures

Figure 1 : Les différents types de substances sémiologiques	10
Figure 2 : Représentation très simplifiée du processus de perception des odeurs chez les insectes	15
Figure 3 : Différents exemples de morphologie d'antenne d'insecte.....	16
Figure 4 : Les principaux types de sensilles.....	17
Figure 5 : Carte de distribution moyenne des différents types de sensilles olfactives chez <i>Drosophila melanogaster</i> (Dmel) et différentes espèces de Tephritidae.	19
Figure 6 : Modèle d'évolution génétique « birth and death »	25
Figure 7 : Cycle biologique de mouches des fruits	31
Figure 8 : Dégâts de mouches des fruits sur des fruits de mangue.	32
Figure 9 : Mâle et femelle adultes de <i>Bactrocera dorsalis</i>	36
Figure 10 : Mâle et femelle adultes de <i>Bactrocera zonata</i>	37
Figure 11 : Mâle et femelle adultes de <i>Ceratitidis capitata</i>	37
Figure 12 : Mâle et femelle adultes de <i>Ceratitidis catoirii</i>	38
Figure 13 : Mâle et femelle adultes de <i>Ceratitidis quilicii</i>	39
Figure 14 : Mâle et femelle adultes de <i>Dacus demmerezi</i>	39
Figure 15 : Mâle et femelle adultes de <i>Neoceratitidis cyanescens</i>	40
Figure 16 : Mâle et femelle adultes de <i>Zeugodacus cucurbitae</i>	40
Figure 17 : Le premier olfactomètre en Y développé par McIndoo (1926).....	59
Figure 18 : Photos d'un olfactomètre à 6 voies développé par Biasazin et al. (2018b).....	60
Figure 19 : Schéma d'un dispositif expérimental <i>flywalk</i> développé par Steck et al. (2012) ..	61
Figure 20 : Signal phylogénétique des fruits intacts et fruits coupés.....	111

- Figure 21 : Arbre phylogénétique des 28 espèces de fruits étudiées et résultats du pPCA pour les composés volatils des fruits intacts et des fruits coupés 113
- Figure 22 : Représentation graphique des principaux composés volatils des fruits intacts et des taxons des fruits suivant les axes PC1 et PC2, PC3 et PC4 de la structure globale..... 114
- Figure 23 : Représentation graphique des principaux composés volatiles des fruits coupés et des taxons des fruits suivant les axes PC1 et PC2, PC3 et PC6 et PC5 115
- Figure 24 : Analyse GC-EAD₃ sur les différentes espèces de mouches des fruits étudiées avec l'émission volatile de mangues en début de murissement 124

Liste des abréviations

3P	Pôle de Protection des Plantes
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AIC	Akaike Information Criterion ou critère d'information d'Akaike
CIRAD	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CL	Cue-lure
CSD	Current Source Density ou densité de la source de courant
CSP	ChemoSensory Protein ou protéine chimiosensorielle
d_N	Divergence ou mutation Non-synonyme
d_s	divergence ou mutation Synonyme
EAG	Electroantennographie
EAG₃	Electroantennographie Triple
FID	Flame Ionization Detector ou détecteur à ionisation de flamme
GAMOUR	Gestion Agroécologique des MOUches des légumes à La Réunion
GC	Gas Chromatograph ou chromatographie en phase gazeuse
GC-EAD	Chromatographie en phase gazeuse couplée avec un détecteur d'électroantennographie
GC-EAD₃	Chromatographie en phase gazeuse couplée avec un détecteur d'électroantennographie triple
GPC	Global Principal Component ou composante principale de la structure globale
HC	Hydrocarbure cuticulaire
HMP	Host-Marking Pheromone ou phéromone de marquage d'hôtes
IBiSA	Infrastructure Biologie, Santé et Agronomie
IF	Intact Fruit ou fruit intact

INRAE	Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement
IPM	Integrated Pest Management ou protection intégrée des cultures
IR	Ionotropic Receptor ou récepteur ionotrope
LPC	Local Principal Component ou composante principale de la structure locale
MAT	Male Annihilation Technique ou technique d'annihilation des mâles
MCMC	Monte Carlo à chaîne de Markov
ME	Méthyl eugénol
MS	Mass Spectrometer ou spectromètre de masse
OBP	Odorant-Binding Protein ou protéine liant les odeurs
OR	Olfactory Receptor ou récepteur olfactif
Orco	OR coreceptor ou co-récepteur
ORN	Olfactory Receptor Neuron ou neurone récepteur olfactif
PBP	Pheromone-Binding Protein protéine liant les odeurs
PC	Principal component ou composante principale
pPCA	Phylogenetic Principal Component Analysis
RK	Raspberry ketone
SF	Sliced Fruit ou fruit coupé
SLU	Université Suédoise des Sciences Agricoles
SOOI	Sud-Ouest de l'Océan Indien
SPME	Solid Phase MicroExtraction ou extraction par microextraction en phase solide
SSR	Single Sensillum Recording ou enregistrement monosensillaire
TIS	Technique de l'Insecte Stérile
TML	Trimedlure
UMR PVBMT	Unité Mixte de Recherche Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical

Introduction générale

Introduction générale

Bien que les insectes jouent des rôles très importants dans les écosystèmes naturels, certains d'entre eux portent préjudices à l'homme puisqu'ils peuvent causer des dommages aux plantes ou aux cultures d'intérêt, devenant ainsi des ravageurs. La perte en production agricole annuelle associée aux insectes ravageurs est estimée en moyenne entre 18 à 26% au niveau mondial, ce qui représente une valeur de plus de 470 milliards de dollars (Oerke 2006; Culliney 2014). Depuis toujours, la protection des cultures contre les espèces de ravageurs constitue un défi permanent pour les agriculteurs. Ainsi pour réduire la pression exercée par ces ravageurs, beaucoup adoptent une méthode de lutte basée sur l'utilisation des produits chimiques de synthèse. De plus, avec le développement de l'industrie chimique de synthèse au milieu du 20ème siècle, ces produits ont connu une utilisation et une application massive du fait de leur efficacité et de leur facilité d'emploi (Deguine et al., 2016). Cependant, force est de constater que les effets de la lutte chimique sont désastreux pour l'environnement en perturbant l'équilibre naturel de l'écosystème, mais également pour les hommes et les animaux qui sont exposés à des risques sanitaires importants (Stern et al., 1959; Carson, 1962; Edwards & Thompson, 1975; Desneux et al., 2007; Barzman et al., 2015; Furio et al., 2015).

Une prise de conscience a conduit aujourd'hui au développement de méthodes de lutte plus respectueuses de l'environnement comme le biocontrôle. Celui-ci se définit comme étant un ensemble de méthodes de protection de plantes impliquant des agents de biocontrôle favorisant les mécanismes de régulation naturels. Cette approche intègre quatre points principaux dont i) l'utilisation de macroorganismes auxiliaires tels que les insectes, les acariens ou les nématodes ; ii) l'utilisation de microorganismes comme les champignons, les bactéries ou les virus ; iii) l'utilisation de substances naturelles d'origine végétale, animale ou minérale ; iv) l'utilisation des médiateurs chimiques qui sont les phéromones d'insectes ou les kairomones (Herth, 2011). C'est ce dernier point qui fait l'objet de cette thèse.

De nos jours, de nombreuses méthodes de lutte pour la protection des cultures se sont développées en se basant sur des médiateurs chimiques. Bien que l'utilisation de phéromones attirant les mâles ait toujours été privilégiée du fait de leur sélectivité élevée, les composés volatils des plantes trouvent leurs succès de par le fait qu'ils peuvent être utilisés pour contrôler les comportements des insectes phytophages femelles dans la localisation d'hôte. Cette catégorie de composés est donc très intéressante pour contrôler les ravageurs dont les dégâts directs sont provoqués par les individus femelles. Toutefois, les méthodes de lutte basées sur l'utilisation des composés volatils d'hôte ne sont pas encore bien développées et c'est dans ce cadre que s'inscrit ce projet de thèse.

Ce projet de thèse vise à contribuer à la gestion agroécologique des mouches des fruits (Diptera : Tephritidae) qui sont parmi les principaux ravageurs de nombreuses cultures légumières et fruitières dans le monde. En effet ces cultures végétales sont importantes puisqu'elles permettent d'équilibrer les besoins nutritionnels et sont sources d'opportunités économiques pour les populations, notamment dans les pays en voie de développement (Weinberger & Lumpkin, 2007). Cependant, les dégâts dus aux espèces de mouches des fruits sur ces cultures sont très importants et augmentent avec l'invasion de nouvelles espèces. C'est par exemple le cas des îles du sud-ouest de l'océan Indien (SOOI) qui ont connu l'invasion récente de *Bactrocera dorsalis*, une espèce très compétitive et polyphage (c'est-à-dire se nourrissant de plusieurs espèces de fruits hôtes différents). Ainsi, plusieurs régions sont actuellement soumises à des quarantaines et ont perdu leur capacité d'export (Ekesi et al., 2016). Les femelles des mouches des fruits sont attirées par les fruits hôtes, y pondent et les larves causent des dommages aux fruits. Cette thèse a comme finalité d'identifier de nouveaux attractifs basés sur les composés volatils des fruits hôtes pour piéger les femelles de plusieurs espèces de mouches des fruits. Cela requiert une connaissance approfondie des interactions entre les mouches des fruits et leurs environnements, médiées par l'olfaction.

Préalablement au démarrage de cette thèse, plusieurs laboratoires ont cherché des composés de fruits-hôtes susceptibles de piéger *Bactrocera dorsalis* (Siderhurst & Jang, 2006; Kamala Jayanthi et al., 2012, 2014; Biasazin et al., 2014). Cependant, les composés identifiés dans ces travaux n'ont pas abouti à un piège efficace pour cette espèce. Devant ce constat d'échec, nous avons souhaité adopter une nouvelle approche conceptuelle. *Bactrocera dorsalis* est une espèce polyphage qui infeste une très grande quantité de fruits différents, et les études citées ont ciblé les émissions d'un seul, ou de peu de fruits : mangue, goyave, badamier. A l'inverse, nous avons souhaité nous confronter à cette polyphagie. Pour cela, nous avons considéré l'aspect évolutif des systèmes olfactifs pour déterminer comment celui-ci s'est adapté à la polyphagie. Cela nous a amené à étudier les émissions non pas d'une, mais de 28 espèces de fruits différentes. Cela nous a également amené à étendre nos travaux à sept autres espèces de Tephritidae également ravageurs de culture, en plus de *Bactrocera dorsalis*. Cette approche fait l'originalité de la thèse et permet également d'apporter plus de connaissance sur l'écologie sensorielle des mouches des fruits, son évolution et ses corollaires comportementaux.

Ainsi, nous avons posé les questions suivantes afin de mieux orienter nos recherches :

- Quelles informations sur les fruits émetteurs, utiles au choix des fruits hôtes, les mouches des fruits reçoivent-elles de chaque composé ?
- Quelles stratégies olfactives les mouches des fruits utilisent-elles pour percevoir leurs fruits hôtes ?

- Peut-on formuler un attractif à base de composés volatils de plusieurs fruits, dont l'attractivité est compétitivement supérieure aux fruits qui se trouvent en production dans les vergers ?

Pour apporter des éléments de réponses à ces questions, nous avons donc émis trois objectifs principaux, qui sont de :

- Estimer dans quelle mesure chaque composé de fruits peut contribuer à l'identification des hôtes en étudiant la diversité des fruits émetteurs ;
- Tester si les réponses olfactives des mouches des fruits sont sélectives à certains composés selon la diversité et la nature des fruits émetteurs ;
- Tester le potentiel d'attraction de mélanges de composés pour le biocontrôle des mouches des fruits.

La démarche adoptée dans cette thèse implique l'étude de l'écologie chimique des mouches des fruits. L'écologie chimique peut se définir comme étant la science qui étudie les rôles écologiques des substances sémiochimiques régissant les interactions entre un organisme vivant et son environnement. Ces interactions impliquent un organisme émetteur qui synthétise et libère les substances sémiochimiques. Ces dernières se propagent dans l'environnement et sont perçues par les récepteurs sensoriels d'un organisme récepteur traduisant ces messages chimiques en réponse qui peut être comportementale. Pour étudier ces interactions, il est donc nécessaire d'utiliser une approche pluridisciplinaire. Dans le cadre de cette thèse, j'ai utilisé et participé au développement d'outils d'analyse chimique des émissions de fruits, d'analyse neurophysiologique de l'olfaction de l'insecte, ainsi que d'analyse éthologique des comportements d'orientation olfactive des insectes. En particulier, nous avons eu un objectif de développement méthodologique afin d'améliorer la mesure de la sensibilité olfactive des mouches de fruits par rapport aux pratiques actuelles des laboratoires d'écologie chimique.

Cette thèse s'est déroulée au sein de l'Unité Mixte de Recherche Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en milieu tropical (UMR PVBMT) dans le laboratoire d'écologie terrestre et de lutte intégrée de la plateforme IBiSA (Infrastructure Biologie, Santé et Agronomie) du Pôle de Protection des Plantes (3P) du CIRAD à La Réunion. Le laboratoire est équipé de chromatographe en phase gazeuse avec un désorbeur thermique, d'un spectromètre de masse et d'une poste d'électrophysiologie. La présence d'élevage de plusieurs espèces de mouches des fruits au 3P nous a permis de faire des analyses interspécifiques sur nos espèces modèles.

Ce manuscrit de thèse se subdivise en cinq chapitres. Le premier chapitre constitue une synthèse bibliographique sur la perception olfactive et l'adaptation des insectes à l'environnement chimique. Le deuxième chapitre se concentre sur le modèle d'étude, les mouches des fruits Tephritidae et leur gestion intégrée. Le troisième chapitre décrit les

méthodes utilisées en écologie chimique pour étudier les interactions insectes-plantes, et comporte également un article portant sur les développements méthodologiques que nous avons mis en place au cours de la thèse et qui a été publié dans *Journal of Neuroscience Method*. Le chapitre 4 est un chapitre de résultats sur les stratégies d'adaptation olfactive périphérique des mouches des fruits à leur gamme de fruits-hôtes. Il comporte un article sur les stratégies olfactives périphériques des mouches des fruits généralistes dans la perception de ses fruits hôtes, article qui n'a pas encore été soumis à publication. Il comporte également des résultats sur les corrélations phylogénétiques des émissions volatiles de fruits qui sont susceptibles de servir de base à la spécialisation chez les Tephritidae. Ces travaux nécessitent d'être complétés par une étude comportementale avant de pouvoir faire l'objet d'une publication. Le dernier chapitre est un chapitre de discussion générale et de perspectives. Enfin, j'ai également participé en marge de cette thèse à une étude sur les phéromones de la mouche du melon *Zeugodacus cucurbitae*. Cette étude a débouché sur un article, soumis à publication, où je suis deuxième auteure, et qui a été joint en annexe 1.

CHAPITRE 1

*Le rôle de la perception olfactive de
l'environnement chimique dans l'écologie
des insectes*

CHAPITRE 1

Le rôle de la perception olfactive de l'environnement chimique dans l'écologie des insectes

Contenu

1.1. Présentation du chapitre	7
1.2. Processus de la sélection d'hôte chez les insectes phytophages	8
1.3. Les substances sémiachimiques, signaux olfactifs pour les insectes	9
1.4. Le système olfactif périphérique des insectes : description et mécanismes évolutifs.....	14

1.1. Présentation du chapitre

Afin d'interagir avec l'environnement, les insectes impliquent leurs systèmes sensoriels pour discriminer les informations utiles dans un environnement complexe. En effet, l'environnement, qui est en constante évolution, génère divers stimuli. Parmi ces stimuli, les stimuli chimiques jouent des rôles primordiaux dans les interactions intra- et interspécifiques des insectes et les interactions insectes-plantes. Les insectes intègrent ces stimuli chimiques grâce à leurs systèmes chimiosensoriels, l'olfaction et la gustation. Le système olfactif permet la détection des composés volatils dans l'environnement tandis que le système gustatif permet la perception des composés par contact, incluant des composés non-volatils. Le système olfactif est d'une importance cruciale étant donné qu'il est impliqué dans plusieurs comportements primaires des insectes notamment dans la reproduction, la recherche de nourriture, l'interaction entre les individus apparentés et les comportements de fuite ou d'évitement. En particulier, les insectes ont besoin de localiser un hôte adéquat en s'aidant des substances sémiachimiques émises par ce dernier.

Ce premier chapitre contient donc une synthèse bibliographique décrivant le processus de la sélection d'hôtes par les insectes, les différentes substances sémiachimiques de l'environnement et leurs fonctions. Il intègre également l'organisation, l'adaptation et l'évolution du système olfactif périphérique des insectes, incluant les organes impliqués dans la réception des substances sémiachimiques.

1.2. Processus de la sélection d'hôte chez les insectes phytophages

Pour les insectes phytophages, le comportement de recherche et de sélection d'hôte sont essentiels pour leur survie. Les plantes hôtes permettent aux insectes d'assurer des fonctions primaires à leur cycle de vie telles que la reproduction, la ponte, l'alimentation et le repos. La sélection d'hôte implique l'utilisation et l'intégration de signaux olfactifs, gustatifs, visuels et mécanosensoriels à courte et à longue distance (Schoonhoven et al., 2005; Cardé & Willis, 2008). Les signaux olfactifs sont généralement les principaux indicateurs d'un hôte approprié, complétés par des signaux visuels voir mécanosensoriels (Fornasari, 2008). Cependant, selon les espèces, la contribution relative des différentes modalités sensorielles peut varier, certaines espèces privilégient l'aspect visuel et d'autres l'aspect olfactif (Keeseey et al., 2019; Keeseey, Grabe, Knaden, & Hansson, 2020). Ce processus de sélection d'hôte est souvent subdivisé en deux étapes à savoir (i) la recherche de la plante hôte et (ii) l'acceptation de la plante hôte (Schoonhoven et al., 2005; Finch & Collier, 2008).

La recherche d'hôte commence par une recherche globale de l'habitat de l'hôte. Cela implique une détection à longue distance des signaux. En effet, les différents insectes vont se disperser à des distances variables, plusieurs kilomètres chez les lépidoptères (Lingren et al., 1993; Tobin & Blackburn, 2008), plusieurs centaines de mètres voir quelques kilomètres chez les mouches des fruits (Macfarlane et al., 1987; Drew & Romig, 1999; Froerer et al., 2010; Meats, 2016), quelques mètres à une dizaine de mètres chez les moustiques (Morris & Lounibos, 1991; Igor et al., 2020), et cela entraîne des contraintes différentes. Il est à noter que ces signaux ne proviennent pas forcément de l'hôte mais d'un ensemble d'organismes qui habite dans la zone cible (Webster & Cardé, 2017). L'ensemble des composés volatils présents dans un environnement et qui ne sont pas émis par l'organisme cible sont appelés « odeurs de fond » et sont susceptibles de moduler la réponse aux composés attractifs étant donné qu'ils peuvent masquer les composés cibles (Schröder & Hilker, 2008; Conchou et al., 2019).

Par la suite, l'insecte entre dans la phase de détection des signaux olfactifs et visuels spécifiques à l'hôte. Les signaux olfactifs sont généralement des petits métabolites secondaires qui sont volatils et diffusent naturellement à travers les épithéliums de l'hôte (Pichersky et al., 2006; Baldwin, 2010). Il peut aussi s'agir d'autres métabolites qui sont libérés en réponse à des blessures mécaniques, ou qui sont induits suite à divers stress (Turlings et al., 1990; Held et al., 2006; Vickers et al., 2009). Les composés volatils peuvent également provenir d'émissions ponctuelles liées à des rythmes naturels, par exemple les émissions en début de scotophase (période sombre de la photopériode) du maïs (Chamberlain, Khan, Pickett, Toshova, & Wadhams, 2006). Quant aux signaux visuels, il peut s'agir de formes, couleurs, textures et/ ou contrastes. Par exemple, les feuilles ont en général des couleurs assez peu contrastées avec leur environnement contrairement aux fleurs et aux fruits (Aluja & Prokopy, 1993; Döring &

Chittka, 2007). Pendant cette phase de détection des signaux, l'insecte n'est pas encore en contact physique avec la plante hôte. En réponse aux signaux, l'insecte adopte un comportement d'orientation, réduisant sa distance par rapport à la plante hôte (Schoonhoven et al., 2005).

Le comportement d'orientation olfactive implique la chimiotaxie qui est définie par un déplacement le long d'un gradient de concentration d'un composé chimique (Metcalf & Kogan, 1987; Kost, 2008). Ce gradient s'observe surtout à courte distance et avec un minimum de vent/ de turbulences atmosphériques. En cas de vent/ turbulence et ou d'une grande distance de l'hôte, la détection d'un stimuli olfactif peut induire un comportement d'anémotaxie, qui est l'orientation par rapport à la direction du vent (Kennedy, 1977). Enfin des comportements discontinus alternant des vols orientés et des zigzags à la perte de la trace chimique ont été observés principalement chez les lépidoptères, mais également chez les mouches des fruits (Shorey, 1973; Kennedy & Marsh, 1974; David et al., 1983; Landolt et al., 1992; Dalby-Ball & Meats, 2000). La localisation de l'hôte est donc également conditionnée par la manière dont les composés volatils sont dispersés et véhiculés dans la nature. Les panaches d'odeurs ne peuvent pas fournir immédiatement les informations directionnelles nécessaires pour orienter les insectes vers la source, notamment à longue distance, puis qu'elles ne sont pas distribuées avec des gradients de concentration lisses. Ainsi, la dispersion des odeurs dans le vent est modulée par les forces de la diffusion turbulente qui déforment les filaments d'odeur et créent des espaces d'air sans odeur dans le panache. Pour remonter un panache d'odeurs turbulent, les insectes naviguent donc à travers des patchs d'odeur relativement non diluée entrecoupés de patchs d'air pur (Murlis et al., 1992; Cardé & Willis, 2008).

Une fois l'hôte trouvé, l'insecte entre en contact physique avec celui-ci en atterrissant, en touchant ou en grimpant dessus. Il procède dès lors à la palpation de la surface de l'hôte avec ses organes gustatifs et mécanosensoriels. La dureté de la surface de l'hôte est notamment évaluée (Karageorgi et al., 2017). Après cela, l'hôte est soit accepté (se traduisant par exemple par une oviposition), soit rejeté entraînant le départ de l'insecte (Schoonhoven et al., 2005).

1.3. Les substances sémiachimiques, signaux olfactifs pour les insectes

L'environnement chimique est constitué de signaux olfactifs qui sont les substances sémiachimiques. Le mot « sémiachimique » vient du grec *simeon* qui veut dire marque ou signal. Ce terme est proposé pour la première fois par Law et Regnier en 1971 et désigne les produits chimiques qui sont des médiateurs impliqués dans les interactions entre les organismes, soit au sein de la même espèce (phéromones), soit entre des espèces différentes (substances allélochimiques) (Figure 1) (Law & Regnier, 1971; Nordlund & Lewis, 1976; Brossut, 1996).

Les substances sémiochimiques sont des composés à propriétés physico-chimiques variées. Les espèces terrestres utilisent les composés volatils ou les composés attachés à des particules dans l'air. La volatilité d'un composé est mesurée par sa pression de vapeur saturante, qui est définie par la pression à laquelle la phase gazeuse d'une substance est en équilibre avec sa phase liquide ou solide à une température donnée dans un système fermé. Les composés les plus volatils, qui ont une pression de vapeur saturante élevée, ont tendance à avoir un faible poids moléculaire et une faible polarité, mais d'autres facteurs liés à la structure générale des molécules entrent également en jeu. Aussi cette propriété est difficilement prédictible pour une molécule donnée et nécessite souvent une mesure directe.

Quant à la composition des substances sémiochimiques, elle est extrêmement variable selon les organismes émetteurs. Ces émissions sont constituées d'un unique composé ou d'un mélange de composés ayant un ratio plus ou moins spécifique. Une modification d'un mélange, se traduisant par l'ajout d'un ou de quelques composés ou un léger changement dans le ratio, peut affecter les réponses biologiques des organismes récepteurs (Reinhard, 2004; Kost, 2008).

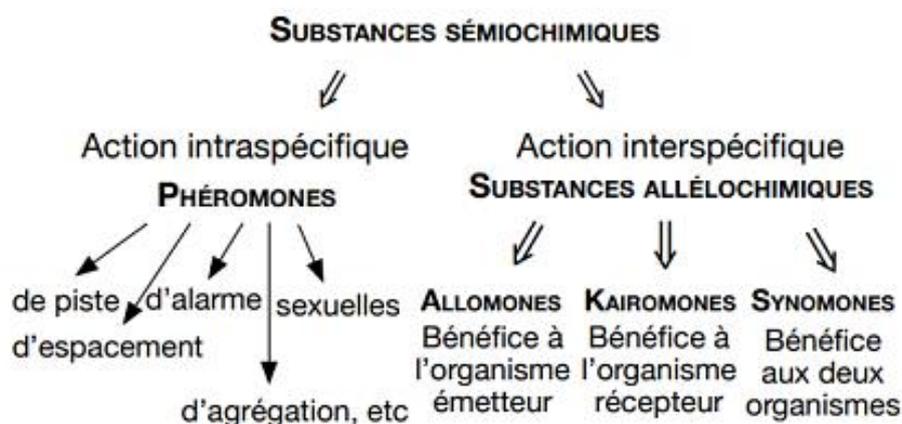


Figure 1 : Les différents types de substances sémiochimiques (d'après Brossut, 1996)

1.3.1. Substances sémiochimiques impliquées dans les interactions intraspécifiques

Les interactions intraspécifiques des insectes sont régies par les molécules phéromonales. Le terme phéromone a été inventé par les chercheurs Karlson et Lüscher en 1959 et est issu du grec « *phereum* » pour transporter et « *horman* » pour stimuler ou exciter. La phéromone est définie comme étant une substance produite par un individu qui engendre une réaction spécifique chez un autre individu de la même espèce (Karlson & Lüscher, 1959). En se basant sur cette première définition, Wyatt (2010) propose une définition plus élaborée énonçant que les phéromones sont des signaux évolués, ayant un ratio défini dans le cas des phéromones à plusieurs composants, et qui sont émises par un individu et perçues par un autre

de la même espèce, dans lequel elles provoquent une réaction spécifique, comme par exemple un comportement stéréotypé ou un processus développemental (Wyatt, 2010).

Chez les insectes, les phéromones présentent des structures chimiques très diverses appartenant à différentes familles chimiques. Cela inclut les hydrocarbures, les esters d'acide gras, les alcools, les acides, les cétones, les époxydes et les isoprénoïdes (Millar, 2000; Blomquist et al., 2012). Cependant la composition des phéromones varie extrêmement entre les espèces. Chez certains insectes, la détection d'un seul stéréoisomère suffit à déclencher un comportement tandis que chez d'autres les ratios entre les composants sont importants pour déclencher une réaction ou différencier les différentes populations comme les castes ou les colonies (Yew & Chung, 2015).

Les phéromones sont catégorisées en deux grands groupes selon la réaction des individus à savoir les phéromones modificatrices et les phéromones incitatrices. Les phéromones modificatrices induisent une réaction du congénère à plus long terme après une perception initiale. Elles affectent la physiologie du receveur et engendrent par la suite un changement dans son comportement (Wilson, 1963). Ce type de phéromone est très présent chez les insectes sociaux et assure l'harmonie au niveau de la colonie. Par exemple, la reine de l'abeille domestique *Apis mellifera* sécrète une phéromone qui inhibe le développement ovarien des abeilles ouvrières afin d'empêcher l'élevage d'une nouvelle reine (Pettis, Higo, Pankiw, & Winston, 1997).

Les phéromones incitatrices ou encore phéromones de déclenchement induisent un comportement immédiat de l'organisme receveur. Ces phéromones sont classées en fonction des comportements qui leur sont associés.

Phéromone sexuelle : c'est une phéromone produite par un individu de sexe opposé et perçue par l'autre sexe. Elle joue un rôle dans la signalisation de l'état de maturation sexuelle d'un individu et de l'attraction de partenaire d'accouplement (Butenandt, Beckmann, Stamm, & Hecker, 1959; Roelofs, 1995). Dans certains cas, elle peut agir comme un aphrodisiaque (Venard & Jallon, 1980). La première identification de phéromone sexuelle remonte en 1959 avec la découverte du « bombykol » ((E,Z)-10,12-hexadécadiène-1-ol) chez le lépidoptère *Bombyx mori* (Butenandt et al., 1959).

Phéromone d'agrégation : elle correspond à une substance sécrétée par un individu afin d'attirer les autres individus conspécifiques à se regrouper à un endroit précis. Ce regroupement est souvent utilisé pour se nourrir, pour se reproduire ou bien pour se protéger contre les prédateurs. Plusieurs insectes sont connues pour l'utilisation de cette catégorie de phéromones comme par exemple les abeilles, les cafards, les coléoptères, les criquets, les guêpes, les mouches et les thrips (Wertheim, Van Baalen, Dicke, & Vet, 2005).

Phéromone d'alarme : elle est utilisée par un individu afin de signaler les congénères d'un potentiel danger ou prédateur. Elle provoque un comportement de fuite ou de dispersion et peut augmenter le recrutement d'autres individus ou l'agression envers les antagonistes (Wilson & Regnier, 1971; Basu et al., 2021).

Phéromone de d'espacement : cette phéromone sert à marquer le territoire et éviter ainsi la surpopulation et la compétition en ressources. Elle est souvent déposée sur ou à proximité des œufs (Arnaud, Detrain, Gaspar, & Haubruge, 2003).

Phéromone de piste : ce type de phéromone est principalement présent chez les insectes sociaux. Elle est utilisée pour tracer une piste odorante afin de profiter collectivement d'une source de nourriture ou de défendre le nid de manière coordonnée. Outre cet effet d'orientation, la phéromone de piste peut également avoir un effet de recrutement (Arnaud et al., 2003; El-Ghany, 2019).

En particulier, les hydrocarbures cuticulaires (HCs) sont considérés comme jouant un rôle phéromonal régulant la communication intraspécifique des insectes. Les HCs constituent jusqu'à 90% de la composition des lipides épicuticulaires des insectes. Ils ont essentiellement pour rôle de limiter la perte d'eau des insectes et de les protéger contre la dessiccation. Les HCs sont également impliqués dans la reconnaissance des espèces notamment pour la sélection des partenaires (Goh et al., 1993; Gibbs & Crockettj, 1998; Blomquist et al., 2012). La première phéromone HC a été découverte chez la femelle de la mouche domestique *Musca domestica* qui est le (Z)-9-tricosène, attirant le mâle (Carlson et al., 1971). Chez les insectes, les HCs sont des hydrocarbures à longue chaîne carbonée principalement comprise entre 19 et 35 atomes de carbones (Lockey, 1988; Martin & Drijfhout, 2009). Tandis que les HCs sont continuellement émis par l'individu et recouvrent l'ensemble de son corps, des glandes phéromonales contiennent des phéromones qui leurs sont propres et sont évaginées à des moments particuliers, comme lorsqu'un individu est prêt à s'accoupler.

1.3.2. Substances chémiochimiques impliquées dans les interactions interspécifiques

Les substances qui assurent la communication entre espèces sont appelées « les substances allélochimiques ». Selon les bénéfices que reçoivent les organismes émetteurs et récepteurs de l'interaction, elles sont catégorisées en allomones, kairomones et synomones (Nordlund & Lewis, 1976).

Allomones : Les allomones sont produites ou acquises par un organisme émetteur et, lorsqu'elles sont en contact avec un organisme d'une autre espèce, induisent une réponse comportementale et/ ou physiologique bénéfique pour l'organisme émetteur et non pour le récepteur (Brown, 1968). Elles sont généralement produites par les insectes ou les plantes pour la défense contre des organismes prédateurs. Pour cela, il existe différents types de substances comme les substances répulsives, les venins ou bien les inhibiteurs de croissance ou les antibiotiques qui affectent la physiologie de l'organisme récepteur (Nordlund & Lewis, 1976).

Kairomones : A l'inverse des allomones, les kairomones procurent des avantages adaptatifs pour les organismes récepteurs (Brown, Eisner, & Whittaker, 1970). Les kairomones sont d'une importance cruciale dans les interactions interspécifiques et présentent de nombreuses fonctions impliquées dans la survie des organismes récepteurs. Elles sont utilisées par les insectes dans un contexte de localisation de sources de nourriture pour ses propres besoins et ceux de ses progénitures. En particulier, ces substances sont utilisées par les insectes phytophages, les insectes parasites, les parasitoïdes, les prédateurs et les fongivores pour la recherche de nourriture et/ ou de sites de ponte. Les substances libérées par les prédateurs sont également utilisées en tant que kairomones par les proies ou les organismes hôtes pour la reconnaissance des ennemis naturels et induisent des réponses comportementales et/ ou physiologiques d'anti-prédations à court ou à long terme (par exemple un comportement d'agrégation ou changement d'apparence morphologique). Les kairomones, chez certains insectes, agissent comme des précurseurs de phéromone, c'est-à-dire qu'elles stimulent la production de phéromones sexuelles par les femelles et augmentent de manière synergique la réponse des mâles (Metcalf & Metcalf, 1992; Ochieng et al., 2002; Ruther et al., 2002).

Synomones : Enfin, les synomones sont des substances émises par un organisme qui profitent à la fois l'organisme émetteur et l'organisme récepteur. Elles sont généralement produites par les plantes et sont souvent utilisées dans les interactions mutualistes avec d'autres organismes. En effet, les synomones regroupent les émissions de fleurs et de nectars qui attirent les insectes pour la pollinisation (Nordlund & Lewis, 1976), mais aussi les composés de défense des plantes contre les herbivores qui attirent leurs ennemis naturels (Pichersky & Gershenzon, 2002). Dans ce dernier cas, la même émission volatile peut être qualifiée d'allomone dans le cadre de la relation plante/herbivore et de synomone dans le cadre de la relation plante/ennemi de l'herbivore.

La détection et l'intégration par les insectes de ces substances sémiochimiques sont assurées en premier lieu par le système olfactif périphérique.

1.4. Le système olfactif périphérique des insectes : description et mécanismes évolutifs

Chez les insectes, le traitement des informations olfactives s'opère successivement à deux niveaux à savoir au niveau du système olfactif périphérique et au niveau du système olfactif central. Le système olfactif périphérique a pour rôle de réceptionner et convertir les signaux chimiques en réponses nerveuses tandis que le système olfactif central intègre, module et organise l'information sensorielle susceptible d'orienter le comportement de l'insecte (Figure 2).

1.4.1. Description anatomique et fonctionnelle des organes olfactifs périphériques

1.4.1.1. Les antennes

Les organes olfactifs des insectes sont les antennes et les palpes maxillaires ou labiaux (Schneider, 1964; Stange, 1992; de Bruyne et al., 1999). La morphologie des antennes varie considérablement selon les espèces et les familles d'insecte. Ce caractère morphologique est souvent utilisé dans les clés de détermination des insectes. Une antenne est composée de trois parties qui sont de la base à l'extrémité dénommées le scape, le pédicelle et le flagelle. Chacune de ces parties est constituée d'un segment antennaire unique, à l'exception du flagelle qui est multi-segmentée. Le scape a principalement un rôle de maintien de l'antenne. Il est attaché à une cavité membraneuse du crâne et est supporté par une structure intersegmentaire flexible. Le mouvement de l'antenne est assuré par une ou deux paires de muscles dont une partie est insérée dans la tête et l'autre partie dans le scape. Un autre groupe de muscles s'étend du scape vers le pédicelle. Seuls ces deux premiers segments possèdent des muscles (Loudon, 2009). Le pédicelle comporte également l'organe de Johnston, qui contient un ensemble de neurones mécanosensoriels sensibles aux vibrations du flagelle et sont ainsi impliqués dans la détection du son, du vent et de la gravité. Enfin, le flagelle est impliqué dans l'olfaction et a une morphologie très variable en termes de forme, de longueur et de taille selon les espèces et les sexes. On distingue des formes plus simples comme les antennes sétacées et filiformes et des formes plus élaborées à l'exemple des antennes lamelliformes, plumeuse, pectiforme et aristée (Figure 3). En particulier, la forme aristée est trouvée chez les diptères Muscomorpha. Le flagelle y est constitué de deux segments uniquement, le funiculus impliqué dans l'olfaction et l'arista qui a une fonction mécano-sensorielle (Göpfert & Robert, 2002).

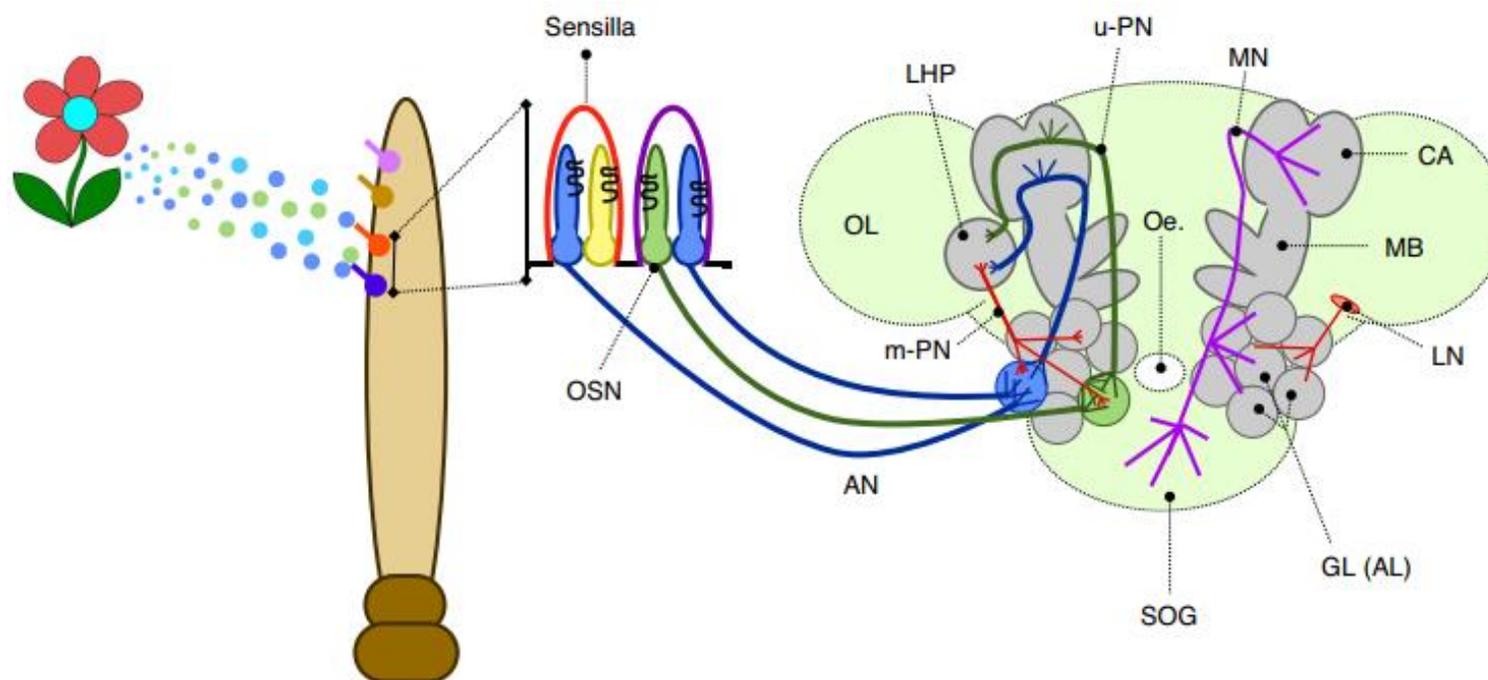


Figure 2 : Représentation très simplifiée du processus de perception des odeurs chez les insectes. Les odeurs sont détectées au niveau des neurones récepteurs olfactifs (ORNs) aussi appelés neurones sensoriels olfactifs (olfactory sensory neurons, OSNs). Les informations sont traitées au niveau périphérique avant d'atteindre le système central. Les ORNs projettent leurs axones via le nerf antennaire (antennal nerve, AN) vers le lobe antennaire (antenal lobe, AL) formé par plusieurs glomérules (GL). Les ORNs de même type projettent leurs axones vers un glomérule spécifique, cela crée un schéma d'activation combinatoire spatiale dans le lobe antennaire en réponse à une stimulation olfactive. Les neurones locaux (local neurons, LN) forment un réseau modulateur entre les glomérules du AL. Les neurones de projection uni-glomérulaires (Uniglomerular projection neurons, u-PN) et multi-glomérulaires (Multi-glomerular projection neurons, m-PN) transfèrent le signal du AL vers les calices (calyces, CA) des mushroom bodies (MB) et vers la corne latérale du protocérébrum (lateral horn of the protocerebrum, LH). MN : modulatory neurons connecting ; SOG : suboesophageal ; OL : Optic lobes, Oe : oesophageal canal (d'après Carrasco et al., 2015).

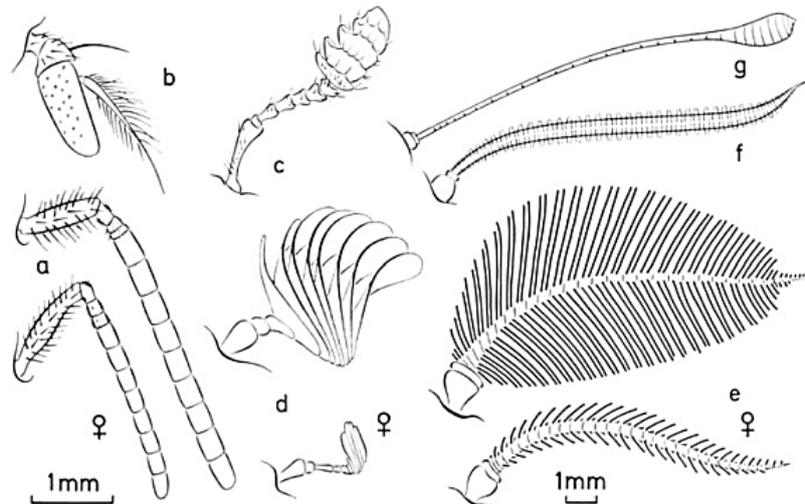


Figure 3 : Différents exemples de morphologie d'antenne d'insecte. La forme chez le mâle et la femelle est montré pour (a), (d) et (e). (a) Abeille (*Apis mellifera* L.) ; (b) Mouche de chair (genre *Sarcophaga*) ; (c) Scarabée nécrophage (genre *Necrophorus*) ; (d) Coléoptère (genre *Rhopaea*) ; (e) Papillons saturniidés (genre *Antheraea*) ; (f) Sphinx (sphinxidae, genre *Pergesa*) ; (g) Papillon (genre *Vanessa*). (Kaissling, 1971).

1.4.1.2. Les sensilles

Les antennes et les palpes maxillaires sont pourvues de soies innervées de formes variées appelées « sensilles » (Zacharuk, 1985). Les sensilles sont constituées d'une structure cuticulaire, de neurones récepteurs olfactifs (olfactory receptor neurons en anglais, ORNs) et de cellules auxiliaires. Les sensilles qui recouvrent le scape et le pédicelle sont des organes mécano-sensoriels tandis que les sensilles sur le flagelle sont impliquées dans l'olfaction et la détection de l'humidité et de la température. Des sensilles gustatives peuvent également se retrouver sur le flagelle à l'exemple de certaines espèces de lépidoptères et d'hyménoptères (Frings & Frings, 1956; Schneider, 1964; Steinbrecht, 1996; Keil, 1999; Galvani et al., 2012; Seada, 2015). Les sensilles olfactives se distinguent par la présence de nombreux pores sur leur paroi tandis que les sensilles gustatives présentent un seul pore terminal (Figure 4) (Steinbrecht, 1996; Keil, 1999).

Toutes les sensilles olfactives ont une architecture commune, un système de pores tubulaires qui connecte le milieu extérieur à la lumière sensillaire renfermant les dendrites des neurones sensoriels. Les sensilles olfactives sont densément distribuées sur l'antenne et elles sont souvent regroupées selon leur morphologie en sensilles basiconiques, sensilles coeloconiques et sensilles trichoïdes (Figure 4a). Chaque sensille répond de manière spécifique

à un type de stimuli chimique, c'est ce qui explique leur diversité morphologique (Picimbon, 2002). De plus, des sensilles olfactives basiconiques recouvrent également le palpe maxillaire.

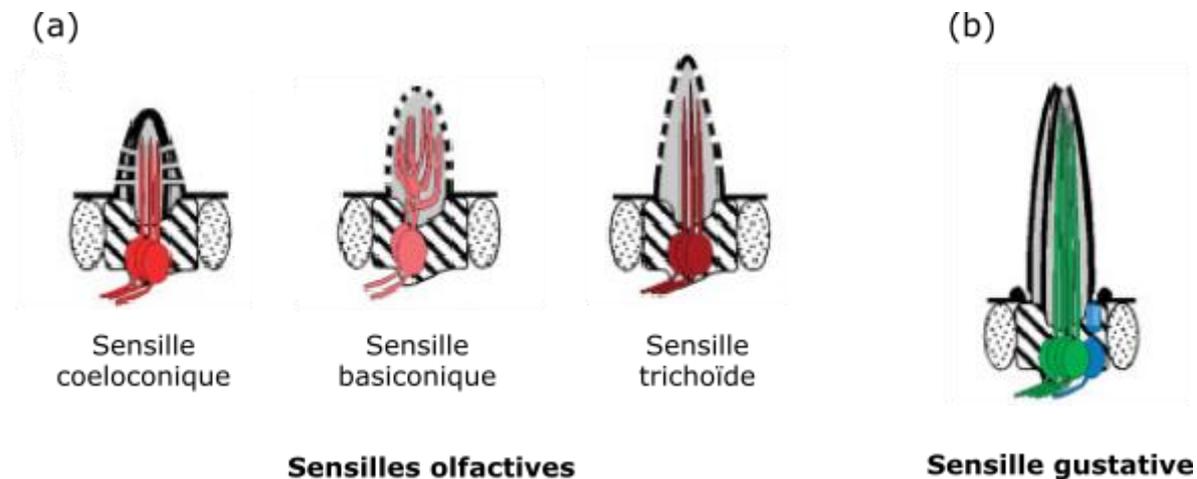


Figure 4 : Les principaux types de sensilles. (a) Trois différentes morphologies de sensilles olfactives (coeloconique, basiconique et trichoïde) composées de neurones olfactives (en rouge) et de cellules accessoires (hachurées). La lymphe sensillaire est représentée en gris. (b) Sensille gustative avec ses neurones récepteurs gustatifs (en vert), accompagnés d'un neurone mécanosensoriel (en bleu) (adapté de : de Bruyne & Warr, 2006).

Les sensilles olfactives chez les Tephritidae

Chez les Tephritidae, quatre types de sensilles coexistent dont les caractéristiques se présentent comme suit :

Sensilles basiconiques et clavates : Les sensilles basiconiques sont de forme conique et plus courte avec un bout plus arrondi. Ces types de sensilles se rencontrent sur l'antenne et le palpe. Elles sont parfois subdivisées en sensilles basiconiques de types I (plus longues et plus larges) et II (plus courtes et plus petites). Cependant, le nombre de sous-catégories observées peuvent varier selon les auteurs. Les sensilles clavates quant à elles ressemblent aux sensilles basiconiques mais elles peuvent en être différenciées par une boursouffure de leur partie distale. Ces sensilles sont homologues à la catégorie des sensilles basiconiques épaisses définies chez les drosophiles (Jacob et al., 2017). On distingue généralement deux catégories : les sensilles clavates de type I et II. Les sensilles basiconiques et clavates sont généralement considérées comme sensibles aux odeurs de nourriture (Lee et al., 1994; de Bruyne et al., 1999; de Bruyne et al., 2001; van der Goes van Naters & Carlson, 2007; Jacob et al., 2017). Cependant, il serait plus juste de considérer que ces sensilles sont spécialisées dans la détection des molécules

polaires, puisque leurs pores à travers la cuticule hydrophobe sont plus larges que chez les autres types de sensilles.

Sensilles coeloconiques : Les sensilles coeloconiques sont les sensilles olfactives les plus petites. Elles présentent un cône protégé par un dôme au fond d'une petite dépression. Ces types de sensilles peuvent avoir au moins deux neurones, avec un maximum de sept neurones distincts. Chez les drosophiles, les sensilles coeloconiques sont sensibles aux petites amines à d'autres familles chimiques comme les esters (Yao et al., 2005; Hu et al., 2010).

Sensilles trichoïdes : Les sensilles trichoïdes sont larges, épaisses et allongées avec une terminaison pointue. Elles sont souvent subdivisées en sensilles trichoïdes de type I, II et III. Les sensilles trichoïdes renferment un, deux ou trois neurones et sont considérées comme impliquées dans la détection des phéromones. Chez les drosophiles, les sensilles trichoïdes montrent une sensibilité au cis-vaccenyl acetate qui est la phéromone d'agrégation chez ces espèces (Shanbhag et al., 1999; van der Goes van Naters & Carlson, 2007; Hu et al., 2010). Plus précisément, la relative petitesse des pores cuticulaires qui les recouvrent suggère une spécialisation pour les composés hydrophobes, ce qui est souvent le cas des composés phéromonaux.

Chez les Tephritidae comme chez les drosophiles, les différentes sensilles olfactives présentent un arrangement spatial particulier le long du funiculus. Cela a été démontré dans une étude récente qui compare la distribution des sensilles de différentes espèces de Tephritidae appartenant aux tribus des Ceratitidini et des Dacini. En effet, les sensilles basiconiques, s'étalent généralement sur la surface du funiculus et sont moins rares sur les bords. Les sensilles clavates sont plus densément réparties dans la région ventro-proximale du funiculus. Les sensilles coeloconiques sont dispersées sur le funiculus. Les sensilles trichoïdes se situent principalement dans la région dorso-distale (Figure 5) (Jacob et al., 2017).

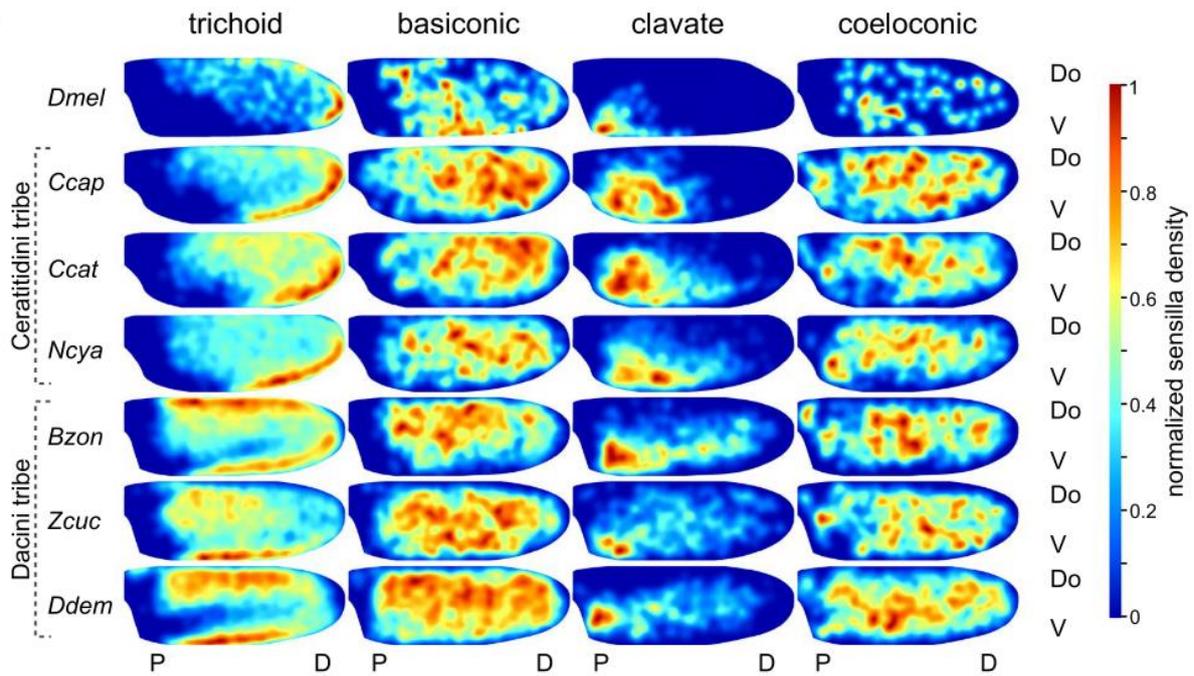


Figure 5 : Carte de distribution moyenne des différents types de sensilles olfactives chez *Drosophila melanogaster* (*Dmel*) et différentes espèces de Tephritidae (*Ccap* : *Ceratitidis capitata*, *Ccat* : *Ceratitidis catoirii*, *Ncya* : *Neoceratitidis cyanescens*, *Bzon* : *Bactrocera zonata*, *Zcuc* : *Zeugodacus cucurbitae* ; *Ddem* : *Dacus demmerezi*). Les types de sensilles sont de gauche à droite les sensilles trichoïdes, les sensilles basiconiques, les sensilles clavates ; les sensilles coeloconiques. Pour *Drosophila melanogaster*, les sensilles basiconiques épaisses ont été comptées comme sensilles clavates. V : ventral, Do : dorsal, P : proximal, D : distal (d’après Jacob et al., 2017).

1.4.1.3. Les neurones récepteurs olfactifs (ORNs)

Les ORNs sont des neurones ayant un corps cellulaire de forme ellipsoïdale présentant un noyau avec peu de chromatine et un cytoplasme translucide sous microscope électronique. Ce sont des cellules bipolaires qui possèdent un prolongement apical, la dendrite, et un prolongement basal qui est l'axone. Les ORNs et les cellules auxiliaires qui les entourent se sont formés à partir des cellules épithéliales. La fonction olfactive des ORNs est soutenue par les cellules auxiliaires qui leur fournissent un milieu extracellulaire. Les dendrites de ces ORNs baignent dans un fluide aqueux protecteur qui est la lymphe sensillaire (Keil, 1999; Park et al., 2002). Les ORNs sont au nombre variable selon les types de sensilles. Chez les insectes, une sensille abrite généralement un à cinq ORNs. Cependant il y a des exceptions, par exemple les sensilles basiconiques des criquets contiennent jusqu'à 51 ORNs et les sensilles placoides des guêpes jusqu'à 140 ORNs (Keil, 1999). Les axones des ORNs de l'antenne se regroupent pour former le nerf antennaire, qui se projette sur le lobe antennaire dans le cerveau de l'insecte.

Les ORNs présentent des degrés de spécialisation variés. Les ORNs qui détectent les phéromones sont par exemple très spécifiques ce qui se traduit par une forte réponse à un ou quelques composés. D'autres en revanche sont moins spécifiques et répondent à divers composés comme les composés des plantes dont la sensibilité à certains est partagée entre plusieurs insectes (de Bruyne & Baker, 2008; Calatayud et al., 2013).

1.4.2. Les récepteurs membranaires des neurones récepteurs olfactifs

Les récepteurs membranaires sont situés sur les dendrites des ORNs. Chez les insectes on distingue deux grandes familles de récepteurs membranaires qui ont un rôle olfactif : les récepteurs olfactifs (olfactory receptors en anglais, ORs) et les récepteurs ionotropiques (ionotropic receptors en anglais, IRs) (Pask & Ray, 2016). Le développement des techniques de séquençages de génomes et transcriptomiques ont permis l'identification et l'amélioration des annotations de gènes olfactifs chez plusieurs espèces d'insectes.

1.4.2.1. Les récepteurs olfactifs (ORs)

L'hypothèse sur l'origine des ORs des insectes est qu'ils ont évolués à partir des récepteurs gustatifs de l'ancêtre commun des insectes ailés (Robertson, Warr, & Carlson, 2003). Les premières données d'identification de gènes ORs chez les insectes ont été mises en évidence avec *Drosophila melanogaster* en 1999 par le biais de nouvelles méthodes bioinformatiques (Clyne et al., 1999; Gao & Chess, 1999; Vosshall, Amrein, Morozov, Rzhetsky, & Axel, 1999).

L'organisation cellulaire et moléculaire des ORs des insectes et des vertébrés présentent quelques similarités. Ce sont des protéines à sept domaines transmembranaires couplées à des protéines G, et un seul type de récepteur est généralement exprimé par ORN. Cependant, les ORs d'insectes constituent une famille protéique à part, caractérisée par une structure 3D qui lui est propre (Butterwick et al., 2018) et par la présence d'un co-récepteur obligatoire (OR coreceptor en anglais, Orco) qui est très conservé entre les espèces (Larsson et al., 2004; Benton et al., 2006; Kaupp, 2010). Ce dernier agit comme des protéines chaperonnes dans le transport des ORs vers les dendrites et assurent le bon fonctionnement de ceux-ci dans la transduction des signaux.

Chez les insectes, la plupart des ORNs n'exprime qu'une seule combinaison OR-Orco. Les ORs sont spécialisés dans la détection de composés sémiocchimiques lipophiles très variés comme les composés à fonction aromatiques, alcools, esters et terpenoïdes mais également des dérivées d'acides gras qui composent certaines phéromones sexuelles (Sakurai et al., 2004; Hallem & Carlson, 2006; Silbering et al., 2011).

1.4.2.2. Les récepteurs ionotropiques (IRs)

Les IRs ont été découverts pour la première fois chez *Drosophila melanogaster* en 2009. Ce sont des anciennes familles de chimiorécepteurs des protostomes qui incluent les arthropodes, les mollusques, les annélides et les nématodes (Benton, Vannice, Gomez-Diaz, & Vosshall, 2009; Croset et al., 2010). Les IRs sont issus d'une divergence élevée de la famille des récepteurs ionotropiques au glutamate. Les IRs possèdent deux co-récepteurs (IR8a et IR25a) qui présentent des fonctions analogues à ceux des Orco (Abuin et al., 2011; Silbering et al., 2011). Un ORN peut exprimer de un à trois IRs à la fois, comme c'est le cas dans les sensilles coeloconiques des drosophiles (Benton et al., 2009). Ces récepteurs sont particulièrement sensibles aux composés aliphatiques amines, aldéhydes et acides (Silbering et al., 2011).

1.4.3. Processus de perception des molécules au niveau périphérique

Les molécules volatiles sont adsorbées sur la surface cuticulaire et diffusent vers les pores des sensilles qu'elles pénètrent. Les molécules captées se diffusent dans la lymphe et se lient à de petites protéines acides, très concentrées, les protéines liant les odeurs (Odorant-Binding Proteins en anglais, OBPs) ou les protéines liant les phéromones (Pheromone-Binding Proteins en anglais, PBPs). Généralement, ces deux protéines sont exprimées dans différents types de sensilles (Vogt & Riddiford, 1981; Steinbrecht et al., 1992). Les OBPs sont secrétées

par les cellules auxiliaires et sont formées de chaînes polypeptidiques d'environ 150 acides aminés avec six cystéines reliées par trois liaisons disulfures. Il existe également d'autres types de protéines qui sont les protéines chimiosensorielles (ChemoSensory Proteins en anglais, CSPs) (Pelosi et al., 2017). Ces dernières sont plus petites et présentent quatre liaisons disulfures (Angeli et al., 1999; Picimbon et al., 2000). Il est à noter que les OBPs et les CSPs ne sont pas des protéines spécifiques aux sensilles olfactives. En effet, on en trouve également dans de nombreuses sensilles gustatives (Galindo & Smith, 2001; Pelosi et al., 2006). Les OBPs sont chargées de la solubilisation des molécules et de leur transport vers le complexe OR-Orco (Pelosi et al., 2017). Ce complexe forme un canal cationique ionotropique activé par les odeurs. Cette interaction provoque alors une dépolarisation de la membrane et génère ainsi un potentiel récepteur qui est codé en amplitude. Après avoir atteint un seuil d'activation, le potentiel récepteur se transforme en potentiel d'action (codage en fréquence) qui est acheminé via l'axone vers le lobe antennaire, premier acteur du système olfactif central.

L'hypothèse derrière le codage olfactif par les ORs découle du codage combinatoire observé chez les mammifères (Keller & Vosshall, 2007; Malnic, Hirono, Sato, & Buck, 1999). Un ensemble de plusieurs molécules odorantes peut activer un seul OR et à l'inverse, plusieurs ORs peuvent détecter une seule molécule odorante, si bien que l'activité d'un seul type d'ORN n'est pas suffisante pour déterminer l'identité des composés qui constituent une odeur. Le codage combinatoire implique le système périphérique et les glomérules du lobe antennaire qui interagissent pour déclencher un schéma spécifique d'activation. Cependant, un codage par voie dédiée a également été observé dans certains cas, c'est-à-dire qu'une molécule odorante induisant un comportement n'active qu'un seul OR associé à un seul glomérule. Andersson et al. (2015) suggèrent que le codage olfactif des insectes pourrait être une hybridation entre le codage combinatoire et le codage par voie dédiée. Les ORs qui répondent à une large gamme de molécules odorantes sont considérés comme étant des « généralistes » tandis que ceux qui répondent à une seule ou quelques molécules sont des « spécialistes » à l'exemple des ORs qui détectent les phéromones (Suh, Bohbot, & Zwiebel, 2014). La capacité à discriminer un grand nombre de molécules odorantes par rapport au nombre d'ORs augmente donc la capacité olfactive d'un insecte (Conchou et al., 2019).

1.4.4. Mécanisme d'évolution du système olfactif

Les insectes évoluent dans un environnement complexe et dynamique. Pour faire face à cela, les insectes ont besoin d'un mécanisme efficace afin d'apercevoir les signaux indispensables à leur survie et à la survie de ses progénitures. Pour le système olfactif, le mécanisme d'adaptation à cet environnement s'opère principalement au niveau morphologique et physiologique.

1.4.4.1. Diversité morphologiques des antennes et des sensilles olfactives

Les antennes des insectes présentent une grande diversité morphologique incluant l'abondance et les types de sensilles. Selon Elgar et al. (2018), cette diversité morphologique résulterait d'une sélection sexuelle et une sélection naturelle.

En effet, certaines espèces d'insectes présentent un dimorphisme sexuel des antennes très marqué. L'exemple le plus classique est celui des papillons avec l'hypertrophie des antennes des femelles tandis que les antennes des mâles sont plus développées. Cette spécificité confère aux mâles la capacité de détecter les phéromones libérées à très faible concentration par les femelles. Darwin (1871) suggère dans son hypothèse sur la sélection sexuelle qu'un organe de sens d'un individu mâle doit être bien développé afin de mieux détecter les signaux des femelles, ce qui rendrait ainsi le mâle plus compétitif par rapport aux autres mâles. Cependant, cette hypothèse a été remise en cause par plusieurs études qui ont démontré des résultats contradictoires (Elgar et al., 2018).

Une hétérogénéité morphologique des antennes et des sensilles est également observée chez les insectes sociaux qui impliquent une grande diversité de signaux dans leur organisation sociale. Chez les fourmis arboricoles vertes *Oecophylla smaragdina* par exemple, les ouvriers majeurs qui sortent du nid présentent un plus grand nombre de sensilles comparés aux ouvriers mineurs qui restent dans le nid. De plus ces ouvriers majeurs sont plus agressifs envers les ennemies que les ouvriers avec moins de sensilles sur l'antenne (Babu et al., 2011; Gill et al., 2013). La différence de morphologie antennaire des insectes sociaux dépendrait donc de la complexité de l'environnement liée à chaque tâche sociale.

Entre autre, une hypothèse est également proposée sur la différence morphologique des antennes des insectes polyphages qui se nourrissent de différentes espèces de plantes ou de matières organiques et les insectes oligophages, se nourrissant d'un nombre restreint d'espèces. En effet, Chapman stipulait que les insectes ayant un régime alimentaire plus large ont besoin de plus de sensilles que ceux avec un régime alimentaire plus spécialisé (Chapman, 1982), et chez les Tephritidae, la généraliste *Bactrocera dorsalis* semble posséder un système olfactif plus complexe que la spécialiste des agrumes *Bactrocera minax* (Wang et al., 2022). Cependant, le fondement de cette hypothèse est mitigé. Chez des espèces de scolytes, *Dendroctonus rhizophagus* possèdent moins de sensilles basiconiques que *Dendroctonus valens* qui a quatre fois moins de nombre d'hôtes que le premier (López et al., 2014). Chez les drosophiles, un nombre accru de sensilles sensibles aux composés de leur hôte ont été observé chez des espèces monophages (Dekker, Ibba, Siju, Stensmyr, & Hansson, 2006; Linz et al., 2013). Enfin, selon une étude morphologique des antennes menée au laboratoire sur des espèces de mouches des

fruits Tephritidae, les spécialistes des Cucurbitaceae présentent des antennes plus larges avec un plus grand nombre de sensilles que les autres espèces de Tephritidae. Ceci pourrait générer une amélioration de la sensibilité olfactive et constituer ainsi une adaptation à des hôtes peut odorants.

Conchou et al. (2019) indiquent une relation entre la morphologie des antennes et la préférence d'habitats. La guêpe des figuiers *Ceratosolen silvestrianus*, qui explore un espace ouvert, possède des antennes plus simples que les antennes ramifiées de *Ceratosolen flabellatus*, espèce explorant les forêts. Les auteurs suggèrent que ce fait peut être lié à la rareté des ressources ou à la structure physique de la forêt qui entrave la production de panache d'odeur navigable.

Les pressions de sélection sur la morphologie des antennes sont difficiles à déterminer. Pour Hansson et Stensmyr (2011), ces contraintes seraient plus de l'ordre de l'environnement physique que de l'adaptation à l'environnement chimique. Il est donc nécessaire de mener plus de recherche à ce sujet afin de comprendre les mécanismes adaptatifs liés à la diversité des antennes des insectes.

Enfin, les gènes impliqués dans le développement morpho-anatomique des antennes commencent à être découverts, déterminants le nombre de cellule formant les antennes et donc la taille de celles-ci (Ramaekers et al., 2019) ou le nombre d'ORNs exprimant un OR donné (Song et al., 2012; Pan et al., 2017).

1.4.4.2. Evolution des récepteurs olfactifs

Le nombre de gènes ORs varie considérablement entre les espèces. Chez les vertébrés, le répertoire de gènes ORs varie entre 156 ORs (chez le grand dauphin *Tursiops truncatus*) à 4230 ORs (chez l'éléphant africain *Loxodonta africana*). Chez les insectes, ce nombre est compris entre 10 et environ 350 ORs (Eirín-López, Rebordinos, Rooney, & Rozas, 2012; Hughes et al., 2018).

La variation interspécifique des ORs est corrélée à l'environnement physique. Par exemple, le mode de vie des insectes sociaux implique l'exploration d'un environnement chimique complexe. Ces insectes sont obligés de discriminer une grande variété de signaux incluant des composés pour la reconnaissance des individus conspécifiques et diverses phéromones. Cette sélection naturelle pourrait expliquer la large expansion des ORs de ces insectes. En guise d'exemple, la fourmi charpentière *Camponotus floridanus* et l'abeille *Apis mellifera* possèdent respectivement 352 ORs et 163 ORs, contre 10 ORs chez le pou de

l'humain *Pediculus humanus* et 62 ORs chez les drosophiles (Vosshall et al., 1999; Robertson & Wanner, 2006; Kirkness et al., 2010; Zhou et al., 2012).

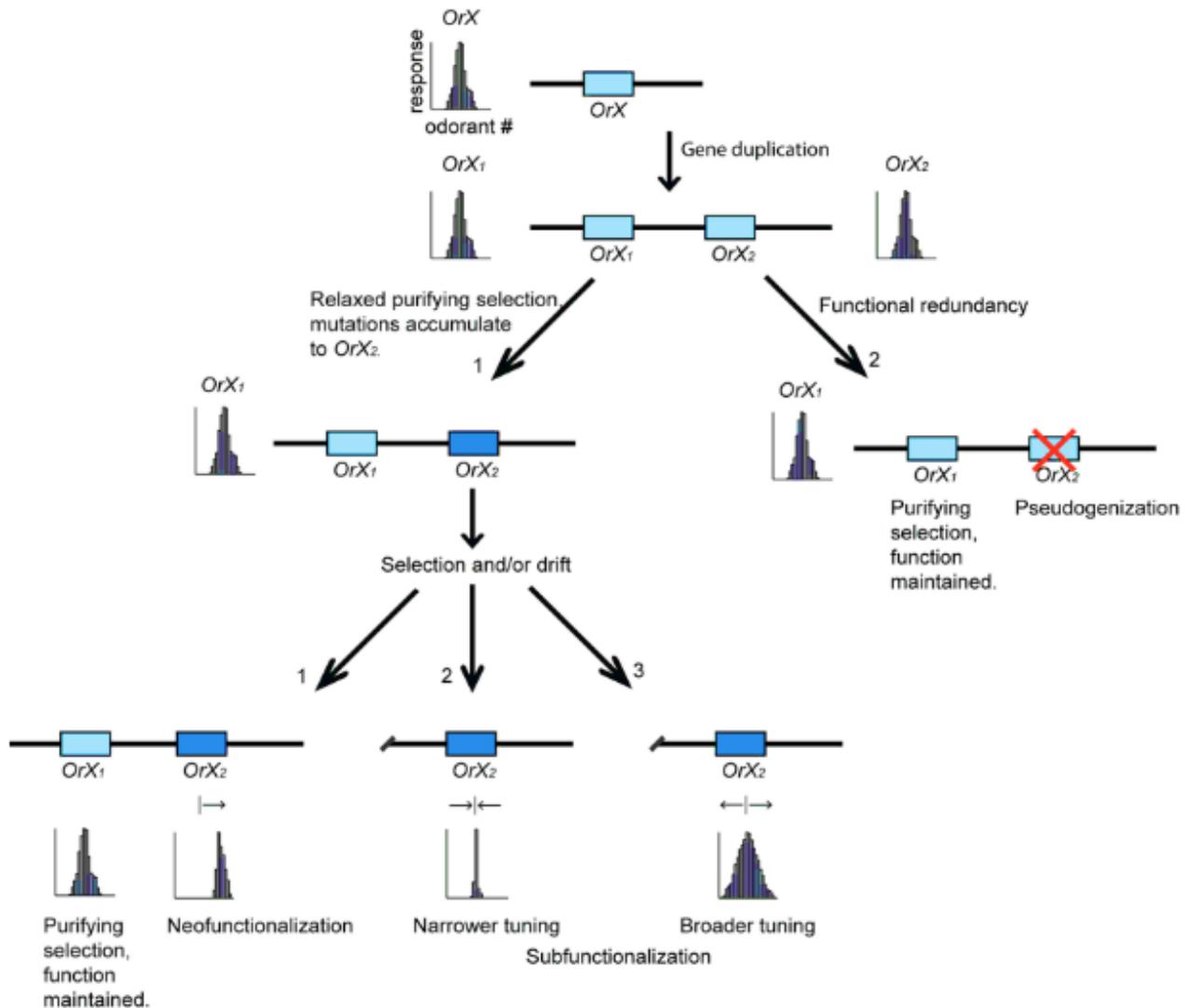


Figure 6 : Modèle d'évolution génétique « birth and death ». Dans cet exemple, l'évènement évolutif commence par une duplication du gène *OrX* qui donne naissance à deux gènes paralogues *OrX₁* et *OrX₂*. En raison de la redondance fonctionnelle, l'une des copies du gène est fréquemment pseudogénisée, bien que les deux puissent également être conservées. Dans ce dernier cas, les mutations peuvent s'accumuler sur l'un des gènes à la suite d'une sélection purificatrice relâchée, étant donné que la fonction de l'autre récepteur reste intacte. L'OR muté peut acquérir une nouvelle fonction (néofonctionnalisation) ou une fonction similaire à celle de son paralogue (sous-fonctionnalisation). La sélection naturelle ou la dérive génétique peut faire varier la largeur des courbes de réponses par rapport à celle de l'OR parental (d'après Andersson et al., 2015).

Du point de vue moléculaire, les gènes ORs constituent une famille multigénique. L'expansion et le rétrécissement de ce répertoire de gènes sont expliqués par le modèle d'évolution génétique « birth and death » ou naissance et mort (Nei & Rooney, 2005; Eirín-López et al., 2012; Andersson et al., 2015). Dans ce modèle, les nouveaux gènes sont créés à partir de la duplication de gènes, on parle donc de naissance. La duplication d'un gène induit une redondance fonctionnelle, et donc le relâchement de la pression de sélection sur l'une des deux répliques qui peut donc diverger vers une nouvelle fonctionnalisation. Certains gènes dupliqués restent longtemps dans le génome, tandis que d'autres copies sont inactivées ou supprimées du génome par délétion ou pseudogénéisation (Figure 6).

CHAPITRE 2

*Les mouches des fruits Tephritidae, ravageurs
des cultures fruitières et maraîchères
nécessitant une gestion intégrée*

CHAPITRE 2

Les mouches des fruits Tephritidae, ravageurs des cultures fruitières et maraîchères nécessitant une gestion intégrée

Contenu

2.1. Présentation du chapitre	28
2.2. Biologie et écologie des mouches des fruits	29
2.3. Les mouches des fruits dans la zone SOOI et à La Réunion.....	35
2.4. Méthodes de lutte contre les mouches des fruits.....	42

2.1. Présentation du chapitre

Le modèle d'étude sur lequel repose cette thèse concerne plusieurs espèces de la famille Tephritidae (ordre : Diptera), appelées communément « mouches des fruits ». Ce sont des insectes phytophages dont la famille regroupe un grand nombre d'espèces nuisibles aux cultures fruitières et légumières. Selon leur degré de spécialisation aux plantes hôtes, les espèces de mouches des fruits sont classifiées en espèces « généralistes » qui possèdent une gamme d'hôte polyphylétique, et en espèces « spécialistes » ayant une gamme d'hôte restreinte et monophylétique (Fox & Morrow, 1981). D'autres termes, donnant plus de précision sur le nombre d'espèces exploitées, sont également utilisés. On distingue notamment les espèces polyphages (exploitant plusieurs espèces de plantes hôtes appartenant à différentes familles), oligophages (exploitant des espèces de plantes hôtes appartenant à une seule famille) ou monophages (exploitant une seule espèce hôte) (Cates, 1980).

De plus, la famille des Tephritidae se subdivise en plusieurs tribus qui contiennent chacune des espèces polyphages et oligophages, ce qui rend cette famille intéressante pour étudier les mécanismes évolutifs/ adaptatifs associés à la polyphagie dont les mécanismes olfactifs. Le degré de spécialisation a donc évolué plusieurs fois de manière indépendante, ce qui signifie que les mécanismes olfactifs impliqués peuvent être spécifiques et différents. Inversement, le fait d'avoir plusieurs clades permet de découvrir les points communs sur les mécanismes olfactifs de différentes espèces.

Ce deuxième chapitre renferme donc une synthèse bibliographique sur la biologie et écologie des mouches des fruits, les différentes espèces d'importance économique dans la zone du SOOI et à La Réunion, lieu de déroulement de la thèse ainsi que les moyens de lutttes déployés pour lutter contre les espèces nuisibles.

2.2. Biologie et écologie des mouches des fruits

2.2.1. Systématique

Les mouches des fruits sont des insectes phytophages appartenant à la famille des Tephritidae. Cette grande famille comporte plus de 4500 espèces réparties dans différentes tribus et environ 450 genres (White & Elson-Harris, 1992; Norrbom, 2004). La classification hiérarchique de cette famille se présente comme suit :

Règne : Animalia Linnaeus, 1758
 Phylum : Arthropoda Latreille, 1829
 Classe : Insecta Linnaeus, 1758
 Ordre : Diptera Linnaeus, 1758
 Sous-ordre : Brachycera Schiner, 1862
 Division : Cyclorrapha Brauer, 1863
 Groupe : Schizophora Becher, 1882
 Super-famille : Tephritoidea Newman, 1834
 Famille : Tephritidae Newman, 1834

La famille des Tephritidae se compose de plusieurs espèces formant un groupe de ravageurs qui a une très grande importance économique puisqu'elles attaquent les cultures fruitières, légumières et florales de la plupart des zones du monde, que ce soit en milieu tempéré, subtropical ou tropical. Les espèces nuisibles appartiennent principalement à la sous-famille des Dacinae avec la tribu des Ceratidini (*Ceratitis* et *Neoceratitis*) et des Dacini (*Dacus*, *Bactrocera* et *Zeugodacus*), et la sous-famille des Trypetinae avec la tribu des Toxotrypanini (*Anastrepha* and *Toxotrypana*) et des Carpomyinae (*Rhagoletis*) (Norrbom, 2004).

2.2.2. Cycle de vie

Le déroulement du cycle est similaire pour toutes les espèces de mouches des fruits, et la durée diffère selon les espèces, les conditions de température et d'humidité relative du milieu et des hôtes. En guise d'exemple, le cycle de vie de plusieurs espèces de *Ceratitis* se déroule sans diapause à 25°C et 75% d'humidité relative (Vayssières et al., 2008a). Dans la plupart des

cas dans le monde, les mouches des fruits ont une abondance saisonnière avec des populations élevées en été et faibles en hiver (Ouedraogo, 2011; Rull, Lasa, Aluja, Ordano, & Guille, 2013).

Les Tephritidae sont des insectes holométaboles avec un cycle de développement dont les principales étapes sont : l'émergence des adultes, l'accouplement, l'oviposition, le stade œuf, le développement des larves dans le fruit et enfin la pupaison dans le sol (Figure 7) (White & Elson-Harris, 1992). Après l'émergence des adultes, une période de quelques jours de maturation est nécessaire pour qu'ils soient sexuellement actifs. Cette période de maturation sexuelle varie selon les espèces, le sexe des individus, et des paramètres climatiques tels que la température et l'humidité relative. Chez les Ceratitidini, elle est de 6 à 8 jours après l'émergence pour les femelles et de 3 à 4 jours après l'émergence pour les mâles à 25°C (Vayssieres, Sinzogan, & Bokonon-Ganta, 2008), et peut atteindre une quinzaine de jours à 15°C (Duyck & Quilici, 2002a). Chez les Dacini, elle peut atteindre 25 jours (Duyck et al., 2004). Les mouches des fruits adultes n'ont pas les mêmes besoins métaboliques que les larves et se nourrissent principalement de bactéries et levures (Drew et al., 1983). Les femelles en particulier utilisent les protéines ainsi collectées pour leur maturation sexuelle et le développement ovarien. Avant l'accouplement, les mâles de certaines espèces forment un « lek » qui est un regroupement de 2 à 10 individus mâles afin de parader et de faire un appel pour attirer les femelles (Emlen & Oring, 1977; Shelly, 2018). Lors de l'appel, le mâle procède à la dévagination d'une ampoule anale et libère ainsi une phéromone odorante qui va attirer la femelle (Quilici, et al., 2002a). S'ensuit un comportement de cour plus ou moins complexe selon les espèces (Benelli et al., 2014), puis les adultes s'accouplent. Les mâles ont la capacité de s'accoupler fréquemment, tandis que les femelles ont une période réfractaire de plusieurs semaines après l'accouplement et ne sont capable de s'accoupler qu'une ou deux fois dans leur vie. Après l'accouplement, il y a un temps de latence avant l'oviposition et pour un « choix » de site de ponte pour la femelle. La période de pré-oviposition peut être plus courte ou plus longue, selon l'espèce. Les femelles pondent des œufs dans les premiers millimètres de la pulpe du fruit-hôte à l'aide de leur ovipositeur. Les œufs éclosent au bout d'un ou deux jours et donnent des larves. Ensuite, les larves en se nourrissant de la pulpe, se développent dans le fruit et passent par trois stades larvaires. Au troisième stade du développement larvaire, les larves s'enfoncent dans le sol pour se transformer en pupes (Christenson & Foote, 1960; White & Elson-Harris, 1992).

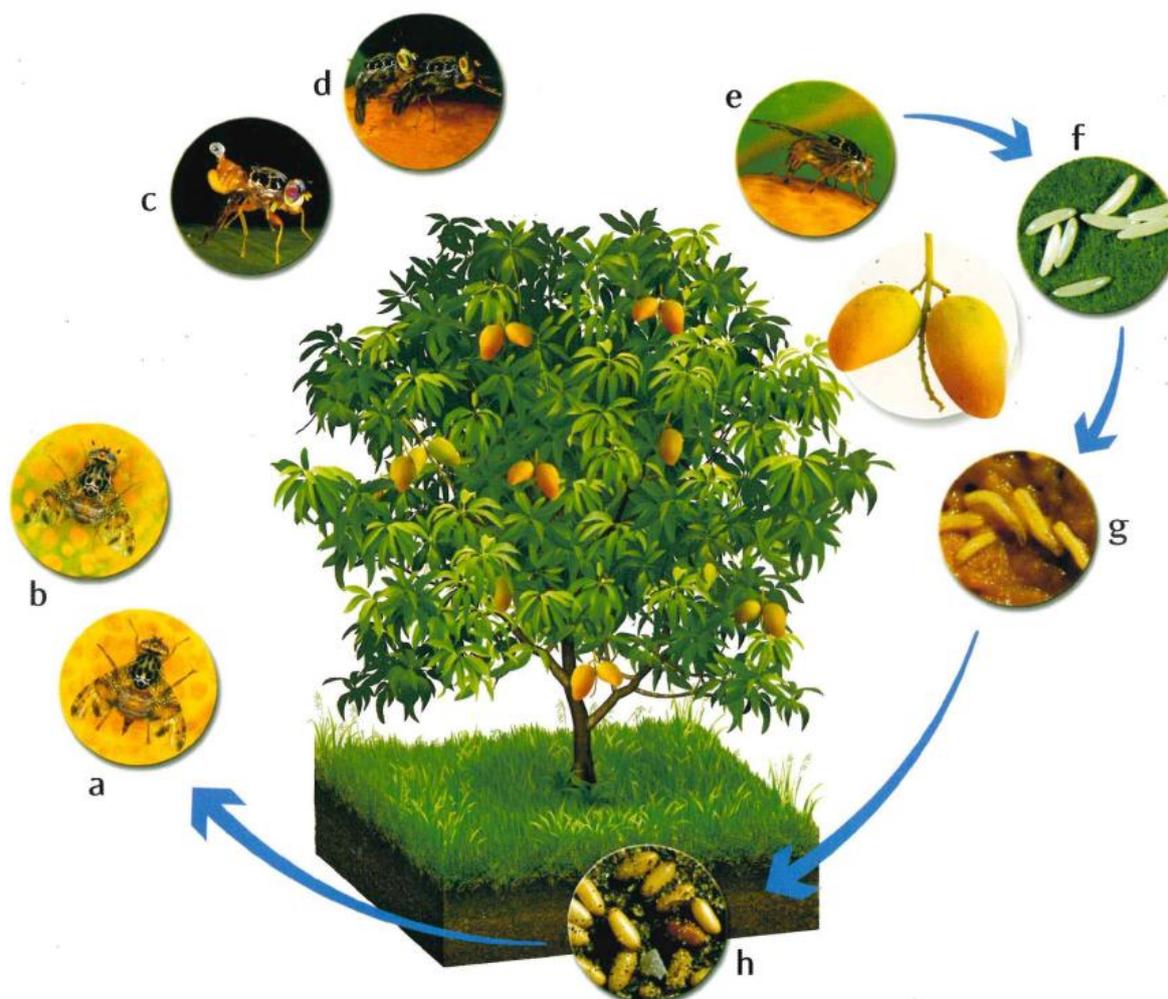


Figure 7 : Cycle biologique de mouches des fruits. Adultes femelle (a) et mâle (b) après leur émergence ; (c) mâle en position d'appel phéromonal ; (d) adultes en position d'accouplement ; (e) femelle en position de ponte sur un fruit ; (f) œufs (sous l'épiderme du fruit) ; (g) larves (dans le fruit) ; (h) pupes (dans le sol). Les flèches correspondent aux changements de stades (d'après Franck et al., 2018 ; photos : © Antoine Franck, CIRAD).

Les dégâts causés par les mouches des fruits sur le fruit se produisent donc essentiellement durant le développement larvaire dans la pulpe du fruit entraînant la détérioration de celui-ci (Figure 8). La pique de la femelle engendre une décoloration autour de la zone impactée et constitue une porte d'entrée pour les pathogènes tels que champignons ou les bactéries par la blessure. De plus, les femelles déposent des bactéries autour de l'œuf lors de la ponte qui accélère le développement des larves. En effet, les tissus des fruits sont pauvres en protéines et c'est les bactéries qui fournissent des acides aminés essentiels et d'autres éléments de croissance aux larves (Fletcher, 1987). Le fruit se détériore donc rapidement et

chute par terre. Une fois tombé au sol, des ravageurs secondaires, essentiellement des Nitidulidae et Drosophilidae, viennent sur le fruit et le font pourrir (Etienne, 1982).



Figure 8 : Dégâts de mouches des fruits sur des fruits de mangue. (a) Pique de mouche sur un fruit, photo : S. Cadet. (b) Détérioration de fruits par les larves, photo : © IITA, CIRAD.

2.2.3. Implication des substances sémiochimiques dans le cycle de vie des mouches des fruits

Les substances sémiochimiques jouent des rôles importants dans différentes phases du cycle de vie des mouches des fruits. Elles sont notamment impliquées dans la localisation des sites de reproduction et la communication intraspécifique entre les individus avant l'accouplement, mais également dans la recherche des sites de ponte par les femelles (Díaz-Fleischer & Aluja, 1999).

Phéromones sexuelles : peu avant l'accouplement, les mouches mâles produisent des phéromones sexuelles afin d'attirer les femelles matures. Elles sont généralement produites au niveau de la glande rectale. Chez les espèces de *Ceratitis*, l'évagination des membranes anales lors de l'appel sexuel est particulièrement importante que chez les Dacini, ce qui augmente l'émission des phéromones chez ces espèces (Arita & Kaneshiro, 1986). Les phéromones sexuelles sont constituées d'un mélange de divers composés avec différents isomères et comprennent des composés majeurs, mineurs et des composés à l'état de trace. Elles peuvent être nouvellement synthétisées et/ ou synthétisées à partir d'un métabolite secondaire de plante (cf. attractifs des mâles) (Fletcher, 1968; Shelly, 2010). La composition du mélange ainsi que la quantité de composés varient entre les mâles, notamment en fonction de l'alimentation, de la

disponibilité des nourritures, du contexte social et du moment de la journée (Nation, 1990; Papadopoulos et al., 1998; Merli et al., 2018).

Phéromones d'agrégation : ces composés déclenchent chez les mâles des mouches des fruits un phénomène de regroupement ou « lek » afin de parader et d'attirer les femelles (Emlen & Oring, 1977; Tan & Nishida, 1998). L'appel des autres mâles conspécifiques et le *lek* se passent sous une feuille de plante hôte portant des fruits chez certaines espèces comme *Bactrocera dorsalis* et sur une plante hôte sans fruits chez d'autres espèces à l'exemple de *Ceratitis capitata*. Chez *Zeugodacus cucurbitae*, le signalement se passe fréquemment sur des plantes non-hôtes (Mir & Mir, 2016; Shelly, 2018). Cependant, la source de ces phéromones n'est pas encore bien définie. En effet, des questionnements se posent si chez les mouches des fruits les phéromones d'agrégation sont dérivées des phéromones sexuelles ou proviennent des plantes où a lieu le *lek*. Pour *Ceratitis capitata*, il a été proposé que l' α -copaène, composé naturellement émis par les plantes hôtes, joue le rôle de phéromone d'agrégation (le terme « phéromone » étant alors abusif). Pour *Bactrocera dorsalis*, les résultats de recherche ne sont pas concluants étant donné que certaines études montrent qu'il s'agit des mêmes composés que les phéromones sexuelles, alors que d'autres évoquent le contraire (Kobayashi et al., 1978; Nishida et al., 1988; Nishida et al., 2000; Tan & Nishida, 2020).

Attractifs de mâles : les mâles de certaines espèces de mouches des fruits peuvent avoir une forte attractivité envers des métabolites secondaires de plantes et s'en nourrissent. Ces métabolites ingérés induisent un changement physiologique chez les mâles et améliorent sa performance sexuelle. En effet, après ingestion, des dérivés métaboliques d'attractifs de mâles sont stockés dans les glandes à phéromones sexuelles des mâles et sont libérés avec celles-ci au moment de la parade nuptiale dans un état modifié ou inchangé. Ce type de phéromone est très attractif pour les femelles et garantit un succès d'accouplement pour les mâles (Nishida et al., 2004; Shelly, 2010; Tan et al., 2014). Par exemple, le méthyl eugénol ingéré, transporté via l'hémolymphe jusqu'à la glande rectale, est converti en d'autres phenylpropanoïdes, en 2-allyl-4,5-diméthoxyphénol et trans-coniferyl alcool chez *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera papaya* et *Bactrocera tryoni* (Fletcher, 1968; Nishida et al., 1988). Chez les espèces sensibles au raspberry ketone, il n'y a pas de transformation du métabolite ingéré (Tan & Nishida, 1995). Il existe deux types d'attractifs de mâles : ceux qui sont produits par les plantes tels que le méthyl eugénol (ME), le raspberry ketone (RK), la zingérone et l' α -copaène, et ceux qui sont anthropogéniques comme le cue-lure (CL), le trimedlure (TML) et d'autres analogues. Les mâles de nombreuses espèces du genre *Bactrocera* et *Zeugodacus* répondent fortement soit au ME soit au RK (Drew & Hooper, 1981). Ces composés sont naturellement présents dans les odeurs florales de certaines orchidées ou dans les odeurs de fleurs, de fruits, de feuilles d'autres plantes. L'attractif synthétique dérivé acétylique du RK, le CL, a été conçu pour lutter contre les espèces sensibles au RK, notamment *Zeugodacus cucurbitae* (Beroza, Alexander, Steiner,

Mitchell, & Miyashita, 1960). Aucune espèce n'est connue pour avoir à la fois une réponse au ME et au RK/CL. Toutefois, la zingerone attire les mâles des espèces sensibles au ME mais également d'espèces sensibles au RK, probablement dû à sa structure chimique qui est hybride entre celle du ME et du RK (Tan & Nishida, 2000). Les mâles de *Ceratitis capitata* sont principalement attirés par l' α -copaène, le TML et ses analogues (Jang et al., 2001).

Phéromone de marquage d'hôtes : après l'oviposition, les femelles de la tribu Ceratitidini produisent et déposent sur le fruit un autre type de phéromone appelé « phéromone de marquage d'hôtes » (host-marking pheromone en anglais, HMP). Ceci permet d'informer les autres femelles conspécifiques de la présence d'œufs dans le fruit. Cela permet donc d'éviter la compétition en nourriture entre les progénitures en terme de ressources (Prokopy, 1972a). Toutefois, aucun dépôt de HMP n'a été observé chez *Bactrocera dorsalis*, *Zeugodacus cucurbitae* et d'autres espèces du genre *Bactrocera* (Prokopy & Koyama, 1982; Fitt, 1984; Prokopy et al., 1989).

Kairomones des fruits hôtes : après l'accouplement, les mouches femelles entament la recherche de plante hôte afin de trouver le site de ponte approprié. A ce stade, les signaux environnementaux dont font partie les kairomones de fruits sont d'une importance cruciale pour les individus femelles afin de les guider vers les sites d'oviposition. Le bon choix des sites de pontes par les femelles assure le bon développement et la survie des descendants. Tandis que les espèces spécialistes sont principalement attirées par leurs fruits-hôtes, les espèces généralistes sont également capable de pondre sur certains fruits qui ne sont pas propices au développement de leurs larves (Charlery de la Masselière et al., 2017a). Beaucoup de travaux de recherche concernent l'attraction des mouches femelles vers la sources d'odeur du fruit hôte (Light et al., 1992; Cruz-López et al., 2006; Siderhurst & Jang, 2006; Alagarmalai et al., 2009; Siderhurst & Jang, 2010; Cha et al., 2011; Niogret et al., 2011; Kamala Jayanthi et al., 2014). Par ailleurs, Drew & Romig (1999) soulève l'importance de la plante hôte qui est considérée comme un lieu de rendez-vous pour les mâles et les femelles. Quelques études montrent que les émissions volatiles de la plante hôte stimulent cette rencontre entre les mâles et les femelles. Les deux sexes sont attirés vers un point central pour la parade nuptiale et l'accouplement (Drew, 1987; Jang et al., 1997).

Kairomones alimentaires : les mouches des fruits adultes, notamment les femelles, sont attirées par les odeurs de leurs sources de nourriture. Ces kairomones alimentaires sont principalement issues des voies métaboliques microbiennes et des dégradations de protéines (Drew et al., 1983; Davis et al., 2013). Aussi, de nombreuses bactéries associées aux Tephritidae sont diazotrophes (capables de fixer les azotes atmosphériques) et fournissent des azotes sous forme assimilables qui sont des éléments constitutifs de protéines durant les périodes où les protéines sont rares dans l'environnement (Nardi, Mackie, & Dawson, 2002).

2.3. Les mouches des fruits dans la zone SOOI et à La Réunion

2.3.1. Les espèces invasives dans la zone SOOI

La zone SOOI abrite différentes espèces indigènes de mouche des fruits qui causent depuis des années des ravages aux cultures fruitières et légumières. On note la présence d'espèces endémiques comme *Ceratitis catoirii*, endémique de Maurice et de La Réunion (Orlan & Moutia, 1960; Etienne, 1972; White et al., 2000) et *Ceratitis malgassa*, endémique de Madagascar (Dubois, 1965). Les dégâts provoqués par les mouches des fruits se sont démultipliés avec l'établissement de nombreuses autres espèces invasives en provenance du continent africain ou de l'Asie. En effet, les îles du SOOI constituent un carrefour entre ces deux continents à travers les échanges commerciaux qui ont probablement causés les différentes vagues d'invasion de Tephritidae. Les espèces de *Ceratitis* viennent du continent africain et se sont propagées dans les îles durant la première partie de 20^{ème} siècle. Pour les espèces de *Bactrocera*, l'invasion a commencé plus tard en fin du 20^{ème} siècle avec comme origine des populations asiatiques (Duyck et al., 2022). Les schémas d'invasion sont différents selon les espèces et les zones géographiques. Par exemple, *Bactrocera zonata* a directement envahi les îles du SOOI depuis l'Asie tandis que *Bactrocera dorsalis* est d'abord passé par l'Afrique avant de coloniser l'Océan Indien. En effet, après avoir envahi l'Afrique continentale, le Kenya en 2003 et la Tanzanie en 2004 (Drew et al., 2005; Lux et al., 2003), cette espèce s'est consécutivement installée dans les îles du SOOI en l'espace de quelques années : aux Comores en 2005, à Mayotte en 2007, à Madagascar en 2010, à Maurice en 2015 et à La Réunion en 2017 (de Meyer et al., 2012; Ekesi et al., 2016; Hassani et al., 2016; Moquet et al., 2021). Ceci dit, la supposition d'introduction de proche en proche des îles à partir du continent africain vient d'être remise en cause avec la confirmation que les populations de *Bactrocera dorsalis* à Maurice et à La Réunion correspondent à une deuxième vague d'invasion directement originaire d'Asie (Deschepper et al., 2022).

2.3.2. Les espèces invasives à La Réunion

2.3.2.1. Description des espèces étudiées

Plusieurs espèces de mouches des fruits sont présentes à La Réunion, dont neuf sont actuellement considérées comme des ravageurs très préjudiciables pour les cultures fruitières et légumières. Ces espèces appartiennent aux tribus des Ceratitidini et Dacini, de la sous-famille des Dacinae (White & Elson-Harris, 1992). Parmi ces espèces, deux sont indigènes de l'Océan Indien : *Ceratitis catoirii* et *Dacus demmerezzi*. Les autres espèces ont été successivement introduites à La Réunion en provenance de l'Asie et de l'Afrique (Vayssières et al., 2001; Duyck et al., 2006; Duyck et al., 2022).

Huit espèces de mouches des fruits sont étudiées dans le cadre de cette thèse dont les caractéristiques morphologiques, les gammes d'hôtes et la répartition géographique sont présentées ci-dessous.

a. La mouche orientale des fruits *Bactrocera dorsalis* (Hendel, 1912)

L'adulte de *Bactrocera dorsalis* est caractérisé par la présence de deux bandes latérales jaunes sur le scutum. Le scutellum est coloré en jaune avec une petite bande noire à la base. Son abdomen est marqué de taches sombres noires formant un T. Les ailes sont transparentes munies des nervures costales noirâtres (Figure 9) (Ekesi & Billah, 2006).

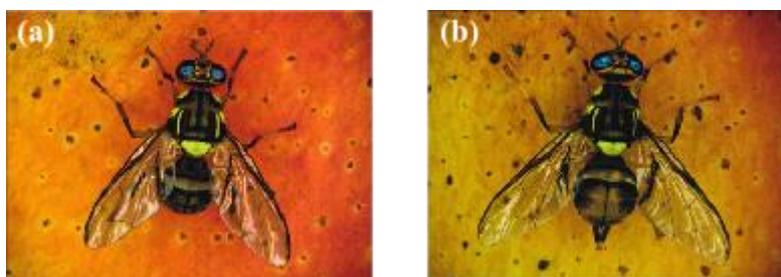


Figure 9 : Mâle (a) et femelle (b) adultes de *Bactrocera dorsalis*.

Photos : © Antoine Franck, CIRAD

Bactrocera dorsalis est l'espèce la plus récemment détectée à La Réunion. Ces individus sont signalés pour la première fois en fin avril 2017. C'est une espèce originaire d'Inde, de l'Asie du sud-est et du sud de la Chine. Elle présente une large distribution mondiale, notamment dans les régions subtropicales et tropicales (Stephens, Kriticos, & Leriche, 2007). A La Réunion, l'espèce se retrouve dans presque tout l'ensemble de l'île entre 0 et 1600 m (Moquet et al., 2021). *Bactrocera dorsalis* est une espèce très polyphage. Elle est inféodée à plus de 250 espèces de plantes hôtes dans le monde et à plus d'une cinquantaine à La Réunion. Les espèces les plus touchées sur l'île, selon le taux d'infestation, sont les mangues (*Mangifera indica*), les badames (*Terminalia catappa*), les jamrosats (*Syzygium jambos*), les goyaviers fraises (*Psidium cattleianum*) et les goyaves (*Psidium guajava*) (White & Elson-Harris, 1992; Schutze et al., 2017; Moquet et al., 2021).

b. La mouche de la pêche *Bactrocera zonata* (Saunders, 1841)

L'adulte de *Bactrocera zonata* se caractérise par la quasi-absence de taches brunes sur les ailes. Cependant, l'espèce est facilement reconnaissable par la présence d'une petite tache noire à l'extrémité des ailes. Le scutum présente deux bandes jaunes longitudinales (Figure 10).

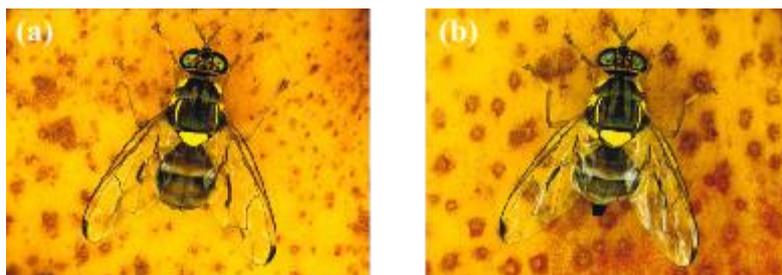


Figure 10 : Mâle (a) et femelle (b) adultes de *Bactrocera zonata*.

Photos : © Antoine Franck, CIRAD

Bactrocera zonata est originaire du Bengale, en Inde. Cette espèce se répartit dans les zones subtropicales et tropicales mais elle est également établie dans le nord de l’Egypte où les températures peuvent descendre très bas en hiver. Cela démontre sa capacité à survivre dans les conditions climatiques méditerranéennes (Delrio & Cocco, 2012). Elle a été détectée à La Réunion pour la première fois en 1991. La population de cette espèce a explosée en 2000 après une tentative d’éradication (Hurtrel et al., 2002). Sur l’île, l’espèce se rencontre sur les zones à basse altitude entre 0 et 600 m (Moquet et al., 2021). Cette espèce est polyphage et attaque environ une vingtaine de fruits hôtes (White & Elson-Harris, 1992; Charlery de la Masselière et al., 2017b) dont les principaux sont les mangues, les pêches (*Prunus persica*) et les goyaves.

c. La mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824)

L’adulte de *Ceratitis capitata* présente une bande transversale sinueuse claire près du bord antérieur du scutellum. L’abdomen est de couleur jaune-orangée avec deux bandes argentées transversales. Les ailes sont claires tachetées de points noirs, jaunes et brunâtres. Les mâles de cette espèce possèdent sur leur tête des palettes noires et aplaties à l’apex des soies orbitales (Figure 11).

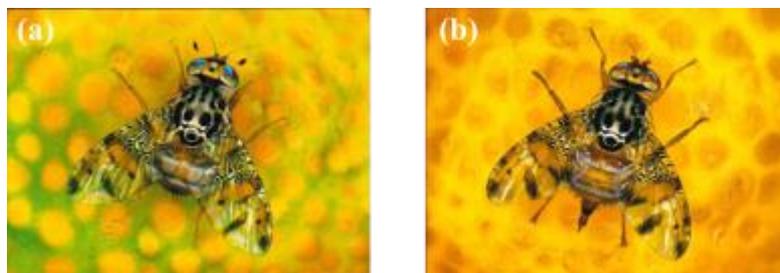


Figure 11 : Mâle (a) et femelle (b) adultes de *Ceratitis capitata*.

Photos : © Antoine Franck, CIRAD

Ceratitis capitata est originaire de l'Afrique de l'Est. C'est une espèce quasi-cosmopolite avec une répartition dans les zones tropicales, subtropicales et méditerranéennes. *Ceratitis capitata* est la première espèce qui a envahi La Réunion avec une détection en 1939 (Etienne, 1972; de Meyer et al., 2002). Elle est fréquente dans l'est de l'île et se retrouve entre 0 et 850 m d'altitude (Moquet et al., 2021). Cette espèce est extrêmement polyphage avec plus de 300 plantes hôtes dans le monde (Liquidó et al., 1990).

d. La mouche des fruits des Mascareignes *Ceratitis catoirii* (Guérin-Méneville, 1843)

L'adulte de *Ceratitis catoirii* présente également une bande transversale sinueuse claire près du bord antérieur du scutellum. L'autre moitié du scutellum des femelles sont entièrement de couleur noire. Les mâles se distinguent par la présence de larges palettes blanches à l'apex des soies orbitales (Figures 12).

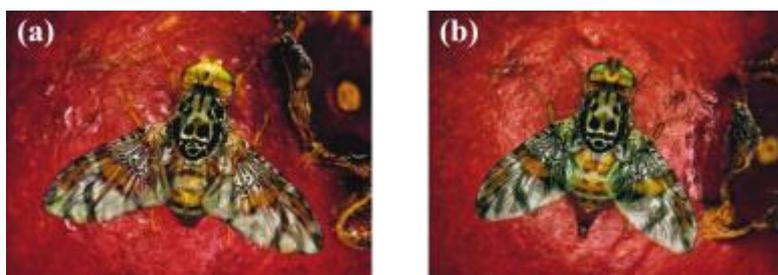


Figure 12 : Mâle (a) et femelle (b) adultes de *Ceratitis catoirii*.

Photos : © Antoine Franck, CIRAD

Ceratitis catoirii est une espèce endémique de La Réunion et de l'île Maurice mais sa répartition géographique est actuellement limitée à La Réunion (White et al., 2000). L'espèce a été observée dans le nord et le sud de l'île à des altitudes entre 0 et 760 m (Moquet et al., 2021). *Ceratitis catoirii* est une espèce polyphage.

e. La mouche du Cap *Ceratitis quilicii* (de Meyer, Mwatawala & Virgilio, 2016)

L'adulte de *Ceratitis quilicii* a un scutellum blanc jaunâtre marqué par trois taches noires séparés et deux petites taches brunes foncées à la base. Les mâles ne présentent pas de palettes sur les soies orbitales contrairement aux deux autres espèces *Ceratitis capitata* et *Ceratitis catoirii*. Ils ont cependant de longues soies noires, visible à l'œil nu, sur les pattes antérieures (Figure 13) (de Meyer et al., 2016).

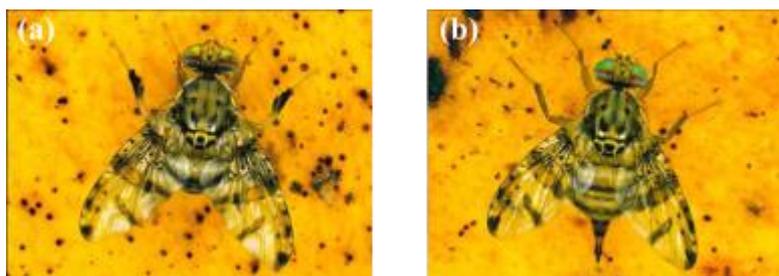


Figure 13 : Mâle (a) et femelle (b) adultes de *Ceratitidis quilicii*.

Photos : © Antoine Franck, CIRAD

Ceratitidis quilicii (anciennement appelé *Ceratitidis rosa*) est originaire de l'Afrique du sud et de l'est. L'espèce ne se répartit que dans ses aires d'origine et à La Réunion où elle a été détectée en 1955 (White & Elson-Harris, 1992; Marc de Meyer, 2001). Elle est présente sur toute l'île entre 0 à 1580 m d'altitude (Moquet et al., 2021). C'est une espèce polyphage, se nourrissant de différentes espèces de fruits, avec plus d'une vingtaine d'hôtes confirmés à La Réunion.

f. La mouche des Cucurbitaceae de l'Océan Indien *Dacus demmerezi* (Bezzi, 1917)

L'adulte de *Dacus demmerezi* a une forme massive et mesure plus 8 mm. L'espèce présente une fine bande jaune longitudinale sur le scutum. Elle se distingue par la présence de tache brune au milieu et à la base de l'aile (Figure 14).

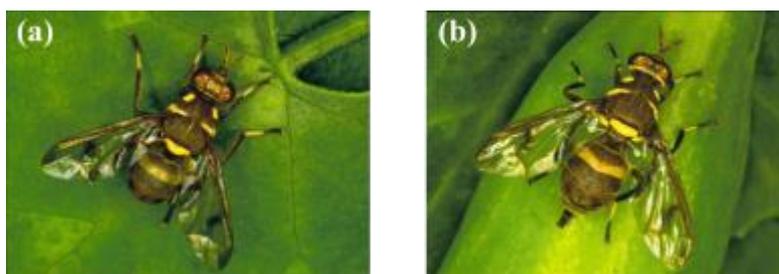


Figure 14 : Mâle (a) et femelle (b) adultes de *Dacus demmerezi*.

Photos : © Antoine Franck, CIRAD

Dacus demmerezi est une espèce originaire des îles de l'océan Indien. Son aire de répartition est limitée à Madagascar et dans les îles du SOOI. L'espèce a été détectée à La Réunion en 1972. Sur l'île, elle provoque souvent des dégâts importants dans les zones à haute altitude, à plus de 600 m. C'est une espèce oligophage inféodée aux espèces appartenant à la famille des Cucurbitaceae (Vayssières, 1999; Ryckewaert et al., 2010).

g. La mouche de la tomate *Neoceratitis cyanescens* (Bezzi, 1923)

L'adulte de *Neoceratitis cyanescens* est facilement identifiable par la présence de bandes brunes sur les ailes. Le scutellum est de couleur brune noire sur la moitié apicale. L'abdomen est marqué par des bandes rouges très caractéristiques (Figure 15) (de Meyer & Freidberg, 2012).

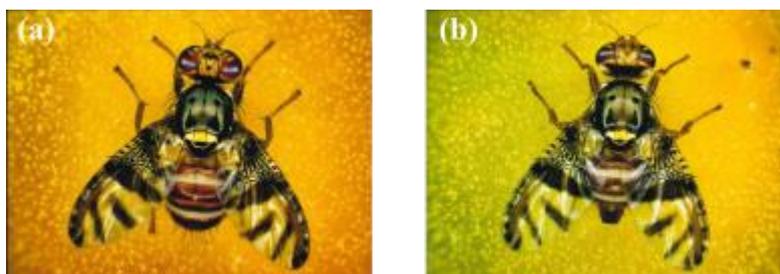


Figure 15 : Mâle (a) et femelle (b) adultes de *Neoceratitis cyanescens*.

Photos : © Antoine Franck, CIRAD

Neoceratitis cyanescens est originaire de Madagascar. Son aire de répartition est constituée de son aire d'origine et les îles du SOOI. Cette espèce a été détectée à La Réunion en 1951. Sur l'île, elle se trouve entre 0 et 1500 m d'altitude. C'est une espèce oligophage qui attaque les espèces de plante appartenant de la famille des Solanaceae (Etienne, 1982).

h. La mouche du melon *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett, 1899)

L'adulte de *Zeugodacus cucurbitae* a un scutum présentant deux bandes jaunes latérales et trois lignes médianes jaunes. Les ailes portent trois taches brunes dont une à l'extrémité (Figures 16).

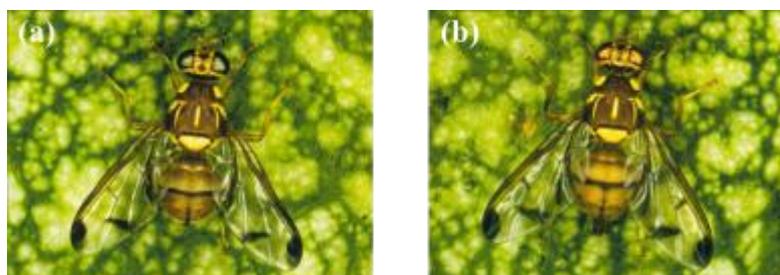


Figure 16 : Mâle (a) et femelle (b) adultes de *Zeugodacus cucurbitae*.

Photos : © Antoine Franck, CIRAD

Zeugodacus cucurbitae (anciennement appelé *Bactrocera cucurbitae*) est une espèce d'origine asiatique, plus précisément de l'Inde. Son aire de distribution comprend plusieurs pays d'Asie, d'Afrique et les îles du SOOI. Cette espèce a été détectée à La Réunion en 1972. Elle y colonise les zones du littoral jusqu'à 600 m d'altitude. *Zeugodacus cucurbitae* est une espèce oligophage qui se développe majoritairement sur des espèces de plantes appartenant à la famille des Cucurbitaceae (Etienne, 1982; Dhillon et al., 2005).

2.3.2.2. Recouvrement des gammes d'hôtes des mouches des fruits à La Réunion

Les espèces de Tephritidae invasives à La Réunion forment trois groupes écologiques distincts selon leurs gammes d'hôtes: i) les généralistes qui sont *Ceratitis catirii*, *Ceratitis capitata*, *Ceratitis quilicii*, *Bactrocera zonata* et *Bactrocera dorsalis*, ii) les spécialistes (*Dacus demmerezi*, *Dacus ciliatus* et *Zeugodacus cucurbitae*) se nourrissant presque exclusivement de plantes appartenant à la famille des Cucurbitacées et iii) la spécialiste *Neoceratitis cyanescens* dont les hôtes sont constitués pour la plupart de plantes de la famille des Solanacées. Les espèces spécialistes utilisent des plantes hôtes qui sont proches phylogénétiquement, contrairement aux espèces généralistes. Malgré la spécialisation, les gammes d'hôtes de ces espèces se recouvrent partiellement, avec des espèces polyphages qui peuvent exploiter des Cucurbitaceae et Solanaceae et les espèces oligophages qui infestent occasionnellement d'autres plantes (Charlery de la Masselière et al., 2017b). La plupart des plantes hôtes des espèces généralistes sont saisonnières et ne permettent pas à elles seules la survie d'une population annuelle de mouches, mais l'alternance des saisons de fructification entre espèces de plantes le permet. A l'inverse, les familles de plante exploitées par les espèces spécialistes sont abondantes et fructifient toute l'année sur l'île (Vayssières, 1999; Charlery de la Masselière et al., 2017b).

Selon les impacts qu'une espèce a sur son environnement, on distingue la niche fondamentale qui rassemble toutes les ressources et les conditions environnementales permettant la survie et la reproduction d'une espèce en l'absence de compétiteurs, tandis que la niche réalisée rassemble toutes les ressources et les conditions environnementales réellement utilisées par une espèce, et peut varier à cause de la présence d'espèces compétitrices (Hutchinson, 1957). Les invasions successives de *Bactrocera zonata* et *Bactrocera dorsalis*, connues comme étant des espèces extrêmement polyphages et compétitives, ont engendré un changement horizontal dans la communauté de ces espèces de mouches de fruits, conséquence d'un chevauchement de niche. Les espèces généralistes ont perdu un certain nombre de plantes hôtes tandis que les espèces spécialistes n'ont subi aucun changement au niveau de la taille de leurs gammes d'hôtes (Charlery de la Masselière *et al.*, 2017b). En particulier, la gamme d'hôte réalisée de *Ceratitis capitata* s'est réduite vers des fruits refuges à petites baies (Charlery de la

Masselière et al., 2017a; Moquet et al., 2021). *Ceratitis catoirii* ne se trouve plus que sur quelques fruits à La Réunion comme par exemple sur les jujubes (*Ziziphus mauritiana*) et les badames (Moquet et al., 2021). *Ceratitis quilicii* tolère une gamme d'altitudes plus étendue que les autres Tephritidae généralistes, et s'est donc déplacée vers les plus hautes altitudes sans trop réduire sa gamme d'hôte. Enfin, l'invasion de *Bactrocera dorsalis* a provoqué la quasi-disparition de *Bactrocera zonata* alors que c'était l'espèce dominante auparavant. Cela laisse penser que cette dernière espèce n'a pas de niche refuge à La Réunion, ni en terme climatique, ni en terme d'hôte.

2.4. Méthodes de lutte contre les mouches des fruits

La famille des Tephritidae regroupe plusieurs espèces ayant des impacts économiques importantes. Les pertes en rendement agricole sont en effet très conséquentes avec par exemple une moyenne de 40% pour la culture de mangues et de 50% pour la culture de citrouille et de tomate en Afrique subsaharienne. Les vergers qui n'ont reçu aucune méthode de lutte peuvent atteindre jusqu'à 100% de pertes de production (Gavriel, Jurkevitch, Gazit, & Yuval, 2011). Outre ces impacts directs, les mouches des fruits occasionnent également des impacts indirects avec les restrictions à l'exportation qui met à mal la commercialisation mondiale des fruits et légumes (Ekesi et al., 2016).

La gestion de ces ravageurs repose en grande partie sur l'utilisation de produits phytosanitaires qui ont également des impacts négatifs puisqu'ils sont onéreux et affectent l'environnement et la santé humaine et animale (Khan et al., 2005; Gill & Garg, 2014; Candia et al., 2019). Des stratégies alternatives écologiquement durables reposent sur l'intégration d'un ensemble de mesures incluant des méthodes basées sur l'olfaction des insectes.

De ce fait, différents programmes de lutte ont été développés tels que la protection intégrée des cultures (Integrated Pest Management en anglais, IPM) appliquée dans plusieurs pays du monde (Jessup et al., 2007; Vargas et al., 2015; Muriithi et al., 2016) ou de gestion agroécologique des mouches des fruits (Deguine et al., 2013). L'IPM est une approche de gestion durable des ravageurs qui combine l'utilisation de différentes techniques biologiques, culturelles et chimiques afin de réduire les impacts sur l'environnement, la santé et l'économie. Cette approche s'est avérée efficace pour lutter contre les espèces de Tephritidae en incorporant différentes techniques de piégeages à l'exemple de la technique d'annihilation des mâles (Male Annihilation Technique en anglais, MAT), la Technique de l'Insecte Stérile (TIS) et souvent la pulvérisation sur des plantes auxiliaires d'insecticides associés à des attractifs alimentaires (Ekesi et al., 2016; Vreysen et al., 2007).

GAMOUR (Gestion Agroécologique des MOUCHES des légumes à La Réunion), par exemple, est un projet recherche-développement développé à La Réunion dans le but de lutter contre les espèces s'attaquant aux cultures de Cucurbitaceae à savoir *Dacus ciliatus*, *Dacus demmerezi* et *Zeugodacus cucurbitae*. D'un point de vue technique, le projet s'appuie sur une démarche agroécologique et privilégie la gestion des populations de bioagresseurs et de leurs ennemis naturels. Il intègre l'utilisation de différentes techniques de protection des cultures telles que l'augmentorium, les plantes pièges, les appâts adulticides et le piégeage sexuel (Deguine et al., 2013).

Le succès de ces différentes méthodes de lutttes implique des connaissances approfondies sur l'olfaction, l'écologie chimique et la biologie des mouches des fruits.

2.4.1. Méthodes basées sur la lutte chimique conventionnelle

La lutte chimique contre les mouches des fruits a commencé au début du 20^{ème} siècle avec l'utilisation de divers insecticides comme l'arséniate de plomb, le fluorosilicate de sodium et le dichlorodiphényltrichloroéthane (Vilardebo, 1946; Metcalf & Luckmann, 1994). D'autres insecticides à large spectre ont été également utilisés à l'exemple du méthidathion, diméthanoate et malathion. Ce sont des insecticides à très large spectre qui sont très toxiques et non-spécifiques (Michaud & Grant, 2003). Du fait d'impacts négatifs sur des espèces non-cibles, plusieurs produits, incluant le malathion, ont été retiré du marché européen. Le spinosad, moins toxique pour d'autres insectes tels que les ennemis naturels des ravageurs de culture, a été depuis utilisé comme alternative (Chueca et al., 2007). Les différents traitements sont essentiellement appliqués par pulvérisation foliaire avec des doses et conditions différentes selon les produits. D'autres pratiques privilégient la pulvérisation de la surface du sol du verger infesté afin de tuer les larves et les pupes avant que les adultes émergent. Le traitement par bande ou par tache d'un mélange d'appât alimentaire et d'insecticide a été développé comme alternative aux traitements chimiques classiques dans le but réduire les doses et la zone d'épandage (Prokopy et al., 1992; Badii et al., 2015). Enfin, des insecticides peuvent également être contenus à l'intérieur de pièges en association avec un attractif, pratique qui préserve l'environnement et qui est compatible avec une gestion agroécologique des cultures.

2.4.2. Méthodes de lutte basées sur l'olfaction des insectes

Les connaissances et les nombreuses recherches sur les substances sémiochimiques impliquées dans le cycle de vie des mouches des fruits ont permis le développement de méthodes de lutttes basées sur l'olfaction des insectes. Les phéromones, les kairomones ou

encore les allomones sont utilisées à cet effet. Les possibilités de lutte qui en découlent sont bien sûr intéressantes dans le contexte actuel de diminution ou de suppression des insecticides et le respect des insectes auxiliaires.

2.4.2.1. Attract and kill

La technique attract and kill englobe tous les systèmes qui attirent les insectes cibles vers une toxine. Il existe différents systèmes de dispositifs associés à ce terme, le piégeage de masse, la « bait station » qui est également connu sous le nom de « lure and kill » et le MAT (El-Sayed, Suckling, Wearing, & Byers, 2006; Sarwar, 2015).

Le piégeage de masse a pour objectif de capturer le maximum d'individus femelles dans un piège afin d'éviter leurs attaques aux fruits. Cette technique est utilisée jusqu'à maintenant dans la surveillance et la lutte contre les Tephritidae. Elle consiste à combiner un piège très efficace et un attractif très sélectif (Koul, Dhaliwal, & Cuperus, 2004). Pour cela, un ensemble de stimuli visuels et olfactifs sont utilisés pour développer différents types de piège (Epsky & Heath, 1998). En effet, plusieurs études ont été menées afin d'examiner l'effet de la couleur, de la forme et de la taille des stimuli visuels (Prokopy, 1972b; Prokopy & Economopoulos, 1976; Riedl & Hislop, 1985; Aluja & Prokopy, 1993; Epsky & Heath, 1998). La couleur jaune ou jaune fluorescente est généralement considérée très attractive pour de nombreuses espèces de mouches des fruits. Selon Prokopy (1972b), le jaune agit comme un stimulus « super-normal » (c'est-à-dire qui induit des réponses exagérées) du feuillage vert des plantes qui provoque des comportement de recherche de plante hôte et de nourriture. Toutefois, il existe des espèces qui répondent à d'autres couleurs comme *Rhagoletis completa* et *Bactrocera minax* qui sont attirés par la couleur verte (Riedl & Hislop, 1985; Cui et al., 2022). Les attractifs olfactifs couramment utilisés sont essentiellement des attractifs alimentaires (protéines). Ils sont utilisés sous leurs formes naturelles, synthétiques, liquides ou solides (Allwood, Vueti, Leblanc, & Bull, 2002).

La technique de « bait station » est similaire au piégeage de masse étant donné que le système est composé de mélange d'attractifs alimentaires à base de protéine et de sucre de fermentation et d'insecticide appliqué dans des dispositifs accrochés dans les plantes-hôtes. Cependant, la « bait station » utilise une substance toxique plutôt qu'un piège pour éliminer les mâles et femelles adultes de l'insecte cible (Koul et al., 2004; El-Sayed et al., 2006). La différence entre ces deux premiers systèmes réside dans le fait que le piégeage de masse se réfère à un type de piège, conserve la mouche cible capturée, alors que la « bait station » se réfère uniquement à des dispositifs qui attirent la mouche cible au contact direct avec l'insecticide sans la conserver (El-Sayed et al., 2006).

Le « MAT » ou technique d'annihilation des mâles consiste à utiliser un attractif spécifique des mâles, une paraphéromone, pour n'attirer que les mâles des mouches des fruits dans le champ. L'objectif de cette technique est de réduire le nombre des mâles à un faible niveau afin de diminuer la fécondation et interrompre ainsi le cycle de vie des mouches (Sarwar, 2015). La première découverte des attractifs de mâles des Tephritidae date environ d'une centaine d'année avec la découverte du méthyl eugénol (Howlett, 1912, 1915). Depuis les principaux attractifs habituellement utilisés sont le méthyl eugénol (benzene, 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl) ou le Cue-lure (4-(p-hydroxyphenyl)-2-butanone acetate) pour les espèces de *Bactrocera*, le Trimedlure (tert-butyl-4-5-chloro-2-methylcyclohexane-1-carboxylate) ou le terpinyl acetate (alpha, alpha,4-trimethyl-3-cyclohexene-1-methanol) pour les espèces de *Ceratitis* et enfin le Cue-lure ou le Vertlure (methyl-4-hydroxybenzoate) pour les espèces de *Dacus* (Keiser et al., 1973; Ekesi & Billah, 2006). Un bloc MAT est un piège formé de l'attractif sexuel spécifique et d'un insecticide le tout porté par un support solide. Cependant, la technique du MAT peut être aussi faite par pulvérisation foliaire de la mixture attractif-insecticide ou par introduction dans un piège gobe-mouche (Sookar et al., 2006).

2.4.2.2. Push pull ou la stratégie de détournement stimulo-dissuasif

Une étude mentionnant la stratégie push-pull (répulsion-attraction) a été publiée pour la première fois en 1987. L'étude consistait à développer un nouveau moyen de lutte comportementale contre un lépidoptère ravageur du coton (genre : *Helicoverpa*) qui était devenu résistant aux insecticides (Pyke, Rice, Sabine, & Zalucki, 1987). Depuis, plusieurs travaux ont suggéré des stratégies similaires comme méthodes potentielles de régulation des ravageurs (Eigenbrode, Birch, Lindzey, Meadow, & Snyder, 2016). Ces stratégies se basent sur le potentiel de différents stimuli modifiant le comportement pour manipuler la distribution et l'abondance des ravageurs ou des auxiliaires (Cook, Khan, & Pickett, 2007). Les stimuli peuvent être de nature variée (visuels, olfactifs, tactiles ou gustatifs) et intervenir à différentes étapes de la sélection de l'hôte (localisation à courte ou à longue distance) (Lamy, 2016). Le principe du push-pull consiste à repousser un insecte ravageur en dehors de la culture tout en l'attirant sur un hôte de substitution sur lequel il pourra être contrôlé. De ce fait, la composante dite « push » du système se trouve à l'intérieur de la culture à protéger. Elle va repousser ou dissuader les ravageurs afin que le maximum d'entre eux se détourne vers la composante « pull ». Cette zone va constituer un hôte de substitution plus attractif que la culture. Afin d'éviter toute pullulation, les ravageurs peuvent y être contrôlés en utilisant diverses méthodes telles que la culture piège, le piégeage massif, les insectes auxiliaires, les produits phytopharmaceutiques, etc. (Lamy, 2016). Des stratégies adaptées du push-pull sont parfois utilisées contre des espèces de Tephritidae (Deguine et al., 2015) et plusieurs études récentes

ciblent à cette fin des répulsifs et inhibiteurs d'oviposition (Jaffar & Lu, 2022; Kempraj, Park, Cameron, & Taylor, 2022).

2.4.2.3. Confusion sexuelle

A part les différentes méthodes citées ci-dessus, la confusion sexuelle fait également partie des méthodes de lutte basées sur l'olfaction. Cependant, cette pratique n'est pas encore très développée chez les mouches des fruits. La confusion sexuelle consiste à diffuser dans l'atmosphère une quantité suffisante de phéromone synthétique dans une zone délimitée afin de perturber la rencontre entre les mâles et les femelles et empêcher ainsi la reproduction. Le rapport entre l'attractivité de l'appel sexuel et de la source de phéromone synthétique détermine l'efficacité du mécanisme. L'exposition des mâles à un perturbateur provoque une diminution ou une suppression de la réactivité aux phéromones qui sont généralement dues à l'adaptation ou à l'accoutumance des récepteurs sensoriels (Cardé & Minks, 1995; Cardé, 2021). La confusion sexuelle est utilisée dans la lutte contre différentes espèces de papillon ravageur à l'exemple de la carpocapse *Cydia pomonella* sur les pommes, la tordeuse orientale *Grapholita molesta* sur les pêches et les nectarines, la mineuse tropicale des tomates *Keiferia lycopersicella* sur les Solanacées, le ver rose *Pectinophora gossypiella* sur le coton et la tordeuse omnivore *Platynota stultana* en vignoble. Les individus mâles des papillons ont une très grande capacité à détecter à longue distance les phéromones sexuelles libérées par les femelles. En effet, leur système olfactif est conçu de manière à détecter et distinguer les traces de phéromones parmi les autres substances volatiles environnantes. C'est ce qui explique le succès de la confusion sexuelle chez ces insectes puisque la diffusion des phéromones synthétiques dans les parcelles de culture perturbent la localisation des femelles par les individus mâles (Cardé & Minks, 1995; Il'Ichev et al., 2006; Stengl, 2010; Cardé, 2021). Par ailleurs, puisque cette technique s'applique dans une zone délimitée, elle est efficace contre les insectes qui explorent des cultures regroupées, en particulier les espèces oligophages qui ne vont pas se disperser sur d'autres plantes.

2.4.3. Méthodes de lutte non basées sur l'olfaction

2.4.3.1. Méthodes de lutte mécanique

Les luttes mécaniques regroupent l'ensemble des méthodes prophylactiques. On note notamment le système de « wrapping » qui consiste à emballer le fruit dans un sac en papier bien avant les attaques des mouches des fruits, au moins un mois avant la récolte. Cette

technique vise à éviter le contact entre le fruit et les femelles de mouches, et permet donc d'éviter la ponte (Badii et al., 2015).

L'assainissement des parcelles de cultures fait partie intégrante des luttes mécaniques. Pour cela, les pratiques les plus répandues sont le ramassage des fruits infestés tombés au sol, qui sont mis dans des sacs noirs entreposés au soleil ou enfouis en profondeur dans le sol afin de détruire les stades pré-imagaux et d'interrompre le cycle de vie des mouches (Ishaq et al., 2004; Vayssières et al., 2008b). Une autre pratique alternative consiste à utiliser un « augmentorium ». Le principe est de piéger les mouches adultes émergentes et de permettre aux parasitoïdes de s'échapper dans la nature, augmentant ainsi leur population. L'augmentorium est utilisé à La Réunion dans le cadre de la lutte agroécologique des mouches des fruits (Deguine et al., 2011a,b).

2.4.3.2. Technique de l'insecte stérile ou lutte autocide (TIS)

Le concept de la TIS a été conçu dans les années 1950 aux Etats-Unis par le chercheur Knipling et son équipe (Knipling, 1955). Par la suite, cette technique a été appliquée pour lutter contre la mouche de la viande *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) et des espèces de Tephritidae tropicales (Klassen & Curtis, 2005). La TIS consiste dans un premier temps à élever en masse des individus de l'insecte cible dans des infrastructures spécialisées. Les pupes ou les adultes sont irradiés par la suite afin de leur conférer une stérilisation reproductive. Puis, les individus mâles sont lâchés dans un espace délimité afin de les faire rentrer en compétition avec les mâles présents dans la nature. La population de l'insecte ciblée se trouve ainsi réduite du fait de l'accouplement des femelles natives avec les mâles stériles relâchés. Plusieurs succès d'éradication ont eu lieu avec les mouches des fruits, comme par exemple la lutte contre *Bactrocera tryoni* en Australie ; *Ceratitis capitata* au Mexique, Palestine, Israël ; *Zeugodacus cucurbitae* dans le sud du Japon et dans plusieurs îles de l'archipel d'Hawaï (Steiner & Lee, 1955; Enkerlin & Mumford, 1997; Koyama et al., 2004; Meats & Edgerton, 2008). Toutefois, la TIS est plus efficace quand la densité de population de ravageurs est faible avant le lâcher des mâles stériles. Elle ne s'applique donc pas seule, mais en combinaison avec d'autres techniques de piégeage comme par exemple l'application de MAT intensive (Khan et al., 2017).

2.4.3.3. La lutte biologique

La lutte biologique se définit comme étant l'exploitation d'agents vivants (incluant les virus) pour combattre les organismes nuisibles (ravageurs et pathogènes), directement ou indirectement, pour le bien de l'homme (Stenberg et al., 2021). Pour les mouches des fruits, la

lutte biologique consiste principalement en l'utilisation de parasitoïdes mais également de champignons et de nématodes entomopathogènes. Les parasitoïdes des mouches des fruits déposent leurs œufs dans les larves, les pupes ou les œufs des mouches. Ce sont des espèces de micro-hyménoptères appartenant aux Braconidae, Eulophidae, Chalcididae et Diapriidae. Les plus utilisées sont des espèces de la sous-famille Opiinae (Braconidae). Les premiers essais de lutte biologique contre les mouches des fruits avec des parasitoïdes ont eu lieu en 1902 sur *Ceratitis capitata* (Wharton, 1989). Depuis, différents programmes d'introduction de différentes espèces de parasitoïdes ont été menés à travers le monde. A La Réunion, une introduction de *Psytalia fletcheri* en 1995 a permis d'avoir un taux de parasitisme allant jusqu'à 75% sur *Zeugodacus cucurbitae* (Quilici, et al., 2002b). Par la suite, *Fopius arisanus*, un parasitoïde ovo-pupal, a été introduit en 2003 sur l'île et a présenté un taux de parasitisme élevé (entre 70% à 80%) sur *Bactrocera zonata* et *Ceratitis catoirii* (Quilici et al., 2005; Rousse, Gourdon, & Quilici, 2006), puis s'est naturellement déporté vers *Bactrocera dorsalis* après l'invasion de cette espèce avec un taux de parasitisme qui s'est stabilisé aux alentours de 17% (Moquet, Jobart, Fontaine, & Delatte, 2022).

Concernant les champignons entomopathogènes contre les mouches des fruits, plusieurs études se sont concentrées sur l'utilisation de différents isolats de champignons des genres *Metarhizium* et *Beauveria* (Plectosphaerellaceae). Par exemple, *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* ont montré une efficacité et une pathogénicité élevées par rapport à d'autres champignons entomopathogènes sur différentes espèces de *Ceratitis* (*Ceratitis capitata*, *Ceratitis quilicii*, *Ceratitis cosyra*) en conditions de laboratoire (Dimbi et al., 2003; Soliman et al., 2020). Différentes techniques d'application sont proposées pour la lutte contre les mouches des fruits avec les champignons entomopathogènes au champ. Les larves sont ciblées par inoculation du sol. Les adultes sont ciblés par des pulvérisations aériennes, d'appâts protéinés ou bien par autodissémination. Ainsi, les mouches adultes sont attirées vers la source de champignons entomopathogènes à l'aide de stimuli visuels ou olfactifs, se contaminent avec l'inoculum et puis disséminent les spores à ses congénères par le biais des différents contacts physiques (Daniel & Wyss, 2010; Ekesi et al., 2011; Dimbi et al., 2013; Bedini et al., 2018).

En outre, des essais en laboratoire et au champs ont montré que plusieurs espèces de mouches des fruits sont sensibles aux attaques de nématodes du genre *Steinernema* (Steinernematidae) et *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae) (Toledo et al., 2006; Kamali et al., 2013; Shaurub et al., 2021). Ce sont des parasites obligatoires dans la nature et qui sont caractérisés par une association mutualiste avec des bactéries spécifiques (*Xenorhabdus* spp. et *Photorhabdus* spp., respectivement) (Adeolu, Alnajjar, Naushad, & Gupta, 2016). Selon différentes études, les espèces du genre *Heterorhabditis* ont provoqué un taux de mortalité élevé chez les mouches des fruits (Dolinski, 2016; Shaurub et al., 2021).

CHAPITRE 3

*Les méthodes en écologie chimique pour
étudier les réponses olfactives des
mouches des fruits*

CHAPITRE 3

Les méthodes en écologie chimique pour étudier les réponses olfactives des mouches des fruits

Contenu

3.1. Présentation du chapitre	50
3.2. Méthodes d'identification des composés chémiochimiques	51
3.3. Mesure des réponses physiologiques antennaires aux composés volatils par électroantennographie	55
3.4. Mesure des réponses comportementales aux composés volatils	57
3.5. Article 1 : Amélioration de la mesure des réponses antennaires des mouches des fruits par électroantennographie triple	63

3.1. Présentation du chapitre

L'écologie chimique est un domaine multidisciplinaire résultant de l'interaction de différents champs d'étude notamment de la chimie, de l'éthologie, des neurosciences et de l'écologie et évolution. En effet, les analyses chimiques apportent de la connaissance sur la nature des substances chémiochimiques présentes. L'éthologie, ici limitée aux organismes récepteurs animaux, permet de comprendre les comportements stéréotypés des organismes vis-à-vis des signaux chimiques. Les neurosciences aident à évaluer la détection et les mécanismes de réception et d'intégration des signaux chimiques. Enfin, les sciences de l'écologie et de l'évolution permettent de comprendre et de prédire les variations sensorielles entre les espèces selon les liens phylogénétiques et selon le contexte environnemental (Derby & Sorensen, 2008).

L'histoire de l'écologie chimique a été marquée par la découverte du méthyl eugénol, premier attractif de mâle de *Bactrocera dorsalis* en 1912 (Howlett, 1912, 1915) et de la première identification de phéromone sexuelle de papillon, bombyx du mûrier *Bombyx mori* (Butenandt et al., 1959). Le premier olfactomètre, qui était un olfactomètre en Y, a été inventé

en 1926 (McIndoo, 1926). L'histoire a été également marquée par la découverte des caractéristiques attractives et répulsives des composés volatils des plantes pouvant être appliqués dans la lutte contre les insectes ravageurs (Butenandt et al., 1959). Actuellement, le domaine est en plein essor du fait de son double aspect, fondamental et appliqué. En effet, de nombreuses études s'intéressent à l'écologie chimique afin d'apporter des solutions écologiquement durables pour lutter contre les ravageurs des cultures à travers la compréhension des interactions chimiques entre les plantes hôtes et les insectes cibles.

Dans chacune des disciplines concernées, des outils spécifiques à l'écologie chimique ont été développés. Cependant, la mise en place et l'utilisation de certains outils assez techniques nécessite une certaine expertise, ce qui constitue une contrainte évidente pour tous les laboratoires d'écologie chimique. De plus, nous assistons également au développement rapide de nouvelles améliorations techniques dans tous les domaines, dont certaines auxquelles nous avons participé. Ces considérations justifient de développer une partie de cette thèse à la description des méthodes en écologie chimique et leurs limites.

Ce chapitre comporte donc une synthèse bibliographique sur les différentes méthodes utilisées en écologie chimique afin d'étudier les réponses olfactives de notre modèle d'étude, les mouches des fruits ainsi que leurs applications dans la recherche d'attractifs. Cette partie inclue également un article sur les développements méthodologiques que nous avons menés durant la thèse afin d'optimiser les techniques déjà existantes sur la mesure des réponses antennaires des mouches des fruits.

3.2. Méthodes d'identification des composés sémiocchimiques

3.2.1. Méthodes d'échantillonnage des composés volatils

Les méthodes traditionnelles d'échantillonnage des composés volatils sont principalement l'extraction par solvant ou l'extraction par distillation. Le principe de base de l'extraction par solvant consiste à solubiliser un échantillon liquide ou solide dans du solvant liquide qui peut être de l'eau ou des solvants organiques tels que l'acétone, le dichlorométhane, l'éthanol, le pentane, l'hexane, etc (Goodner & Rouseff, 2011; Ormeño, Goldstein, & Niinemets, 2011). Cette technique est également utilisée pour l'extraction des composés non-volatils comme pour l'extraction des hydrocarbures cuticulaires des insectes. Quant à l'extraction par distillation, les échantillons sont exposés à de l'eau bouillante ou de la vapeur d'eau et libèrent leurs composés par évaporation. Cependant ces méthodes présentent des limites du fait de leur faible rendement, de la formation de sous-produits ou de la dégradation de certains composés sous l'action de la chaleur (dans le cas de l'extraction par distillation) et

de leur stabilité limitée (Chemat & Boutekedjiret, 2015). De plus, ces techniques sont délicates à mettre en œuvre et demandent une certaine technicité.

Actuellement, la technique d'extraction privilégiée en écologie chimique est la technique de l'espace de tête ou « head space ». Elle consiste en une accumulation des composés volatils afin de les concentrer dans un espace réduit. L'espace de tête peut se créer en mettant la plante ou un organe de la plante dans un sac de prélèvement tel que le Nalophan (polyéthylèneterephtalate), le Teflon (polytetrafluoroéthylène) ou le Tedlar® (polyfluorure de vinyle) dans le cas d'une extraction en milieu naturel (Capelli, Sironi, & del Rosso, 2013). Ces matériaux présentent une faible émission volatile de fond (Miller & McGinley, 2008). Ils sont inertes chimiquement avec une stabilité mécanique et thermique élevée. Ces sacs de prélèvement sont transportables, faciles à manier et généralement à usage unique. Cependant, ces matériaux peuvent adsorber d'autres composés ce qui représentent des risques de contaminations. De plus, les condensations ou les dépôts sur les sacs ne sont pas visuellement vérifiables (Capelli et al., 2013). On peut également mettre une plante sous une chambre de collecte en verre en forme de cloche pour une extraction dans des conditions contrôlées. Le verre est non-odorant et lavable pour réutilisation (Heath & Manukian, 1994). Ces techniques donnent une image plus réaliste des profils d'émission des plantes détectées par les insectes, comparée aux extractions par solvant ou par distillation à la vapeur.

L'extraction des composés volatils peut être soit statique soit dynamique. Pour la méthode statique, la plante émet librement les composés volatils sans circulation d'air dans l'espace de tête. Souvent, la quantité de composés volatils obtenue avec cette méthode est faible ou à l'état de trace. Quant à la méthode dynamique, l'espace de tête est traversé par un flux d'air continu en tant que gaz vecteur. Elle permet d'éviter le problème de saturation de composés volatils dans l'espace de tête (Tholl et al., 2006).

Les composés volatils sont collectés sur un piège qui les concentre en mettant l'espace de tête en contact avec un dispositif d'absorption ou d'adsorption. Pour cela, il existe différents types de dispositif dont le plus commun est l'extraction par microextraction en phase solide (Solid Phase MicroExtraction en anglais, SPME), basée sur l'ad/absorption des composés sur une fibre revêtue de phase stationnaire. La nature de la phase stationnaire dépend du type de molécules ciblées. Une autre technique utilisée dans le cadre de cette thèse est l'utilisation de tube d'adsorption comme le Tenax qui possède un polymère poreux d'oxyde de 2,6-diphényl-p-phénylène. Le tube en métal est relié à une pompe afin de capter les composés volatils. Les tubes d'adsorption se prêtent bien à une utilisation en milieu naturel et présentent une faible affinité pour l'eau et une bonne stabilité thermique (Lhuillier *et al.*, 2000). En comparant avec la fibre SPME, le Tenax ne sature pas grâce à un gros volume d'adsorption. Il conserve mieux les ratios entre les composés (Agelopoulos & Pickett, 1998) et maintient une relation plus

linéaire entre la quantité de composé dans l'échantillon et la quantité piégée (Alborn, Bruton, & Beck, 2021). Toutefois, l'utilisation de tubes d'adsorption nécessite un appareil dédié supplémentaire comme un désorbeur thermique pour l'injection des composés, ce qui allonge le temps d'analyse. Cet appareillage est onéreux et son réglage est minutieux et moyennement stable.

3.2.2. Technique d'analyse chromatographie en phase gazeuse couplée à spectromètre de masse

Les émissions volatiles collectées sont couramment analysées par chromatographie en phase gazeuse (Gas Chromatograph en anglais, GC) (James & Martin, 1952). C'est une méthode séparative des molécules d'un mélange. Un chromatographe est composé d'un injecteur, d'une colonne dans un four thermostaté et d'un détecteur.

3.2.2.1. La séparation sur colonne

La séparation des différentes molécules s'effectue dans la colonne qui est placée dans un four. Il s'agit d'un fin tuyau capillaire, généralement en silice fondue, d'un diamètre interne entre 0,10 à 0,70 mm et d'une longueur entre 10 à 100 m. Les colonnes de 30 ou 60 m de longueur sont souvent utilisées en laboratoire. Les colonnes de 100 m sont destinées à la séparation des échantillons très complexes. La surface interne de la colonne est tapissée par un mince film de phase stationnaire dont l'épaisseur varie généralement entre 0,1 à 0,5 μm . Cette colonne est traversée en continu par un flux gazeux qui constitue la phase mobile. La séparation des différentes molécules injectées dans la colonne s'opère en fonction de leur affinité relative entre les deux phases : si l'affinité est plus grande pour la phase stationnaire, les composés sont immobilisés (piégés), et si leur affinité est plus grande avec la phase mobile ils sont entraînés par celle-ci et s'échappent. La phase gazeuse (les composés mélangés au gaz vecteur) qui a traversé la colonne passe dans le détecteur avant de sortir vers un détecteur chimique (McNair & Miller, 1997; Marriott et al., 2001; Tholl et al., 2006).

La sélectivité et l'efficacité de la séparation dépend majoritairement de la longueur, du diamètre interne, de l'épaisseur du film et du débit de la colonne. A cela s'ajoute également la température du four, la nature du gaz vecteur et la nature de la phase. En effet, différentes phases stationnaires peuvent-être utilisées selon les colonnes. Elles sont caractérisées par le gradient de polarité de leurs constituants allant d'apolaire à polaire. Une phase stationnaire apolaire est principalement constituée de composés à base d'hydrocarbures aliphatiques saturés ou de silicones comme les polydiméthylsiloxanes. Une phase stationnaire polaire quant à elle est

constituée de composés polaires, par exemple, les polyéthylènes glycols. Une phase stationnaire polaire va retenir les composés polaires plus longtemps qu'une colonne à phase stationnaire apolaire. Les différences de propriétés physicochimiques des composés leur confèrent des vitesses d'élution différentes selon les phases stationnaires et ils sont donc séparés en fonction du temps (Bouchonnet & Libong, 2004). Ainsi l'utilisation combinée d'une colonne à phase polaire et d'une colonne à phase apolaire permet de séparer des composés qui ne peuvent pas être séparés efficacement sur une seule colonne. Les deux colonnes sont utilisées au cours d'analyses différentes, ou au cours d'une seule analyse dans le cas d'un double GC (GCxGC) qui permet une séparation plus précise des échantillons complexes. En effet, une analyse par GCxGC consiste à séparer les échantillons successivement dans deux colonnes à polarité différente entre lesquelles se trouve un dispositif de modulation qui concentre une petite partie du flux de la première colonne et l'injecte rapidement dans la deuxième colonne (Xu et al., 2003).

3.2.2.2. L'injecteur

L'injection peut se faire manuellement ou automatiquement et selon l'état initial des échantillons, il existe différents types d'outils d'injection selon la nature de l'échantillon : micro-seringue (liquide), seringue à gaz (gaz), thermodésorbiteur (solide, liquide, gaz), Head space (solide, liquide, gaz) ou SPME. La chambre d'injection présente une double fonction, celle de porter l'échantillon à l'état vapeur (si ce n'est pas déjà le cas) et de l'amener en tête de colonne grâce au gaz vecteur qui constitue la phase mobile. Selon le type d'injection choisi, l'échantillon est transféré en totalité vers la tête de colonne, c'est-à-dire sans division de flux (mode splitless) ou avec division de flux (mode avec split) (Rouessac, Rouessac, & Cruché, 1992).

3.2.2.3. Le détecteur

Les détecteurs les plus couramment utilisés en écologie chimique sont le détecteur à ionisation de flamme (Flame Ionization Detector, FID) et le détecteur de spectrométrie de masse (Mass Spectrometer en anglais, MS). Si le FID permet la détection et la quantification des composés volatils, un MS est indispensable pour leur identification. Un MS est constitué de trois éléments principaux : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur. Les molécules sortantes de la colonne sont ionisées dans la source, en les soumettant sous vide, par l'impact d'un faisceau d'électrons. L'excès d'énergie reçu par les molécules ainsi ionisées entraîne la rupture des liaisons chimiques aux points les plus fragiles des molécules qui conduit à la

formation des fragments appelés « ions-fils » ou « ions-fragments ». Ces ions sont par la suite accélérés par une différence de potentiel et expulsés de la source. L'analyseur sépare à son tour ces ions formés par la source en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Il existe plusieurs types d'analyseur mais leur mécanisme de fonctionnement est basé sur l'utilisation des champs magnétiques et/ ou électrique. Il en résulte un spectre de masse, déterminé par les m/z des principaux fragments (Rouessac et al., 1992; Menet, 2011). Arrivés au détecteur, les ions sont détectés proportionnellement à leur nombre et transformés en signal électrique. Le spectre de masse est comparé à une librairie de spectre ou « spectrothèque » afin d'avoir l'identité de la molécule. Les principales librairies utilisées à l'échelle internationale sont la NIST et la Wiley. Toutefois, toutes les molécules ne sont pas encore répertoriées dans les bases de données, ce qui pose une limite pour l'identification et l'analyse des composés.

3.3. Mesure des réponses physiologiques antennaires aux composés volatils par électroantennographie

3.3.1. L'électroantennographie (EAG)

L'EAG est une approche relativement simple qui permet de caractériser la réponse globale de l'antenne d'un insecte lorsqu'elle est stimulée par des molécules odorantes. Schneider (1957) a été le premier à avoir développé la technique de l'EAG sur *Bombyx mori*. Les expérimentations consistaient à enregistrer les potentiels électriques des récepteurs olfactifs de l'insecte à l'aide de microélectrodes après amplification des signaux (Schneider, 1957). Communément, l'EAG consiste à placer une électrode à chaque extrémité de l'antenne (une électrode de référence et une électrode d'enregistrement) afin de mesurer la différence de potentiel électrique de l'antenne en réponse aux composés volatils (Visser, 1986; Agelopoulos et al., 1999; Biasazin et al., 2018b). Elle peut également se pratiquer *in vivo* sur certaines espèces d'insecte, selon la morphologie de l'antenne, en insérant l'électrode de référence dans une partie du corps de l'insecte, par exemple dans l'œil. Un changement du potentiel de l'EAG résulte d'un changement dans le potentiel membranaire des ORNs, plus particulièrement de la dépolarisation de leurs dendrites, provoquée par une stimulation odorante (Pelletier, 2007).

La stimulation des antennes en EAG se fait directement à l'aide d'un flux d'air injecté transitoirement à travers une cartouche d'odeur, et piloté par une électrovanne. La cartouche est insérée manuellement dans une chambre de mélange en verre, traversée par un flux d'air permanent, humidifié et purifié. Cette stimulation directe offre l'avantage de contrôler de potentielles interactions entre composés volatils en respectant un intervalle de temps régulier entre les stimulations et en permettant de les appliquer dans un ordre aléatoire. Cela limite des effets artéfactuels, dus soit à une éventuelle adaptation neuronale induite par une première

stimulation, soit à une dégradation de la préparation biologique dans le temps. Cependant, la cartouche est alimentée par le composé sous forme liquide dilué dans un solvant, et la fraction qui est volatilisée (et donc la quantité de composé réellement injectée sur la préparation) varie selon les molécules et n'est pas connue (Andersson, Schlyter, Hill, & Dekker, 2012). Les principaux solvants utilisés sont l'hexane, qui s'évapore entièrement avant application de la stimulation, et l'huile de paraffine qui n'est pas volatile.

3.3.2. Le couplage chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur d'électroantennographie

Les mesures des réponses antennaires peuvent également s'effectuer avec la technique d'analyse chromatographique couplée à un détecteur d'électroantennographie (GC-EAD). Dans ce cas, l'antenne de l'insecte est stimulée à partir de composés volatils élués dans le GC (Arn, Städler, & Rauscher, 1975). Dans ce type d'expérimentation, le flux en sortie de colonne est divisé en deux pour atteindre séparément un détecteur standard qui est le FID et l'antenne de l'insecte via une ligne de transfert appropriée. Les réponses sur les deux détecteurs sont enregistrées simultanément. Bien que possible, remplacer le FID par un MS associé à l'EAD a été rarement réalisé du fait de la difficulté technique de cette association (Shuttleworth & Johnson, 2022).

A la sortie de la colonne vers l'EAD, le flux est mélangé avec un flux d'air humidifié à température ambiante dans une chambre de mélange en verre avant d'atteindre le montage électroantennographique. Toutefois, le point froid en sortie de la colonne crée une zone de condensation pour les composés. Dans notre pratique, afin de minimiser cette longueur de colonne froide, nous avons rempli l'espace entre la colonne et le tube chauffé à l'extrémité de la ligne de transfert, à l'aide d'une feuille d'aluminium thermiquement conductrice qui vient envelopper la colonne et boucher la ligne de transfert.

Pour les pratiques en GC-EAD, il est conseillé d'utiliser une colonne plus courte et de plus gros diamètre par rapport à un GC-MS afin d'augmenter la quantité de flux qui peut la traverser et d'atteindre le détecteur. Cependant, les pics du GC sont assez larges (>5 secondes) à cause de la lenteur d'éluion des stimuli, posant ainsi une contrainte pour le système étant donné que l'antenne des insectes répond mieux au changement rapide de stimulus (Marion-poll & Thiery, 1996). Afin de palier à ce problème, des améliorations méthodologiques ont été développées récemment à l'exemple de la technique de modulation par hachage du signal du GC (cf. article 1) qui permet d'envoyer alternativement l'échantillon entre les deux détecteurs FID et EAD à une fréquence rapide (Myrick & Baker, 2018).

Contrairement aux stimulations par cartouches, la stimulation avec un GC permet de savoir approximativement la quantité de composé volatil injecté puisque l'intégralité de l'échantillon est volatilisé, même si une condensation de composés sur le verre de la chambre de mélange peut secondairement affecter ce paramètre. La stimulation avec un GC présente également comme intérêt d'éliminer les impuretés dans l'échantillon. En effet, du fait de la sensibilité des ORNs dans la détection des composés, les réponses aux impuretés peuvent fausser les interprétations des résultats par rapport aux réponses des composés cibles. Ainsi, le GC permet une séparation de ces impuretés et de mieux associer les différentes réponses avec des pics de composés (Paoli et al., 2017; Schorkopf et al., 2019).

3.4. Mesure des réponses comportementales aux composés volatils

L'EAG permet de détecter les composés volatils potentiellement significatifs pour le comportement de l'insecte. Cependant, il ne permet pas de savoir le comportement d'orientation de l'insecte par rapport au composé d'intérêt. Pour cela, il existe différents types de dispositifs pour mesurer les réponses comportementales d'un individu à un composé ou à un mélange de composés.

3.4.1. Tests comportementaux en conditions contrôlées

La technique la plus courante pour les tests comportementaux en conditions contrôlées a recours à l'utilisation d'olfactomètre. En écologie chimique, l'olfactomètre sert à mesurer le comportement d'orientation olfactive des insectes. Ce mot a été emprunté à un appareil médical, appelé olfactomètre, utilisé en laboratoire de psychologie mais les principes des deux sont totalement différents (McIndoo, 1926). On distingue principalement le système olfactométrique à une voie, à double choix et à multi-voies, le tunnel de vol, le flywalk et les pièges *ex situ*. Pour chacun des systèmes, il existe plusieurs designs de dispositifs selon les modèles d'étude, les protocoles et les matériels choisis.

Olfactomètre à une voie : le système olfactométrique à une voie ou linéaire est conçu pour tester un seul composé ou un seul mélange de composés. Généralement le dispositif est constitué de tube cylindrique comportant successivement trois chambres : la chambre de stockage des individus, la chambre de piégeage et la chambre à stimulus. Le système possède un système de ventilation en aval de la chambre à stimuli pour diffuser l'odeur à tester. Ainsi, cet olfactomètre distingue les insectes restant immobiles d'insectes remontant un flux d'air en présence d'une odeur. Les premiers essais avec ce type d'olfactomètre ont été réalisés par

Katsoyannos et al. en 1980 sur le lépidoptère *Eupoecilia ambiguella* et les Tephritidae *Rhagoletis cerasi* et *Ceratitis capitata*.

Olfactomètre à double choix : dans les tests à double choix, les olfactomètres en Y ou en T sont jusqu'à nos jours largement utilisés (Zhang et al., 2019; Noushini et al., 2020; Būda et al., 2022). Ils sont composés de tube central avec une bifurcation en forme de Y ou de T permettant à l'insecte de faire le choix entre deux stimuli (Figure 17) (McIndoo, 1926). Ces olfactomètres sont dynamiques, c'est-à-dire qu'ils sont traversés par un flux d'air qui achemine les odeurs. Parmi les individus remontant le flux d'air, ce système permet de distinguer ceux qui choisissent une odeur particulière, et apporte donc une information supplémentaire par rapport à l'olfactomètre à une voie. Il permet également de tester une interaction possible entre deux odeurs différentes mises en compétition.

Olfactomètres multi-voies : ces olfactomètres permettent de présenter différents composés simultanément. Typiquement, le dispositif est composé d'une chambre centrale et de plusieurs branches dans lesquelles sont placées les sources d'odeurs traversées par un flux d'air (Pettersson, 1970; Vet et al., 1983; Turlings et al., 2004). Un exemple récent d'olfactomètre multi-voies est celui développé par Biasazin et al. (2018b). Le dispositif en verre est constitué de la base vers le haut : d'une cage cubique de stockage, d'un compartiment avec 6 pièges, d'un compartiment à odeurs et d'un système d'éclairage. Le dispositif est alimenté par une pompe pour pousser un flux d'air, humidifié et filtré par du charbon actif, jusqu'à la cage cubique avec un débit constant de $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figure 18). Malgré le potentiel combinatoire accru de ce type d'olfactomètres par rapport à un olfactomètre à double choix, les flux d'airs qui parcourent ceux-ci sont sujets à plus de turbulences, ce qui peut limiter l'expression des comportements d'insectes.

Flywalk : c'est un système permettant d'étudier le comportement des insectes suite à leur rencontre immédiate avec une brève stimulation olfactive. Les insectes sont placés individuellement dans des tubes en verre traversés par un flux d'air continu (Figure 19). Chaque tube est relié à un système de délivrance d'odeur. Bien que le petit diamètre des tubes permette un contrôle précis du timing des stimulations olfactives, il contraint également le déplacement de l'insecte qui ne peut que marcher et non voler. Les mouvements de marche résultants d'une attraction des individus sont observés et enregistrés par *tracking* vidéo (Steck et al., 2012). La distance parcourue, et donc l'activité motrice peut être également évaluée. Pour ce système, la mesure des réponses est différente par rapport aux autres systèmes cités auparavant. Ici, la réponse s'obtient sur un seul individu confronté à plusieurs répétitions d'une même stimulation olfactive, tandis que pour les autres olfactomètres, il s'agit d'un comptage du nombre d'individus présents dans les différentes zones.

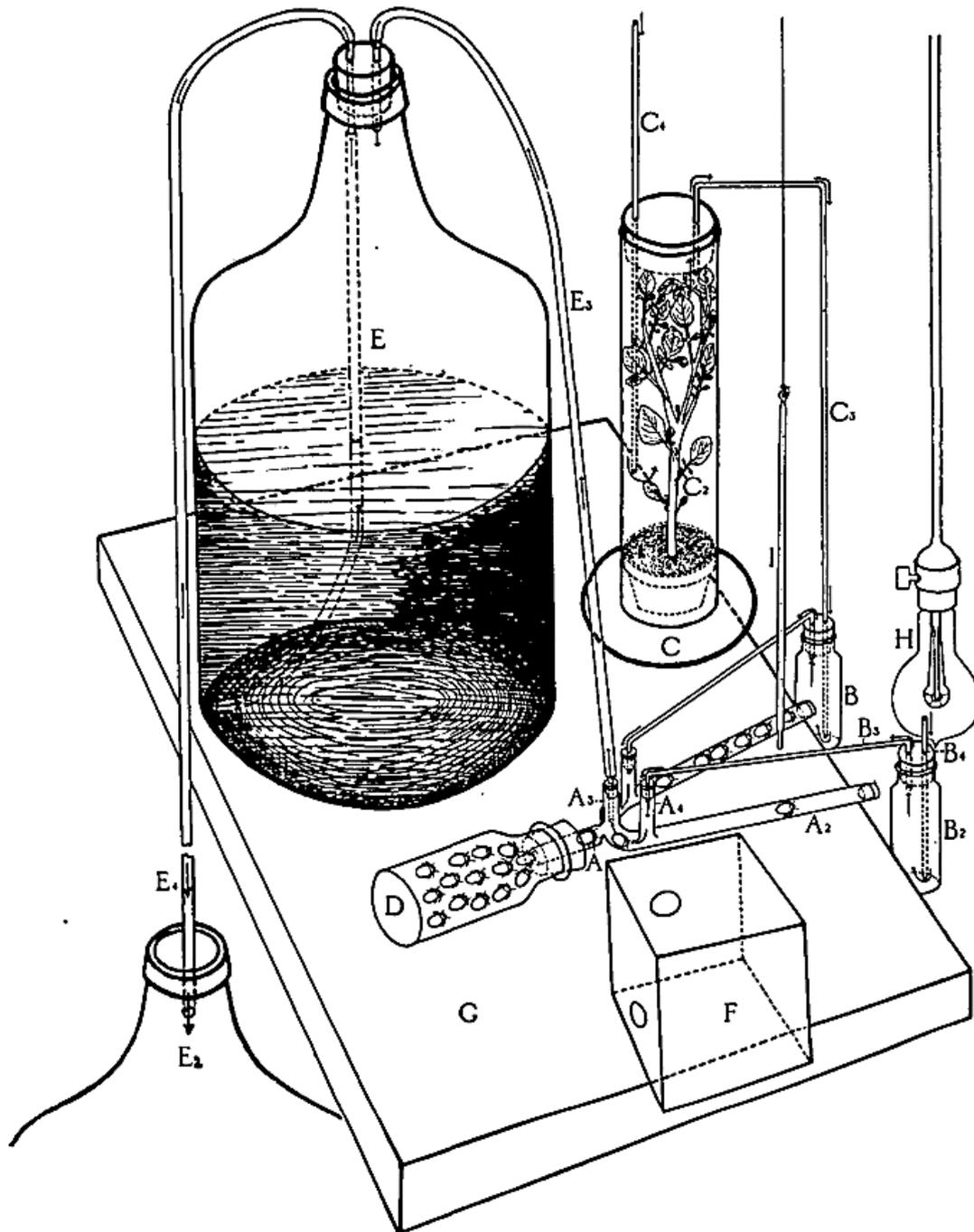


Figure 17 : Le premier olfactomètre en Y développé par McIndoo (1926). A : bras principal du tube en Y, A2 : un bras du tube en Y, A3 : tube de sortie du tube en Y, A4 : tubes d'entrée du tube en Y, B : bouteille contenant la substance odorante, B2 : bouteille contenant la substance témoin, B3 et B4, tubes de sortie et d'entrée des bouteilles B et B2, C : chambre de plante, C2 : un plant vivant de pomme de terre, C3 et C4 : tubes de sortie et d'entrée de la chambre de plante, D : bouteille sombre pour contenir les insectes, E et E2 : bouteilles de 5 gallons, la dernière étant posée sur le sol, E3 et E4 : siphons, le dernier a un mètre de long, F, boîte cubique de 5 pouces dans laquelle est inséré le tube en Y pour éliminer les lumières latérales, etc., G : planche épaisse, H : lumière électrique, I : thermomètre (d'après McIndoo, 1926).

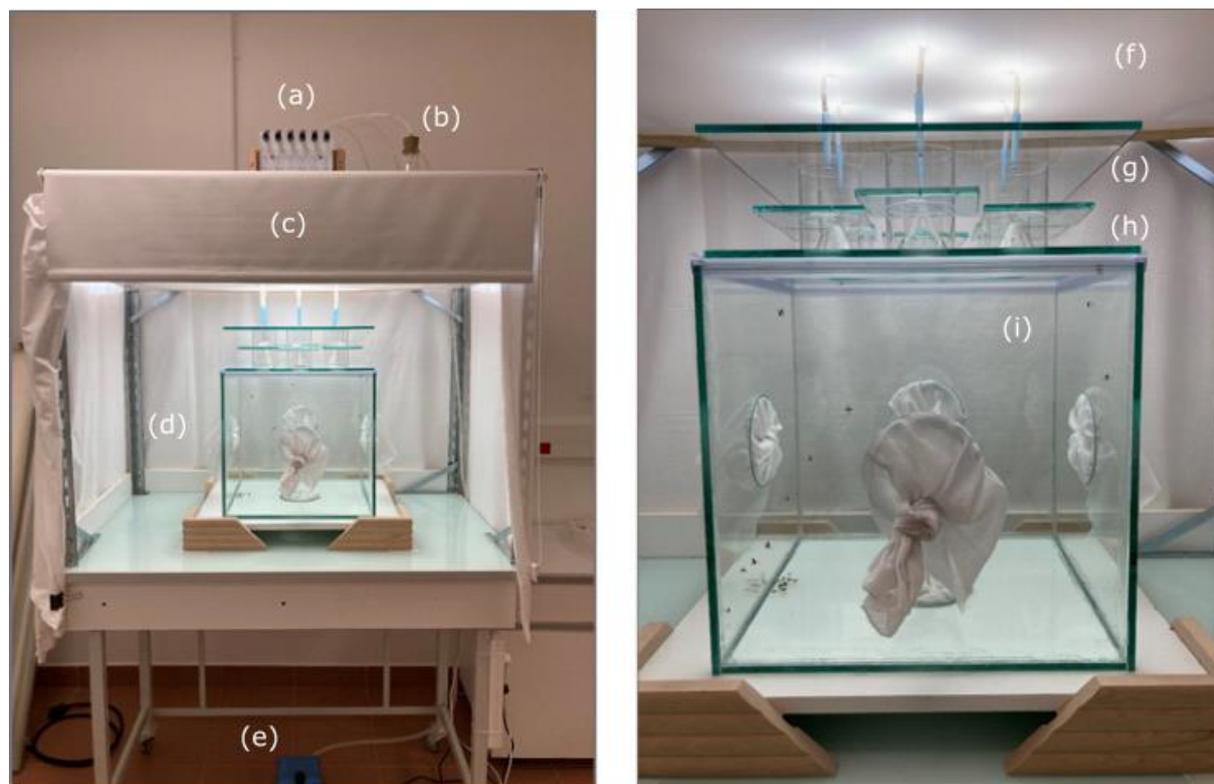


Figure 18 : Photos d'un olfactomètre à 6 voies développé par Biasazin et al. (2018b). La photo à gauche représente la vue d'ensemble du dispositif qui est constitué de débitmètre (a), d'un système de filtration et d'humidification d'air (b), d'un système lumineux (c), du système de piégeage (d) et d'une pompe (e). La photo à droite est zoom du système de piégeage surplombé par une plaque diffractant la lumière (f). Le système est composé d'un compartiment à odeur (g) et d'un compartiment de piégeage (h) avec chacun six éléments. La cage de stockage (i) est constitué d'une cage cubique en verre de 40 x 40 x 40 cm avec six trous circulaires sur le dessus, et de grands trous circulaires sur les côtés latéraux et le fond permettant d'accéder pour libérer et collecter les mouches.

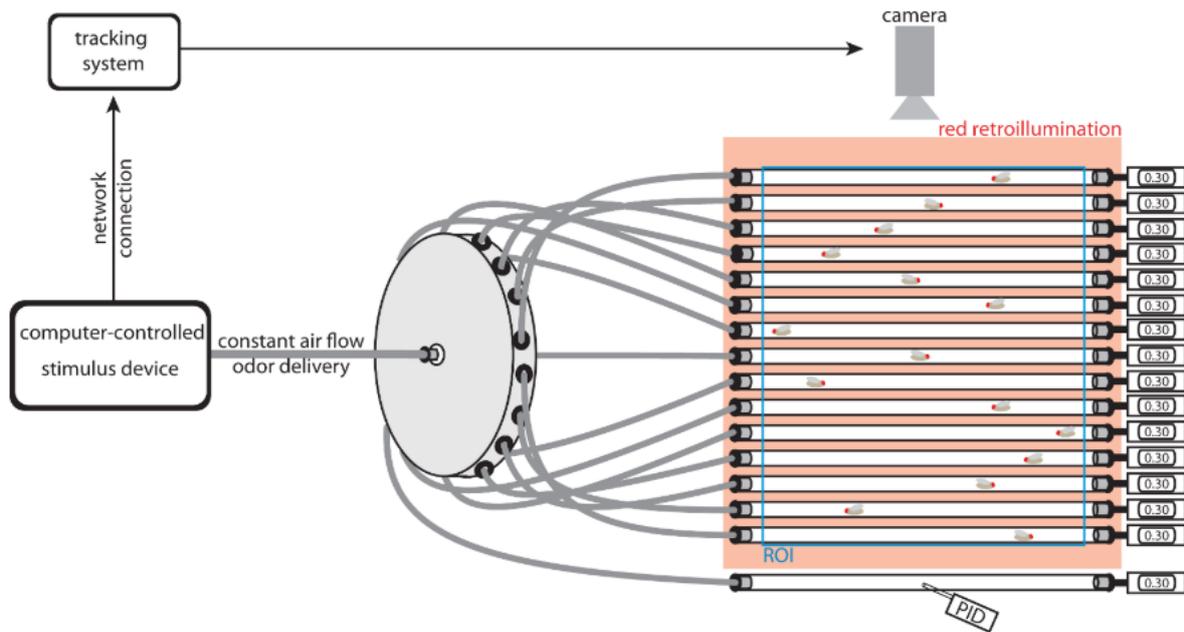


Figure 19 : Schéma d'un dispositif expérimental *flywalk* développé par Steck et al. (2012). 15 mouches sont exposées individuellement dans des tubes en verre avec un flux d'air continu et sont suivies automatiquement. Un système de stimulation contrôlé par ordinateur produit des stimuli olfactifs, qui sont transportés par le flux d'air vers les mouches via un panneau diviseur. Le système de stimulus communique avec le système de suivi pour l'activation et la désactivation. Des débitmètres numériques placés après chaque tube en verre afin d'assurer un mouvement du stimulus identique dans tous les tubes. Le système est muni d'un *tracking video*. Un détecteur de photo-ionisation (PID) est branché sur un tube supplémentaire pour vérifier la fiabilité du dispositif de stimulation. Un rétro-éclairage rouge est fournie par une feuille électroluminescente afin d'éviter les signaux visuels (d'après Steck et al., 2012).

Tunnels de vol : ils étaient conçus, à l'origine, pour l'évaluation des comportements de vol des insectes aux phéromones sexuelles (Miller & Roelofs, 1978; Heath et al., 1993). La longueur d'un tunnel de vol est variable selon l'espèce pour laquelle il est conçu, le plus souvent entre 1,5 et 3 m. Les insectes sont relâchés sous le vent à l'extrémité d'une chambre et sont exposés à un flux d'air qui achemine l'odeur depuis sa source (Baker & Linn, 1984; Knudsen et al., 2018). Dans le tunnel de vol, l'insecte qui vole peut se déplacer librement dans un espace à trois dimensions. Le principe de fonctionnement de ce système consiste principalement à mesurer la trajectoire de chaque individu ou bien le temps mis par l'insecte pour atteindre la source d'odeur (Baker & Cardé, 1984).

Pièges ex situ : ce système est assez simple et utilise des arènes ou cages d'observation qui fonctionnent sans système dynamique. Les sources d'odeurs sont placées à l'intérieur du dispositif et le nombre d'individus s'y approchant ou rentrant en contact avec les sources d'odeur est compté (Mazomenos & Haniotakis, 1981; Wood, Browne, Silverstein, & Rodin, 1966).

3.4.2. Tests comportementaux en conditions semi-contrôlées

Les tests en conditions semi-contrôlées se réalisent dans de grandes cages placées en extérieur. Le dispositif est constitué de cages en moustiquaire laissant passer le vent, la température et l'humidité ambiante, ainsi que les odeurs de fond. La taille des cages varie souvent entre 1 à 3 m de diamètres. Généralement, 2, 4 ou 8 pièges sont suspendus ou posés sur le sol de la cage, à équidistance les uns des autres. Les individus sont libérés dans la cage en nombre contrôlé. Chez les Tephritidae, ce système a été utilisé par exemple pour évaluer les réponses d'attraction de quelques espèces d'*Anastrepha* à des extraits de mâles ou à des extraits d'autres individus congénères (López-Guillén, López, Malo, & Rojas, 2011; Robacker & Hart, 1986), et l'attraction de femelles de *Zeugodacus cucurbitae* à des émissions volatiles de fruits endommagés (Pinero, Souder, Cha, Collignon, & Vargas, 2021). Bien que le test en grande cage permette d'avoir les mêmes climats, turbulences atmosphériques et odeurs de fond qu'en conditions naturelles tout en contrôlant la population d'insecte présente dans la cage et susceptible d'être piégée, il présente des inconvénients importants. Tout d'abord, l'impossibilité pour les insectes de se disperser engendre une densité d'insectes contrainte et qui n'est pas naturelle. A part cela, les pièges rapprochés sont des sources de contamination et les parois de la cage peuvent adsorber les attractifs, ce qui limite les doses pouvant être testées.

3.4.3. Les essais en plein champs

Les tests comportementaux en plein champs ont recours à l'usage de pièges et de diffuseurs d'odeurs. Ces derniers sont placés dans les parcelles selon un plan d'expérimentation défini, par exemple en bloc (disposition en blocs où chaque traitement figure aléatoirement une fois et une seule) ou en carré latin (disposition en lignes et en colonnes où chaque traitement figure aléatoirement une fois et une seule). Classiquement, les pièges sont inspectés et nettoyés à un intervalle de temps régulier par l'expérimentateur. Les essais en plein champs permettent de comprendre le comportement des insectes face aux agents abiotiques et biotiques de l'habitat (Opp & Prokop, 1979; Mazomenos & Haniotakis, 1985). Le piégeage en plein champ est la finalité des recherches d'attractifs pour les ravageurs de culture, aussi ces tests permettent de

valider l'ensemble de l'approche expérimentale. Les tests en plein champs ont été largement utilisés sur les espèces de Tephritidae, par exemple pour évaluer l'attractivité de *Bactrocera dorsalis* et *Zeugodacus cucurbitae* aux odeurs des hôtes et de nourritures (Biasazin, et al., 2018a; Vargas et al., 2018). Aussi, ils ont été utilisés pour tester l'attractivité de différents phéromones sexuelles ou attractifs de mâle comme le méthyl eugénol sur *Bactrocera dorsalis* (Shelly, 2001). Cependant, la quantification des réponses comportementales reste difficile en plein champs étant donné que les paramètres affectant les comportements varient dans le temps et dans l'espace. On peut citer par exemple la variabilité des populations naturelles d'insectes qui n'est en général pas connue, comme la variabilité de leur état physiologique (Opp & Prokop, 1979). Le manque de contrôles dans ce type d'expérimentation peut donc conduire à des résultats non-reproductibles.

3.5. Article 1 : Amélioration de la mesure des réponses antennaires des mouches des fruits par électroantennographie triple

3.5.1. Présentation et résumé de l'article

Au début de cette thèse, nous avons entrepris des travaux d'optimisation des techniques utilisées au laboratoire pour la mesure des réponses antennaires des mouches des fruits. Cette idée de développement méthodologique se basait sur des constatations faites sur les pratiques actuelles et sur l'adaptation des techniques aux caractéristiques du système olfactif de nos espèces non-modèles mouches des fruits.

En effet, la plupart des laboratoires procèdent à un enregistrement de l'EAG sur une seule position de l'antenne, le plus souvent à l'extrémité. Il a été longtemps cru que le fait d'enregistrer à l'extrémité de l'antenne permet de mesurer l'activité de l'ensemble des neurones antennaires. Ces croyances ont été remises en cause par Jacob en 2018 qui a démontré la nécessité de faire un EAG multiple pour avoir une estimation complète de l'activité des ORNs. Ainsi dans ce contexte, nous avons souhaité réaliser des enregistrements à plusieurs endroits de l'antenne. Nous avons constaté que la solution la plus simple, le fait de déplacer l'électrode, n'était pas satisfaisante étant donné que cela demande beaucoup de temps de manipulation pour faire des répétitions et des comparaisons de plusieurs espèces, mais également d'étudier un fruit dont la saisonnalité est courte. C'est pourquoi nous avons décidé ensemble de développer un EAG multiple permettant de faire des enregistrements simultanés. Nous avons essayé des montages avec deux, trois ou quatre électrodes avant de choisir celui qui offrait le meilleur résultat en termes de qualité du signal et de stabilité par rapport au mouvement mécanique de l'antenne. Ce montage à trois électrodes, que nous avons nommé EAG triple, permet également

de recouvrir un maximum de zones sur l'antenne. Toutefois, le montage est plus ou moins facile selon les espèces et demande une certaine rigueur dans la pratique.

Nous avons également mis en place un système d'enregistrement électropalpographique (EPG). Le palpe maxillaire est souvent négligé parce que la préparation est plus difficile à réaliser et moins stable, et que l'organe possède moins de récepteurs olfactifs différents. Toutefois, des études récentes ont montré que chez les drosophiles, le palpe est impliqué dans des comportements d'attraction (Dweck et al., 2016) et que chez les Tephritidae, il est impliqué dans l'attraction par le ME et le Cue-lure (Chieng et al., 2018; Verschut et al., 2018; Noushini et al., 2020), ainsi que dans la détection de la phéromone femelle (Noushini et al., 2020). Cela a donc créé un effet de mode et une réelle attente de la communauté scientifique, au moins sur les modèles mouches des fruits, pour des enregistrements plus fréquents de cet organe. Ainsi, nous avons utilisé l'EPG en détecteur couplé au GC pour un projet collaboratif sur les réponses de *Zeugodacus cucurbitae* aux composés cuticulaires de ses congénères (cf. annexe 1).

Nous avons dupliqué la technique de modulation par hachage du signal du GC (Gouinguéné et al., 1998; Myrick & Baker, 2018) afin de remédier au problème d'une faible réponse EPG/EAG au GC, dû à une relativement lente montée en concentration de la stimulation olfactive (plusieurs secondes), qui génère de l'adaptation neuronale avant même que la stimulation n'atteigne sa concentration maximale. Dans leur pratique, Gouinguéné et al. (1998) se sont basés sur la température pour créer des retenues transitoires des composés volatils sur une zone froide où les composés se condensent. Pour l'adaptation de cette technique à notre système, nous avons installé un commutateur de Dean's « D-Swafer Dean's Switch (PerkinElmer) » sur la colonne de la chromatographie. Le D-Swafer Dean's Switch permet l'envoi en alterné de l'échantillon entre deux sorties FID et EAD₃, contrairement au GC-EAD classique qui envoie simultanément l'échantillon vers le FID et EAD à l'aide d'un connecteur en Y.

L'article ci-après parle donc de la mise en place d'un système d'enregistrement électroantennographique simultané sur trois positions (EAG₃) de l'antenne de mouches des fruits. Il décrit les manipulations nécessaires pour la mise en place du système et les avantages comparatifs de l'EAG₃ par rapport à l'EAG classique. Nous décrivons également le couplage de ce système avec le GC avec modulation du signal par le D-Swafer Dean's Switch. Pour l'estimation des activités antennaires sur les trois positions de l'antenne, un modèle de densité de la source de courant (Current Source Density en anglais, CSD), prenant en compte la géométrie de l'antenne, a été appliqué sur les signaux (Jacob, 2018). Dans l'article, nous avons pu démontrer que l'EAG₃ permet une augmentation de la gamme de composés pour lesquels une réponse sensorielle est détectée. En sus de cela, outre l'estimation qualitative, l'EAG₃ permet une estimation quantitative des réponses olfactives.

3.5.2. Article 1

Journal of Neuroscience Methods 390 (2023) 109842



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroscience Methods

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

Triple electroantennography captures the range and spatial arrangement of olfactory sensory neuron response on an insect antenna

Gaëlle Ramiaranjatovo^{a,b}, Bernard Reynaud^{a,b}, Vincent Jacob^{a,*}^a CIRAD, UMR PVBM, F-97410 St Pierre, La Réunion, France^b UMR PVBM, Université de la Réunion, St Pierre, La Réunion, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Chemical ecology
GC-EAD
Chopper modulation
Current source density
EAG
Olfaction

ABSTRACT

Background: Electroantennography (EAG) is a basic neuroscientific tool that is widely used to measure olfactory responses in insects. It is particularly adapted to probing the olfactory systems of non-model insect species in chemical ecology and evolutionary biology. As currently practiced, EAG measures have varying degrees of correlation with olfactory responses, especially for insects whose olfactory sensory neurons (OSNs) are arranged in zones on the antennae. This limitation was shown to be partly due to the fact that only a single antennal position was recorded.

New methods: We describe a setup using triple electroantennography (EAG₃), whereby three antennal positions are recorded simultaneously. The spatial arrangement of the electrodes ensures the mechanical stability of the assembly. The EAG₃ detector was coupled to a gas chromatograph (GC-EAD₃), customized using a Dean's switch to improve the EAG signals by chopper modulation. EAG₃ signals were analysed through a current point model to estimate olfactory responses across the antenna.

Results: Recordings were performed on Tephritidae and *Drosophila* species, which have antennae of different shapes and sizes. We confirmed that the spatio-temporal pattern of antennal activation was stimulus dependent and allowed us to quantify the antennal olfactory response.

Comparisons with existing method: Compared to typical single-probe EAG, we show that EAG₃ improves response quantification and increases the range of compounds for which a sensory response is detected.

Conclusions: Our EAG₃ setup is an original low-cost and easy-to-use method. It offers a useful bridge between comprehensive neurophysiological investigations and the broader themes explored in chemical ecology.

1. Introduction

Olfaction is the primary sensory modality targeted by biocontrol products for insect pest management. In order to explore the sensitivity of insects to a range of volatile compounds, researchers in agroecology must study the olfactory systems of non-model insect species. Of the many neuroscientific tools available (Joerges et al., 1997; Kaissling, 1995; Olsson and Hansson, 2013; Renou and Lucas, 2013; Schneider, 1957; Schneider and Boeckh, 1962), electroantennography (EAG) may be the most suitable because it does not require prior knowledge of the studied species, is low-cost and easy to use. It involves recording the electric potentials on the surface of an antenna. Thus, it is accessible to experts in different fields, beyond that of neuroscience.

How EAG signals relate to neuronal activity on the antenna has been the subject of debate for years. It is generally thought that the response

reveals the cumulative activity of all the antennal olfactory sensory neurons (OSNs) found between the reference and recording electrodes. Therefore, placing the electrode at the tip of the antenna is optimal. Paradoxically, direct comparisons between EAG amplitude and OSN responses have revealed both close (Löfstedt et al., 1983) and weak (Wibe, 2004) correlations. Some authors suggest that the EAG response should only be considered as a qualitative indication of the insect's response to an odour (Olsson and Hansson, 2013). One of the main factors behind this discrepancy is usually overlooked. In most cases, the EAG electrode is sensitive to OSNs in its vicinity (Ayer and Carlson, 1992; Bigiani et al., 1989; Crnjar et al., 1989; Jacob, 2018; Nagai, 1983). However, OSNs are generally arranged unevenly on the antennal surface (Bengtsson et al., 2011; Benton et al., 2009; Couto et al., 2005; Ghaninia et al., 2014; Jacob et al., 2017; Larsson et al., 2001; Lin and Potter, 2015; Pérez-aparicio et al., 2022; Shanbhag et al., 1999; Tait et al., 2016).

* Corresponding author.

E-mail address: vincent.jacob@cirad.fr (V. Jacob).<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2023.109842>

Received 22 December 2022; Received in revised form 9 March 2023; Accepted 22 March 2023

Available online 24 March 2023

0165-0270/© 2023 Published by Elsevier B.V.

Thus, conventional EAG methods may generate highly variable and biased responses, depending on probe location. This is particularly significant in species with aristate antennae because their olfactory sensilla only cover a single antennal segment, the funiculus. Therefore, recording EAG at multiple antennal positions on aristate antennae should capture the response of more OSNs and generate a more accurate estimation of the insect's olfactory response.

This paper describes a user-friendly setup to record EAG at three antennal positions. It reports on the advantages of this method for exploring the olfactory response to natural odour partitioned by a gas chromatograph (GC), compared to single-position EAG. We have performed triple electroantennography (EAG₃) on several Brachycera species, ranging from the club-shaped funiculus of Drosophilidae and Ceratitidini species to the more elongated funiculus of Dacini species. The experiment involves scanning the funiculus surface with three EAGs, which are recorded simultaneously. The selected positions maximize the spacing between the electrodes and ensure mechanical stability. The setup can be used independently or as an electroantennographic detector (EAD), combined with a gas chromatograph (GC-EAD₃). A Dean's switch was used to improve the signal-to-noise ratio through a chopper coupling (Myrick and Baker, 2018). To analyse the data, we adapted a current point model to the geometry of the setup. A dataset, including the responses to volatile compounds of strawberry guava for eight different species of Tephritidae, showed that GC-EAD₃ improves the measurement of insect olfactory response compared to conventional EAD, both qualitatively and quantitatively.

2. Materials and methods

2.1. Insects

Females of *Drosophila melanogaster* (standard wild-type laboratory strain Canton Special, CS) and eight species of Tephritidae were used for this study: *Bactrocera dorsalis* (oriental fruit fly), *Bactrocera zonata* (peach fruit fly), *Ceratitis capitata* (medfly), *Ceratitis catovirii* (Mascarene fruit fly), *Ceratitis quilicii* (Cape fruit fly), *Dacus demmerezi* (Indian Ocean cucumber fly), *Neoceratitis cyanescens* (tomato fruit fly) and *Zeugodacus cucurbitae* (melon fly). Insects were used at peak of fertility, which for Tephritidae species corresponded to, respectively, 12–15, 28–32, 10–14, 21–26, 13–17, 11–15, 10–16, 25–31 days after emergence; and were from the 62–64th, 179–180th, 107–108th, 311–312th, 77–79th, 59th, 64–65th, 7th generations, respectively. Insects were collected in Reunion Island and reared in the laboratory under controlled conditions of temperature (25 ± 1 °C), humidity ($65 \pm 10\%$ relative humidity) and light (12 h photoperiod). Cohorts of adult flies were placed in 30 cm × 30 cm × 30 cm cubic cages. They were given water and food based on crystallized sugar and protein (yeast hydrolysate enzymatic, MP biomedical, LLC, USA). Larvae were reared on an artificial diet (Duyck and Quilici, 2002), except *N. cyanescens*, which was reared on potato, and *Z. cucurbitae* and *D. demmerezi*, which were reared on courgette.

2.2. Fruit volatile collection

Volatile extractions were performed on *Psidium cattleianum* L. (strawberry guava) fruit. Ripe, bright red, sting-free fresh fruit was selected and collected in the morning. For each sample, five fruit were placed in a nalophan bag of 30 cm × 50 cm (SenseTrading, Gröningen, Netherlands), with low background emissions. The bags were sealed with a plastic cable tie on both ends, forming a sealed wrapper. A Tenax GR (Supelco, Bellefonte, USA) adsorption tube was inserted *exodus*. Contents of the headspace were pumped through the Tenax GR tube with a portable pump (Spectrex, California, USA), pulling the air at a rate of 100 mL.min⁻¹ for two hours (no push). Tubes were stored at -20 °C and analysed as soon as possible in the days that followed.

2.3. Automated thermal desorption

Samples were analysed using a gas chromatograph (Model Clarus 580, Perkin Elmer, Inc., USA), with an automatic thermal desorber (ATD) (Turbomatrix 350, Perkin Elmer, Inc., USA), as the injector. The thermal desorption was carried out in two steps. First, the tube was purged for 1 min at ambient temperature to remove moisture and oxygen. The tube was heated to 250 °C and desorbed for 5 min with a helium flow of 50 mL.min⁻¹, without inlet split. Subsequently, the volatile compounds passed through the cryogenic tenax trap held at 4 °C. The trap was then heated to 300 °C with 40 °C.s⁻¹ ramp. The helium flow applied was 2 mL.min⁻¹ and the outlet split was 18 mL.min⁻¹. The compounds reached the GC column at the end of the second step.

2.4. Chopper-modulated GC system

In the GC, we used a fused silica Restek Rxi-5 ms column (Restek, Lisses, France) of 30 m length, 0.32 mm i.d. and 0.25 µm stationary phase film thickness, under pressure (15 psig). The GC oven temperature was programmed as follows: 50 °C for 1 min, then 6.5 °C.min⁻¹ to 200 °C and 40 °C.min⁻¹ to 250 °C, held for 5 min. The FID detector was heated at 250 °C. The carrier gas was helium N60. We duplicated the signal chopping technique developed by Myrick and Baker (2018) to increase the signal-to-noise ratio in GC. The column output was connected to a D-Swafer Dean's switch (PerkinElmer, Inc., USA), which delivered the effluent alternately to the flame ionization detector (FID) and to the EAD₃ through a 3-m long transfer line heated at 250 °C (Antelia, Dardilly, France). The switch speed was accelerated by assembling three solenoid valves (Perkin Elmer) and a pressure control, as described in Myrick and Baker (2018). The chopping frequency was set to 1 Hz with a custom program with Labview software (version 15.0.1f10, National Instruments, France) and a digital module (NI 9472, National Instruments, Nanterre, France). The Swafer was driven by nitrogen as a makeup gas at a pressure of 15 psi, which resulted in a flow rate of about 25 mL.min⁻¹ to the detectors, despite 2 mL.min⁻¹ through the column.

2.5. Triple EAG/EAD

A live individual was fixed in a 1000 µL pipette tip, the narrow end of which had been cut to get the head of the insect out. The head was then immobilized, by fixing a sheath of dental wax (Enta Periphery Wax, Netherlands) at the base of the head. For species of the Dacini tribe with elongated antennae, a silicone adhesive elastomer "Kwik-Sil" (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA), with low toxicity for neuronal tissue, was applied to the first two antennal segments to restrict the movement of the antennae. The elastomer was not necessary for species of the Ceratitidini tribe or for *Drosophila*.

Seventy-five µL glass capillary tubes (Hirschmann® Laborgeräte, Germany) were pulled with a puller instrument (Model PC-100 Narishige, Japan) to create micropipettes with a 1–2 µm tip. They were filled with an electrolyte solution (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 4 mM MgCl₂, and 10 mM HEPES). Silver wires (DAGAN, Minneapolis, Minnesota, USA) were chloride-coated by immersion in a 5-minute bath in bleach, then inserted into the micropipettes to form the electrodes. Electrodes were supported by low clutter micromanipulators (Model U-31CF and Model NMN25, Narishige, Japan), which were used to align and bring them to the required positions on the antenna. The reference electrode was inserted into the left eye. The three recording electrodes were precisely positioned on the left antenna in order to maximize the spacing between electrodes and their stability (Fig. 1). Two electrodes were placed on the latero-proximal and latero-distal position on the funiculus, and the third was placed on the medio-central position. The EAG/EAD signals were simultaneously recorded at these three positions. The signals were amplified (x 1000) and filtered between 0.1 and 1000 Hz with a differential AC amplifier (Model 1700, A-M system, Carlsborg,

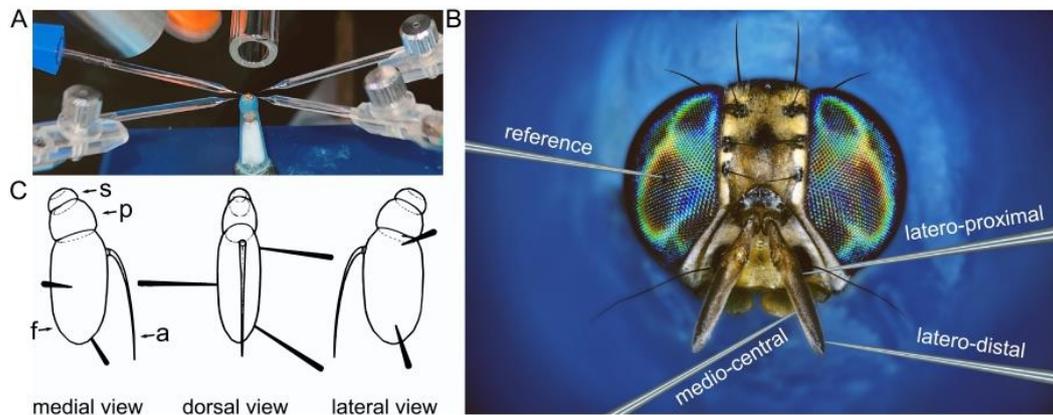


Fig. 1. Triple electroantennography preparation. A. Photograph showing the spatial arrangement of the four electrodes and stimulation tube around a whole-body insect mount. B. Photomicrograph of a head of *Bactrocera dorsalis* implanted with the four electrodes that makes up the EAG₃. The picture was produced by focus stacking and numerically edited for repositioning electrodes to illustrate a typical mounting (photo: A. Franck-CIRAD). C. Sketches of three recording electrodes (in black) mounted on the third antennal segment of an aristate antenna. The three drawings show the same mounting from different angles (s: scape; p: pedicel; f: funiculus; a: arista).

USA), digitized at 500 Hz with an acquisition card (NI 9215, National Instruments, France), associated with a custom acquisition program with Labview software (version 15.0.1f10, National Instruments, France).

2.6. Odour delivery system and stimulation sequences

A flow of humidified and charcoal-filtered air was delivered continuously ($20 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$) to the insect via a glass chamber made up of a 20 cm long tube, with an internal diameter of 5 mm. The glass chamber was placed 1 cm from the antennae preparation. For EAD preparations, 2–3 mm of column protruding from the transfer line was inserted into a small hole downstream of the tube, 5 cm from the tube outlet. To minimize the length of column that is cold (and undergoes compound condensation), the space between the column and the heated tube at the end of the transfer line was sealed by wrapping the column with thermally-conductive aluminium foil. Preliminary tests with a photo-ionization detector (200B miniPID, Aurora Scientific) confirmed that it improved the compound release (supplementary Fig. 1). For EAG preparations, the tip of a Pasteur pipette was inserted into the small hole, 5 cm from the tube outlet. The pipette held a piece of filter paper loaded with $1 \mu\text{L}$ of an odorant solution, made up of a compound diluted at 10^{-2} v/v in mineral oil. The stimulation involved puffing air ($3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$, 200 ms) through the pipette, regulated with an electro-valve (LHDA-1233215-H, Lee Company, France), controlled by a digital module (NI 9472, National Instruments, Nanterre, France) and a custom program with Labview software (version 15.0.1f10, National Instruments, France). The time interval between puffs of stimuli was one minute, and the tested compounds within a dataset were applied in random order.

Three different datasets were analysed in this paper. First, we re-analysed data published in (Jacob, 2018), which involved consecutive EAG recordings of the same insect with a single electrode (dataset 1). Recording positions were regularly spaced along the funiculus proximo-distal axis, as specified in the initial publication. Four positions were used on the antennae of *Drosophila melanogaster*, which were stimulated with methyl salicylate, linalool, ethyl acetate, 1-octen-3-ol, pentyl acetate, ethyl butyrate, and paraffin oil as a control. Seven positions were used on the antennae of *Zeugodacus cucurbitae*, which were stimulated with methyl salicylate, Z3-hexenyl acetate, linalool and paraffin oil. Secondly, GC-EAD₃ recordings were performed on eight Tephritidae species in response to the volatile emissions of strawberry guava (dataset 2). Thirdly, EAG₃ recordings were performed on

Bactrocera dorsalis in response to a set of 31 different esters, terpenes and alcohol, and paraffin oil (dataset 3).

2.7. Current source density analysis

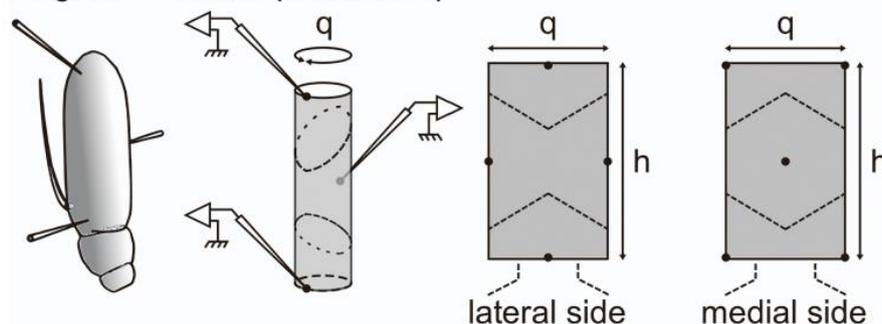
We adapted the current point model described by Jacob (2018) to the EAG₃/EAD₃ geometry (Fig. 2). Briefly, the model aims to localize and quantify OSN activation from the EAG/EAD distribution. It considers that an OSN constitutes a point source current that flows to or from each recording site. Although the path taken by the current is not known, we modelled its propagation through the cuticle. Modelling propagation through the inside of the antenna would only marginally change the analysis, as discussed by Jacob (2018). It is possible to calculate a linear function to transform any distribution of OSN activity into the potentials recorded by the three EAG/EAD electrodes. Inversely, the three EAG/EAD recordings can be used to estimate a distribution of current source density (CSD) over the antenna, but only at a spatial resolution matching the number of EAG electrodes. Thus, we approximated the CSD distribution from the EAG/EAD signals by inverting the linear function, which assumes that CSD is constant over three cuticular regions. The solution should be considered a reasonable approximation with possible biases, given that alternative CSD distributions with inhomogeneous density within the regions could induce the same values of potentials (Jacob, 2018). The linear coefficients calculated for ten insect species are provided in Table 1. The design ensures that each cuticle position is assigned to the region associated with the nearest electrode.

The anisotropy of the cuticular tissue's conductivity implies that the equation of current propagation is corrected by an unknown constant (Pettersen et al., 2006). Consequently, the results are expressed in an arbitrary unit proportional to $\mu\text{A}\cdot\text{mm}^{-2}$. Any possible comparison of absolute values between species assumes similar anisotropy. The total antennal current is defined as the sum of the CSD multiplied by the respective cuticular area of the three regions, and the unit is proportional to μA .

2.8. Analysis and statistics

For EAG recordings (dataset 1 & 3), the response amplitude was defined as the minimal response level in the 700 ms window following stimulation onset, subtracted from a baseline, calculated during a reference time period lasting 500 ms, before the stimulation onset. As an exception, the baseline was not subtracted in the experiment with seven

length $h >$ section perimeter q



length $h <$ section perimeter q

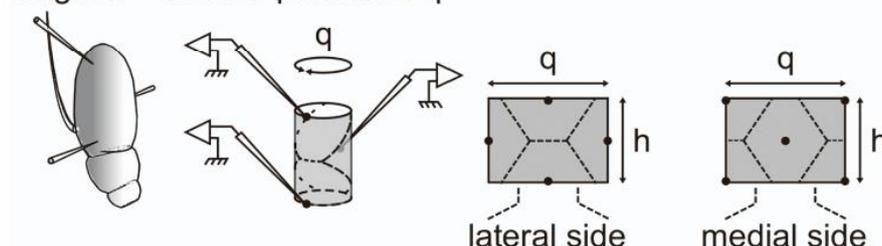


Fig. 2. Geometrical depiction of the current point model. The funiculus drawn on the left is modelled by a cylinder with latero-distal and latero-proximal electrodes at each end and the medio-central electrode on the opposite side. The surface of the cylinder is subdivided into three regions for the calculation of the current source density. The boundaries between regions (dashed lines) are defined by the equidistant points between the electrode positions (black dots). Consequently, the geometry differs slightly between long (up) and short (down) funiculus. Note that the area of the central region is always twice as large as the area of the regions at either end. The model considers that the current is only propagated along the surface of the cylinder, thus, it is represented simply using 2-D geometry after unfolding. For each electrode, its position is first set to the (0,0) coordinate. Therefore, the unfolded template is obtained by cutting through the medial side for lateral electrodes, and through the lateral side for the medial electrode. Then, the equation of current propagation is integrated along the surfaces of the three regions to calculate their respective coefficient of contribution to the electrode potential.

Table 1

Coefficients for calculating CSD from EAG₃ recordings for ten insect species. The funiculus length and cross-section perimeter (mm) used for calculations are shown for each species. The corresponding coefficients can be applied to species with the same funiculus dimension. By definition, $CSD = F^{-1} \times EAG_3$ in matrix formulation.

Species	funiculus length	funiculus cross-section perimeter	$F^{-1}(1,1)$	$F^{-1}(2,1)$	$F^{-1}(3,1)$	$F^{-1}(1,2)$	$F^{-1}(2,2)$	$F^{-1}(3,2)$	$F^{-1}(1,3)$	$F^{-1}(2,3)$	$F^{-1}(3,3)$
<i>Bactrocera dorsalis</i>	0.67	0.51	20.3	-3.6	-2.8	-5.5	11.2	-5.5	-2.8	-3.6	20.3
<i>Bactrocera zonata</i>	0.63	0.47	21.5	-3.7	-3.1	-5.6	11.5	-5.6	-3.1	-3.7	21.5
<i>Ceratitidis capitata</i>	0.35	0.54	27.8	-4.3	-5.9	-7.3	14.4	-7.3	-5.9	-4.3	27.8
<i>Ceratitidis catovirii</i>	0.41	0.57	25.1	-4.1	-4.8	-6.8	13.2	-6.8	-4.8	-4.1	25.1
<i>Ceratitidis quiliicii</i>	0.49	0.55	26.5	-4.5	-4.6	-7.5	14.1	-7.5	-4.6	-4.5	26.5
<i>Dacus ciliatus</i>	0.68	0.47	20.5	-3.5	-2.9	-5.2	10.9	-5.2	-2.9	-3.5	20.5
<i>Dacus demmerewi</i>	0.91	0.52	16.7	-2.7	-2.4	-3.9	8.8	-3.9	-2.4	-2.7	16.7
<i>Drosophila melanogaster</i>	0.18	0.33	49.5	-6.9	-12.3	-12.1	24.9	-12.1	-12.3	-6.9	49.5
<i>Neoceratitis cyaneocens</i>	0.37	0.50	28.0	-4.6	-5.0	-7.8	14.8	-7.8	-5.0	-4.6	28.0
<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	0.59	0.52	21.4	-3.8	-2.8	-6.1	11.6	-6.1	-2.8	-3.8	21.4

electrode positions and paraffin oil was considered as one stimulus among others. For dataset 3, we calculated the latency of the response onset, defined as the timing of the first response value that crossed a threshold, which was calculated as 3 times the standard deviation below the mean value of the reference time period. We also used a second measurement of response latency, which was less sensitive to noise, herein slope peak latency. The EAG was further smoothed by convolving it with a Gaussian function with 20-ms standard deviation, and then derived by subtracting a time-shifted EAG (time step of 2 ms). Slope peak latency was defined as the timing of the minimum value of this signal within the 500 ms window following stimulus onset.

For dataset 1, we introduced an index of spacing for a triplet of electrodes, out of the seven aligned recording positions, calculated as follows: first, we calculated the minimal (m) and maximal ($M \geq m$) distance between two consecutive electrodes. The index was defined as $m/d - m/M$, d being the minimal possible distance between two electrodes (funiculus length divided by six). The rationale of this index is the following: first, the triplets of electrodes are sorted by the minimal distance m/d , which takes the values 1, 2 or 3. Then, the triplets are sorted according to the maximal distance, since $0 \leq m/M < 1$.

For dataset 2, the demodulated EAD at the chopping frequency was calculated using a Morlet wavelet transform modulus (vwt function of the Rwave R software package). Note that, unlike typical EAG/EAD, this analysis yields positive response values. The response amplitudes were calculated by subtracting a baseline from the maximum demodulated EAD in 5 s time windows, which were manually synchronized with stimulus times. The baseline was estimated during the first 100 s of a GC run before any odorant stimulation, and was set at the median value of maximum demodulated EAD during 5 s moving windows. The significances of EAD responses were tested by comparing measures with 0 across individuals with a bootstrap test.

Permutation tests and bootstrap were performed with 1000 replicates, if not stated otherwise. Bootstrap was used for calculating the 95% confidence intervals (c.i.).

3. Results

3.1. Averaging EAG at three positions quantifies the antennal olfactory response

In a preliminary experiment, we drew on the literature to estimate the cumulative response of antennal OSNs to six compounds, by adding up the response profiles of each olfactory receptor (DoOR database, Münch and Galizia, 2016), multiplied by the number of antennal OSNs expressing them (Grabe et al., 2016). We then recorded the EAG response to these compounds consecutively, at four positions spanning the funiculus of a female *Drosophila melanogaster*. The amplitude of the EAG response was averaged over the four positions. This metric correlated better with the estimated OSN response (linear model with no intercept, $R^2 = 0.81$, c.i. 0.53 – 0.97, $F(1,5) = 121$, $p = 0.0001$), than the EAG response recorded at the funiculus tip only ($R^2 = 0.48$, c.i. –0.2 to 0.88, $F(1,5) = 27$, $p = 0.003$, Fig. 3A).

We then considered whether three positions suffice to quantify the antennal response. EAG was recorded at seven positions spanning the longer funiculus of melon flies, using the mean EAG response amplitude as a proxy of antennal response (EAG-7). Averaging EAG response amplitude at three positions with maximal spacing between them (the most proximal, the most distal, and the middle one: EAG-3), correlated better with EAG-7 (linear model, $r^2 = 0.88$, c.i. 0.75 – 0.96, $F(1,26) = 186$, $p < 10^{-12}$) than tip EAG (linear model, $r^2 = 0.34$, c.i. 0.04 – 0.73, $F(1,26) = 13.33$, $p < 0.002$, Fig. 3B). Part of this effect is due to a statistical bias, since the tip EAG is one position out of the three, which are in turn, three out of seven. Averaging three independent variables decreases the standard deviation by the square root of 3 and averaging seven by the square root of 7. Assuming that the seven positions are independent measurements of antennal response with the same noise level, the ratio of standard deviation of residuals between the EAG vs

EAG-7 linear regression and the EAG-3 vs EAG-7 linear regression can be calculated directly (the square root of 9/2). In our data, we observed a ratio of 3.2 (c.i. 1.97–4.35), which was significantly higher than this value ($p = 0.05$, $n = 1000,000$ bootstrap replicates). Furthermore, while repeating this analysis with all combinations of three out of seven positions, we found that this ratio was positively correlated with an index of spacing between positions ($r^2 = 0.26$, c.i. 0.09 – 0.48, $F(1,33) = 11.66$, $p < 0.01$). It follows that recording EAG at three positions captures different components of the antennal response, and the complementarity between positions increases when the spacing between them is maximized.

3.2. The spatio-temporal pattern of EAG response is stimulus dependent

Fig. 4 shows a case study recording using the GC-EAD₃ setup on a tomato fruit fly in response to volatile emissions from strawberry guavas. Since the GC output is chopped, the FID and EAD signals oscillate at 1 Hz. We demodulated the signal at this frequency. To assess whether the spatio-temporal variations of the EAD response result from experimental artefacts or from biological properties, we tested their reproducibility across stimuli and individuals. Fig. 5A shows stacked EAD₃ recorded from eight medfly individuals in response to three fruit compounds. The maximum amplitude was systematically recorded latero-proximally for compound #1, at the two distal positions for compound #2 and latero-distally for compound #3. We analysed the normalized responses to 25 compounds using linear discriminant analysis (Fig. 5B). Clearly, spatial patterns induced by the same compound clustered together. This was confirmed by the ratio of median Euclidian distance within and between compounds, which significantly differed from 1 (c.i. 0.27–0.4, permutation test $p < 0.001$). This observation was replicated in eight different species of Tephritidae with various antennal lengths (minimum and maximum values for the c.i. of the ratio of

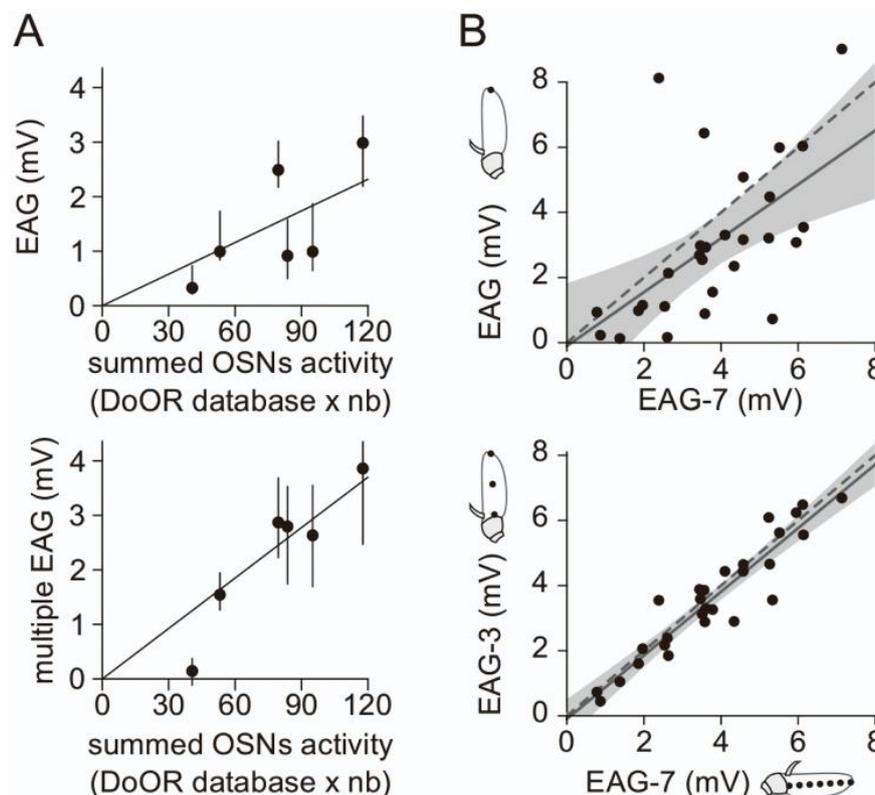


Fig. 3. Consecutive EAG recordings at multiple antennal positions estimate the total antennal response. A. Conventional EAG recorded at the tip of a female *Drosophila melanogaster* funiculus (top) and mean EAG response over four recording positions (bottom) as a function of the estimated summed responses of antennal OSNs. Dots and error bars represent the median response to a compound ($n = 11$ individuals) and its 95% bootstrap c.i. The tilted line represents linear regressions with no intercept. B. Conventional EAG recorded at the tip (top) and mean EAG response over three positions (EAG-3, bottom) as a function of the mean EAG response over seven positions (EAG-7). Recordings were made in the melon fly (four different stimuli, including paraffin oil x seven flies). Dash line is the identity diagonal, while tilted line and grey area represents a linear regression and its confidence interval. Data in this figure were included in (Jacob, 2018).

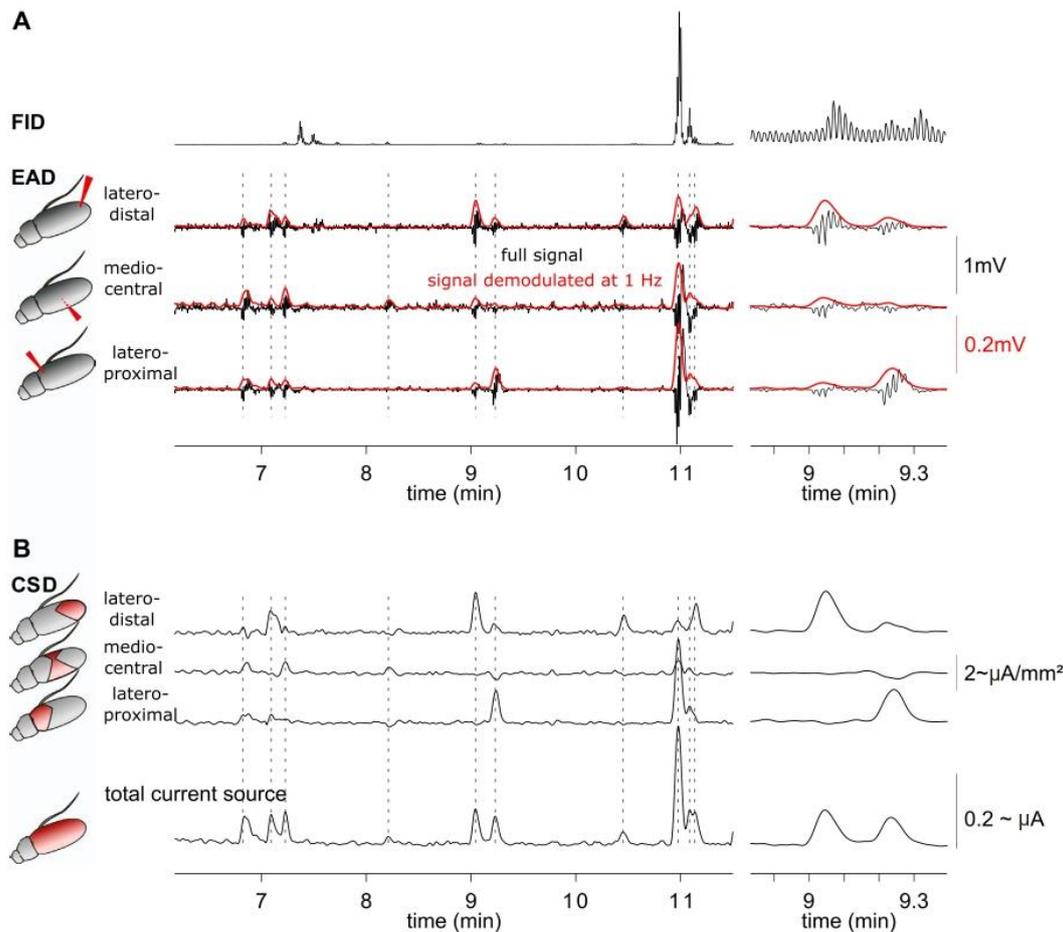


Fig. 4. Case study of a GC-EAD₃ recording and analysis. The recording was done using a female tomato fruit fly in response to a strawberry guava volatile sample. **A.** Four signals are recorded simultaneously: FID and EAD at three positions on the funiculus (black lines). On the right, two response peaks were zoomed in on. The signals oscillate at 1 Hz because of the chopping coupling. The EAD signals demodulated at 1 Hz are drawn in red, with a different vertical scale. **B.** The CSD are calculated over the three regions of the funiculus and then combined to estimate the total current source on the antenna.

median Euclidian distances were 0.22–0.59, permutation test $p < 0.001$, in each case).

Unlike the GC-driven stimuli, direct odorant stimulations have sharp onset and reproducible timing. EAG₃ was recorded in seven female oriental fruit flies, in response to 31 compounds and to paraffin oil. Again, the ratio of median Euclidian distance of response amplitude within and between compounds significantly differed from 1 (c.i. 0.62–0.89, permutation test $p < 0.001$). We also calculated the response latency (onset and slope peak, Fig. 5C). Some compounds elicited an average response delay of up to 20 ms between positions. The delay was significantly correlated with an index of response amplitude ratio (linear model with the pairs of positions as an independent factor; for onset latency: $r^2 = 0.49$, c.i. 0.34–0.66, $F(5,90) = 17.6$, $p < 10^{-10}$; for slope peak latency: $r^2 = 0.70$, c.i. 0.59–0.81, $F(5,90) = 41.2$, $p < 10^{-15}$, Fig. 5D). Lastly, the ratio of median Euclidian distances for response latency within and between compounds was significantly less than 1 (for onset latency c.i. 0.64–0.88, permutation test $p < 0.001$; for slope peak latency c.i. 0.69–0.91, permutation test $p < 0.001$).

3.3. EAD₃ extends the range of compounds for which a sensory response is detected

Even though the EAD amplitude varies with the recording position, a

single electrode qualitatively accounts for the presence of a sensory response. At each position, we tested the significance of the EAD responses separately ($n = 8$, bootstrap test $p < 0.01$), for the 25 compounds and the eight Tephritidae species (Fig. 6). While 72.1% of the sensory responses were significant at all three electrode positions, 16.9% of the responses were significant at only two positions and 10.9% of the responses were significant at only one position. Therefore, EAD₃ provides a qualitative improvement in the estimation of olfactory response compared to classical EAD.

3.4. EAD₃ quantitatively estimates the olfactory response of the antenna

To assess antennal activity, the CSD was estimated in three regions of the funiculus surface and then integrated (Fig. 4B). For each electrode position, EAD was correlated with antennal activity (the c.i. of r^2 ranged from 0.17 to 0.97, depending on species and electrode position [supplementary Table 1], F-statistic ranged from 121 to 6110 for (1,257) to (1,331) degrees of freedom, in each case $p < 10^{-20}$). However, for the best estimations, we averaged the three simultaneously recorded EAD for each species (the c.i. of r^2 was 1–1 for each species, $F(1,257–331) > 1280971$, $p = 0$ in each case, Fig. 7). The gain between average EAD₃ and antennal activity differed between species, and depended on both funiculus area and sensilla density (Fig. 7).

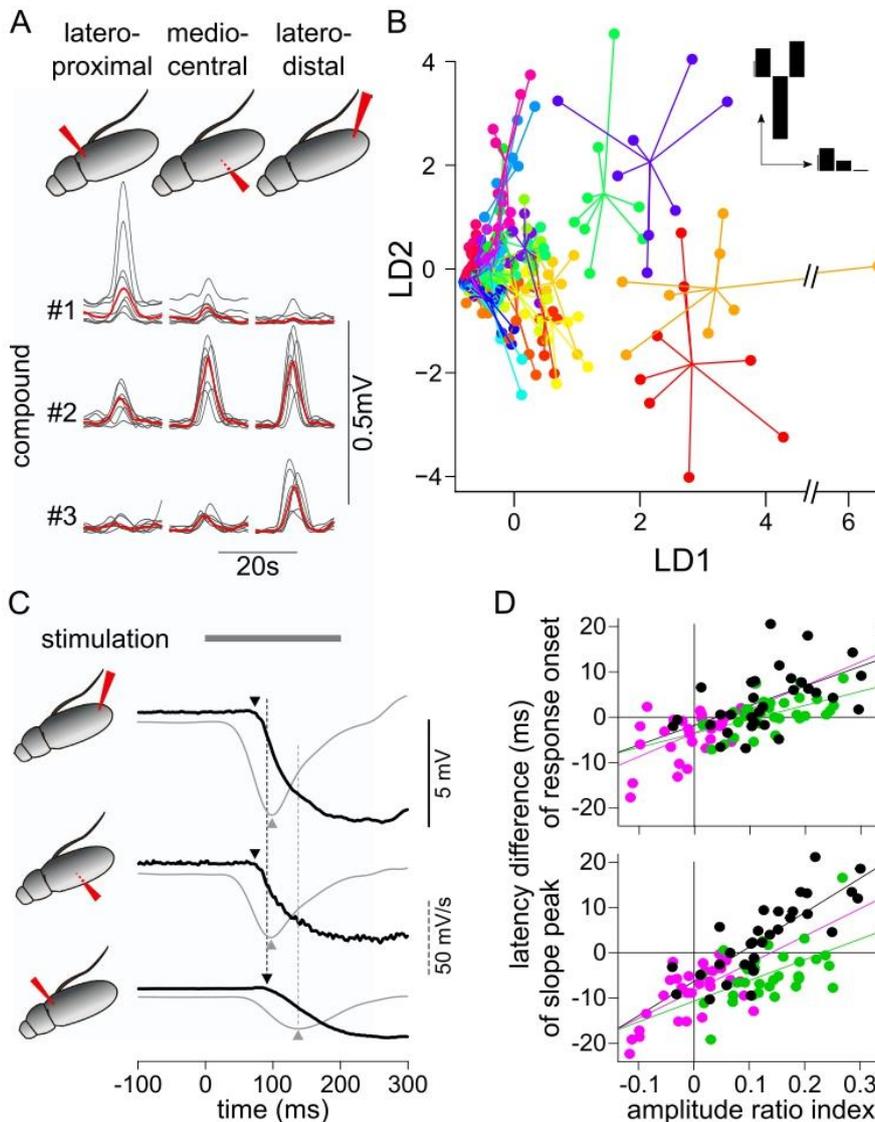


Fig. 5. Reproducibility of EAG₃ spatio-temporal patterns. A. Superimposed EAD responses to three compounds of strawberry guava emissions in eight female medflies at the three positions. The EAD demodulated at 1 Hz is shown. Red lines are median values. B. Linear discriminant analysis of EAD response of eight Mascarene fruit flies to 37 strawberry guava compounds. Responses are grouped by compounds that are colour-coded and linked to their mean value. Inset: projection of LD1 and LD2 on the three electrode positions. C. Example of EAG₃ response in the oriental fruit fly to a single olfactory stimulation (grey bar, stimulus duration). For each electrode position, the EAG recording is plotted in black and the slope of the filtered signal is plotted in grey. Arrowheads point to the latency of the response onset (black) and of the peak of the slope (grey). For comparison, arrowheads are prolonged by vertical dashed lines for the proximo-lateral position only. D. Response latency difference correlates with response amplitude ratio between electrode positions. Each dot represents the mean measure ($n=7$ individuals) for responses to a compound (32 compounds in total). The amplitude ratio index stands for the difference divided by the sum of response amplitudes between positions. The pairs of positions considered are colour coded (magenta: latero-distal minus latero-proximal; green: medio-central minus latero-proximal; black: medio-central minus latero-distal). Coloured lines represent a single linear regression with the pairs of positions as an independent factor.

3.5. The CSD model refines the localization of the activated neurons

We calculated a spatial accuracy index on both the raw EAD₃ data and after CSD analysis. The index was defined as the maximum amplitude of the three positions, divided by their sum. For each Tephritidae species, the spatial accuracy index was significantly higher for CSD than for EAD₃ (Wilcoxon's paired rank test, $Z > 38800$ and $p < 10^{-20}$ in each case, Fig. 8A). The position of maximum EAD and maximum CSD amplitude was the same in 79.1% of cases (Fig. 8B). In the remaining 20% of cases, the maximum EAD was almost systematically recorded medio-centrally. The EAD₃ pattern appears to be biased towards this position, whereas CSD localizes the position of activated neurons more accurately.

4. Discussion

We recently showed that multiple EAG electrodes probing the surface of aristate antenna are necessary for measuring complete olfactory activity (Jacob, 2018; Jacob et al., 2017). Although the precision of the

measurement increases with the number of electrodes, three properly positioned electrodes can localize the antennal response (Jacob, 2018). A new analysis presented in this paper shows that EAG₃ can also quantify antennal response. Thus, we introduced a triple electro-antennography setup, which is capable of spanning the olfactory epithelium. Using a broader range of chemicals, we also confirmed that the spatio-temporal patterns of antennal activation are stimulus dependent. This robust observation contradicts the general belief that a single electrode positioned at the tip of the antenna records the activity of all antennal neurons, while other positions are suboptimal. This false assumption is based on an interpretation of a multi-position EAG experiment, performed on European corn borers (Nagai, 1981). Notwithstanding, other observations for the same species are consistent with our findings and with the current point model (Nagai, 1985, 1983, 1981). We observed that the optimal position is not only species specific, but also compound specific. We found that spacing out the three electrodes as much as possible improved the estimation of the olfactory response, which suggests that scanning most of the olfactory epithelium surface is relevant.

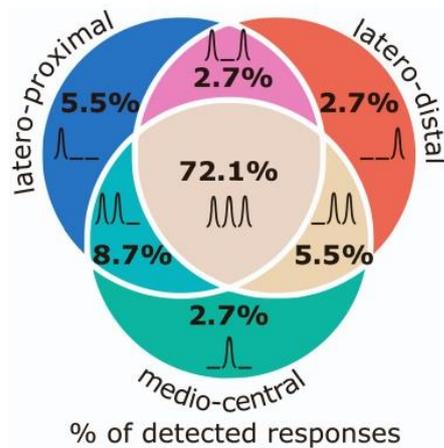


Fig. 6. Venn diagram depicting the detectability of EAD responses as a function of electrode position. An EAD response was detected as significant if the p-value of a bootstrap difference from baseline was smaller than 0.01 ($n = 8$). The dataset combines the responses of eight fly species to 25 strawberry guava compounds ($n = 200$). Twelve additional compounds were excluded from this analysis because the responses immediately overlapped with the preceding response.

4.1. Comparison with existing techniques

The advantages of multi-position recordings in a typical experiment to define the chemical tuning of an olfactory system had not been assessed before our study. Few sequential recordings, in which a single electrode is displaced, had been conducted because it is time-consuming. Some recordings with only two positions were considered inadequate (Biasazin et al., 2014), and some only tested a limited number of chemicals (which also excluded a GC-run) (Jacob et al., 2017). Moreover, it assumes the same antennal response from trial to trial, which is not necessarily the case due to variability in volatile samples (Alborn et al., 2021; Andersson et al., 2012) or alterations in sensory response (Jafari and Alenius, 2021). Simultaneous recordings, as in our EAG₃ setup, overcome these limitations and provide a spatio-temporal measure of the antennal response in a single individual

in real time. Nagai's multi-position setup (Nagai, 1981) involved bathing different antennal parts in saline solutions. This method was only possible using large insects with long antennae. In contrast, our design targeted a variety of Diptera antennae of different shapes and sizes. In theory, customized systems could be adapted for different types of antennae. We successfully obtained recordings for the small bulbous funiculus of the *Drosophila* species (not shown) and for the oblong mm-long funiculus of the *Dacus* species. The preparation was remarkably stable, which may be because the three electrodes were clamped to the antenna. This was possible because of the rigidity of the funiculus in these species. Sealing the first antennal segments with a silicone adhesive elastomer was beneficial for species with the longest antennae. Our setup was cheap and easy to mount, which means the method is affordable for many laboratories. Four to five ATD-GC-EAD₃ runs were made per day, on a regular basis, compared to the five to six ATD-GC-EAD runs that we performed previously.

The resulting estimation of insect olfactory response is increased qualitatively and quantitatively compared to a conventional EAG using a micropipette. The EAG₃ method has yet to be compared with alternative EAG mountings, such as capping various parts of the intact or severed antenna with a glass or gel electrode. However, it is likely that the corresponding qualitative and quantitative estimations will improve significantly. Relevant sensory responses may be missed with conventional EAG. In some cases, no EAG response could be observed for compounds that did elicit a response in antennal OSNs (Blight et al., 1995). Accordingly, we found that 28% of responses could not be detected at every electrode position, while this number increased to 45% in another dataset (Jacob et al., 2017). Thus, the EAG₃ setup brings a substantial qualitative gain.

The conventional EAG method may underestimate the sensory responses, as suggested when behaviourally important compounds only elicited a weak EAG response (Jang et al., 1989). Furthermore, Wibe found that the cumulative activity of antennal OSNs correlated weakly with an EAD signal in a weevil (Wibe, 2004), while another EAG study reported a much better correlation with a pyralid moth (Löfstedt et al., 1983). Although the strength of the correlation differed between recording positions, it is also likely to vary with species, range of compounds tested, and sensilla targeted. In support of this hypothesis, the zonal arrangement of OSN classes on the funiculus differs depending on sensilla types (Benton et al., 2009; de Bruyne et al., 2001; Jacob et al., 2017; Lin and Potter, 2015). In some species the OSNs appear to be more

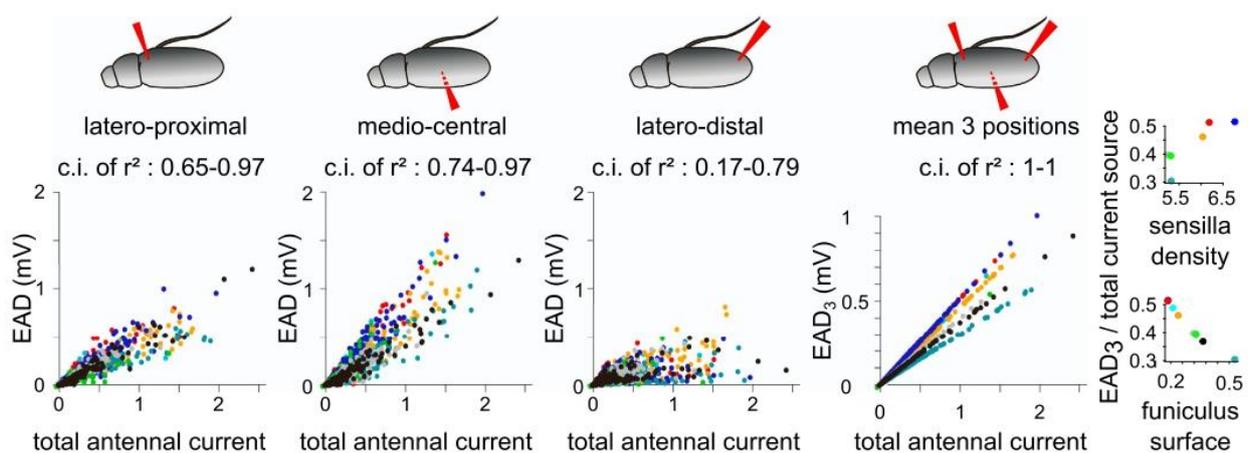


Fig. 7. Estimation of antennal olfactory activity with EAD₃. The best estimator of antennal activity is the total antennal current, calculated with the current point model fed by the three EAD recordings. The scatterplots show the correlation of the EAD response at each position, and their mean, with this value. Species are colour coded with: black, grey, dark cyan, blue, cyan, orange, red and green for *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera zonata*, *Dacus demarezzii*, *Ceratitis capitata*, *Ceratitis catovirii*, *Ceratitis quilicii*, *Neoceratitis cyaneescens* and *Zeugodacus cucurbitae*, respectively. Coefficients of determination and their bootstrap confidence intervals were calculated independently for each species. The minimum lower limit and the maximum upper limit among the species are shown above the graphs. The ramp of a linear fit between mean EAD₃ and total current source varies between species and depends on both sensilla density and funiculus size, as shown in the two panels on the right.

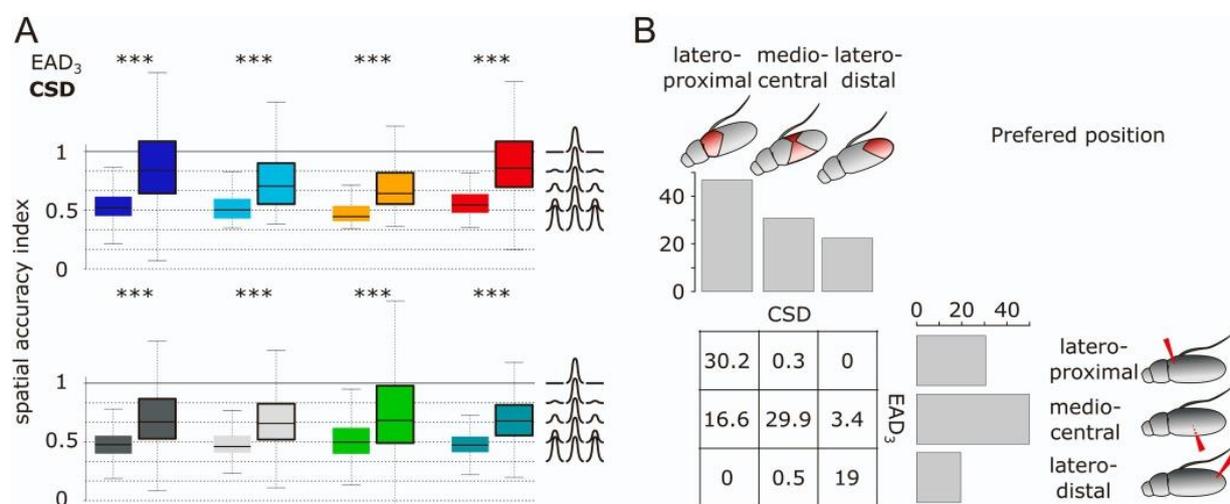


Fig. 8. Localization of the activation on the antenna with CSD analysis. **A.** CSD analysis localizes activity on the antenna more accurately than raw EAD₃. For each fly species (same colour coding as in Fig. 7), box-and-whisker plots show the quartile distribution of a spatial accuracy index for raw EAD₃ (boxes without frame) and CSD responses (boxes framed by a thick line). For all species, the index was systematically higher for CSD than for EAD₃ responses (bootstrap comparison of medians, *** $p < 0.001$). For positive responses, the index ranges from 0.33 (three equal responses) to 1 (two responses at 0), as shown schematically on the right. **B.** Cross-comparisons of the position of the maximum value for raw EAD₃ and CSD responses. The distribution of the two preferred positions (bars) and the joint distribution (matrix) are scaled as % of total responses.

scattered (Tait et al., 2016). The spatial distribution of functional types of OSNs is not known in the Tephritidae species used here, but morphological studies suggest clear differences along the proximo-distal axis, but not between the medial and lateral surfaces (Jacob et al., 2017). Hence, the observed bias towards the proximal position could be specific to our dataset.

EAG₃ had obvious advantages for recording funiculus activity, but this might not be the case for multi-segmented antennae. An EAG electrode was also shown to record localized OSN activity in moths, (Nagai, 1985), and a current point model is compatible with multi-position recordings (Jacob, 2018). However, each annulus was reported to repeat approximately the same distribution of OSNs (Binyameen et al., 2012; Ghaninia et al., 2014; Pérez-aparicio et al., 2022; Sanes and Hildebrand, 1976; Shields and Hildebrand, 2001). This was also the case for a mosquito (Ghaninia et al., 2007). Thus, the chemical tuning is unlikely to vary much along the proximo-distal axis of a filamentous antenna, although the optimal position for an electrode might not be at the tip (Jacob et al., 2021). Conversely, a zonal arrangement of OSNs has also been described in the lamellate antennae of beetles (Bengtsson et al., 2011; Larsson et al., 2001), on which an EAG electrode can be positioned on each lamella (Chen et al., 2019). More generally, specific investigations on different types of club-shaped antennae are required to test the benefits of multi-position EAG.

4.2. The benefits of the current point model

Averaging the three EAG signals was as accurate as the current point model for estimating total antennal activity. Our study suggests that researchers could use this simple metric to compare specimens with similar antennal shapes and sizes. The analysis using the current point model serves two purposes. First, it allows a direct comparison between species; second, it reveals the most likely location of the activated OSNs. The comparison between species must be interpreted with caution, as it relies on unknown assumptions, such as the similar conductivity of the antennal tissues. The spatial information included in the EAG₃ signal is blurred, whereas the CSD analysis clarifies it. Locating the activated OSNs can guide further investigation and could be useful for separating co-eluted responses. In Fig. 4, a double-peak with retention time just

above 11 min is the distinct combination of a proximal activation, followed by a distal activation.

The total OSN response on the antenna is correlated with the activation level of olfactory receptors and the number of OSNs expressing them. These two properties evolve under selection (Crowley-gall et al., 2016; Dekker et al., 2015, 2006; Linz et al., 2013). Using the current point model, we computed the EAG₃ responses expected from three alternative evolutionary scenarios (Fig. 9). Compared to an ancestral state, the receptor activation level, the number of OSNs, or both, increase in response to an odour. In the first case, the EAG undergoes the same proportional increase regardless of the electrode location. In the two other cases, the additional OSNs spread over new regions of the funiculus. Depending on the electrode position, the change in single-probe EAG either overestimates or underestimates the change in OSN number. In such cases, only the use of EAG₃ recordings can quantify the changes in antennal response. We have provided initial experimental evidence to support this phenomenon, by using six compounds in *Drosophila melanogaster*, and by analysing the DoOR 2.0 database (Münch and Galizia, 2016) and the known number of OSN types (Grabe et al., 2016).

4.3. Multichannel EAG serves different purposes

Our method aims to explore changes of chemical specificity across the olfactory epithelium. Multichannel EAGs have been performed for other purposes: to increase the signal-to-noise ratio with multiple antennae (Park and Baker, 2002), or to build a biosensor using multi-species EAG for compound discrimination (Hetling et al., 2007; Myrick et al., 2008; Park et al., 2002). Nagai's multi-position setup (Nagai, 1981) intended to shed light on the biophysical mechanism involved in the generation of the EAG signal. Our setup could also further our understanding of this mechanism. In particular, we observed that the amplitude ratio (between responses at different positions), correlates with the latency difference. This suggests that the EAG signal does not differ from most field potential signals. The current source or sink starts at the OSN site, before being propagated to the nearest electrode and then to the one further away. We have yet to determine the current's exact pathway. The maximum time delay of 20 ms between positions, as

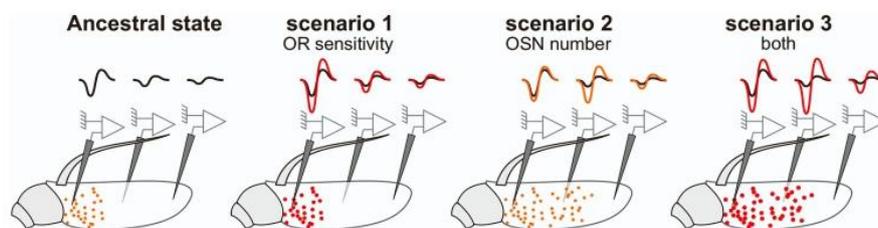


Fig. 9. Schematic depiction of the sensitivity of EAD₃ to changes in the olfactory response. Compared to an ancestral state, we modelled the expected EAG₃ responses according to three evolutionary scenarios. If only the sensitivity of the olfactory receptors varies (scenario 1), each EAG response changes with the same ratio. If the number of OSNs varies (scenario 2), individual EAGs overestimate or underestimate the change due to OSNs at new locations. In contrast, the mean EAG₃ depends linearly on the number of OSNs. If the number and sensi-

tivity of OSNs vary (scenario 3), the mean EAG₃ response is equally sensitive to both mechanisms.

reported here, suggests that the propagation speed is around 0.02 m/s. This needs to be confirmed by more detailed research, associated with known positions of neuronal activation.

5. Conclusion

To conclude, the EAG₃ and GC-EAD₃ setup provides an accurate spatio-temporal description of insect olfactory responses. It is a useful and affordable tool for studying insect chemical ecology and/or the evolution of olfactory systems. It could accelerate the identification of new baits for the biocontrol of many pests. This approach is essential for insects with aristate antennae, but it could also be beneficial in the case of insects with different antennal morphologies.

CRedit authorship contribution statement

Conceptualization: GR, BR and VJ; Data curation: GR; Formal analysis: VJ; Funding acquisition and supervision: BR and VJ; Writing - original draft: GR and VJ; Writing - review & editing: BR and VJ.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing interests.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors would like to thank Serge Glenac and Jim Payet for collecting and rearing the insects and Andrew Myrick for advices concerning the Chopper modulation system. The authors greatly acknowledge the Plant Protection Platform for their technical support (3 P, IBISA). This research was conducted within the framework of the UMT BAT 'Biocontrôle en Agriculture Tropicale'. This work was funded by the Conseil Régional de la Réunion and the European Regional Development Fund (ERDF), the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), and the French Ministry of Agriculture, as part of the research project GEM-DOTIS (Ecophyto II 2018).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.jneumeth.2023.109842](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2023.109842).

References

Alborn, H.T., Bruton, R.G., Beck, J.J., 2021. Sampling of volatiles in closed systems: a controlled comparison of three solventless volatile collection methods. *J. Chem. Ecol.* 47, 930–940. <https://doi.org/10.1007/s10886-021-01306-6>.

Andersson, M.N., Schlyter, F., Hill, S.R., Dekker, T., 2012. What reaches the antenna? How to calibrate odor flux and ligand-receptor affinities. *Chem. Senses* 37, 403–420. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjs009>.

Ayer, R.K., Carlson, J., 1992. Olfactory physiology in the *Drosophila* antenna and maxillary palp: acj6 distinguishes two classes of odorant pathways. *J. Neurobiol.* 23, 965–982. <https://doi.org/10.1002/neu.480230804>.

Bengtsson, J.M., Khbais, H., Reinecke, A., Wolde-Hawariat, Y., Negash, M., Seyoum, E., Hansson, B.S., Hillbur, Y., Larsson, M.C., 2011. Conserved, highly specialized olfactory receptor neurons for food compounds in 2 congeneric scarab beetles, *Pachnoda interrupta* and *Pachnoda marginata*. *Chem. Senses* 36, 499–513. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr002>.

Benton, R., Vannice, K.S., Gomez-Diaz, C., Vossahl, L.B., 2009. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell* 136, 149–162. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.001>.

Biasazin, T.D., Karlsson, M.F., Hillbur, Y., Seyoum, E., Dekker, T., 2014. Identification of host blends that attract the African invasive fruit fly, *Bactrocera invadens*. *J. Chem. Ecol.* 40, 966–976. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0501-6>.

Bigiani, A., Scalera, G., Crnjar, R., Barbarossa, I.T., Magherini, P.C., Pietra, P., 1989. Distribution and function of the antennal olfactory sensilla in *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera, Tephritidae). *Bolletino di Zool.* 56, 305–311. <https://doi.org/10.1080/1125008909355655>.

Binyameen, M., Anderson, P., Ignell, R., Seada, M.A., Hansson, B.S., Schlyter, F., 2012. Spatial organization of antennal olfactory sensory neurons in the female *Spodoptera littoralis* moth: Differences in sensitivity and temporal characteristics. *Chem. Senses* 37, 613–629. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjs043>.

Blight, M.M., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M., 1995. Antennal perception of oilseed rape, *Brassica napus* (Brassicaceae), volatiles by the cabbage seed weevil *Ceutorhynchus assimilis* (Coleoptera, Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 21, 1649–1664. <https://doi.org/10.1007/BF02033667>.

de Bruyne, M., Foster, K., Carlson, J.R., 2001. Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* 30, 537–552. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00289-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00289-6).

Chen, L., Li, Y., Shao, K., 2019. A practical technique for electrophysiologically recording from lamellated antenna of scarab beetle. *J. Chem. Ecol.* 45, 392–401. <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01059-3>.

Couto, A., Alenius, M., Dickson, B.J., 2005. Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr. Biol.* 15, 1535–1547. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.034>.

Crnjar, R., Scalera, G., Liscia, A., Angioy, A.M., Bigiani, A., Pietra, P., Barbarossa, I.T., 1989. Morphology and EAG mapping of the antennal olfactory receptors in *Dacus oleae*. *Entomol. Exp. Appl.* 51, 77–85. <https://doi.org/10.1007/BF00343446>.

Crowley-gall, A., Date, P., Han, C., Rhodes, N., Andolfatto, P., Layne, J.E., Rollmann, S. M., 2016. Population differences in olfaction accompany host shift in *Drosophila mojavensis*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 283. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1562>.

Dekker, T., Iba, I., Siju, K.P., Stensmyr, M.C., Hansson, B.S., 2006. Olfactory shifts parallel superspecialism for toxic fruit in *Drosophila melanogaster* sibling, *D. sechellia*. *Curr. Biol.* 16, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.075>.

Dekker, T., Revadi, S., Mansourian, S., Ramasamy, S., Lebreton, S., Becher, P.G., Angeli, S., Rota-Stabelli, O., Anfora, G., 2015. Loss of *Drosophila* pheromone reverses its role in sexual communication in *Drosophila suzukii*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3018>.

Duyck, P.F., Quilici, S., 2002. Survival and development of different life stages of three *Ceratitis* spp. (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures. *Bull. Entomol. Res.* 92, 461–469. <https://doi.org/10.1079/BER2002188>.

Ghaninia, M., Ignell, R., Hansson, B.S., 2007. Functional classification and central nervous projections of olfactory receptor neurons housed in antennal trichoid sensilla of female yellow fever mosquitoes, *Aedes aegypti*. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1611–1623. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05786.x>.

Ghaninia, M., Olsson, S.B., Hansson, B.S., 2014. Physiological organization and topographic mapping of the antennal olfactory sensory neurons in female hawkmoths, *Manduca sexta*. *Chem. Senses* 39, 655–671. <https://doi.org/10.1093/chemse/bju037>.

Grabe, V., Baschwitz, A., Dweck, H.K.M., Lavista-Ilanos, S., Hansson, B.S., Sachse, S., 2016. Elucidating the neuronal architecture of olfactory glomeruli in the *Drosophila* antennal lobe. *CellReports* 16, 3401–3413. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.063>.

Jacob, V., 2018. Current source density analysis of electroantennogram recordings: a tool for mapping the olfactory response in an insect antenna. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00287>.

- Jacob, V., Scolari, F., Delatte, H., Gasperi, G., Jacquin-Joly, E., Malacrida, A.R., Duyck, P.-F., 2017. Current source density mapping of antennal sensory selectivity reveals conserved olfactory systems between tephritids and *Drosophila*. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15431-4>.
- Jacob, V., Tibère, R., Nibouche, S., 2021. Few sensory cues differentiate host and dead-end trap plant for the sugarcane spotted borer *Chilo sacchariphagus* (Lepidoptera: Crambidae). *J. Chem. Ecol.* 47, 153–166. <https://doi.org/10.1007/s10886-020-01240-z>.
- Jafari, S., Alenius, M., 2021. Odor response adaptation in *Drosophila*—a continuous individualization process. *Cell Tissue Res* 383, 143–148. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03384-6>.
- Jang, E.B., Light, D.M., Flath, R.A., Nagata, J.T., Mon, T.R., 1989. Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* to identified volatile constituents from calling males. *Entomol. Exp. Appl.* 50, 7–19. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1989.tb02307.x>.
- Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C.G., Menzel, R., 1997. Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature* 387, 285–288. <https://doi.org/10.1038/387285a0>.
- Kaissling, K.-E., 1995. Single unit and electroantennogram recordings in insect olfactory organs. In: Spielman, A., Brand, J. (Eds.), *Experimental Cell Biology of Taste and Olfaction*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 361–377.
- Larsson, M.C., Leal, W.S., Hansson, B.S., 2001. Olfactory receptor neurons detecting plant odours and male volatiles in *Anomala cuprea* beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Insect Physiol.* 47, 1065–1076. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00087-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00087-7).
- Lin, C.C., Potter, C.J., 2015. Re-classification of *Drosophila melanogaster* trichoid and intermediate sensilla using fluorescence-guided single sensillum recording. *PLoS One* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139675>.
- Linz, J., Baschwitz, A., Strutz, A., Dweck, H.K.M., Sachse, S., Hansson, B.S., Stensmyr, M. C., 2013. Host plant-driven sensory specialization in *Drosophila erecta*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280, 20130626. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0626>.
- Löfstedt, C., der Pers, Van, Löfqvist, J.N.C., Lanne, B.S. J., 1983. Sex pheromone of the cone pyralid *Dioryctria Abietella*. *Entomol. Exp. Appl.* 34, 20–26. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1983.tb03285.x>.
- Münch, D., Galizia, C.G., 2016. DoOR 2.0 - comprehensive mapping of *Drosophila melanogaster* odorant responses. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep21841>.
- Myrick, A.J., Baker, T.C., 2018. Increasing signal-to-noise Ratio in gas chromatography - electroantennography using a Deans switch effluent chopper. *J. Chem. Ecol.* 44, 111–126. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0916-y>.
- Nagai, T., 1981. Electroantennogram response gradient on the antenna of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J. Insect Physiol.* 27, 889–894. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(81\)90090-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(81)90090-1).
- Nagai, T., 1983. Spread of local electroantennogram response of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 19, 291–298. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(83\)90057-3](https://doi.org/10.1016/0048-3575(83)90057-3).
- Nagai, T., 1985. Summation and gradient characteristics of local electroantennogram response of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 24, 32–39. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(85\)90110-5](https://doi.org/10.1016/0048-3575(85)90110-5).
- Olsson, S.B., Hansson, B.S., 2013. Electroantennogram and Single Sensillum Recording in Insect Antennae. In: Touhara, K. (Ed.), *Pheromone Signaling: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Vol. 1068. Springer Science+Business Media, LLC, Berlin, pp. 157–177. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-619-1_11.
- Pérez-aparicio, A., Ammagarhalli, B., Gemena, C., 2022. A closer look at sex pheromone autodetection in the oriental fruit moth. *Sci. Rep.* 12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10954-x>.
- Petersen, K.H., Devor, A., Ulbert, I., Dale, A.M., Einevoll, G.T., 2006. Current-source density estimation based on inversion of electrostatic forward solution: effects of finite extent of neuronal activity and conductivity discontinuities. *J. Neurosci. Methods* 154, 116–133. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.12.005>.
- Renou, M., Lucas, P., 2013. Functional characterization of insect olfactory receptor neurons through in vivo approaches. *Methods Mol. Biol.* 1003, 173–186. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-377-0_13.
- Sanes, J.R., Hildebrand, J.G., 1976. Structure and development of antennae in a moth, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* 51, 282–299. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90144-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90144-5).
- Schneider, D., 1957. Elektrophysiologische untersuchungen von chemo- und mechanorezeptoren der antenne des seidenspinners *Bombyx mori* L. *Z. Vgl. Physiol.* 40, 8–41. <https://doi.org/10.1007/BF00298148>.
- Schneider, D., Boeckh, J., 1962. Rezeptorpotential und nervenimpulse einzelner olfaktorischer sensillen der insektenantenne. *Z. Vgl. Physiol.* 45, 405–412. <https://doi.org/10.1007/BF00340462>.
- Shanbhag, S., Müller, B., Steinbrecht, R., 1999. Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster* 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28, 377–397. [https://doi.org/10.1016/S0020-7322\(99\)00039-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7322(99)00039-2).
- Shields, V.D.C., Hildebrand, J.G., 2001. Recent advances in insect olfaction, specifically regarding the morphology and sensory physiology of antennal sensilla of the female sphinx moth *Manduca sexta*. *Microsc. Res. Tech.* 55, 307–329. <https://doi.org/10.1002/jemt.1180>.
- Tait, C., Batra, S., Ramaswamy, S.S., Feder, J.L., Olsson, S.B., 2016. Sensory specificity and speciation: a potential neuronal pathway for host fruit odour discrimination in *Rhagoletis pomonella*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 283, 1–9. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2101>.
- Wibe, A., 2004. How the choice of method influence on the results in electrophysiological studies of insect olfaction. *J. Insect Physiol.* 50, 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.03.006>.

CHAPITRE 4

*Stratégies d'adaptation olfactive
périphérique des mouches des fruits à
leur gamme de fruits hôtes*

CHAPITRE 4

Stratégies d'adaptation olfactive périphérique des mouches des fruits à leur gamme de fruits hôtes

Contenu

4.1. Présentation du chapitre	77
4.2. Article 2 : Stratégie olfactive périphérique des mouches des fruits généralistes dans la perception de ses fruits hôtes	78
4.3. Les corrélations phylogénétiques des émissions volatiles de fruits sont susceptibles de servir de base à la spécialisation chez les Tephritidae	107

4.1. Présentation du chapitre

Les composés volatils sont d'une importance cruciale dans les différentes interactions entre les insectes et l'environnement. Par exemple, les insectes se reposent grandement sur les composés volatils pour la recherche de leurs sites de ponte et impliquent ainsi leur système olfactif afin d'intégrer les informations fournies par chacun des composés (de Bruyne & Baker, 2008). Face à la grande diversité de composés volatils émis dans la nature mais également contraints par la capacité neuronale des insectes à intégrer de multiples informations sensorielles (Bernays, 2001), les systèmes olfactifs effectuent une sélection dès le niveau périphérique des composés qui sont susceptibles d'être utilisés par l'insecte. De ce fait, l'étude du système périphérique permet d'identifier les composés détectés par l'insecte, même si elle ne permet pas de savoir comment il les utilise. En conséquence, les mouches des fruits doivent utiliser des stratégies efficaces pour détecter et choisir leurs sites de ponte.

Pour déchiffrer ces stratégies, nous tentons dans ce chapitre d'estimer les contraintes évolutives associées à chaque composé volatil de fruits ainsi que les réponses physiologiques et comportementales des mouches des fruits vis-à-vis de ces composés. Pour cela, nous nous sommes basés sur deux grandes hypothèses fournies sur les mécanismes olfactifs des espèces généralistes et spécialistes. Pour les espèces de mouches des fruits généralistes dont la gamme d'hôte comprend diverses espèces de fruits qui peuvent être phylogénétiquement éloignées, il a été stipulé que ces insectes se basent sur la détection des composés volatils communs émis

entre les différentes espèces de fruits hôtes (Biasazin et al., 2018b). D'un autre côté, pour les espèces spécialistes avec une gamme d'hôte limitée à une seule famille de fruits, leur système olfactif reposerait sur la détection des composés les plus spécifiques à ces familles de fruits (Bruce, Wadhams, & Woodcock, 2005).

Nous avons donc subdivisé ce chapitre en deux grandes parties. Dans la première partie, présentée sous forme d'article précédé d'une présentation, nous traitons la stratégie olfactive périphérique adoptée par les espèces de mouches des fruits généralistes pour percevoir leurs fruits hôtes. Dans la deuxième partie, nous traitons le cas des espèces spécialistes à travers l'étude de la corrélation entre les composés volatils et la phylogénie des fruits. Il est à préciser que cette deuxième partie est exploratoire et nécessitera des études physiologiques et comportementales approfondies ultérieures, du même ordre que celles réalisées lors de la première partie.

4.2. Article 2 : Stratégie olfactive périphérique des mouches des fruits généralistes dans la perception de leurs fruits hôtes

4.2.1. Présentation et résumé de l'article

La localisation d'hôte est essentielle pour les insectes phytophages afin de pouvoir se nourrir et pondre (Bruce et al., 2005). Toutefois, localiser un hôte dans un environnement complexe, incluant plusieurs espèces de plantes, peut paraître difficile. C'est le cas pour les espèces polyphages qui peuvent explorer une très large gamme d'hôte. En effet, le nombre des hôtes des insectes phytophages varie selon les espèces et atteint parfois un nombre assez remarquable. Par exemple, *Ceratitis capitata* possède plus de 300 plantes hôtes et *Bactrocera dorsalis* plus de 250 plantes hôtes à l'échelle mondiale (Liquidó et al., 1990; White & Elson-Harris, 1992; Schutze et al., 2017). Rien qu'à La Réunion, cette dernière espèce a été reportée sur plus d'une cinquantaine d'espèces de fruits (Moquet et al., 2021). La polyphagie offre à ces espèces une capacité de s'adapter à un environnement changeant afin d'assurer la survie des individus et de leurs générations futures. Cette capacité rend difficile le contrôle des insectes ravageurs polyphages étant donné qu'il existe toute l'année un grand nombre d'hôtes naturels et sauvages qui sont autant de réservoirs de populations susceptibles de réinfester les cultures.

Cependant, la stratégie olfactive développée par les espèces polyphages dans la reconnaissance de leur site de ponte reste encore actuellement mal connue. Une hypothèse renforcée par plusieurs observations stipule que le système olfactif des espèces généralistes se base sur les composés communs à plusieurs espèces de fruits hôtes (Biasazin et al., 2018b). Dans leurs études, Biasazin et al. (2018b) ont démontré une sensibilité olfactive de quatre espèces de mouches des fruits aux composés volatils communs à quatre espèces de fruits

phylogénétiquement éloignées, et ces composés se sont révélés attractifs en tests comportementaux olfactifs. Toutefois, ce nombre limité de fruits n'est pas suffisant pour confirmer l'hypothèse évoquée. De plus, l'échantillonnage de ces espèces de fruits n'est pas représentatif des fruits explorés par les espèces de Tephritidae.

Dans notre étude, nous explorons donc cette piste en explorant un plus large jeu de données incluant 28 espèces de fruits et 8 espèces de Tephritidae, complétée par des études comportementales sur *Bactrocera dorsalis*. En effet, cette espèce très polyphage explore une large gamme d'hôte ce qui rend intéressant son étude dans la compréhension des mécanismes olfactifs liés à la polyphagie (Schutze et al., 2017). Les autres espèces considérées ont des gammes d'hôtes qui se recouvrent en grande partie et sont plus ou moins larges, ce qui permettra de généraliser nos conclusions ou au contraire de les invalider. La compréhension de ces mécanismes devrait faciliter la sélection de composés potentiellement attractifs pour les espèces de mouches des fruits.

Pour cela, nous avons analysé les émissions volatiles de fruits en GC-MS. En effet, étant basés à La Réunion, nous avons l'opportunité de travailler sur un grand nombre d'espèces de fruits à maturité et sur les arbres, ce qui n'aurait pas pu être réalisé ailleurs. L'échantillonnage a été réalisé par une ancienne doctorante du laboratoire, Maud Charlery de la Masselière, qui a réalisé cette tâche sur une année en 2016-2017, pour s'adapter aux saisons de fructifications qui diffèrent selon les espèces. L'idée initiale était de se concentrer uniquement sur les analyses des émissions volatiles pour en tirer des conclusions et ne concernait pas *Bactrocera dorsalis* qui n'était pas encore présente sur l'île à cette période. Néanmoins, nous avons pensé que cette idée nécessitait d'être complétée par une étude réalisée sur les mouches des fruits elles-mêmes et que ces données pourraient se révéler un outil crucial pour explorer l'écologie chimique de *Bactrocera dorsalis*.

Au début de cette thèse, nous avons profité de la mise en place au laboratoire d'une automatisation de l'analyse des données GC-MS par MzMine, ce qui nous a permis d'analyser la base de données de manière beaucoup plus rapide, complète et plus uniforme que l'ébauche d'analyse réalisée par Maud. Ces données comportent des émissions volatiles de fruits intacts, afin de se rapprocher le plus possible des conditions écologiques perçues par les insectes, et d'autre part des émissions volatiles de fruits coupés, puisque les fruits entaillés dans les vergers peuvent émettre de nouveaux composés potentiellement intéressants. Au total, 369 échantillons ont été analysés avec cinq à sept répétitions pour chaque fruit : 193 volatilomes de fruits intacts et 176 volatilomes pour les fruits coupés. Nous avons pu identifier 511 composés volatils pour les fruits intacts et 665 composés volatils pour les fruits coupés dont les principales familles chimiques sont les esters et les terpénoïdes.

Nous avons par la suite calculé pour chacun de ces composés un indice de diversité et des indices de signal phylogénétique ce qui nous a permis d'identifier les composés communs à plusieurs espèces de fruits et ceux qui sont spécifiques à un fruit ou groupe de fruits. En fonction de ces indices et de la présence des composés dans les fruits intacts et les fruits coupés, nous avons sélectionné une trentaine de composés afin de tester les réponses physiologiques de huit espèces de Tephritidae vis-à-vis de ces composés. Pour cela, nous avons appliqué les développements méthodologiques que nous avons abordés dans l'article 1. Ainsi, des expérimentations en EAG₃ et GC-EAD₃ avec les composés sélectionnés ont été réalisées.

Ces analyses ont montré une corrélation négative entre les réponses olfactives des mouches des fruits et la diversité des fruits émetteurs. De plus, nous avons observé que ce trait de corrélation négative était conservé entre les différentes espèces de Tephritidae. Cela suggère que la sensibilité olfactive des mouches des fruits augmente avec la spécificité des composés de l'hôte. Ce résultat nous a surpris car il ne correspondait pas à notre première hypothèse. Cela nous a donc obligé à réadapter notre cadre théorique et à proposer une nouvelle hypothèse comme quoi les systèmes olfactifs des mouches des fruits se spécialisent également dans la discrimination des fruits hôtes. Un modèle neuronal mécanistique de la détection olfactive des mouches des fruits a été développé afin de valider la pertinence de ces hypothèses.

Nous avons envisagé une conséquence comportementale de ce nouveau cadre théorique que nous avons testé sur *Bactrocera dorsalis*. Il s'agissait de tester l'attractivité d'un mélange de composés communs et un mélange de composés spécifiques par piégeage *ex situ* à double choix à deux concentrations différentes. Nous avons prédit qu'une sensibilité accrue aux composés spécifiques devrait induire une préférence pour ceux-ci uniquement lorsqu'ils sont présentés à faible concentration. En accord avec notre prédiction, à faible concentration, les femelles de *Bactrocera dorsalis* ont montré plus d'attractivité pour les composés spécifiquement émis par quelques espèces de fruits que pour les composés partagés entre les fruits. A plus haute concentration, une inversion de tendance a été observée, c'est-à-dire qu'il y a une préférence pour les composés communs, similaire aux observations de Biasazin et al. (2018b). Le fait d'avoir observé la confirmation expérimentale d'une prédiction réalisée avant même de faire les manipulations a été une agréable surprise, et renforce la pertinence de notre hypothèse. Cependant, une hypothèse alternative possible, même si moins probable, serait une spécialisation des systèmes olfactifs des mouches des fruits dans la distinction des hôtes par rapport aux non-hôtes. Cette deuxième hypothèse explique mal l'inversion d'attractivité en fonction de la concentration que nous avons observée, et supposerait également une corrélation marquée entre les composés préférés et la gamme d'hôte des espèces, ce qui ne semble pas être le cas. Cependant, nous n'avons comparé l'attractivité qu'envers deux mélanges de composés. Nous ne pouvons pas exclure qu'un seul des composés des deux mélanges peut être impliqué

dans les comportements observés. Ainsi, tester l'attractivité des composés un par un aurait pu permettre de généraliser notre hypothèse à l'ensemble des composés spécifiques et communs.

Quoiqu'il en soit, nos observations associées au nouveau cadre conceptuel permettent d'envisager la conception future d'un nouveau leurre utilisable pour le biocontrôle de *Bactrocera dorsalis*, associant des composés communs et spécifiques de fruits pour une attractivité renforcée.

4.2.2. Article 2

1 **Fruit discriminating olfactory systems as an adaptation of Tephritidae**
2 **fruit flies to polyphagy**

3 Gaëlle Ramiaranjatovo^{1,2}, Maud Charlery de la Masselière¹, Robin Comte¹, Pierre-François Duyck¹,
4 Bernard Reynaud^{1,2}, Vincent Jacob¹

5 1. CIRAD, UMR PVBMT, F-97410 St Pierre, La Réunion, France

6 2. Université de La Réunion, France

7

8 **1. Introduction**

9 To ensure primary functions such as reproduction, oviposition, feeding and resting,
10 insects need to find a suitable host. To achieve this, they rely on the volatile emissions of the
11 host, which play a crucial role in host perception and localization (Schoonhoven et al., 2005;
12 Cardé and Willis, 2008). Insects detect and integrate the volatile compounds of their chemical
13 environment through the peripheral olfactory system, which specialises, amongst other things,
14 in detecting host compounds (Linz et al., 2013; Keeseey et al., 2015; Dweck et al., 2018; Molnár
15 et al., 2018). However, distinguishing a host in a natural environment, composed of a large
16 diversity of volatile compounds, is a complex task which requires an effective strategy
17 (Wäschke et al., 2014, Meiners, 2015). Most commonly, insects rely on one or several chemical
18 signatures specific to their hosts, which are compounds or a set of compounds with a defined
19 ratio (Bruce et al., 2005; Bruce and Pickett, 2011). Thus, understanding the olfactory strategy
20 involved in host searching behavior requires identifying the chemical signatures that trigger it.
21 This is particularly relevant for insect pests, since these compounds can be used for pest control
22 by trapping (e.g. Siderhurst and Jang, 2010).

23 Polyphagous species have a wide host range, which further complexifies the task. Most
24 likely they use many chemical signatures of their multiple hosts. However, since a compound
25 might be shared between the emissions of two or more hosts, the number of compounds they
26 recognise does not necessarily match the width of their host range. The prevailing hypothesis
27 states that polyphagous insects essentially use few compounds shared between their host
28 emissions (Pan et al., 2015; Cunningham et al., 2016; Biasazin et al., 2018). Limited
29 experimental evidence support this, including a recent study performed on four polyphagous
30 fruit fly species from the family Tephritidae that rely on compounds shared between four
31 different host fruits (Biasazin et al., 2018).

32 Mitigating this theory, polyphagous species exhibit preferences between multiple host
33 options (Muthuthantri and Clarke, 2012; Charlery de la Masselière et al., 2017), and most
34 importantly can change their preference depending on their experience (Cunningham et al.,
35 2001). Such behavioral plasticity suggests an ability to discriminate hosts beyond the sole use

36 of host-shared compounds. The relative contribution of host-shared compounds and compounds
37 that are not shared between hosts, herein species-specific host compounds, remain unresolved.

38 To challenge this, we studied the olfactory strategies developed by eight Tephritidae
39 fruit fly species for detecting their hosts: the Oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*, which is a
40 highly invasive species infesting more than 250 different host plants (Schutze et al., 2017), four
41 other polyphagous species whose host range overlap with *B. dorsalis*: *Bactrocera zonata*,
42 *Ceratitis capitata*, *Ceratitis catoirii* and *Ceratitis quilicii* (Charlery de la Masselière et al., 2017;
43 Moquet et al., 2021); two species whose host range covers the Cucurbitaceae plant family:
44 *Dacus demmerezi* and *Zeugodacus cucurbitae*; and one species whose host range cover the
45 Solanaceae family: *Neoceratitis cyanescens*. First, we analysed the composition of the volatile
46 emissions of 28 host fruits species through gas chromatography coupled with mass
47 spectrometry (GC-MS). We assessed the degree of sharedness of each compound among the
48 fruit emissions. Secondly, we measured the olfactory responses of females from the eight
49 Tephritidae species to stimulations by synthetic compounds with various degrees of sharedness
50 among fruits. To do this, we used the triple electroantennography (EAG₃) technique
51 (Ramiaranjatovo et al., 2023) and chopper-modulated GC coupled with a triple
52 electroantennogram detector (GC-EAD₃). Thirdly, we compared the antennal responses to these
53 compounds with the prediction of a neuronal model of insect peripheric olfactory system
54 optimized for fruit discrimination. Finally, we tested the behavioural preference of female *B.*
55 *dorsalis* in dual choice *ex situ* trap between two sets of volatile compounds with contrasting
56 degree of sharedness between fruit emissions.

57

58 2. Materials and methods

59 2.1. Insects

60 Female individuals of eight species of Tephritidae were used for the electrophysiology
61 experiments: *Bactrocera dorsalis* (oriental fruit fly), *Bactrocera zonata* (peach fruit fly), *Ceratitis*
62 *capitata* (Medfly), *Ceratitis catoirii* (Mascarene fruit fly), *Ceratitis quilicii* (Cape fruit fly), *Dacus*
63 *demmerezi* (Indian ocean cucumber fruit fly), *Neoceratitis cyanescens* (tomato fruit fly), *Zeugodacus*
64 *cucurbitae* (melon fly). Individuals had respectively 12-15, 28-32, 10-14, 21-26, 13-17, 11-15, 10-16,
65 25-31 days after emergence during the experimental periods and belonged to the 62-64th, 179-180th, 107-
66 108th, 311-312th, 77-79th, 59th, 64-65th, 7th generations. Cohorts were established from collected
67 individuals in Reunion Island and were reared under regulated conditions (temperature of 25 ± 1°C,
68 relative humidity of 65 ± 10% and 12 hours of photoperiod) in laboratory. Larvae of *N. cyanescens* were
69 reared on potatoes (*Solanum tuberosum*), *D. demmerezi* and *Z. cucurbitae* on zucchini (*Cucurbita pepo*)
70 and the larvae of the other species with an artificial diet (Duyck & Quilici, 2002). The insects emerged

71 and developed in 30 x 30 x 30 cm rearing cages. They were fed an artificial diet containing crystallised
72 sugar, protein (Yeast hydrolysate enzymatic, MP biomedical, LLC, USA) and water.

73 For behavioural tests, experiments were conducted on female individuals of *B. dorsalis* having
74 18-25 days after emergence and from 76-78th generations. The rearing conditions were similar to those
75 described above.

76 **2.2. Plant materials and collection of volatile compounds**

77 Volatilomes of 28 fruit species, considered to be potential hosts of Tephritidae species (Moquet,
78 Payet, Glenac, & Delatte, 2021), were analysed in this study (Table). Samples were extracted from intact
79 fruits on the tree or from sliced fruits. In total, 3 to 8 (median 7) replicates were performed for each fruit
80 species and condition, with a total of 193 samples for intact fruits and 176 samples for sliced fruits.

81 Fruit volatile collection was performed by dynamic headspace extraction at the ripening stage
82 when female flies are likely to be stinging the fruit. Fruit or fruit cluster was bagged in a nalophan bag
83 of 47 cm width (SenseTrading, Gröningen, Netherlands) sealed with plastic ties at the two extremities
84 to create a headspace. Air contents was sucked during two hours at 100 mL.min⁻¹ and was adsorbed in
85 Tenax GR tube (Supelco, Bellefonte, USA). For each fruit species and condition, a control sample was
86 performed with an empty nalophan bag held in similar position.

87 **2.3. Compounds identification**

88 Tenax traps were stored at room temperature and analysed within seven days using an
89 automatic thermal desorber (ATD, Turbomatrix 350, Perkin Elmer, USA) coupled with GC-MS
90 (Clarus 580 GC and SQ8T MS, Perkin-Elmer, USA). The parameters of the ATD were as follow:
91 primary desorption 5 min at 250°C, flow 50 mL.min⁻¹; no inlet split; up to an Air Toxic trap at held at
92 2°C; secondary desorption 1 mL.min⁻¹ during 5 min, and a constant flow of 3 mL.min⁻¹. An Elite-5MS
93 capillary column (60 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, Perkin-Elmer, USA) was used for
94 analyses. The oven was heated from 50 to 270°C at 8°C.min⁻¹. Helium was used as carrier gas with a
95 constant flow of 0.21 mL.min⁻¹.

96 **Table 1:** List of the 28 fruit species studied

97

Fruit families	Fruit species	Common names
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i>	Mango
Cactaceae	<i>Hylocereus undatus</i>	Dragon fruit
Caricaceae	<i>Carica papaya</i>	Papaya
Combretaceae	<i>Terminalia catappa</i>	Indian almond
Cucurbitaceae	<i>Sechium edule</i>	Chayote
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita maxima</i>	Pumpkin
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Cucumber
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i>	Zucchini
Cucurbitaceae	<i>Cucumis melo</i>	Melon
Cucurbitaceae	<i>Citrullus lanatus</i>	Watermelon
Lauraceae	<i>Persea americana</i>	Avocado
Lythraceae	<i>Punica granatum</i>	Pomegranate
Moraceae	<i>Ficus carica</i>	Fig
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	Guava
Myrtaceae	<i>Psidium cattleianum</i>	Strawberry guava
Myrtaceae	<i>Syzygium samarangense</i>	Java apple
Myrtaceae	<i>Syzygium jambos</i>	Rose apple
Oxalidaceae	<i>Averrhoa carambola</i>	Star fruit
Rosaceae	<i>Eriobotrya japonica</i>	Loquat
Rosaceae	<i>Prunus persica</i>	Peach
Rosaceae	<i>Prunus domestica</i>	Plum
Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i>	Coffee
Rutaceae	<i>Citrus reticulata</i>	Tangor
Solanaceae	<i>Solanum melongena</i>	Eggplant
Solanaceae	<i>Solanum mauritianum</i>	Bugweed
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i>	Chilli
Solanaceae	<i>Solanum betaceum</i>	Tree tomato
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomato

98

99 Retention Indices (RI) were calculated from the retention times (RT) of C7-C30 n-alkanes. A
100 pre-processing of data was carried out with MZmine2 software (Pluskal, Castillo, Villar-Briones, &
101 Orešič, 2010). Compound peaks were detected by ADAP algorithm (Ni, Su, Qiu, Jia, & Du, 2016) (S/N
102 threshold 3, Wavelet Coeff. 3, minimum feature height 1,000,000, Coefficient/area threshold 300, peak
103 duration 0 to 0.2, RT wavelet 0 to 0.05 min), deconvoluted through blind source separation (window
104 width 0.1, minimum number peaks 2, RT tolerance 0.025), RANSAC aligned (m/z tolerance 0.3, RT
105 tolerance 0.1 min, automatic iteration no., minimum points no. 50%, threshold 0.1 min), and gap filled
106 (m/z tolerance 0.3, RT tolerance 0.02 min). Each compound was identified according to their molecular
107 weight and RI, and by comparison of their mass spectra with NIST 14 library databases.

108 The synthetic compounds used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (Merck
109 KGaA) at the highest purity available: ethyl propionate, methyl butyrate, methyl 2-methylbutyrate, ethyl
110 butyrate, methyl valerate, pentyl acetate, methyl hexanoate, camphene, β -myrcene, hexyl acetate,
111 methyl heptanoate, β -ocimene, ethyl heptanoate, methyl octanoate, benzyl acetate, trans-2-hexenyl
112 butyrate, benzyl butanoate, propyl acetate, isobutyl acetate, ethyl methacrylate, propyl propionate, ethyl
113 isovalerate, prenyl acetate, α -pinene, (-)- β -pinene, ethyl hexanoate, cis-3-hexenyl acetate, 3-carene,
114 limonene, linalool, (4E,6E)-allocimene, methyl salicylate, benzyl isobutyrate, phenylpropyl acetate, β -
115 caryophyllene.

116 2.4. Triple electroantennography EAG₃ bioassays

117 Electrophysiology experiments were conducted using EAG₃ technique according to the
118 protocols described in Ramiaranjatovo et al. (2022). EAG₃ improves the estimation of the olfactory
119 responses of the insect by recording simultaneously at three positions of the antenna. Briefly, a live fly
120 was immobilized in a 1,000 μ L pipette tip, leaving the head exposed. The base of the head was fixed
121 with dental wax (Enta Periphery Wax, Netherlands). For species of the Dacini tribe with elongated
122 antennae, the first two antennal segments, which do not have olfactory functions, were stabilized with a
123 silicone adhesive elastomer « Kwik-Sil » (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA). Four
124 electrodes, consisting of a chloride silver wires inserted into a glass micropipette (tip diameter 1-2 μ m)
125 filled with an electrolyte solution (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 4 mM MgCl₂, and 10 mM
126 HEPES) were used to perform the EAG₃ recording. The recording electrodes were placed in the latero-
127 proximal, medio-central and latero-distal regions of the right funiculus. The reference electrode was
128 inserted in the middle of the left eye. The recording electrodes were connected to a four-channel
129 differential AC amplifier (Model 1,700, A-M system, Carlsborg, USA) which amplified (gain x 1,000)
130 and filtered the signals between 1 and 1,000 Hz. Data acquisition was fitted by digitalizing the signals
131 at 500 Hz with an acquisition card (NI 9215, National instruments, France) associated with Labview
132 software (National instruments, France).

133 2.5. Coupling chopped Gas chromatograph - triple electroantennography detector (GC-EAD₃)

134 For GC-EAD₃ experiments, EAG₃ antennal preparation was used as a detector in parallel with the flame
 135 ionization detector (FID). In order to improve the signal to noise ratio, the GC system was equipped with
 136 a D-Swafer Dean's (PerkinElmer, Inc., USA) at the column output, as described in Ramiaranjatovo et
 137 al. (2022). The device allows for a chopping of the GC signal through the alternate sending of the
 138 effluent to the both the EAG₃ and the FID detectors (Myrick & Baker, 2018; Ramiaranjatovo et al.,
 139 2022). The chop frequency was regulated to 1 Hz with Labview software (National Instruments, France)
 140 and a digital module (NI 9472, National Instruments, Nanterre, France). A fused silica Restek Rxi-5 ms
 141 column (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness, Restek, Lisses, France) was used and heated as
 142 follows : 50°C for 1 min, then 6.5°C.min⁻¹ to 200°C and 40°C.min⁻¹ to 250°C, held for 5 min. The
 143 temperature of the FID was set to 250°C. Helium N60 was used as carrier gas.

144 2.6. Stimuli preparation and odour delivery system

145 Stimuli were delivered through a glass chamber (20 cm x 5 mm i.d.FID.). The tube had a small
 146 hole 5 cm downstream outlet into which the odour source was inserted. The glass chamber was crossed
 147 by a continuous humidified and charcoal-filtered airflow (20 mL.s⁻¹) that reached the insect preparation,
 148 placed at 1 cm from the tube outlet.

149 For EAG₃ experiments, the stimulation of the insect preparation was done from an odour
 150 cartridge consisting of Pasteur pipette with a square of filter paper loaded with 1 µL of solution. The
 151 Pasteur pipette was inserted into the small hole of the glass chamber and was traversed for 200 ms by
 152 an air puff (3 mL.s⁻¹) regulated with an electro-valve (LHDA- 1233215-H, Lee Company, France)
 153 controlled by a digital module (NI 9472, National Instruments, Nanterre, France) and Labview software
 154 (National Instruments, France). 30 synthetic compounds were tested at v/v 10⁻⁴ dose on the 8 species of
 155 Tephritidae (*B. dorsalis*: n = 4; *B. zonata*: n = 4, *C. capitata*: n = 5; *C. catoirii*: n = 5, *C. quilicii*: n = 3;
 156 *D. demmerezi*: n = 4, *N. cyaneascens*: n = 5; *Z. cucurbitae*: n = 4) and at v/v 10⁻² dose on only *B. dorsalis*
 157 (n = 7). Each compound was diluted in paraffin oil. A negative control stimulation (paraffin oil) and a
 158 positive stimulation (1-octen-3ol) at the same dose as the tested compounds were successively
 159 performed before and after each experiment. An experiment consisted of passing compounds
 160 individually in a random order with a time interval of one minute between each stimulation.

161 For GC-EAD experiments, the sample was fed to the glass chamber using a 3 m long heated
 162 transfer line (Antelia, Dardilly, France). A small piece of column at the output of this transfer line was
 163 inserted into the small hole of the glass chamber. 37 synthetic compounds, diluted in paraffin oil and
 164 distributed into two blends were tested at 10 ng.µL⁻¹ dose on the 8 species of Tephritidae (*B. dorsalis*: n
 165 = 4; *B. zonata*: n = 4; *C. capitata*: n = 3; *C. catoirii*: n = 3; *C. quilicii*: n = 3; *D. demmerezi*: n = 3; *N.*
 166 *cyaneascens*: n = 3; *Z. cucurbitae*: n = 4) and at 1 µg.µL⁻¹ dose on only *B. dorsalis* (n = 5). The two blends
 167 were applied successively and randomly on the same individuals. 1µL of solution were manually

168 injected in the GC. A negative (paraffin oil) and positive (hexenyl acetate, dilution v/v: 10^{-2} ; 1-octen-3-
169 ol, dilution v/v: 10^{-2}) control stimulations were successively performed before and after each run and
170 following the same procedures as above. The run lasted 30 minutes.

171 For behavioural tests, different blends was created, consisting of a blend of 5 specific
172 compounds (methyl 2-methylbutyrate, butyl butyrate, methyl heptanoate, methyl octanoate, prenyl
173 acetate), a blend of 5 shared compounds (ethyl acetate, cis-3-hexenyl acetate, hexyl acetate, ethyl
174 propionate, ethyl butyrate) between the different fruit species studied and present in intact and sliced
175 fruits, and a blend combining the two above. Preliminary work for calibrating compound ratios was
176 carried out in Swedish University of Agriculture Sciences SLU laboratory before the behavioural assays
177 in order to homogenise the volatile emission rates in the blend. The blends were diluted in paraffin oil
178 and tested at two different doses (dilution v/v 10^{-4} and 10^{-3} in paraffin oil). To diffuse the odours, 1 μ L
179 of test blend was supplied on a square of filter paper and placed at the bottom of the trap.

180 2.7. Behavioural assays setup

181 A simple *ex situ* trap was used to study the attractiveness of *B. dorsalis* to the different blends.
182 A device was consisting of rearing cage of 30 cm x 30 cm x 30 cm inside which two trap were placed.
183 A trap was made of 30 mL wide mouth glass vials sealed with parafilm lined with yellow tape to
184 facilitate the orientation of the flies towards the traps. The lid was then perforated and a sectioned
185 transparent 1,000 μ L pipette tip was inserted into the hole, serving as a conduit for the flies. Each cage
186 was considered as a replicate into which 30 gravid female flies were released simultaneously. The flies
187 were starved and acclimatized before the start of each experiment.

188 2.8. Data analysis

189 All of statistical analyses were implemented in R software (R Core Team, 2020). We excluded
190 in the analysis the volatile compounds that were present in larger quantities in the control samples than
191 in the samples with fruits ($p < 0.05$, Wilcoxon test, *wilcox.test* function, R package *Stats*). Volatilomics
192 data were normalised by dividing each compound peak by the geometric mean of each corresponding
193 sample, then successively transformed by boxcox (*boxcox* function, R package *MASS*, $\lambda = 0.014$)
194 and paretoscale (*paretoscale* function, R package *RFmarkerDetector*) (van den Berg et al., 2006; Grace
195 & Hudson, 2016).

196 We then classified each compound according to their sharedness among fruits by Shannon α -
197 diversity index (*diversity* function, R package *vegan*). It describes the diversity of the fruits that emit
198 each compound (Jost, 2007). To measure the phylogenetic signal, Abouheif's C_{mean} index
199 (*abouheif.moran* function, R package *adephylo*) was computed for each compounds based on
200 autocorrelation approach (Abouheif, 1999; Pavoine, Ollier, Pontier, & Chessel, 2008). For calculating
201 this index, the phylogeny of the 28 fruit species was generated by Bayesian phylogenetic inference using

202 Markov chain Monte Carlo (MCMC) methods (Ronquist et al., 2012) and the matrix of phylogenetic
 203 proximities was performed with “oriAbouheif” method (*proxTips* function, R package *adephylo*)
 204 (Pavoine et al., 2008).

205 For analysing EAG₃ and GC-EAD₃ data, we used the current source density (CSD) model to the
 206 setup geometry as described in Jacob (2018) and Ramiaranjatovo et al. (2022). The antennal activities
 207 of female flies were represented by the total of CSD estimated at the three antenna positions. The
 208 antennal activity and the α -diversity for EAG₃ recordings were analysed using linear model and for GC-
 209 EAD₃ recording using means comparison with randomisation test.

210 For the behavioural tests, the percentage of captured flies was analysed with generalized linear
 211 mixed-effects models (GLMM) with binomial error distribution (*glmer* function, R package *lme4*),
 212 considering blends and doses as random effects and each experimental date as fixed-effect.

213 **2.9. Neuronal model of olfactory detection**

214 To support our hypothesis on the capacity of flies to discriminate host fruits, we created a set of
 215 10,000 neuronal models of the olfactory detection whose parameters were randomly chosen. Each model
 216 included three sets of compartments: 665 compounds, 10 or 20 olfactory receptor neurons (ORN), and
 217 the total antennal activity recorded by EAG₃. An odour (input) was defined by a combination of the 665
 218 (as observed in sliced fruit emissions) compounds at different doses (in log units), which can also include
 219 a single compound. As a benchmark, in data collected from sliced fruit samples and after normalisation
 220 by geometric mean and log transformation, the doses varied from -4 to +4. For the subset of peaks
 221 directly detected by the ADAP-GC algorithm, the doses varied between 0 and +4. Each ORN was
 222 activated by 20 or 30 compounds randomly chosen through a simple input-output relationship, defined
 223 by two parameters: sensitivity threshold and dynamic range width. The threshold was randomly pulled
 224 from a uniform distribution between the doses 0 and 8. The compound was considered as detected only
 225 if the threshold was less than or equal to 4 for at least one ORN. The dynamic range width was randomly
 226 pulled from a normal distribution whose mean was 2.5 and standard deviation 0.5. The activation x_j of
 227 an ORN_{*i*} by compound *j* was 0 below threshold, 1 above threshold + dynamic range width, and increased
 228 linearly between the two. The activity of ORN_{*i*} was calculated by combining all compound activations
 229 with the following equation: $1 - \pi_j(1-x_j)$, which ensured that the activity level remains between 0 and
 230 1. The antennal activity was the sum of ORN activities.

231 After building the model, we set real sliced fruit samples data as inputs. It ensured natural odour
 232 variability between and within fruit species. To question the propensity of the model to discriminate
 233 fruit species, we applied a random forest analysis to the ORN activities (randomForest function, R
 234 package randomForest) and quantified the discrimination error by the out-of-bag score defined as $(1 -$
 235 $\text{number of correctly classified samples}) / \text{total number of samples}$. We then set single compounds as an
 236 input at four different doses $\log(5)$, $\log(50)$, $\log(500)$ and $\log(5000)$. For the subset of compounds

237 detected by at least one ORN, we calculated the correlation coefficient between the α -diversity of
238 emitting fruits and the total antennal response.

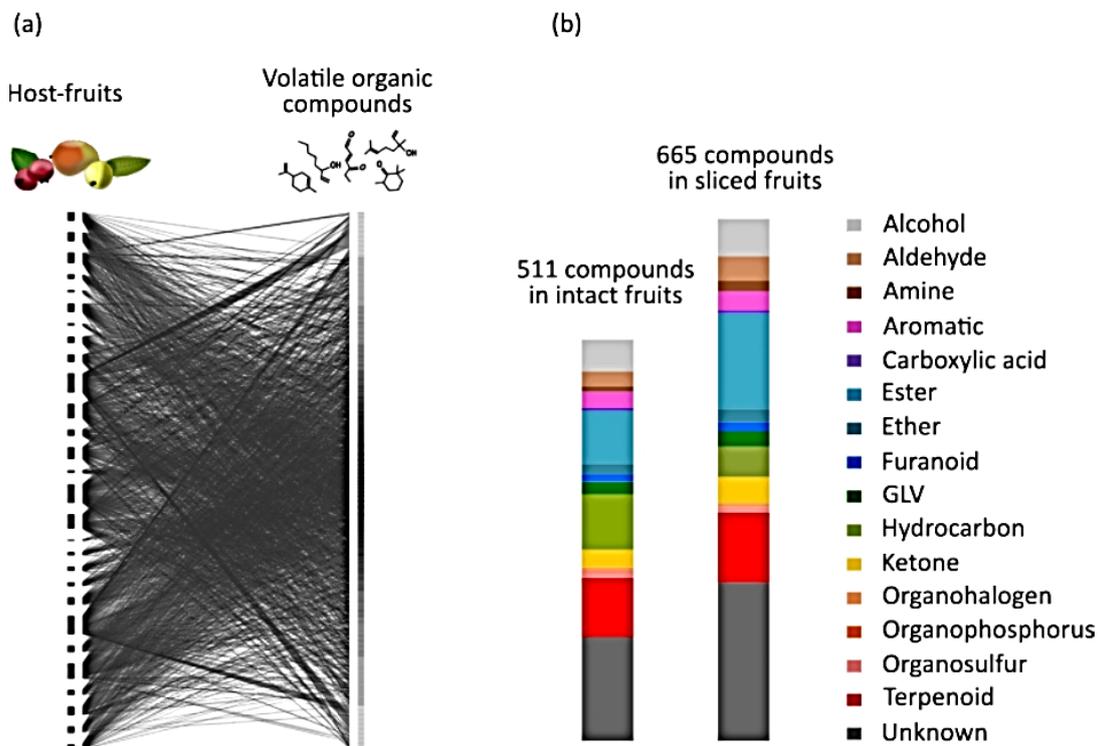
239

240 **3. Results**

241 **3.1. The volatile emissions of many fruit species partially overlap**

242 We hypothesised that generalist species might rely on shared compounds between the emissions
243 of their various hosts. To explore the diversity of volatile emissions of 28 species of fruits through ATD-
244 GC-MS, we analysed separately intact fruits on the tree and sliced fruits, as notched fruits in orchards
245 may emit new and potentially attractive compounds to fruit flies. Despite the large diversity of fruit
246 species included in this study, we observed a partial overlap of the emission content between species,
247 with compounds emitted by several fruit species (Figure 1a). For intact fruits, we detected 511
248 compounds, 380 of which were identified and another 131 were assigned to a chemical family. For
249 sliced fruits, we detected 665 compounds, 463 of which were identified and another 202 were assigned
250 to a chemical family. The main chemical families are esters (respectively 13.31% and 18.35% of the
251 total number of compounds for intact and sliced fruits) and terpenoids (respectively 14.87% and 13.38%
252 of the total number of compounds for intact and sliced fruits). Remaining compounds are classified as:
253 alcohol, aldehyde, amine, aromatic, carboxylic acid, ether, furanoid, green leaf volatile (GLV),
254 hydrocarbon, ketone, organohalogen, organophosphorus, organosulfur and unknown compounds
255 (Figure 1b). The proportions of the different chemical families of compounds in intact and sliced fruits
256 were significantly different ($\chi^2(15) = 31.084$; $p = 0.008$).

257



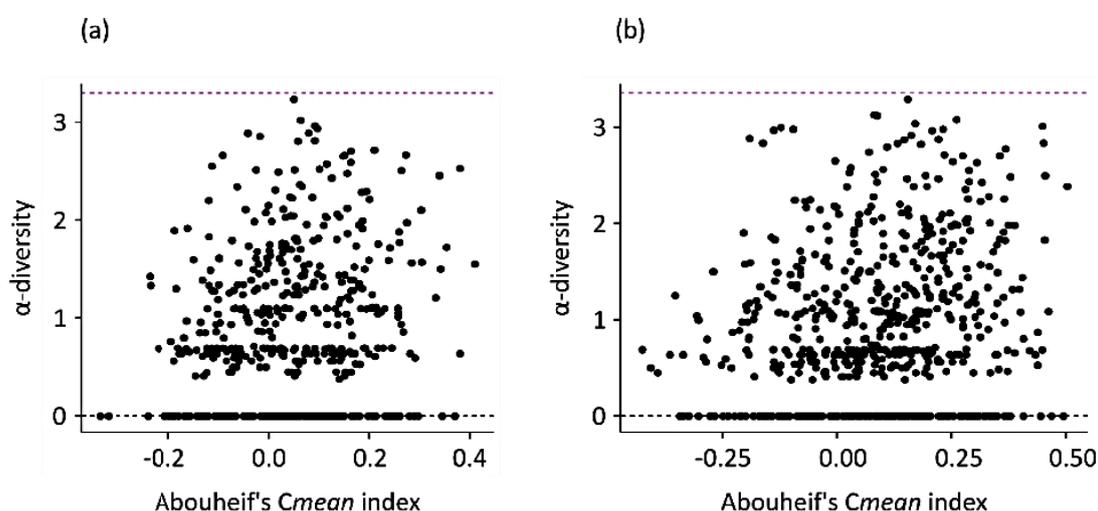
258

259 **Figure 1:** Diversity of volatile emissions of the 28 host-fruits of Tephtitidae studied. (a) Interaction
 260 network of the volatile compounds (right) and emitting fruit species (left) for intact fruits. The fruits are
 261 sorted in phylogenetic order, while the compounds are sorted by the amount of fruits that emits them,
 262 that number being maximal in the middle and minimal (1 fruit) on the two extremities. (b) Chemical
 263 classification of volatile compounds identified on the 28 fruit species. The two bars show the compounds
 264 of intact fruits (left) and sliced fruits (right), respectively. Each color represents the chemical family of
 265 compounds and the corresponding height is proportional to the number of compounds in each chemical
 266 family.

267

268 To quantify this degree of sharedness among fruits, we classified each compounds according to
 269 an index of α -diversity of the emitting fruits. While some compounds were specifically emitted by a
 270 single fruit species we observed a continuum of the degree of sharedness between fruit emissions, from
 271 2 up to 27 fruit species. Closely related fruit species are likely to emit the same compounds, fruits from
 272 the same phylogenetic taxa consisting in redundant sampling. To test if high α -diversity values result
 273 from such phylogenetic autocorrelation, we computed the phylogenetic signal Abouheif's C_{mean} index.
 274 We observed that α -diversity was not correlated with phylogenetic signal, confirming the existence of

275 compounds shared between the emissions of different fruit species and not correlated with fruit
 276 phylogeny (Figure 2).



277

278 **Figure 2:** α -diversity index (of *Bactrocera dorsalis*' hosts) depending on the phylogenetic signal
 279 Abouheif's C_{mean} for the intact fruits compounds (a) and the sliced fruits compounds (b). Each point
 280 represents a compound. Compounds with an α -diversity of 0 are emitted by only one fruit species. The
 281 magenta dashed line at the top is the maximum limite of α -diversity value where all fruit species emit
 282 the compound. A C_{mean} of 0 means phylogenetic independence.

283

284 For the rest of the manuscript, we used an index of α -diversity calculated from a subset of the
 285 13 fruit species most infested by *B. dorsalis* by field observations (Moquet et al., 2021). However, this
 286 new index was correlated with α -diversity calculated from the 28 fruits species (for α -diversity used in
 287 EAG₃: $F(1, 25) = 69.24$; $p < 0.001$ for intact fruits/ $F(1, 28) = 71.085$; $p < 0.001$ for sliced fruits and α -
 288 diversity used in GC-EAD₃: $F(1, 31) = 62.9$; $p < 0.001$ for intact fruits/ $F(1, 35) = 113.29$; $p < 0.001$
 289 for sliced fruits) and both indexes resulted in the same qualitative observations reported below.

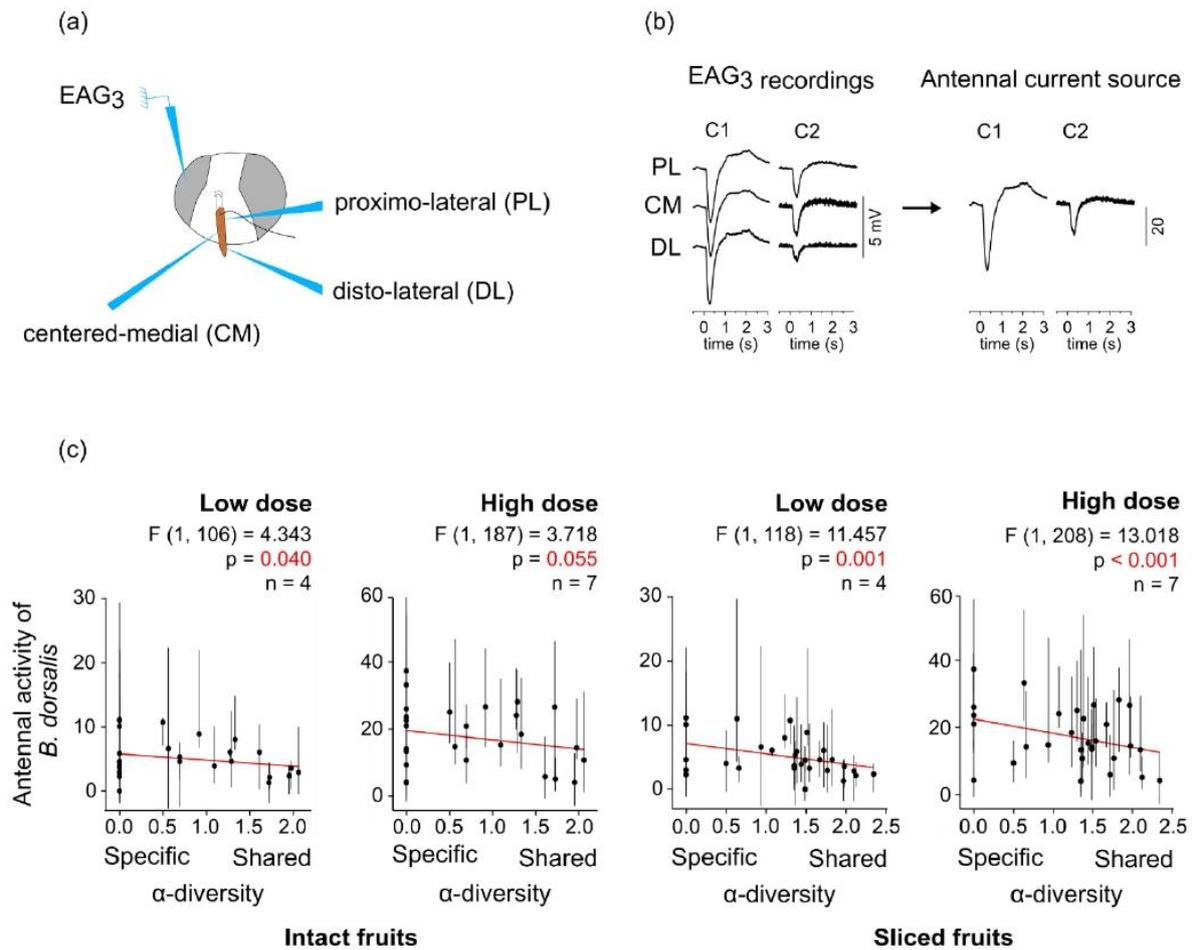
290

291 **3.2. *B. dorsalis* olfactory responses to volatile compounds are negatively correlated with their**
 292 **degree of sharedness among fruit species**

293 The olfactory responses to a set of compounds were measured in *B. dorsalis* females with EAG₃
 294 at two doses. At both doses, the response was negatively correlated with the α -diversity of emitting
 295 fruits, whether this index was calculated from intact fruits (low dose $F(1, 106) = 4.443$; $p = 0.040$; $n =$

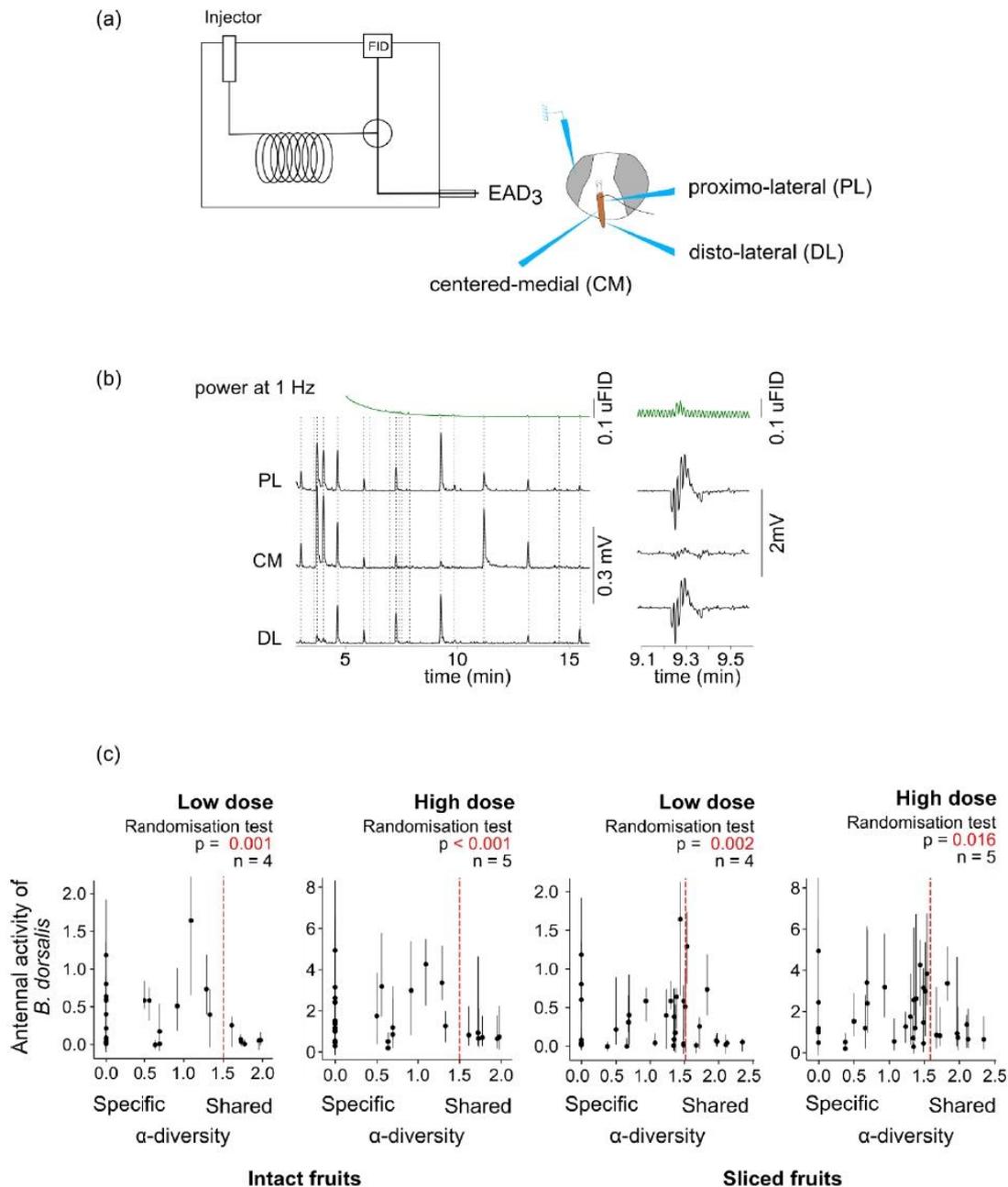
296 4, high dose F (1, 187) = 3.718; $p = 0.055$; $n = 7$) or sliced fruits (low dose F (1, 118) = 11.47; $p = 0.001$;
297 $n = 4$, high dose F (1, 208) = 13.018; $p < 0.001$; $n = 7$) (Figure 3).

298 We then repeated this experiment but with providing the stimulations through the GC-EAD₃.
299 Despite a tendency towards a negative correlation between olfactory response and α -diversity, it was
300 not significant for both intact fruits (low dose F (1, 130) = 0.549; $p = 0.460$; $n = 4$, high dose F (1, 163)
301 = 3.718; $p = 0.212$; $n = 5$) and sliced fruits (low dose F (1, 146) = 0.196; $p = 0.659$; $n = 4$, high dose F
302 (1, 183) = 0.120; $p < 0.730$; $n = 5$). This effect was due to a non-linear trend: response values were low
303 only to the compounds which had a high α -diversity. To test this, we defined two classes of α -diversity
304 according to an arbitrary threshold, and found a significant difference of the mean olfactory responses
305 between the two classes through a randomization test, both at low (Intact fruits α -diversity: $p = 0.001$ –
306 Sliced fruits α -diversity: $p = 0.002$) and high (Intact fruits α -diversity: $p < 0.001$ – Sliced fruits α -
307 diversity: $p < 0.016$) doses (Figure 4).



308

309 **Figure 3:** Antennal responses of *Bactrocera dorsalis* in EAG₃. (a) Schematic representation of the EAG₃
 310 system. (b) An exemple of EAG₃ recording on female individual of *B. dorsalis* stimulated with two
 311 compounds (C1 and C2). The three signals represent the simultaneous recording at the three positions
 312 of the antenna and on the right the corresponding antennal current source. (c) Antennal responses of *B.*
 313 *dorsalis* to synthetic compounds at low (dilution v/v: 10⁻⁴) and high doses (dilution v/v: 10⁻²) depending
 314 on the α -diversity of *B. dorsalis* hosts. The results for intact fruits are on the left and for the sliced fruits
 315 on the right. Each point represents a median response to a compound with a 95% bootstrap CI. Red
 316 lines correspond to linear regression curves.



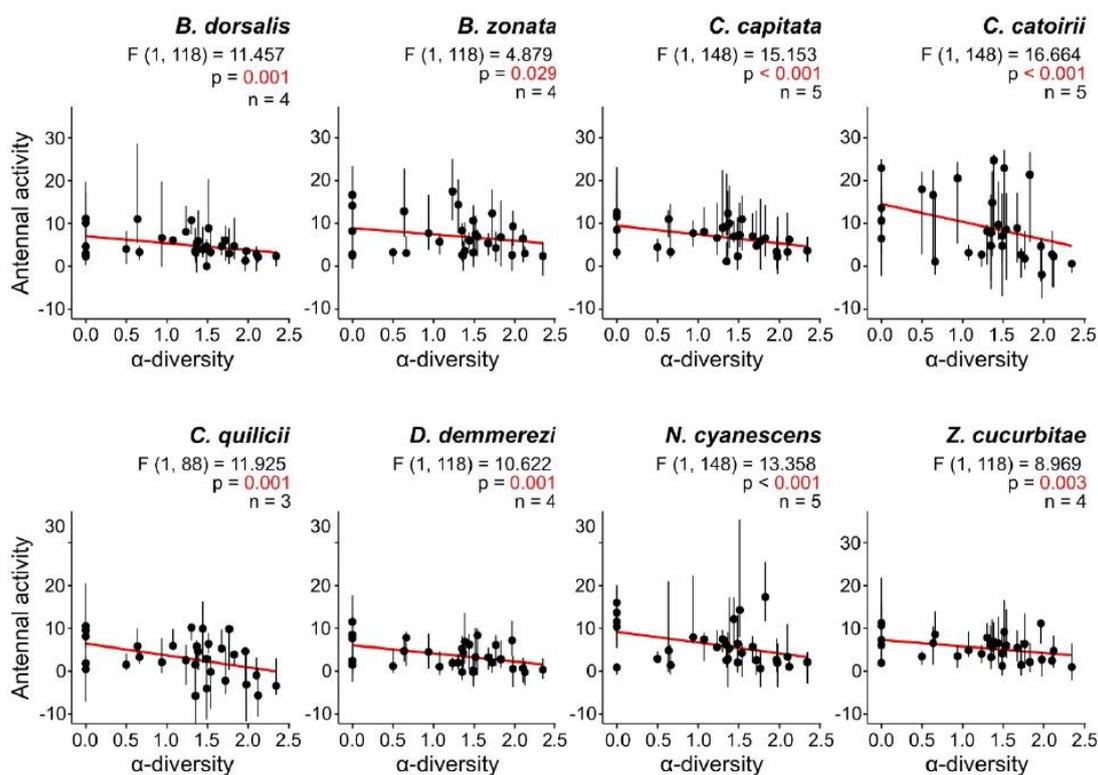
317

318 **Figure 4:** Antennal responses of *Bactrocera dorsalis* in GC-EAD₃. (a) Schematic representation of the
 319 chopped GC-EAD₃ system. (b) An example of GC-EAD₃ recording on female individual of *B. dorsalis*.
 320 The signals represent the simultaneous recording with a zoom on a compound peak on the right: the first
 321 is FID signal and the three signals below are the signals at the three positions of the antenna. (c) Antennal
 322 responses of *B. dorsalis* to synthetic compounds at low (dilution v/v: 10⁻⁴) and high doses (dilution v/v:
 323 10⁻²) depending on the α -diversity of *B. dorsalis* hosts. The results for intact fruits are on the left and for

324 the sliced fruits on the right. Each point represents a median responses to a compound with a 95% bootstrap
 325 CI. The randomization test compares the median antennal responses values below an above thresholds
 326 represented by vertical dashed lines in red represent the thresholds chosen for the randomisation test.

327

328 **3.3. The negative correlation between olfactory responses and the degree of fruit sharedness**
 329 **is conserved among Tephritidae species**



330

331 **Figure 5:** Antennal activity of eight Tephritidae species to synthetic compounds in EAG₃, depending
 332 on the α-diversity of *B. dorsalis* hosts. Each point represents a median responses to a compound with a
 333 95% bootstrap CI. Red lines correspond to linear regression curves.

334

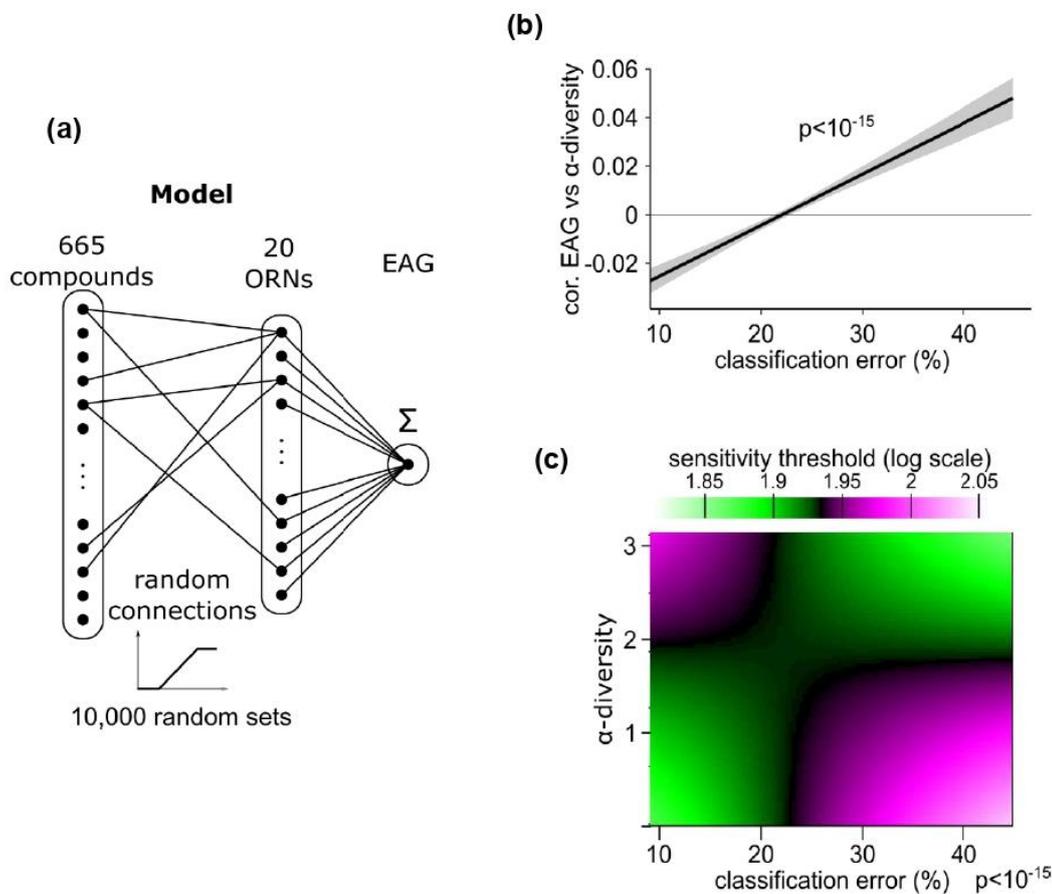
335 Electrophysiology experiments were performed on females of eight species of Tephritidae at
 336 the low dose only. We observed a significant negative correlation between EAG₃ olfactory responses
 337 and emitting fruits α-diversity in all the tested species (*B. dorsalis*: F (1, 118) = 11.47; p = 0.001; n = 4
 338 – *B. zonata*: F(1, 118) = 4.897; p = 0.029; n = 4 – *C. capitata*: F (1, 148) = 15.153; p < 0.001; n = 5 –

339 *C. catoirii*: $F(1, 148) = 16.664$; $p < 0.001$; $n = 5$ – *C. quilicii*: $F(1, 88) = 11.925$; $p = 0.001$; $n = 3$ – *D.*
 340 *demmerezi*: $F(1, 118) = 10.622$; $p = 0.001$; $n = 4$ – *N. cyanaescens* (1, 148) = 13.358; $p < 0.001$; $n = 5$ –
 341 *Z. cucurbitae*: $F(1, 118) = 8.969$; $p = 0.003$; $n = 4$; Figure 5). We deduced that this trait is conserved
 342 among Tephritidae species.

343

344 **3.4. A negative correlation between olfactory responses and degree of fruit sharedness allows** 345 **an efficient fruit species discrimination**

346 We hypothesised that this trait might result from a selection of olfactory systems efficient in
 347 discriminating fruit species. To challenge this, we build 10,000 neuronal models of peripheric olfactory
 348 detection, with random sensitivity to volatile compounds (Figure 6). The GC-MS fruit samples were
 349 used as inputs to these models, to consider the real variability of fruit emissions within and between fruit
 350 species (Figure 6a). For each model, we estimated the capacity of ORNs to discriminate fruits by the
 351 classification error index of a random forest algorithm. We also calculated the correlation coefficient
 352 between the model-predicted EAG responses to single compounds at different doses and the α -diversity
 353 of emitting fruits. The classification error and the correlation coefficients were significantly correlated
 354 ($p < 10^{-15}$). More specifically, the best models for discriminating fruit species exhibited a negative
 355 correlation between olfactory response and fruit α -diversity (Figure 6b). We then explored which
 356 characteristics of the model are responsible for this effect. Each model is characterised by the
 357 compounds being detected, with which sensitivity threshold and width of the dynamic range. We found
 358 that the proportion of detected compounds depended significantly on an interaction between fruit α -
 359 diversity and classification errors ($p < 10^{-15}$). For those detected compounds, we found that the sensitivity
 360 threshold also depended significantly on an interaction between fruit α -diversity and classification
 361 errors. Contrarily, the width of the dynamic range did not depend either on fruit α -diversity or on
 362 classification errors (Figure 6c). To confirm the robustness of this finding, we replicated the analysis
 363 by varying several model parameters: the number of ORNs (10 or 20), the average proportion of detected
 364 compounds (15, 20 or 30 by ORNs), the possible ranges of sensitivity threshold (0-4 or 0-8 log units)
 365 and width of dynamic range (2-3 or 1-4 log units). We systematically observed the same correlations.
 366 To conclude, the models suggest that olfactory systems able to discriminate efficiently fruit species are
 367 prone to have a higher sensitivity to fruit-specific compounds than to compounds shared among the
 368 emissions of several fruit species.

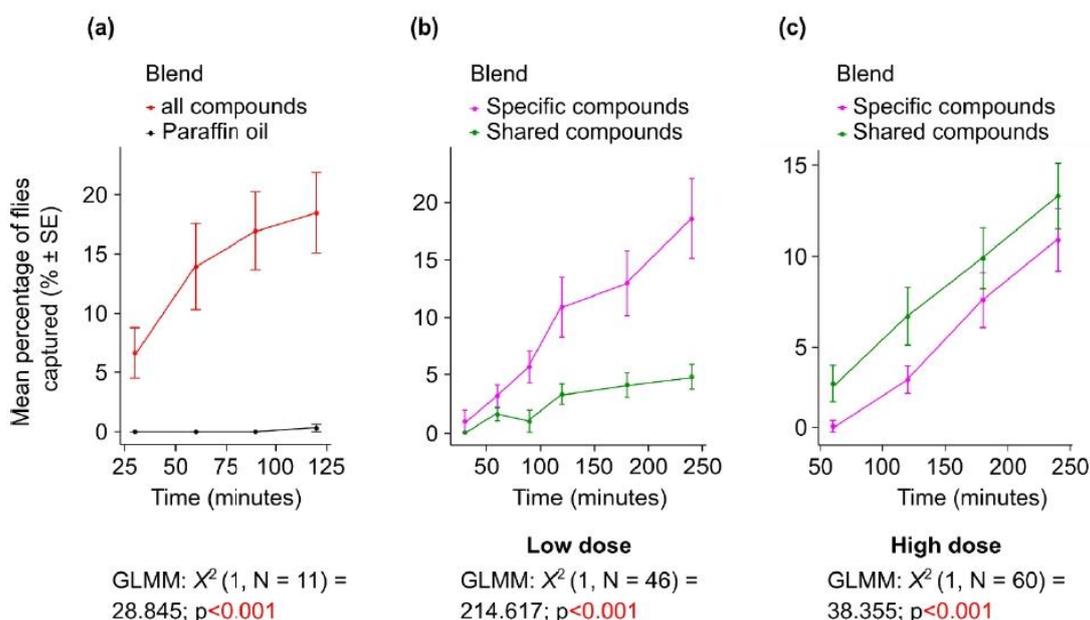


369

370 **Figure 6:** Neuronal model of olfactory detection. (a) Schematic representing the variables for the
 371 creation of the model. The connections between volatile compounds and ORNs follow a simplified dose-
 372 response curve (shown below the connections) whose threshold and dynamic range are randomly drawn.
 373 (b) For each random model, the correlation coefficient between EAG and α -diversity was computed
 374 (vertical axis) as well as the capacity of ORNs to discriminate fruit species according to a Random
 375 Forest algorithm (horizontal axis). These two variables are correlated (the regression line (in black)
 376 and its 95% confidence interval (in grey area) are shown; $p < 10^{-15}$). (c) Heatmap showing the sensitivity
 377 threshold to compounds with high and low α -diversity in function of the capacity of ORNs to
 378 discriminate fruit species ($p < 10^{-15}$). Green and purple colors represent respectively a low and high
 379 sensitivity threshold.

380 **3.5. Female *B. dorsalis* have a higher behavioral olfactory sensitivity to fruit-specific**
 381 **compounds than to compounds shared between fruit emissions**

382 The behavioural responses of females of *B. dorsalis* to different ester compounds blends were
 383 tested in dual choice *ex situ* trap. A preliminary experiment showed that females *B. dorsalis* were more
 384 attracted by a blend of 10 selected compounds than by paraffin oil (GLMM: χ^2 (1, N = 11) = 28.845; p
 385 < 0.001; proportion of flies captured in the last measurement: mean = 0.185 (95% CI 0.118; 0.252) with
 386 the blend and mean = 0.003 (95% CI -0.003; 0.009) with paraffin oil; Figure 7a). Then, we tested
 387 competitively the attractiveness of a sub-blend including five fruit-specific compounds and a sub-blend
 388 including five compounds shared among fruits. Insects were more attracted to the blend of specific
 389 compounds than to the blend of shared compounds at low dose (dilution v/v: 10^{-4}) (GLMM: χ^2 (1, N =
 390 46) = 214.617; p < 0.001; proportion of flies captured in the last measurement: mean = 0.186 (95% CI
 391 0.118; 0.254) with the blend of specific compounds and mean = 0.048 (95% CI 0.027; 0.070) with the
 392 blend of shared compounds); Figure 7b). At higher dose (dilution v/v: 10^{-3}), a reversal of the trend was
 393 observed, i.e. females preferred the blend of shared compounds (GLMM: χ^2 (1, N = 60) = 38.355; p <
 394 0.001; proportion of flies captured in the last measurement: mean = 0.109 (95% CI 0.076; 0.142) with
 395 the blend of specific compounds and mean = 0.133 (95% CI 0.098; 0.168) with the blend of shared
 396 compounds; Figure 7c).



397

398 **Figure 7:** Mean percentage of females of *B. dorsalis* captured in *ex situ* traps depending on counting
 399 time. (a) Dual choice tests between a blend of all selected compounds (in red) and a Paraffin oil (in
 400 black). (b) Dual choice tests between a blend of shared compounds (in green) and a blend of specific

401 compounds (in magenta) at low dose (dilution v/v: 10^{-4}). (c) Dual choice tests between a blend of shared
402 compounds (in green) and a blend of specific compounds (in magenta) at high dose (dilution v/v: 10^{-2}).

403

404 4. Discussion

405 The olfactory system of insects allows them to perceive and react to chemical signals from the
406 environment. In this study we focused on *Bactocera dorsalis*, a Tephritidae polyphagous species which
407 explores a wide host range, in order to provide further insight into the olfactory mechanisms of insects
408 towards hosts recognition. We first outline that insects deal with a complex background environment
409 with a large number and diversity of volatile compounds. Then, through electrophysiology analyses, we
410 demonstrate a significant negative correlation between the olfactory responses of *Bactocera dorsalis*
411 and the α -diversity of emitting fruits. We observed that this negative correlation trait was conserved in
412 other in different across several Tephritidae species of the tribes Dacini and Ceratitidini. Finally, we
413 suggest that this trait results from a high sensitivity to specific compounds and showed a behavioural
414 correlate to the physiological observation.

415

416 4.1. Insects explore a complex chemical environment

417 Plant produced numerous volatile compounds of different chemical families (Hatanaka, 1993;
418 Knudsen et al., 2006; El Hadi et al., 2013). By analysing the chemical composition of volatile emissions
419 from Tephritidae host fruits, we identified a considerable number of volatile compounds. These volatile
420 emissions were dominated by terpenoids and esters, which are characteristic of volatile emissions from
421 fruits (El Hadi et al., 2013). A single fruit species can emit more than 300 volatile compounds (Bood &
422 Zabetakis, 2002; Pino et al., 2005; Schwab et al., 2008; El Hadi et al., 2013) and although each fruit
423 species has its own chemical profile, there is a significant overlap between species. Some evidences
424 suggest that these shared compounds between hosts can be used by phytophagous insects as bridges for
425 hosts shifting (Cha et al., 2012; Biasazin et al., 2018).

426 However, the chemical composition of the environment is subject to large spatiotemporal
427 variations, concerning both the quality and the quantity of volatile compounds (Meiners, 2015). In a
428 geographical region, only a limited number of hosts are present at a time. Moreover, several studies
429 showed that not only plant phenology, but also the composition of volatile emissions and their emission
430 rates vary according to the time of day and the season due to the temperature, light intensity and humidity
431 rate changes (Takabayashi et al., 1994; Llusià & Peñuelas, 1999; Peñuelas & Llusià, 2001; Vallat et al.,
432 2005; Wäschke et al., 2013; Meneguzzo et al., 2019). Furthermore, the density of the host plants and the
433 surrounding vegetation could create a microclimate that would bring about a change in the chemical

434 environment (Wäschke et al., 2013; Meiners, 2015). This might result in a high population density of a
435 pest in a defined area.

436 Another source of variation in the chemical composition of the environment is also the physical
437 state of the host. We found a difference in the volatile composition of intact and sliced fruit by having a
438 greater number of compounds emitted by sliced fruit. We expected this result since damaged fruit
439 produce more volatile compounds than intact one (Geervliet et al., 1994; Beck et al., 2008; Meiners,
440 2015). Even if we performed an artificial slicing of fruits, damaged fruits exist in nature and present a
441 source of selection for insects.

442 Thus, faced with this complex and dynamic chemical environment, fruit flies are under selection
443 pressure to properly recognize their host fruits. We tried to define a space equivalent to the level of
444 selection pressure for fruit flies by calculating the α -diversity and Abouheif's C_{mean} indices on each
445 identified host volatile compounds. With these indices, we show that the volatile emissions of host fruits
446 consists of a continuum between specific compounds emitted by either a single fruit species or a
447 restricted group of fruits, and shared compounds emitted by most fruit species. However, the choice of
448 these indices is arbitrary. Moreover, we focused on two phenological states of fruits only, and did not
449 distinguish fruit species according to their spatio-temporal dispersion in the environment. Thus, our
450 study explores imperfectly the chemical environment to which the flies adapted. Despite this limitation,
451 we observed physiological and behavioural traits that correlates with chemical cues of fruit emissions.

452

453 **4.2. Tephritidae species are not only specialised in detecting their hosts, but also in** 454 **discriminating them**

455 In insects, the olfactory system plays a crucial role in the recognition of host plants (Bruce,
456 Wadhams, & Woodcock, 2005). Faced with the multitude and diversity of volatile compounds, they
457 have to adapt their olfactory mechanism to acquire evolutionary advantages. The theories behind these
458 mechanisms remain unclear to date. Biasazin et al. (2018) suggest that polyphagous species rely on
459 shared compounds between host plant. They demonstrated that a blend of shared volatile compounds
460 between fruit species was attractive for Tephritidae species. Surprisingly, our results show a negative
461 correlation between antennal responses of *Bactrocera dorsalis* and the diversity of emitting fruits in
462 EAG₃ experiments. With GC-EAD₃, even if we did not observe a negative correlation, we still observed
463 a low response to compounds emitted by a high α -diversity of fruits. The high responses to specific
464 compounds imply that these are not less important than shared compounds in the olfactory mechanisms
465 of polyphagous fruit fly species.

466 Different hypothesis can explain this observation. When faced with various volatile compound
467 emitters, insect need to correctly identify the host volatile compounds into a complex environment

468 including a volatile emissions of non-host plants (Bruce et al., 2005; Bruce & Pickett, 2011). Olfactory
469 systems might be tuned to host specific compounds. Compounds shared between fruits might also be
470 emitted by other plant parts and other non-hosts, and would be generic in any natural environment, thus
471 be neglected by the insect. While this effect likely contributes to our observations, such generic
472 compounds should not be attractive whatever the dose. Since we observed a preference to shared
473 compounds at high dose only, it suggests that another effect should be involved. We then hypothesised
474 that specific compounds are used by fruit flies to discriminate fruits. Indeed, insects also need to
475 discriminate between the host plants themselves in order to choose the most suitable host for their own
476 survival and for the successful development of their offspring (Soto et al., 2015; Hafsi et al., 2016).
477 This ability to make a choice allows them to switch host or to colonise other environments depending
478 on the environmental context, for instance the seasonal availability of the host, the appearance of new
479 host species, or the invasion of a new geographic area. This offers therefore to fruit flies a better
480 resilience to environmental changes.

481 The mechanistic model on olfactory detection that we developed confirms that a selection
482 pressure on host discrimination ability would select low sensitivity thresholds to specific compounds.
483 Moreover, it predicted that at low dose only specific compounds would be detected and thus preferred,
484 which we confirmed with behavioral tests. At higher dose however, we observed a switched preference
485 toward shared compounds, which reconcile our observations with (Biasazin et al., 2018). We conclude
486 that each three functions of host detection, host vs non-host selection and host discrimination contribute
487 together in shaping insect olfactory systems.

488

489 **4.3. Application potential for biocontrol of Tephritidae pests**

490 Understanding the olfactory strategies adopted by insects to recognise their host plant not only
491 provides fundamental insights into ecology and evolution, but also enables the effective design of
492 attractants for pest control (Agelopoulos et al., 1999). Our hypothesis could be complementary to that
493 of Biasazin et al. (2018). In our study, we provided more volatilomic data and integrated a dose
494 parameter in the behavioural tests with blends of specific and shared compounds. Thus, a perspective of
495 this study would be to test a blend of shared compounds, for example the one identified in Biasazin et
496 al. (2018) studies, with the addition of some specific compounds chosen from the most attractive fruits.
497 Combining shared and specific compounds would ensure a preference both at high and low dose, and
498 by extension at any distance from the lure.

499 In conclusion, we have highlighted in this study non-exclusive hypotheses on the olfactory
500 mechanisms developed by fruit flies in the recognition of their host plants. We show that their olfactory
501 system is not only adapted in detecting their hosts, but also in discriminating them. The capacity to
502 discriminate between host and non-host fruits and between host fruits themselves are essential for

503 polyphagous Tephritidae for better adaptation to the environment and to the selection pressure related to
504 overlapping host ranges.

505

506 **References**

507

508 Abouheif, E. (1999). A method for testing the assumption of phylogenetic independence in comparative
509 data. *Evolutionary Ecology Research*, 1(8), 895–909. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0238-5>

510 Agelopoulos, N., Birkett, M. A., Hick, A. J., Hooper, A. M., Pickett, J. A., Pow, E. M., Smart, L. E.,
511 Smiley, D. W. M., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. (1999). Exploiting semiochemicals in
512 insect control. *Pesticide Science*, 55, 225–235.

513 Beck, J. J., Higbee, B. S., Merrill, G. B., & Roitman, J. N. (2008). Comparison of volatile emissions
514 from undamaged and mechanically damaged almonds. *Journal of the Science Of Food and
515 Agriculture*, 88, 1363–1368. <https://doi.org/10.1002/jsfa>

516 Biasazin, T. D., Karlsson, M. F., Hillbur, Y., Seyoum, E., & Dekker, T. (2014). Identification of Host
517 Blends that Attract the African Invasive Fruit Fly, *Bactrocera invadens*. *Journal of Chemical
518 Ecology*, 40(9), 966–976. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0501-6>

519 Biasazin, T. D., Larsson Herrera, S., Kimbokota, F., & Dekker, T. (2018). Translating olfactomes into
520 attractants: shared volatiles provide attractive bridges for polyphagy in fruit flies. *Ecology Letters*,
521 22(1), 108–118. <https://doi.org/10.1111/ele.13172>

522 Bood, K. G., & Zabetakis, I. (2002). The biosynthesis of strawberry flavor (II): Biosynthetic and
523 molecular biology studies. *Journal of Food Science*, 67(1), 2–8. [https://doi.org/10.1111/j.1365-
524 2621.2002.tb11349.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb11349.x)

525 Bruce, T. J. A., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. (2005). Insect host location : a volatile situation,
526 10(6). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.04.003>

527 Bruce, T. J. A., & Pickett, J. A. (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects -
528 Finding the right mix. *Phytochemistry*, 72(13), 1605–1611.
529 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.011>

530 Būda, V., Radžiūtė, S., Apšegaitė, V., Blažytė-čereškienė, L., Čepulytė, R., Bumbulytė, G., &
531 Mozūraitis, R. (2022). Electroantennographic and Behavioural Responses of European Cherry
532 Fruit Fly, *Rhagoletis cerasi*, to the Volatile Organic Compounds from Sour Cherry, *Prunus
533 cerasus*, Fruit. *Insects*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/insects13020114>

534 Candia, I. F., Bautista, V., Larsson Herrera, S., Walter, A., Ortuño Castro, N., Tasin, M., & Dekker, T.
535 (2019). Potential of locally sustainable food baits and traps against the Mediterranean fruit fly
536 *Ceratitidis capitata* in Bolivia. *Pest Management Science*, 75(6), 1671–1680.
537 <https://doi.org/10.1002/ps.5286>

538 Carson, R. (1962). Silent spring. *Houghton Mifflin, Boston, Cambridge, MA, USA*, 368.

539 Cha, D. H., Yee, W. L., Goughnour, R. B., Sim, S. B., Powell, T. H. Q., Feder, J. L., & Linn, C. E.
540 (2012). Identification of Host Fruit Volatiles from Domestic Apple (*Malus domestica*), Native
541 Black Hawthorn (*Crataegus douglasii*) and Introduced Ornamental Hawthorn (*C. monogyna*)
542 Attractive to *Rhagoletis pomonella* Flies from the Western Unite. *Journal of Chemical Ecology*,
543 38(3), 319–329. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0087-9>

544 Duyck, P. F., & Quilici, S. (2002). Survival and development of different life stages of three *Ceratitidis*
545 spp. (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures. *Bulletin of Entomological
546 Research*, 92(6), 461–469. <https://doi.org/10.1079/ber2002188>

547 Ekesi, S., De Meyer, M., Mohamed, S. A., Virgilio, M., & Borgemeister, C. (2016). Taxonomy,
548 Ecology, and Management of Native and Exotic Fruit Fly Species in Africa. *Annual Review of*

- 549 *Entomology*, 61, 219–238. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023603>
- 550 El Hadi, M. A. M., Zhang, F. J., Wu, F. F., Zhou, C. H., & Tao, J. (2013). Advances in fruit aroma
551 volatile research. *Molecules*, 18(7), 8200–8229. <https://doi.org/10.3390/molecules18078200>
- 552 Fletcher, B. S., & Prokopy, R. J. (1991). Host location and oviposition in tephritid fruit flies. In
553 *Reproductive Behaviour of Insects: Individuals and Populations* (pp. 141–171).
- 554 Geervliet, J. B. F., Vet, L. E. M., & Dicke, M. (1994). Volatiles from damaged plants as major cues in
555 long-range host-searching by the specialist parasitoid *Cotesia rubecula*. *Entomologia*
556 *Experimentalis et Applicata*, 73(3), 289–297. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb01866.x>
- 557 Gill, H. K., & Garg, H. (2014). Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. In
558 *Larramendy M & Soloneski S (eds), Pesticides – Toxic aspects. London: IntechOpen* (pp. 187–
559 230). Retrieved from [https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-](https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics)
560 [technologies/liveness-detection-in-biometrics](https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics)
- 561 Grace, S. C., & Hudson, D. A. (2016). Processing and Visualization of Metabolomics Data - Using R.
562 *Intech*, 67–94. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>
- 563 Hafsi, A., Facon, B., Ravigné, V., Chiroleu, F., Quilici, S., Chermiti, B., & Duyck, P. F. (2016). Host
564 plant range of a fruit fly community (Diptera: Tephritidae): Does fruit composition influence larval
565 performance? *BMC Ecology*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12898-016-0094-8>
- 566 Hansson, B. S., & Stensmyr, M. C. (2011). Evolution of insect olfaction. *Neuron*, 72(5), 698–711.
567 <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.003>
- 568 Hatanaka, A. (1993). The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, 34(5), 1201–
569 1218. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)80003-j](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)80003-j)
- 570 Howlett, F. M. (1912). The effect of Oil of Citronella on two species of *Dacus*. *Transactions of the*
571 *Royal Entomological Society of London*, 60(2), 412–418. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1912.tb03101.x)
572 [2311.1912.tb03101.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1912.tb03101.x)
- 573 Howlett, F. (1915). Chemical reactions of fruit-flies. *Bulletin of Entomological Research*, 6(3), 297–
574 305.
- 575 Jacob, V. E. J. M. (2018). Current Source Density Analysis of Electroantennogram Recordings: A Tool
576 for Mapping the Olfactory Response in an Insect Antenna. *Frontiers in Cellular Neuroscience*,
577 12(September), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00287>
- 578 Johnson, J. D., Ryan, M. J., Toft, J. D., Graves, S. W., Hejtmancik, M. R., Cunningham, M. L., Herbert,
579 R. M., & Abdo, K. (2000). Two-Year Toxicity and Carcinogenicity Study of Methyleugenol in
580 F344/N Rats and B6C3F1 Mice. *J. Agric. Food Chem*, 48(8), 3620–3632.
- 581 Jost, L. (2007). Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology*, 88(10),
582 2427–2439. <https://doi.org/10.1890/06-1736.1>
- 583 Kamala Jayanthi, P. D., Kempraj, V., Aurade, R. M., Venkataramanappa, R. K., Nandagopal, B.,
584 Verghese, A., & Bruce, T. J. A. (2014). Specific Volatile Compounds from Mango Elicit
585 Oviposition in Gravid *Bactrocera dorsalis* Females. *Journal of Chemical Ecology*, 40(3), 259–
586 266. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0403-7>
- 587 Khan, M. A., Ashfaq, M., Akram, W., & Lee, J.-J. (2005). Management of Fruit Flies (Diptera:
588 Tephritidae) of the Most Perishable Fruits. *Entomological Research*, 35(2), 79–84.
589 <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2005.tb00140.x>
- 590 Knudsen, J. T., Eriksson, R., Gershenzon, J., & Ståhl, B. (2006). Diversity and distribution of floral
591 scent. *The Botanical Review*, 72(1), 1–120. [https://doi.org/10.1663/0006-](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2006)72[1:DADOF5]2.0.CO;2)
592 [8101\(2006\)72\[1:DADOF5\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2006)72[1:DADOF5]2.0.CO;2)
- 593 Llusà, J., & Peñuelas, J. (1999). *Pinus halepensis* and *Quercus ilex* terpene emission as affected by
594 temperature and humidity. *Biologia Plantarum*, 42(2), 317–320.
595 <https://doi.org/10.1023/A:1002185324152>
- 596 Meiners, T. (2015). Chemical ecology and evolution of plant-insect interactions: A multitrophic
597 perspective. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.02.003>

- 598 Meneguzzo, F., Albanese, L., Bartolini, G., & Zabini, F. (2019). Temporal and spatial variability of
599 volatile organic compounds in the forest atmosphere. *International Journal of Environmental*
600 *Research and Public Health*, 16(24), 24. <https://doi.org/10.3390/ijerph16244915>
- 601 Moquet, L., Payet, J., Glenac, S., & Delatte, H. (2021). Niche shift of tephritid species after the Oriental
602 fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) invasion in La Réunion. *Diversity and Distributions*, 27, 109–129.
603 <https://doi.org/10.1111/ddi.13172>
- 604 Myrick, A. J., & Baker, T. C. (2018). Increasing Signal-to-Noise Ratio in Gas Chromatography -
605 Electroantennography Using a Deans Switch Effluent Chopper. *Journal of Chemical Ecology*,
606 44(2), 111–126. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0916-y>
- 607 Ni, Y., Su, M., Qiu, Y., Jia, W., & Du, X. (2016). ADAP-GC 3.0: Improved Peak Detection and
608 Deconvolution of Co-eluting Metabolites from GC/TOF-MS Data for Metabolomics Studies,
609 88(17), 8802–8811. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02222>.ADAP-GC
- 610 Norrbom, A. (2004). Fruit fly (diptera: Tephritidae) classification and diversity. *Systematic and*
611 *Entomology Laboratory, ARS, USDA, Department of Entomology, NMNH. SI; The Diptera Site.*
- 612 Pavoine, S., Ollier, S., Pontier, D., & Chessel, D. (2008). Testing for phylogenetic signal in phenotypic
613 traits: New matrices of phylogenetic proximities. *Theoretical Population Biology*, 73(1), 79–91.
614 <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2007.10.001>
- 615 Peñuelas, J., & Llusià, J. (2001). Complexity of factors driving VOC emissions from plants. *Biologia*
616 *Plantarum*, 44(4), 481–487.
- 617 Pino, J. A., Mesa, J., Muñoz, Y., Martí, M. P., & Marbot, R. (2005). Volatile components from mango
618 (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2213–2223.
619 <https://doi.org/10.1021/jf0402633>
- 620 Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for
621 processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC*
622 *Bioinformatics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- 623 R Core Team. (2020). A language and environment for statistical computing. R Foundation for
624 Statistical Computing, Vienna, Austria. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
- 625 Ramiaranjatovo, G., Reynaud, B., & Jacob, V. (2022). Triple electroantennography: honing the scope
626 of insect olfaction.
- 627 Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu,
628 L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic
629 inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542.
630 <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- 631 Schutze, M. K., Virgilio, M., Norrbom, A., & Clarke, A. R. (2017). Tephritid Integrative Taxonomy:
632 Where We Are Now, with a Focus on the Resolution of Three Tropical Fruit Fly Species
633 Complexes. *Annual Review of Entomology*, 62(62), 147–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035518>
- 635 Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor
636 compounds. *The Plant Journal*, 54(4), 712–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x>
- 638 Soto, E. M., Betti, M. I. L., Hurtado, J., & Hasson, E. (2015). Differential responses to artificial selection
639 on oviposition site preferences in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Insect Science*, 22(6),
640 821–828. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12176>
- 641 Takabayashi, J., Dicke, M., & Posthumus, M. A. (1994). Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-
642 mite interactions: Variation caused by biotic and abiotic factors. *Journal of Chemical Ecology*,
643 20(6), 1329–1354. <https://doi.org/10.1007/BF02059811>
- 644 Vallat, A., Gu, H., & Dorn, S. (2005). How rainfall, relative humidity and temperature influence volatile
645 emissions from apple trees in situ. *Phytochemistry*, 66(13), 1540–1550.
646 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.038>

- 647 van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006).
648 Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of
649 metabolomics data. *BMC Genomics*, 7, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- 650 Wäschke, N., Meiners, T., & Rostás, M. (2013). Foraging Strategies of Parasitoids in Complex Chemical
651 Environments. *Chemical Ecology of Insect Parasitoids*, 37–63.
652 <https://doi.org/10.1002/9781118409589.ch3>
- 653 White, I. M., & Elson-Harris, M. . (1992). Fruit flies of economic significance : their identification and
654 bionomics. *C.A.B. International, Wallingford, UK.*, 601.

4.3. Les corrélations phylogénétiques des émissions volatiles de fruits sont susceptibles de servir de base à la spécialisation chez les Tephritidae

4.3.1. Présentation de l'étude

Dans cette partie, nous traitons les stratégies olfactives adoptées par les espèces de mouches des fruits spécialistes dans la détection de leurs plantes hôtes. Ces espèces spécialistes sont inféodées à une seule famille de fruits, la famille des Cucurbitaceae pour *Dacus cialiatius*, *Dacus demmerezi* et *Zeugodacus cucurbitae*, et la famille des Solanaceae pour *Neoceratitis cyanescens*. Cependant, ces espèces conservent une large gamme d'hôte au sein de ces familles de fruits dont la forme et la couleur restent très diversifiées (par exemple, dans la famille des cucurbitaceae, les courgettes *cucurbitae pepo* sont généralement de couleur verte, de forme allongée tandis que les citrouilles *Cucurbita maxima* sont orange, de forme arrondie ou allongée selon les variétés). Hors, la spécialisation chez ces espèces résulte à la fois de la performance des larves, mais aussi de la préférence des adultes pour le site de ponte (Hafsi et al., 2016). Dès lors, il est nécessaire pour ces espèces de trouver un point commun entre leurs hôtes qui les diffèrent des fruits non-hôtes. Nous faisons l'hypothèse que ce point commun réside dans les émissions volatiles des fruits. Nous avons donc cherché à déterminer les composés communs à une famille de fruit et spécifiques à cette famille, c'est-à-dire absents des autres fruits.

Ainsi, dans le but d'identifier les composés volatils spécifiques des familles de fruits, nous avons menés des analyses sur les composés émis par les 28 espèces de fruits. Nous avons choisi de centrer cet échantillonnage sur quatre familles de fruits surreprésentées, et dont les composés spécifiques peuvent être étudiés. Il s'agit de la famille des Cucurbitaceae (6 espèces) et des Solanaceae (5 espèces) qui sont chacune infestées par des espèces de mouches des fruits spécialistes ; ainsi que des familles de Myrtaceae (4 espèces) et de Rosaceae (3 espèces), très infestées par les espèces de Tephritidae généralistes. Enfin, l'échantillonnage couvre également 10 autres familles de fruits avec une seule espèce par famille. Pour ces familles, il n'est pas possible de distinguer les composés spécifiques à la famille des composés spécifiques à l'espèce échantillonnée. Aussi, le rôle de ces échantillons se restreint à tester la spécificité familiale des composés de Cucurbitaceae, Solanaceae, Myrtaceae et Rosaceae. Pour cela, nous avons calculé un indice de signal phylogénétique sur les fruits hôtes afin de détecter la présence de signal phylogénétique avec ces traits de composés volatils. Une analyse multivariée a été également réalisée pour distinguer ces composés spécifiques aux familles de fruits.

4.3.2. Démarches méthodologiques et analytiques

La première étape de cette étude consiste en l'identification des composés volatils des fruits hôtes des mouches des fruits. Pour cela, nous avons repris les données volatilomiques des fruits intacts et des fruits coupés sur les 28 espèces de fruits hôtes utilisés dans l'article précédent. Ces 28 espèces de fruits sont réparties sur 14 familles. L'échantillonnage de ces fruits incluait des familles de plantes cultivées, d'intérêt économique, qui sont menacées par les attaques des mouches des fruits. La taille d'échantillonnage ainsi que la méthode d'extraction et d'identification des composés volatils sont décrites dans l'article 2 (voir section matériels et méthodes). Pour rappel, parmi ces 28 espèces de fruits, nous étions capables d'identifier 511 composés pour les fruits intacts et 665 composés pour les fruits coupés.

Ensuite, nous avons procédé à une reconstruction phylogénétique de ces 28 espèces de fruits. L'arbre phylogénétique a été reconstruit à partir des séquences de gènes chloroplastiques maturase K (*matK*) (1 464 pb) et ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) (1 332 pb) (Hollingsworth et al., 2009). Les séquences ont été obtenues à partir de la base de donnée de séquence d'ADN GenBank du NCBI (Benson et al., 2013) ou par séquençage d'ADN réalisé dans le cadre de l'étude de Charlery de la Masselière et al. (2017b). Les deux séquences de gènes ont été alignées séparément avec le logiciel MEGA (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018), puis concaténées et ajustées manuellement. Pour chaque gène, les meilleurs modèles de substitution nucléotidique ont été sélectionnés à l'aide de jModelTest 2 (Darriba, Taboada, Doallo, & Posada, 2012) en se basant sur les valeurs du critère d'information d'Akaike (AIC). Les modèles GTR + G et GTR + I + G ont été sélectionnés respectivement pour les gènes *matK* et *rbcL*. Pour générer la phylogénie de nos 28 espèces de fruits, nous effectuée une analyse par inférence phylogénétique bayésienne en utilisant les méthodes de Monte Carlo à chaîne de Markov (MCMC). Les analyses ont été réalisées avec le logiciel MrBayes v3.2 (Ronquist, Mark, & Ayres, 2012). Deux exécutions indépendantes avec chacune quatre chaînes de Markov ont été lancées simultanément pour 5 000 000 de générations, et échantillonnées toutes les 1 000 générations. La convergence de chaque exécution a été confirmée avec Tracer v1.7 (Rambaut, Drummond, Xie, Baele, & Suchard, 2018). L'objectif est de déterminer au bout de combien de générations a lieu une convergence, appelée « burn-in », des scores de probabilité vers une distribution stationnaire. Le burn-in a été atteint après 500 000 générations équivaut à 10% des échantillons. Nous avons donc déterminé la phylogénie consensuelle parmi les échantillons trouvés après la valeur de burn-in.

Puis, nous avons mesuré le signal phylogénétique à l'aide de calcul d'indices. Le signal phylogénétique indique la part de variation dans les valeurs de traits (les composés volatils dans notre cas) entre les espèces, qui peut être expliquée par leur proximité phylogénétique (Blomberg, Garland, & Ives, 2003). Il existe plusieurs façon de calculer un signal

phylogénétique et dans notre étude nous avons calculé pour chaque composé volatil trois indices à savoir l'indice C_{mean} d'Abouheif, l'indice λ de Pagel et l'indice K de Bloomberg dans un but de comparaison (Münkemüller et al., 2012). L'indice C_{mean} d'Abouheif est souvent utilisé à cause de sa robustesse à détecter le signal phylogénétique (Pavoine et al., 2008). Cet indice mesure le signal phylogénétique avec une approche d'autocorrélation (Abouheif, 1999; Pavoine et al., 2008). La matrice de proximités phylogénétiques est obtenue avec la méthode « oriAbouheif », fonction « proxTips », package R « adephylo » (Pavoine et al., 2008). L'indice est calculé avec la fonction « abouheif.moran », package R « adephylo ». Quant aux indices λ de Pagel et K de Bloomberg, ils sont basés sur un modèle de mouvement brownien de l'évolution de caractères. λ de Pagel est calculé avec la méthode « lamda », fonction « phylosig » du package R « phytools », tandis que K de Bloomberg utilise la méthode « K » de la même fonction. Nous avons également calculé les p-values des différences de percentiles entre les composés des fruits intacts et des fruits coupés par bootstrap.

Enfin, nous avons effectué une analyse multivariée appelée « Phylogenetic Principal Component Analysis (pPCA) » dans le but de distinguer les composés corrélés à la phylogénie, plus précisément à chaque famille de fruit. Le pPCA regroupe les composés en quelques variables présentant une structure globale et locale. La structure globale représente les axes des composantes principales (principal components en anglais, PCs) positivement corrélés à la phylogénie. Ces PCs vont alors distinguer les composés qui sont similaires entre les espèces de fruits apparentées. La structure locale représente par ailleurs les axes du PCs et les composés qui sont négativement corrélés à la phylogénie, indiquant ainsi les composés qui créent des dissimilarités entre les espèces de fruits apparentées (Jombart, Pavoine, Devillard, & Pontier, 2010). Cette analyse a été réalisée avec la fonction « ppca », package R « adephylo » et la méthode « Abouheif » pour les proximités phylogénétiques.

4.3.3. Résultats

4.3.3.1. Phylogénie des fruits et degré de corrélation phylogénétique

La phylogénie des 28 espèces de fruits étudiées présente de grands clades qui regroupent 14 familles de fruits. Cette phylogénie confirme les quatre familles de fruits, qui sont les Cucurbitaceae, Solanaceae, Myrtaceae et Rosaceae, avec plusieurs échantillons. La répartition des espèces est homogène pour les 10 autres familles.

Le signal phylogénétique de chaque composé émis par ces espèces de fruits a été calculé à partir des indices C_{mean} d'Abouheif, λ de Pagel et K de Bloomberg. Ces trois indices ont montré approximativement les mêmes schémas de résultats (cf. annexe 2). Ceci dit, ces indices ne sont pas exactement équivalents et sont souvent difficiles à interpréter. Cependant, le fait de

trouver le même résultat qualitatif confirme bien que ce trait est indépendant et permet de faire le choix de se concentrer sur un indice. Nous avons donc basé notre analyse sur l'indice C_{mean} d'Abouheif à cause de sa robustesse dans la détection du signal phylogénétique. Afin de mieux comprendre cet indice, nous avons réalisé une étude préliminaire sur des distributions artificielles. Pour cela, nous avons attribué à un composé arbitraire une valeur d'indice de 1 chez toutes les 28 espèces de fruits, une valeur de 1 pour chacune des espèces de fruits et 0 chez les autres espèces, une valeur de 1 chez toutes les espèces de Cucurbitaceae et 0 chez les autres espèces et respectivement pareil avec les espèces de Solanaceae, Rosaceae et Myrtaceae. Puis le calcul de l'indice avec ces données fictives nous a aidé dans l'interprétation des résultats et permis de borner l'indice.

L'indice du signal phylogénétique C_{mean} d'Abouheif montre bien l'existence de signal phylogénétique pour les composés volatils. Ce résultat est présenté dans la figure 20. Approximativement, 10% des composés volatils des fruits intacts (55 sur 511) contre 25% pour les fruits coupés (167 sur 665) présentent un signal phylogénétique significatif (test de permutation, nombre de tirage aléatoire = 999, $p \leq 0,05$). De plus, nous avons observé une différence significative entre le signal phylogénétique des fruits intacts et celui des fruits coupés. Les fruits coupés présentent un signal phylogénétique plus important que les fruits intacts, même après compensation par le nombre de composés émis (test de Bootstrap sur la différence de valeur de l'indice à tous les percentiles, nombre de tirage aléatoire = 100 000, $p \leq 0,05$).

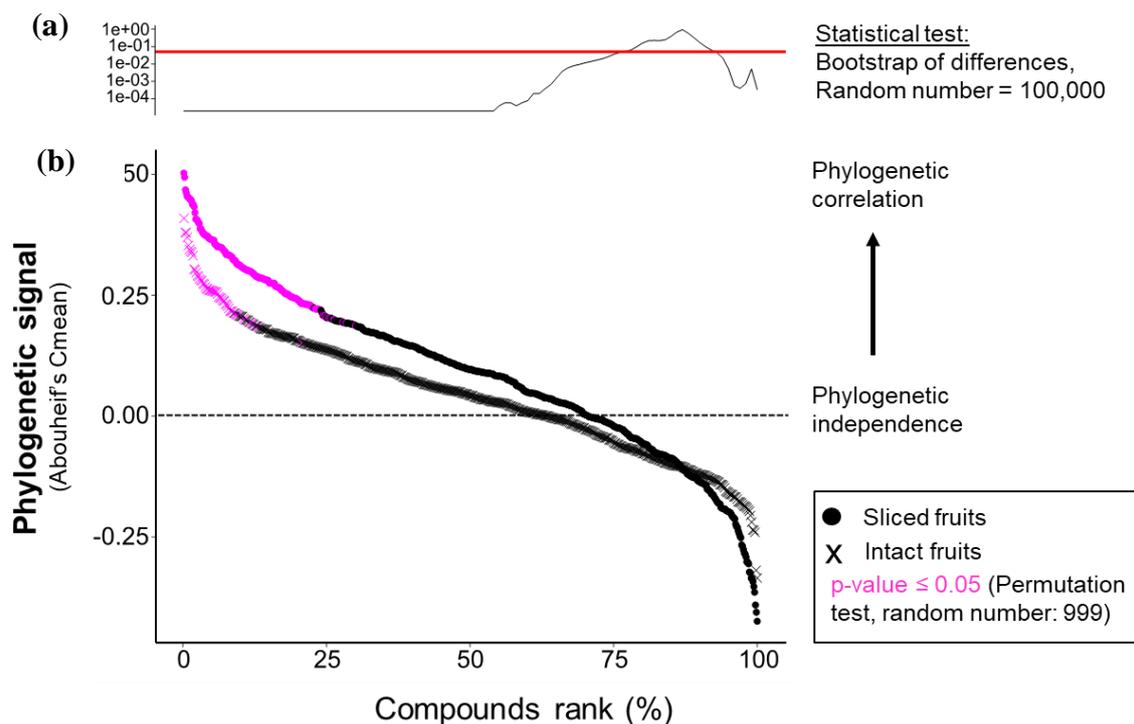


Figure 20 : Signal phylogénétique des fruits intacts et fruits coupés (b). Les croix et les points représentent respectivement les composés des fruits intacts et des fruits coupés. Les valeurs de l'indice du signal phylogénétique sont triées par ordre décroissant et sont représentées en fonction de leurs rangs en pourcentage. La valeur de rang 100 signifie 511 composés pour les fruits intacts et 665 composés pour les fruits coupés. Sur l'axe des ordonnées, 0 indique l'indépendance phylogénétique et les composés avec un signal phylogénétique significatif sont colorés en magenta (55 sur 511 composés pour les fruits intacts et 167 sur 665 composés pour les fruits coupés). Les p-values de chacun de ces composés sont obtenues à partir d'un test de permutation sur 999 randomisations. En haut : p-value du bootstrap des différences de percentiles entre les composés des fruits intacts et des fruits coupés (a). Le trait rouge représente le seuil de significativité de 5%.

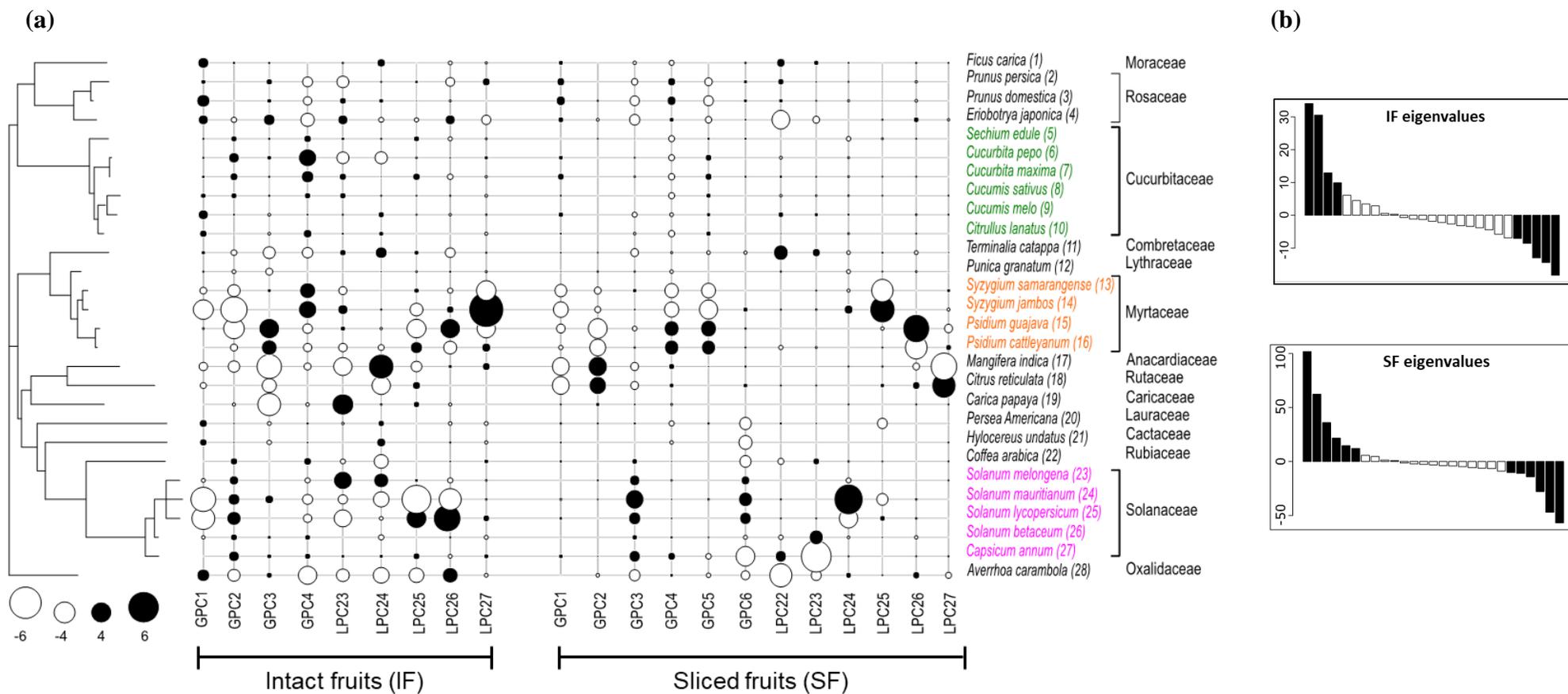
4.3.3.2. Les composés corrélés à la phylogénie sont identifiés

Afin d'identifier les composés spécifiques des familles des fruits, nous avons analysé les données d'émissions de fruits par une analyse multivariée qui incorpore le signal phylogénétique, intitulée « phylogenetic principal component analysis » (pPCA). Cette analyse a fait ressortir 27 axes de PCs. Ce qui nous intéresse le plus, sont les axes des PCs de la structure globale qui nous ont permis de mettre en évidence les composés distinguant les différentes familles de fruits. La figure 21 résume ces résultats. Il est à noter que nous n'avons pas creusé d'avantage les composés des Rosaceae car le nombre d'espèce (3) semble être limitant.

Pour les fruits intacts, nous avons affiché les quatre premiers axes de la structure globale (GPCs) et c'est avant tout un choix descriptif. Une distinction claire des composés qui sont similaires entre les espèces de fruits de la famille des Cucurbitaceae est observée sur le GPC4. Les composés qui distinguent la famille des Solanaceae sont projetés positivement sur le GPC2. Les composés des Myrtaceae sont projetés négativement sur ce même GPC2. La projection des composés sur les axes des GPCs montre que les principaux composés qui séparent la famille des Cucurbitaceae suivant le GPC3 sont anisole, 2-méthyl-1-tétradécène, α -gurjunène, copaène et β -ocimène. Pour les Solanaceae, les composés expliquant la séparation sur le GPC2 sont butyl isocyanatoacetate, ethyl octanoate et hexyl acétate. Les composés des Myrtaceae qui sont corrélés sont α -muurolène et β -caryophyllène (Figure 22).

Pour les fruits coupés, nous avons considéré les six premiers axes des GPCs qui permettent de visualiser au mieux les composés distinguant chaque famille de fruits. La combinaison des axes des GPC4 et GPC5 semble distinguer les Cucurbitaceae des Rosaceae. Les principaux composés expliquant cette séparation sont β -myrcène, (3E)-3-hexenyl acétate et 7-vinylbicyclo[2,4,0]oct-1-ène. Les composés de la famille des Solanaceae sont projetés positivement sur le GPC3 dont les composés principaux sont neryl formate, 2-isobutylthiazole, isopentanol. Les composés qui distinguent la famille des Myrtaceae sont projetés négativement sur la GPC2. Les principaux composés qui séparent cette famille sont γ -terpinène, (4E,6E)-allo-cimène et neo-allo-ocimène (Figure 23).

Concernant les axes de la structure locale, nous avons choisi d'afficher quelques axes (LPCs) permettant d'avoir un aperçu sur les composés qui présentent une corrélation phylogénétique négative (les cinq derniers LPCs pour les fruits intacts et les six derniers LPCs pour les fruits coupés). Pour les deux cas, c'est-à-dire les fruits intacts et les fruits coupés, les profils des Cucurbitaceae sont assez homogènes tandis que pour les autres familles de fruits, il existe des composés qui différencient les espèces proches (Figure 21).



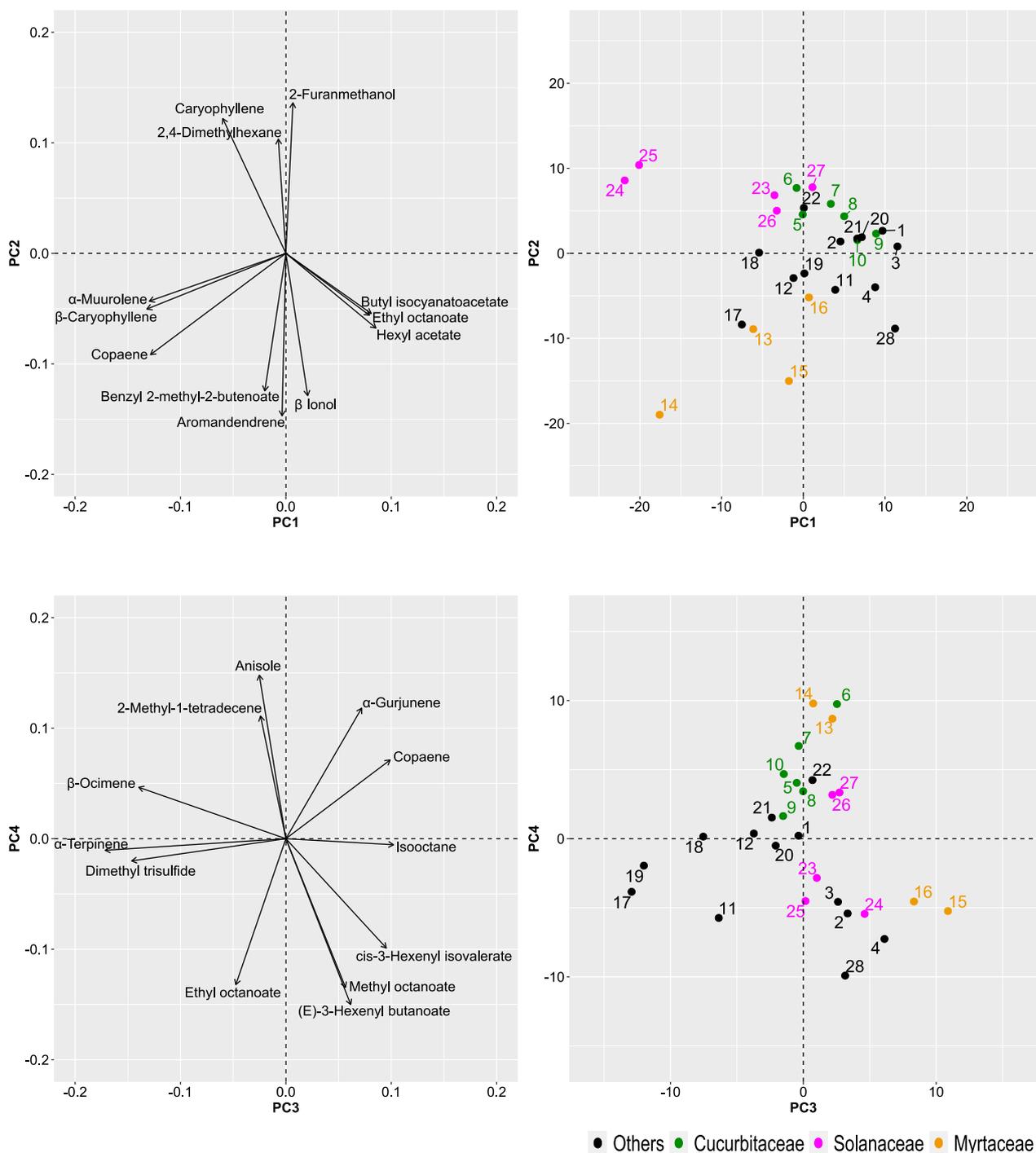


Figure 22 : Représentation graphique des principaux composés volatils des fruits intacts et des taxons des fruits (numérotés de 1 à 28) suivant les axes PC1 et PC2, PC3 et PC4 de la structure globale. Pour les graphiques à droite, chaque point représente une espèce de fruits et les différentes couleurs représentent les familles auxquelles elles appartiennent, vert pour la famille des Cucurbitaceae, magenta pour la famille des Solanaceae, orange pour la famille des Myrtaceae et noir pour les autres familles de fruits. Les chiffres correspondent aux identifiants de 28 espèces de fruits.

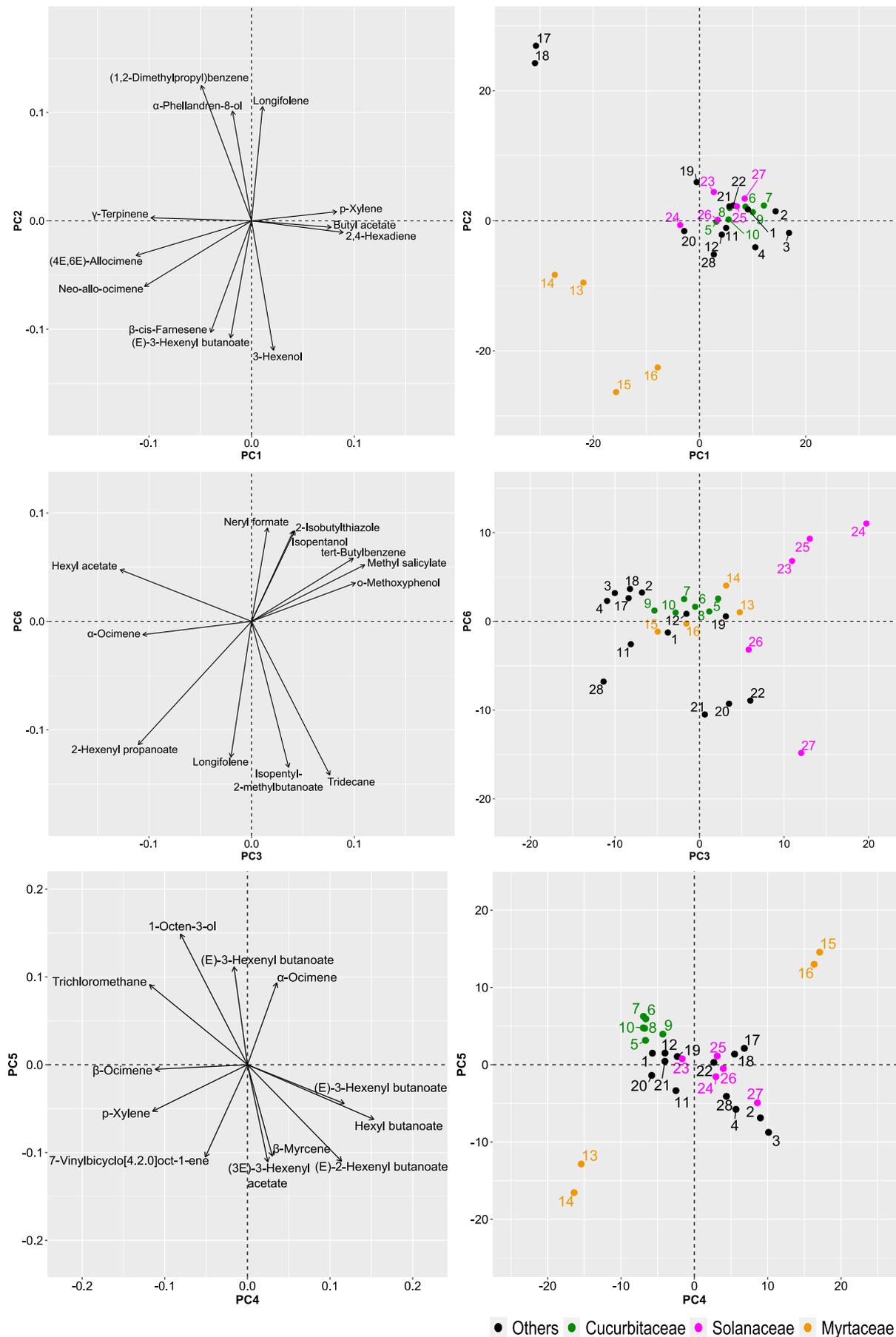


Figure 23 : Représentation graphique des principaux composés volatiles des fruits coupés et des taxons des fruits (numérotés de 1 à 28) suivant les axes PC1 et PC2, PC3 et PC6 et PC5

de la structure globale. Pour les graphiques à droite, chaque point représente espèce de fruits et les différentes couleurs représentent les familles auxquelles elles appartiennent, vert pour la famille des Cucurbitaceae, magenta pour la famille des Solanaceae, orange pour la famille des Myrtaceae et noir pour les autres familles de fruits. Les chiffres correspondent aux identifiants de 28 espèces de fruits.

4.3.4. Discussion

L'analyse des émissions volatiles des 28 espèces de fruits hôtes a permis de détecter la présence de signal phylogénétique parmi les composés volatils de fruits que nous avons étudiés. Cela révèle l'existence de composés qui sont corrélés à la phylogénie des fruits. 55 composés sur 511 et 167 composés sur 665 sont significativement corrélés à la phylogénie respectivement pour les fruits intacts et les fruits coupés. Cependant, cette analyse ne permet pas d'identifier les composés des différentes familles de fruits. Parmi les composés corrélés à la phylogénie, certains peuvent l'être via des clades qui regroupent plusieurs familles (cf PC1 de la pPCA), quand d'autres peuvent l'être via des clades inférieures à l'échelle de la famille. Par ailleurs, cette analyse est également dépendante de l'échantillonnage phylogénétique que nous avons réalisé : les composés spécifiques des Cucurbitaceae avec 6 espèces de fruits auront des scores plus forts que les composés spécifiques des Rosaceae avec 3 espèces par exemple.

Entre autre, la détection de plus de signal phylogénétique chez les composés des fruits coupés démontre l'importance des fruits endommagés dans les vergers. En effet, il est probable que les fruits endommagés soient sujets à plus de ponte et soient plus attractifs. D'ailleurs, une étude a montré plus d'attraction pour les fruits en purée que les fruits intacts (Cunningham, Carlsson, Villa, Dekker, & Clarke, 2016). De plus, ces fruits peuvent être impliqués pour une attraction vers la parcelle ou vers l'arbre, et augmenter le nombre de ponte sur les fruits intacts dans leur voisinage. Ces fruits ne sont donc pas à négliger puisque leurs émissions volatiles pourraient participer à la sélection des hôtes par les mouches des fruits.

De par les analyses pPCA, nous étions capables de distinguer les composés spécifiques des familles des fruits. Toutefois pour les fruits intacts, la séparation de la famille des Cucurbitaceae ne semble pas si évidente. En effet, si des composés sont vraiment spécifiques à une famille et communs à tous ses membres, la pPCA devrait les faire ressortir clairement sur un seul axe. Or, ce n'est pas le cas pour les Cucurbitaceae, pour lesquels une combinaison de deux axes est nécessaire pour les distinguer des autres fruits. Il est donc plausible qu'aucun composé ne soit présent uniquement chez cette famille et que la signature chimique de cette famille, qui permet de la distinguer des autres familles de fruits, réside dans une association

spécifique de composés. Il est à noter que, l'analyse pPCA ne permet pas de conclure si certains ratios entre composés sont spécifiques.

Néanmoins, l'analyse a permis de mettre en évidence les composés distinguant différentes familles de fruits infestées par les espèces de Tephritidae spécialistes. Parmi ces groupes de fruits, nous avons une association d'axes (donc de composés) spécifiques aux Cucurbitaceae infestés par *Dacus demmerezi*, *Dacus ciliatus* et *Zeugodacus cucurbitae* et un axe spécifique aux Solanaceae infestés par *Neoceratitis Cyanescens*. Selon l'hypothèse de Bruce et al. (2005), les insectes spécialistes se basent sur ces composés spécifiques des fruits. Cela rend donc l'identification de ces composés intéressante. Cependant, les réponses des mouches des fruits à la plupart des principaux composés que nous avons mis en évidence dans cette étude ne sont pas connus. Dans notre précédente étude (Article 2), nous avons observé des réponses olfactives à certains de ces composés comme par exemple une réponse au β -ocimène chez les spécialistes des Cucurbitaceae *Dacus demmerezi* et *Zeugodacus cucurbitae* et une réponse à l'hexyl acetate chez la spécialiste des Solanaceae *Neoceratitis Cyanescens*. Pour les autres composés, il convient de faire des tests avec les espèces spécialistes afin de savoir si ces composés déclenchent des réponses conséquentes et de vérifier l'hypothèse émise sur la stratégie olfactive des espèces spécialistes, mais également de comparer les généralistes et les spécialistes pour tester l'hypothèse d'une sensibilité différentielle. Nous avons également distingué les composés des Myrtaceae qui est une famille infestée par plusieurs espèces de Tephritidae généralistes et surtout par *Bactrocera dorsalis*. Parmi les principaux composés mis en exergue, β -caryophyllène est connu pour déclencher des réponses chez plusieurs espèces de mouches des fruits généralistes comme *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera correcta*, *Bactrocera tryoni* et *Ceratitis capitata* (Cossé et al., 1995; Kamala Jayanthi et al., 2014; Cunningham et al., 2016; Jaleel et al., 2019). Ainsi, il se révèle avantageux de tester le potentiel d'attraction des autres composés identifiés sur des espèces généralistes.

Une perspective de cette étude consiste à appliquer la même démarche adoptée dans l'article 2. Cela se traduit par la sélection des composés dispersés sur un axe de PC et de les tester en électrophysiologie et en test comportemental sur les espèces de mouches des fruits ciblées. L'hypothèse est que les axes du PC correspondent à une pression de sélection, et que plus les composés ont un score élevé sur cet axe, plus les spécialistes auront une réponse élevée à ces composés par rapport aux généralistes. Toutefois, même s'il est intéressant de réaliser ces tests, il est possible qu'ils ne soient pas concluants car ils ciblent les composés indépendamment. A priori, les synergies entre composés ne s'effectuent pas au niveau du système olfactif périphérique mais plutôt à partir du lobe antennaire voir du reste du système nerveux de l'insecte. En conséquence, il est possible que par rapport à l'article 2, il soit nécessaire de tester des associations de composés ce qui ne peut être réalisé qu'avec des tests comportementaux avec les outils que nous avons au laboratoire.

A plus large échelle, l'identification et la connaissance des réponses des espèces de Tephritidae aux composés dont l'émission est corrélée à la phylogénie des fruits aide à déterminer efficacement les composés qui peuvent être utilisés dans les programmes de lutte intégrée contre les mouches des fruits. Pour le cas de *Zeugodacus cucurbitae*, le « Cucumber lure » a été identifié d'après l'analyse d'odeurs de concombre *Cucumis sativus* et piège efficacement cette espèce (Siderhurst & Jang, 2010). Des études non-publiées au laboratoire montrent qu'un dérivé de cet attractif permet de piéger au champ à la fois *Zeugodacus cucurbitae* et *Dacus demmerezi*. Aussi, un nouveau leurre n'est pas forcément nécessaire pour ces spécialistes des Cucurbitaceae. Cependant, il n'est pas impossible que notre approche permette *in fine* de révéler de nouveaux composés susceptibles d'améliorer encore les capacités de piégeage pour ces espèces.

CHAPITRE 5

Discussion générale et perspectives

CHAPITRE 5

Discussion générale et perspectives

Contenu

5.1. Adaptation du système olfactif des mouches des fruits à la gamme d'hôte, à la polyphagie	120
5.2. Les méthodologies qui se développent actuellement, susceptibles de faire ouvrir de nouveaux champs de recherches	125
5.3. Stratégie de recherche de leurre de mouche des fruits en se basant sur les mécanismes évolutifs de leur système olfactif	127

Dans cette thèse, nous avons réalisé une comparaison des systèmes olfactifs de plusieurs espèces de mouches des fruits Tephritidae et montré comment leur sensibilité est ajustée aux différents composés de leurs gamme d'hôte. Ces systèmes olfactifs découlent d'une histoire évolutive qui s'exprime à différentes échelles biologiques (moléculaire, cellulaire, fonctionnelle) et temporelles. Ainsi cette partie vise à discuter les mécanismes évolutifs des systèmes olfactifs des mouches des fruits, les nouvelles techniques et méthodes susceptibles de renouveler l'écologie chimique et enfin les stratégies pour l'élaboration d'un nouveau leurre utilisable en biocontrôle.

5.1. Adaptation du système olfactif des mouches des fruits à la gamme d'hôte, à la polyphagie

5.1.1. Evolution moléculaire des systèmes olfactifs périphériques

La connaissance des fonctionnements olfactifs et la disponibilité des données moléculaires et physiologiques chez certaines espèces d'insectes phytophages permettent des comparaisons entre des espèces relativement proches et d'envisager les mécanismes évolutifs à travers lesquels les systèmes olfactifs s'adaptent aux gammes d'hôtes.

5.1.1.1. La pression de sélection associée à la gamme d'hôte modifie les comportements olfactifs

Parmi les espèces de Tephritidae, l'un des modèles les plus étudiés est le cas de la mouche de la pomme *Rhagoletis pomonella* (Diptera : Tephritidae) dans le nord-est des Etats-Unis. Une population de cette espèce locale qui avait comme hôte d'origine les fruits des aubépines *Crataegus* spp (Rosaceae), a opéré un changement d'hôte vers le pommier domestique *Malus pumila* P. Mill (Rosaceae) introduit en Amérique au milieu des années 1800 (Bush, 1969; Walsh, 1867). C'est un exemple très récent de changement de gamme d'hôte, ce qui fait de cette espèce un modèle pour illustrer la divergence écologique rapide des insectes phytophages. Très vite, les chercheurs se sont intéressés à l'étude de l'attraction de cette espèce aux composés volatils des deux fruits et des mécanismes olfactifs associés (Aluja & Prokopy, 1993; Feder & Fichak, 1999; Linn et al., 2003). De nombreuses études ont été menées, aboutissant à l'obtention de données génomiques, transcriptomiques et à la caractérisation récente de l'ensemble des classes de neurones olfactifs antennaires de cette espèce (Olsson, Linn, & Roelofs, 2006; Tait, Batra, Ramaswamy, Feder, & Olsson, 2016).

Rhagoletis pomonella compte 28 classes d'ORNs sur ses antennes. Deux paires de neurones, colocalisées dans les sensilles b7 et b9 de cette espèce, sont impliquées dans la reconnaissance des deux principaux composés volatils des deux fruits, qui sont respectivement le 3-méthylbutan-1-ol pour l'aubépine et l'hexanoate de butyle pour la pomme. En effet, les ORNs b7B et b9A répondent au 3-méthylbutan-1-ol tandis que les ORNs b7A et b9B répondent à l'hexanoate de butyle (Tait et al., 2016). Ces composés agissent comme attractifs pour la population concernée (c'est-à-dire soit la population inféodée à l'aubépine, soit celle qui inféodée à la pomme) et comme antagonistes pour l'autre population (Linn et al., 2003; Nojima et al., 2003; Cha et al., 2012). Ainsi pour cette espèce, la différence de comportement entre les deux populations est basée sur l'inversion de leurs mécanismes sensoriels dans la reconnaissance et le traitement de ses signaux olfactifs (Tait et al., 2016, 2021). Cette histoire évolutive du système olfactif de *Rhagoletis pomonella* associée au changement d'hôte témoigne qu'un changement mineur au niveau de la voie sensorielle peut accompagner un changement rapide d'hôte. De plus, cet exemple suggère que le changement de gamme d'hôte peut induire une spéciation et que la gamme d'hôte exerce donc bien une force de sélection. Cette force de sélection liée à la gamme d'hôte engendre une modification des comportements olfactifs. De tels scénarios se sont certainement produits à de multiples reprises dans l'histoire des espèces de Tephritidae, que nous avons étudiées dans cette thèse, qui ont évolué vers une gamme d'hôte plus large au cours du temps depuis leurs divergences il y a des millions d'années. Cependant, cet exemple ne montre pas de réelle modification du système olfactif périphérique car l'échelle de temps est trop courte. Pour observer cela, il faut considérer des populations plus éloignées phylogénétiquement.

5.1.1.2. La pression de sélection associée à la gamme d'hôte modifie les systèmes olfactifs périphériques

Les drosophiles (Diptera : Drosophilidae) sont bien connues comme étant des espèces modèles, notamment à travers la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* qui est un modèle d'insecte globale dans la recherche scientifique. C'est également une espèce modèle moléculaire et génétique dans la recherche olfactive (de Bruyne et al., 2001; Knaden et al., 2012; Jacob et al., 2017). Les recherches se sont étendues à plusieurs autres espèces du genre *Drosophila* et ont permis d'obtenir leurs génomes complets, y compris les ORs (Adams et al., 2000; Vosshall et al., 2000; Stocker, 2001; Guo & Kim, 2007; McBride & Arguello, 2007). De plus, le système olfactif a été décortiqué à l'aide d'enregistrement monosensillaire (Single Sensillum Recording en anglais, SSR) et la plupart des ORs ont été déorphanisés (ORs dont on connaît les ligands) fonctionnellement chez *Drosophila melanogaster* (de Bruyne et al., 2001; Hallem et al., 2004; Münch & Galizia, 2016) et chez plusieurs autres espèces du genre (Stensmyr et al., 2003, Keeseey et al., 2015; Crowley-gall et al., 2016; Keeseey et al., 2022). Keeseey et al. (2019) suggèrent même l'expansion de la notion d'espèce modèle à l'ensemble du genre *Drosophila* comme modèle d'étude de l'évolution des insectes. Ceci dit d'autres clades d'insectes sont candidats à ce rôle de modèle, à l'exemple des papillons de nuit (Legeai et al., 2011; de Fouchier et al., 2017).

La plupart des espèces de drosophiles sont polyphages et utilisent les fruits en fermentation. Quelques espèces ont cependant des niches divergentes, telles que les espèces monophages *Drosophila sechellia*, *Drosophila mojavensis* ou *Drosophila erecta*. Les études des systèmes olfactifs des espèces monophages ont montré des divergences marquées d'un faible nombre d'ORs sensibles aux composés de leurs hôtes et du nombre d'ORNs qui les expriment (Dekker et al., 2006; Linz et al., 2013; Crowley-gall et al., 2016). Ainsi ces observations sur des espèces à distance phylogénétique plus large que l'exemple de *Rhagoletis pomonella* démontrent bien des modifications directes des systèmes olfactifs périphériques liés à la gamme d'hôte.

La drosophile du cerisier *Drosophila suzukii* a développé une préférence aux fruits mûrs à l'instar des Tephritidae (Keeseey et al., 2015). Au niveau des systèmes olfactifs, *Drosophila suzukii* possède plusieurs ORs divergents avec les autres espèces de drosophiles (Hickner, Rivaldi, Johnson, Siddappaji, & Raster, 2016; Ramasamy et al., 2016) qui pourraient potentiellement être associés à une convergence évolutive possible vers la niche des Tephritidae. De plus, les espèces de Tephritidae et de drosophile présentent une distance phylogénétique suffisamment proche pour qu'au moins quelques ORs soient conservés fonctionnellement. En effet, une étude a montré qu'environ 50% des ORs sont conservés entre *Drosophila melanogaster* et quelques espèces de Tephritidae (Jacob et al., 2017). De plus, les

premières caractérisations fonctionnelles des ORs de Tephritidae montrent des profils de réponses conservés avec des ORs de drosophiles orthologues (Ono et al., 2021; Ono, 2022).

Au sein du genre *Drosophila*, la plupart des ORs sont conservés fonctionnellement et c'est seulement quelques-uns qui sont différents (Keeseey et al., 2015; Crowley-Gall et al., 2016; Keeseey et al., 2022). Cette conservation ou divergence d'ORs résulte de la pression de sélection qui s'applique différemment à chaque OR. Cela peut être testé à partir de l'analyse du ratio ω entre la divergence ou la mutation non-synonyme (d_N) et la mutation synonyme (d_S) des nucléotides de substitution ($\omega = d_N/d_S$). La mutation non-synonyme ne change pas l'acide aminé tandis que la mutation synonyme engendre un changement de celui-ci. Ainsi, si $\omega < 1$, nous avons une sélection purificatrice, c'est-à-dire que le gène a subi un niveau de contrainte fonctionnelle élevé. A l'inverse, si $\omega > 1$ le gène est sous sélection adaptative ou positive (Eirín-López et al., 2012). Les ORs évoluent donc à des vitesses différentes.

Chez les Tephritidae, la divergence des systèmes olfactifs résulte probablement de multiples épisodes de sélection positive et purificatrice qui s'alternent. En effet, en analysant les réponses antennaires de nos espèces d'étude aux composés volatils de fruit hôte, la mangue en début de murissement, en GC-EAD₃ (Figure 24), nous avons observé qu'il y a des composés pour lesquels toutes les espèces de mouches des fruits étudiées ont eu une réponse olfactive. Cela peut résulter d'une sélection purificatrice. Nous avons également eu des composés pour lesquels seules les espèces généralistes (*Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera zonata*, *Ceratitidis capitata*, *Ceratitidis quilicii*, *Ceratitis catoiri*) ont eu une réponse olfactive, suggérant une sélection liée à la gamme d'hôte. Pour certains composés, seules les espèces de la tribu Dacini (*Dacus demmerezi*, *Zeugodacus cucurbitae*, *Bactrocera zonata*, *Bactrocera dorsalis*) ont eu une réponse olfactive, scénario pouvant résulter d'une dérive liée à une faible sélection (corrélation avec la phylogénie mais pas avec l'écologie des espèces). Enfin, pour quelques composés, seules les espèces du genre *Bactrocera* (*Bactrocera zonata*, *Bactrocera dorsalis*) ont présenté une réponse olfactive, scénario attendu en cas de sélection positive. Nous avons également retrouvé tous ces différents scénarios d'évolution avec les analyses d'émissions volatiles de mangue mûres et de goyaviers en GC-EAD₃ avec les espèces de mouches de fruits étudiées (cf annexe 3). La connaissance des fonctions de ces différents composés est essentielle pour la recherche de leur.

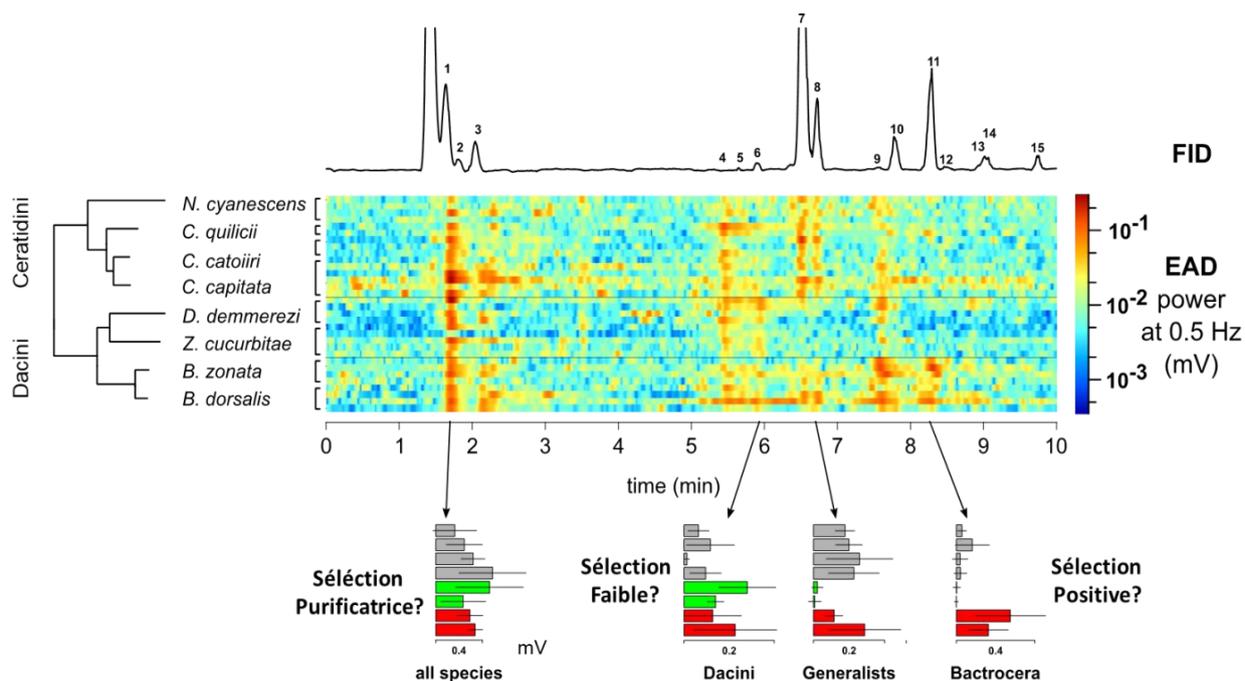


Figure 24 : Analyse GC-EAD₃ sur les différentes espèces de mouches des fruits étudiées avec l'émission volatile de mangues en début de murissement. La courbe en haut représente le chromatogramme du FID avec les différents pics de composés numérotés. Le « heatmap » représente l'intensité de réponses des individus à chaque composé et dont chaque ligne est un enregistrement GC-EAG₃ avec une fréquence de hachage du signal du GC à 0,5 Hz. Pour chaque espèce de mouches des fruits, 4 à 6 répétitions ont été réalisées. Les histogrammes en dessous du graphe représentent les réponses (moyenne et intervalle de confiance 95% calculé par bootstrap) des différentes espèces (dans le même ordre que pour la heatmap) à quelques composés choisis à titre d'exemples pour illustrer la diversité des profils de sensibilité des espèces de Tephritidae. Les réponses des Dacini spécialistes des cucurbitaceae sont représentées par des barres vertes, et celles des Dacini généralistes par des barres rouges.

5.1.2. Evolution fonctionnelle des systèmes olfactifs

La démarche que nous avons adoptée dans cette thèse révèle des propriétés collectives exprimées par un ensemble d'ORs, qui reposent sur les mécanismes évolutifs des ORs individuels décrits dans le paragraphe précédent. L'idée est que la pression de sélection associée à la polyphagie exerce une contrainte sur cette propriété collective, et non sur les ORs un par un. En effet, notre hypothèse sur la polyphagie est que le système olfactif fait intervenir les composés communs entre les fruits et les composés spécifiques respectivement pour la détection et la discrimination des fruits hôtes. Cela signifie donc que pour la perception de ses fruits hôtes, les mouches des fruits activent un ensemble d'ORs pour la détection et l'intégration

des informations de ces composés, ce qui rappelle le principe du codage combinatoire (cf chapitre 1, paragraphe 1.4.3). A titre de comparaison, c'est essentiellement un codage combinatoire qui est utilisé par les drosophiles pour détecter les composés volatils de fruits (Dweck et al., 2018).

Ainsi, dans notre étude, nous avons étudié les réponses olfactives de plusieurs composés et avons trouvé que le trait de corrélation négative entre les réponses antennaires et la diversité des fruits émetteurs est présent sur toutes les espèces de Tephritidae testées, qu'elles soient généralistes ou spécialistes. Pour les généralistes, il s'agirait d'une adaptation à la polyphagie tandis que pour les spécialistes, il pourrait s'agir d'un héritage phylogénétique dans le cas où l'ancêtre commun était polyphage. Une alternative serait que les espèces spécialistes ont un intérêt à distinguer les fruits non-hôtes. Cependant, notre étude ne permet pas réellement de trancher ces questions.

Inversement, les émissions volatiles des fruits résultent également de l'histoire évolutive des fruits eux-mêmes et de la pression de sélection qui les façonne. A ce propos, une hypothèse formulée par Anthony Clarke mérite d'être détaillée (Clarke, 2017). Cet auteur suggère que les mouches des fruits n'exercent que peu de pression de sélection sur les caractéristiques physiques des fruits, car leurs larves n'altèrent ni la germination ni la dispersion des fruits. Ainsi, « l'aspect » des fruits-hôtes des Tephritidae serait principalement adapté aux capacités sensorielles de leurs disperseurs, qui sont souvent des vertébrés généralistes. En conséquence, il suggère que la pression de sélection exercée sur les fruits ait induit une abondance de composés communs à leurs émissions qui en retour aurait facilité la polyphagie des Tephritidae.

5.2. Les méthodologies qui se développent actuellement, susceptibles de faire ouvrir de nouveaux champs de recherches

Une avancée technologique est susceptible d'ouvrir de nouveaux champs de recherches. Par exemple, l'écologie chimique a connu un premier âge d'or et une démultiplication du nombre d'études dans les années 1980 grâce à l'invention de la colonne en silice fondue qui a démocratisé l'utilisation du GC (Dandeneau & Zerenner, 1979). Ainsi, l'innovation méthodologique est un sujet de recherche en soi. La période actuelle voit croître de nouvelles méthodes prometteuses, y compris celle de l'EAG₃ que nous avons développée. Ce paragraphe discute du potentiel des nouvelles méthodes pour renouveler et envisager le futur de l'écologie chimique.

Dans le domaine de l'électrophysiologie, l'enregistrement EAG₃ simultané que nous avons mis en place a permis une estimation qualitative et quantitative des réponses antennaires

des mouches des fruits. Pour l'instant, seul notre laboratoire pratique cette technique et la question se pose de son adoption par d'autres laboratoires. La difficulté technique et le coût financier, par le fait qu'il faut acquérir d'autres matériels supplémentaires comme un amplificateur multi-voies et des micromanipulateurs, pourraient constituer des freins dans l'adoption de cette technique. D'autant plus que l'EAG classique est en partie suffisant pour une estimation qualitative. Toutefois, les avantages comparatifs qu'offrent l'EAG₃ justifient bien la mise en pratique de cette technique et nous espérons qu'elle soit largement utilisée dans d'autres laboratoires. Au minimum, l'EAG₃ sera utilisé lors des futures études de l'UMR PVMBT sur les mouches des fruits, puisqu'il a déjà été utilisé pour tester des phéromones de la mouche du melon *Zeugodacus cucurbitae* (cf. annexe1) et qu'il est en cours d'utilisation pour un nouveau projet sur les attractifs de mâles.

L'idée du hachage de signal du GC pour l'augmentation du rapport signal/bruit remonte à longtemps. Initialement, les techniques de modulation (manuelle) et de modulation thermique du flux du GC ont été développées mais elles ont été abandonnées à cause de la difficulté technique (Marion-poll & Thiery, 1996; Moorhouse et al., 1969; Gouinguene et al., 1998). Myrick et Baker ont proposé trois nouveaux dispositifs, et les plus récents deviennent plus faciles à mettre en place. De plus, leurs dispositifs permettent d'atteindre des fréquences importantes ($\geq 1\text{Hz}$), qui améliorent encore le rendement par rapport aux dispositifs plus anciens (Myrick & Baker, 2012a, 2012b, 2018). Il en résulte un gain de sensibilité du GC-EAD d'un facteur de 10 à 100. Actuellement, nous assistons à un regain d'intérêt à cette méthode de hachage de signal du GC. Nous avons dupliqué un des systèmes de Myrick dans notre laboratoire, puis celui-ci a été exporté vers l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement (INRAE) Versailles, et d'autres chercheurs nous ont signalé être en cours de développement de systèmes alternatifs. D'autres nous ont également fait part de leur souhait de développer ce système dans le futur comme le laboratoire de l'Université Suédoise des Sciences Agricoles (SLU), Alnarp, Suède. Nous pourrions donc nous attendre dans les années qui viennent, à une augmentation du nombre de chercheurs qui utilisera cette technique.

Concernant les analyses chimiques, de nouveaux algorithmes de traitement de données et des logiciels associés permettent l'automatisation des analyses. Le gain de temps qui en découle permet des analyses plus approfondies, plus sûres, et permet d'augmenter le nombre d'échantillons inclus dans une étude par rapport à ce qui se faisait auparavant. En effet, avant les études des chromatogrammes étaient réalisées un par un avec un nombre limité de run GC-MS. Par contre, avec les nouvelles méthodes révolutionnaires telles que l'analyse par MZmine et ADAP-GC (Pluskal et al., 2010; Ni et al., 2016), il est possible de comparer par automatisation un grand nombre de données GC-MS, ce qui permet de changer d'échelle. De plus en plus de laboratoires adoptent ces méthodes, y compris nous. Ces outils induisent

l'avènement d'un nouveau champ disciplinaire, la volatilmique, dans laquelle notre étude s'inscrit. Par ailleurs, de nouveaux outils algorithmiques concurrents sortent régulièrement ce qui laisse un large champ de développement des analyses en écologie chimique.

Une autre limitation des méthodes en écologie chimique est que l'identification des substances sémiochimiques impliquées dans le comportement est un long processus compte tenu du nombre de composés volatils des organismes émetteurs. En effet, tester un seul composé demande un investissement expérimental conséquent. Par exemple, dans notre étude, pour comparer l'attractivité de deux mélanges de composé à une dose, nous a fallu 10 jours de manipulations avec 6 répétitions par jours pour avoir un total de 60 répétitions. Ainsi, tester chacun des cinq composés constituant l'un des mélanges décuplerait le temps de manipulation. Sinon, il serait nécessaire d'augmenter le nombre de manipulation par jour, mais cela demande l'accessibilité et la disponibilité de plus de dispositifs expérimentaux, de matériels biologiques et éventuellement plus de moyens humains. Il est donc d'une importance cruciale de développer des dispositifs permettant de discriminer un grand nombre de composés simultanément. C'est le cas du « flywalk », dispositif développé et utilisé par un seul laboratoire à notre connaissance (Steck et al., 2012), et que nous sommes en train de dupliquer dans notre laboratoire. Toutefois, l'adoption de ce système par d'autres laboratoires n'est pas certaine étant donné que le dispositif peut démultiplier les problèmes de contamination courants des olfactomètres. De plus, des systèmes similaires à celui de McIndoo (1926) sont encore largement utilisés aujourd'hui. Malgré tout, plusieurs modèles d'olfactomètres multi-voies commencent à être bien élaborés et rodés mais les besoins ne sont pas couverts de manière satisfaisante. Ainsi de nouveaux systèmes pourraient se démocratiser et s'imposer comme nouveaux standards de tests comportementaux.

5.3. Stratégie de recherche de leurre de mouche des fruits en se basant sur les mécanismes évolutifs de leur système olfactif

La surveillance et le contrôle des mouches des fruits impliquent l'utilisation de leurre (Noushini et al., 2020). Ici, un leurre désigne une odeur qui induit un comportement d'attraction chez un insecte cible, susceptible d'induire son piégeage dans un dispositif dédié. Le principe de la recherche de leurre repose sur la discrimination d'un composé ou d'un groupe de composés qui présente ce caractère attractif. Cette démarche est basée sur la connaissance du système olfactif et le comportement de l'insecte vis-à-vis les différents composés.

5.3.1. Intérêt et limite de l'étude du système olfactif pour la recherche de leurre

Les substances sémiochimiques sont détectées au niveau du système olfactif périphérique et intégrées par le système nerveux central qui les traduit en comportement. Afin d'éliminer les substances qui ne sont pas détectées, il existe des outils comme l'EAG qui peuvent être utilisés sur peu d'individus et qui peuvent détailler un grand nombre de composés, ce que les études comportementales ne peuvent pas. Toutefois, les analyses électroantennographiques ne permettent pas de déterminer le comportement associé à un composé, si celui-ci induit un comportement d'attraction, de répulsion ou neutre pour l'insecte ou bien s'il induit d'autres comportements tels que la vibration des ailes ou des antennes, le comportement de cour, l'augmentation de la motricité générale, etc.

Le comportement et le système olfactif entretiennent un lien flexible de par l'apprentissage. Souvent, les comportements sont classés en dichotomie en comportement inné ou comportement acquis. Le comportement inné est défini comme étant une réponse automatique au message d'un signal qui ne nécessite pas une forme d'apprentissage. Un des exemples de comportement inné est celui des papillons de nuit dont l'expression des phéromones peut se manifester dès la première nuit après l'émergence (López et al., 2003). Le comportement inné est un comportement hérité génétiquement à l'inverse du comportement acquis qui est le résultat d'un apprentissage. Un auteur souligne le fait de plutôt considérer le comportement comme un continuum allant d'une grande rigidité vers une grande plasticité (Blumberg, 2017). De plus, l'innéité et l'apprentissage agissent ensemble afin de produire un trait de comportement (Tierney, 1986). Au niveau du système nerveux des insectes, des études ont montré que la corne latérale du protocérébron est principalement liée aux informations olfactives innées, tandis que le mushroom body est impliqué dans l'intégration et la modulation par l'expérience des informations, mais également à la formation de la mémoire (cf. figure 2 dans chapitre 1) (de Belle & Heisenberg, 1994; Fişek & Wilson, 2014). Cela témoigne donc de la plasticité de l'olfaction des insectes par rapport au traitement des messages chimiques mais également de leur capacité à s'adapter aux changements des facteurs externes. Dans tous ces processus, l'expérience individuelle et l'apprentissage sont déterminants pour le comportement émergent.

Chez les Tephritidae, l'espérance de vie suffisamment longue après l'émergence (maturité sexuelle atteinte après plusieurs jours, entre 5 à 20 jours selon les espèces) expose les individus à diverses expériences et par conséquent à l'établissement de processus d'apprentissages. Dans notre étude, nous avons pu démontrer que le système olfactif périphérique de ces espèces détecte un grand nombre de composés provenant de fruits différents et nous avons émis l'hypothèse que ces espèces ont acquis la capacité de discriminer leurs différents hôtes. Il est probable que la capacité à changer d'hôte, ainsi que l'apprentissage en

lui-même, fasse partie des contraintes sélectives ayant induit la nécessité que les systèmes olfactifs puissent discriminer les hôtes. En effet, même si l'avantage évolutif de discriminer les hôtes n'est pas immédiat dans un contexte figé, cette capacité offre comme avantage évolutif une meilleure résilience au changement de l'environnement (saisonnalités, invasions, compétitions, etc...), notamment dans le contexte actuel de changement climatique qui peut induire une extinction d'hôte original ou un isolement géographique. Cette capacité s'avère avantageuse pour les espèces qui possèdent plusieurs hôtes différents en même temps, comme les polyphages, pour pouvoir faire le choix d'un hôte par rapport à un autre. Il est donc possible que la stratégie olfactive que nous avons observée résulte d'une adaptation à la polyphagie.

En dehors de tout apprentissage, il est également possible qu'il y ait une interaction directe entre les odeurs de fonds et l'attractif (Conchou, Lucas, Deisig, Demondion, & Renou, 2021), ou encore entre l'état physiologique de l'insecte et l'attractif (Lebreton et al., 2015). Ainsi, pour la recherche de leurre, il est opportun de considérer les facteurs environnementaux qui influent le système olfactif et le comportement de l'insecte étant donné que l'expérience d'un individu change en fonction de l'environnement. Par exemple, il se peut qu'un piège fonctionne mieux d'un endroit à un autre (en milieu ouvert ou en bordure de forêt par exemple), d'une saison à une autre, ou encore selon la culture à protéger et la taille de l'exploitation.

5.3.2. Intérêt de l'étude de l'évolution du système olfactif pour la recherche de leurre

L'approche classique de recherche de leurre en écologie chimique étudie l'interaction entre une source attractive (un seul ou un nombre très limité de fruits) et une espèce d'insecte (Jang et al., 1997; Biasazin et al., 2014; Kamala Jayanthi et al., 2014; Kamala Jayanthi et al., 2021; Būda et al., 2022). Une telle stratégie n'aboutit pas forcément à un résultat efficace puisque le leurre ne peut pas être plus attractif que les fruits déjà existants dans la parcelle, d'autant plus que l'insecte a la capacité de moduler son choix.

Aussi nous cherchons à mettre en œuvre une stratégie différente afin que le leurre soit plus attractif que le fruit à protéger. L'approche que nous avons adoptée dans cette thèse consiste à chercher un mélange de composés venant des émissions volatiles de plusieurs fruits, afin de créer un « super-fruit » dont l'attractivité serait supérieure à celle des fruits à protéger dans la plupart des contextes. Pour cela, nous avons analysé les émissions volatiles de 28 espèces de fruits. Le principe est de découvrir, parmi l'ensemble des composés émis par les différents fruits, les composés d'intérêts pour les espèces de mouches des fruits et d'en créer un mélange.

Dans le même courant de pensée, l'équipe de Teun Dekker a proposé un leurre constitué d'un mélange de composés communs aux émissions de plusieurs fruits qui attire des femelles *Bactrocera dorsalis* en laboratoire (Biazasin et al. 2018). Dans un premier temps, nos données électroantennographiques nous ont semblé contredire cette hypothèse, puisque nous avons trouvé une réponse olfactive plus importante pour les composés spécifiques que pour les composés communs de fruits. Cependant, nous avons émis une nouvelle hypothèse susceptible de réconcilier les deux études : la sensibilité olfactive plus importante aux composés spécifiques qu'aux composés communs de fruits dériverait d'une adaptation sensorielle à la discrimination d'hôte, et ne traduirait pas forcément une préférence pour cette catégorie de composés. Une conséquence logique serait qu'à basse concentration, seuls les composés spécifiques seraient perçus et seraient donc préférés, mais qu'à plus haute concentration, la capacité sensorielle n'étant plus limitante, l'insecte pourrait réellement exprimer sa préférence vers les composés communs.

Dans le cadre de leur séjour scientifique à la Réunion, j'ai accompagné Teun Dekker et Sebastian Larsson Herrera dans des vergers de mangues afin de tester en condition réelle le potentiel de piégeage de l'attractif qu'ils ont développé associant des composés communs de fruits. Le piégeage s'est révélé infructueux, aussi nous avons conclu ensemble que le leurre devrait être complété par autre chose pour être efficace. Il est possible que cet attractif génère une attraction à faible distance seulement. Notre étude permet d'attribuer une fonction différente à certains composés : les composés communs de fruits sont attractifs à plus haute concentration que des composés spécifiques de fruits, qui eux sont attractifs à faible concentration. La concentration moyenne d'une odeur diminue avec la distance à la source (Celani et al., 2014; Cai et al., 2022), aussi il est possible que ces deux catégories de composés jouent des rôles différents selon la distance d'attraction et soient complémentaires. Dans notre étude, nous suggérons de concevoir un mélange avec des composés communs où l'on rajoute quelques composés spécifiques (spécificité liée à la spécificité des composés, la spécificité du fruit émetteur et/ ou la spécificité des réponses sensorielles) afin d'augmenter la sensibilité olfactive des mouches des fruits et leur distance d'attraction. Une solution simple serait de combiner le leurre de Teun Dekker avec quelques composés spécifiques des fruits les plus attractifs pour *Bactrocera dorsalis*, c'est-à-dire la mangue, la goyave ou le goyavier.

Par ailleurs, la conception d'un leurre n'est pas une tâche facile compte tenu des autres paramètres à maîtriser. Le ratio entre composés peut être une composante importante de leur attractivité envers un insecte (Bruce & Pickett, 2011). Dans le cas d'un attractif unique, comme lors de l'étude sur les phéromones de la mouche du melon à laquelle j'ai participé pendant ma thèse, nous avons reproduit le ratio naturel avec des composés synthétiques. Pour l'action des kairomones de fruits sur *Bactrocera dorsalis*, le ratio entre composés d'un mélange attractif est plus difficile à déterminer étant donné la diversité d'hôtes de cette espèce. En effet, utiliser les

ratios naturels n'est pas possible puisque le ratio d'un composé varie d'un fruit à un autre. Pour réaliser des tests comportementaux, nous avons homogénéisé les taux d'émission des différents composés qui constituent les mélanges testés. Une solution serait de tester plusieurs formulations avec des ratios et des doses différentes afin de comparer l'attractivité des différents mélanges. Cependant, il est possible que les ratios soient moins déterminants pour des espèces aussi polyphages, qui exploitent le même composé dans différents contextes d'émissions de fruits. Par ailleurs, une synergie éventuelle entre composés attractifs individuellement n'est pas automatique. La combinaison de deux composés attractifs peut donner un effet supérieur à la somme de chaque composé individuellement, tout comme cela peut ne pas l'être (Tasin et al., 2007). Rien qu'au niveau périphérique, il est possible que plusieurs composés activent le même ensemble de récepteurs, créant des redondances de fonctions qui ne peuvent pas être testées en EAG. Aussi, différents tests comportementaux peuvent être réalisés en éliminant un par un chaque composé et voir les effets que cela induit. Cela permet donc de tester l'importance de chaque composé dans le mélange, pour éventuellement simplifier un leurre vers une version plus facilement manufacturable.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abouheif, E. (1999). A method for testing the assumption of phylogenetic independence in comparative data. *Evolutionary Ecology Research*, 1(8), 895–909. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0238-5>
- Abuin, L., Bargeton, B., Ulbrich, M. H., Isacoff, E. Y., Kellenberger, S., & Benton, R. (2011). Functional Architecture of Olfactory Ionotropic Glutamate Receptors. *Neuron*, 69(1), 44–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.042>
- Adams, M. D., et al., & Venter, J. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287, 2185–2195. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
- Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S., & Gupta, R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 5575–5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Agelopoulos, N. G., & Pickett, J. A. (1998). Headspace analysis in chemical ecology: Effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in headspace samples. *Journal of Chemical Ecology*, 24(7), 1161–1172. <https://doi.org/10.1023/A:1022442818196>
- Alagarmalai, J., Nestel, D., Dragushich, D., Nemny-Lavy, E., Anshelevich, L., Zada, A., & Soroker, V. (2009). Identification of host attractants for the Ethiopian fruit fly, *Dacus ciliatus* loew. *Journal of Chemical Ecology*, 35(5), 542–551. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9636-2>
- Alborn, H. T., Bruton, R. G., & Beck, J. J. (2021). Sampling of Volatiles in Closed Systems : A Controlled Comparison of Three Solventless Volatile Collection Methods. *Journal of Chemical Ecology*, 47, 930–940. <https://doi.org/10.1007/s10886-021-01306-6>
- Allwood, A., Vueti, E., Leblanc, L., & Bull, R. (2002). Eradication of introduced *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) in Nauru using male annihilation and protein bait application techniques. In Veitch, C.R., Clout, M.N. (eds). *Turning the tide: The eradication of invasive species. Switzerland and Cambridge UK* (pp. 19–25).
- Aluja, M., & Prokopy, R. J. (1993). Host odour and visual stimulus interaction *Rhagoletis pomonella* flies. *Journal of Chemical Ecology*, 19(11), 2671–2696.
- Andersson, M. N., Löfstedt, C., & Newcomb, R. D. (2015). Insect olfaction and the evolution of receptor tuning. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00053>
- Andersson, M. N., Schlyter, F., Hill, S. R., & Dekker, T. (2012). What Reaches the Antenna ? How to Calibrate Odor Flux and Ligand- Receptor Affinities. *Chem. Senses*, 37, 403–420. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjs009>

- Angeli, S., Ceron, F., Scaloni, A., Monti, M., Monteforti, G., Minnocci, A., ... Pelosi, P. (1999). Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *European Journal of Biochemistry*, 262(3), 745–754. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00438.x>
- Arita, L. H., & Kaneshiro, K. Y. (1986). Structure and Function of the Rectal Epithelium and Anal Glands During Mating Behavior in the Mediterranean Fruit Fly Male. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, 25, 27–30. Retrieved from <https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/handle/10125/11187%0Ahttp://scholarspace.manoa.hawaii.edu/handle/10125/11187>
- Arn, H., Städler, E., & Rauscher, S. (1975). The Electroantennographic Detector — a Selective and Sensitive Tool in the Gas Chromatographic Analysis of Insect Pheromones. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 30(11–12), 722–725. <https://doi.org/10.1515/znc-1975-11-1204>
- Arnaud, L., Detrain, C., Gaspar, C., & Haubruge, E. (2003). Insectes et communication. *Le Journal Des Ingénieurs*.
- Babu, M. J., Ankolekar, S. M., & Rajashekhar, K. P. (2011). Castes of the weaver ant *Oecophylla smaragdina* (Fabricius) differ in the organization of sensilla on their antennae and mouthparts. *Current Science*, 101(6), 755–764.
- Badii, K. B., Billah, M. K., Afreh Nuamah, K., Obeng Ofori, D., & Nyarko, G. (2015). Review of the pest status, economic impact and management of fruit-infesting flies (Diptera: Tephritidae) in Africa. *African Journal of Agricultural Research*, 10(12), 1488–1498. <https://doi.org/10.5897/ajar2014.9278>
- Baker, T. C., & Cardé, R. T. (1984). Techniques for Behavioral Bioassays. In *Techniques in Pheromone Research* (eds H.E. Hummel & T.A. Miller), Springer (pp. 45–73). https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5220-7_2
- Baker, T. C., & Linn, C. E. (1984). Wind Tunnels in Pheromone Research. In *Techniques in Pheromone Research* (eds H.E. Hummel & T.A. Miller), Springer (pp. 75–110). https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5220-7_3
- Baldwin, I. T. (2010). Plant volatiles. *Current Biology*, 20(9), 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.052>
- Barzman, M., Bärberi, P., Birch, A. N. E., Hommel, B., Jensen, J. E., Kiss, J., Kudsk, P., Lamichhane, J. R., Messéan, A., Moonen, A.-C., Ratnadass, A., Sattin, & P. R., Sarah, J.-L., & Sattin, M. (2015). Eight principles of integrated pest management. *Agron. Sustain. Dev.* (2015), 35, 1199–1215. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0327-9>
- Basu, S., Clark, R. E., Fu, Z., Lee, B. W., & Crowder, D. W. (2021). Insect alarm pheromones in response to predators: Ecological trade-offs and molecular mechanisms. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 128, 103514. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103514>
- Bedini, S., Sarrocco, S., Baroncelli, R., Vannacci, G., & Conti, B. (2018). Pathogenic potential of *Beauveria pseudobassiana* as bioinsecticide in protein baits for the control of the medfly *ceratitis capitata*. *Bulletin of Insectology*, 71(1), 31–38.

- Benelli, G., Daane, K. M., Canale, A., Niu, C. Y., Messing, R. H., & Vargas, R. I. (2014). Sexual communication and related behaviours in Tephritidae: Current knowledge and potential applications for Integrated Pest Management. *Journal of Pest Science*, 87(3), 385–405. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0577-3>
- Benton, R., Sachse, S., Michnick, S. W., & Vosshall, L. B. (2006). Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biology*, 4(2), 240–257. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040020>
- Benton, R., Vannice, K. S., Gomez-Diaz, C., & Vosshall, L. B. (2009). Variant Ionotropic Glutamate Receptors as Chemosensory Receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136(1), 149–162. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.001>
- Bernays, E. A. (2001). Neural limitations in phytophagous insects: Implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annual Review of Entomology*, 46, 703–727. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.703>
- Beroza, M., Alexander, B. H., Steiner, L. F., Mitchell, W. C., & Miyashita, D. H. (1960). New Synthetic Lures for the Male Melon Fly. *Science*, 131(3406), 1044–1045. <https://doi.org/10.1126/science.131.3406.1044>
- Biasazin, T. D., Karlsson, M. F., Hillbur, Y., Seyoum, E., & Dekker, T. (2014). Identification of Host Blends that Attract the African Invasive Fruit Fly, *Bactrocera invadens*. *Journal of Chemical Ecology*, 40(9), 966–976. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0501-6>
- Biasazin, T. D., Chernet, H. T., Herrera, S. L., Bengtsson, M., Karlsson, M. F., Lemmen-Lechelt, J. K., & Dekker, T. (2018a). Detection of volatile constituents from food lures by tephritid fruit flies. *Insects*, 9(3), 14. <https://doi.org/10.3390/insects9030119>
- Biasazin, T. D., Larsson Herrera, S., Kimbokota, F., & Dekker, T. (2018b). Translating olfactomes into attractants: shared volatiles provide attractive bridges for polyphagy in fruit flies. *Ecology Letters*, 22(1), 108–118. <https://doi.org/10.1111/ele.13172>
- Blomberg, S. P., Garland, T., & Ives, A. R. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: Behavioral traits are more labile. *Evolution*, 57(4), 717–745. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00285.x>
- Blomquist, G. J., Jurenka, R., Schal, C., & Tittiger, C. (2012). *Pheromone Production: Biochemistry and Molecular Biology. Insect Endocrinology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384749-2.10012-3>
- Blumberg, M. S. (2017). Development evolving: the origins and meanings of instinct. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 8, 2. <https://doi.org/10.1002/wcs.1371>
- Bouchonnet, S., & Libong, D. (2004). Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *Actualité Chimique*, 7–14.
- Brossut, R. (1996). Pheromones: la communication chimique chez les animaux. Paris, CNRS Editions.
- Brown, W. L. (1968). An Hypothesis Concerning the Function of the Metapleural Glands in Ants. *The American Naturalist*, 102(924), 188–191.

- Brown, W. L., Eisner, T., & Whittaker, R. H. (1970). Allomones and Kairomones: Transspecific Chemical Messengers Allomones and Kairomones. *Source: BioScience*, 20(1), 21–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/1294753>
- Bruce, T. J. A., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. (2005). Insect host location : a volatile situation, 10(6). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.04.003>
- Bruce, T. J. A., & Pickett, J. A. (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects - Finding the right mix. *Phytochemistry*, 72(13), 1605–1611. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.011>
- Būda, V., Radžiūtė, S., Apšegaitė, V., Blažytė-čereškienė, L., Čepulytė, R., Bumbulytė, G., & Mozūraitis, R. (2022). Electroantennographic and Behavioural Responses of European Cherry Fruit Fly, *Rhagoletis cerasi*, to the Volatile Organic Compounds from Sour Cherry, *Prunus cerasus*, Fruit. *Insects*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/insects13020114>
- Bush, G. L. (1969). Sympatric Host Race Formation and Speciation in Frugivorous Flies of the Genus *Rhagoletis* (Diptera, Tephritidae). *Evolution*, 23(2), 237. <https://doi.org/10.2307/2406788>
- Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D., & Hecker, E. (1959). Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. *Zeitschrift Für Naturforschung*, 14(b), 283–284.
- Butterwick, J. A., del Marmol, J., Kim, K. H., Kahlson, M. A., Rogow, J. A., Walz, T., & Ruta, V. (2018). Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. *Nature*, 560(7719), 447–452. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0420-8>
- Cai, X., Guo, Y., Bian, L., Luo, Z., Li, Z., Xiu, C., ... Chen, Z. (2022). Variation in the ratio of compounds in a plant volatile blend during transmission by wind. *Scientific Reports*, 12(6176), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09450-z>
- Calatayud, P., Marion-poli, F., Thiéry, D., & Insectes, C. L. E. S. (2013). La réception sensorielle chez les insectes. In : *Sauvion N. (Ed.), Calatayud Paul-André (Ed.), Thiéry D. (Ed.), Marion-Pol F. (Ed.). Interactions Insectes - Plantes.*, 137–150.
- Candia, I. F., Bautista, V., Larsson Herrera, S., Walter, A., Ortuño Castro, N., Tasin, M., & Dekker, T. (2019). Potential of locally sustainable food baits and traps against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* in Bolivia. *Pest Management Science*, 75(6), 1671–1680. <https://doi.org/10.1002/ps.5286>
- Capelli, L., Sironi, S., & del Rosso, R. (2013). Odor sampling: Techniques and strategies for the estimation of odor emission rates from different source types. *Sensors (Switzerland)*, 13(1), 938–955. <https://doi.org/10.3390/s130100938>
- Cardé, R. T., & Minks, A. (1995). Control of Moth Pests by Mating Disruption: Successes and Constraints. *Annual Review of Entomology*, 40, 559–585. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.40.010195.003015>
- Cardé, R. T., & Willis, M. A. (2008). Navigational strategies used by insects to find distant, wind-borne sources of odor. *Journal of Chemical Ecology*, 34(7), 854–866. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9484-5>

- Cardé, R. T. (2021). Mating Disruption with Pheromones for Control of Moth Pests in Area-Wide Management Programmes. *CRC Press*, 779–794. <https://doi.org/10.1201/9781003169239-45>
- Carlson, D. A., Mayer, M. S., Silhacek, D. L., James, J. D., Beroza, M., & Bierl, B. A. (1971). Sex attractant pheromone of the house fly: Isolation, identification and synthesis. *Science*, 174(4004), 76–78. <https://doi.org/10.1126/science.174.4004.76>
- Carrasco, D., Larsson, M. C., & Anderson, P. (2015). Insect host plant selection in complex environments. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.014>
- Cates, R. G. (1980). Feeding patterns of monophagous, oligophagous, and polyphagous insect herbivores: the effect of resource abundance and plant chemistry. *Oecologia*, 46(1), 22–31.
- Celani, A., Villermaux, E., & Vergassola, M. (2014). Odor landscapes in turbulent environments. *Physical Review X*, 4(0410115), 1–17. <https://doi.org/10.1103/PhysRevX.4.041015>
- Cha, D. H., Powell, T. H. Q., Feder, J. L., & Linn, C. E. (2011). Identification of Host Fruit Volatiles from Three Mayhaw Species (*Crataegus* Series *Aestivales*) Attractive to Mayhaw-Origin *Rhagoletis pomonella* Flies in the Southern United States. *Journal of Chemical Ecology*, 37(9), 961–973. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-0013-6>
- Cha, D. H., Yee, W. L., Goughnour, R. B., Sim, S. B., Powell, T. H. Q., Feder, J. L., & Linn, C. E. (2012). Identification of Host Fruit Volatiles from Domestic Apple (*Malus domestica*), Native Black Hawthorn (*Crataegus douglasii*) and Introduced Ornamental Hawthorn (*C. monogyna*) Attractive to *Rhagoletis pomonella* Flies from the Western United States. *Journal of Chemical Ecology*, 38(3), 319–329. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0087-9>
- Chamberlain, K., Khan, Z. R., Pickett, J. A., Toshova, T., & Wadhams, L. J. (2006). Diel periodicity in the production of green leaf volatiles by wild and cultivated host plants of stemborer moths, *Chilo partellus* and *Busseola fusca*. *Journal Of Chemical Ecology*, 32(3), 565–577. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-9016-5>
- Chapman, R. F. (1982). Chemoreception: The Significance of Receptor Numbers. *Advances in Insect Physiology*, 16, 247–356. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60155-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60155-1)
- Charlery de la Masselière, M., Facon, B., Hafsi, A., & Duyck, P. F. (2017a). Diet breadth modulates preference - performance relationships in a phytophagous insect community. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17231-2>
- Charlery de la Masselière, M., Ravigné, V., Facon, B., Lefeuvre, P., Massol, F., Quilici, S., & Duyck, P. F. (2017b). Changes in phytophagous insect host ranges following the invasion of their community: Long-term data for fruit flies. *Ecology and Evolution*, 7(14), 5181–5190. <https://doi.org/10.1002/ece3.2968>
- Chemat, F., & Boutekedjiret, C. (2015). Extraction // Steam Distillation. *Chemistry Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11557-4>

- Chieng, A. C., Hee, A. K., & Wee, S. (2018). Involvement of the Antennal and Maxillary Palp Structures in Detection and Response to Methyl Eugenol by Male *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Science*, XX(X), 1–5. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iey104>
- Christenson, L. D., & Foote, R. H. (1960). Biology of Fruit Fly. *Annual Review of Entomology*, 5, 171–192. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.05.010160.001131>
- Chueca, P., Montón, H., Ripollés, J. L., Castañera, P., Moltó, E., & Urbaneja, A. (2007). Spinosad bait treatments as alternative to malathion to control the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in the Mediterranean Basin. *Journal of Pesticide Science*, 32(4), 407–411. <https://doi.org/10.1584/jpestics.G07-26>
- Clarke, A. R. (2017). Why so many polyphagous fruit flies (Diptera: Tephritidae)? A further contribution to the “generalism” debate. *Biological Journal of the Linnean Society*, 120(2), 245–257. <https://doi.org/10.1111/bij.12880>
- Clyne, P. J., Warr, C. G., Freeman, M. R., Lessing, D., Kim, J., & Carlson, J. R. (1999). A Novel Family of Divergent Seven-Transmembrane Proteins. *Neuron*, 22(2), 327–338. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81093-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81093-4)
- Conchou, L., Lucas, P., Meslin, C., Proffit, M., Staudt, M., & Renou, M. (2019). Insect odorscapes: From plant volatiles to natural olfactory scenes. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00972>
- Conchou, L., Lucas, P., Deisig, N., Demondion, E., & Renou, M. (2021). Effects of multi-component backgrounds of volatile plant compounds on moth pheromone perception. *Insects*, 12, 1–25. <https://doi.org/10.3390/insects12050409>
- Cook, S. M., Khan, Z. R., & Pickett, J. A. (2007). The Use of Push-Pull Strategies in Integrated Pest Management. *Annual Review of Entomology*, 52(1), 375–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091407>
- Cossé, A. A., Todd, J. L., Millar, J. G., Martínez, L. A., & Baker, T. C. (1995). Electroantennographic and coupled gas chromatographic-electroantennographic responses of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, to male-produced volatiles and mango odor. *Journal of Chemical Ecology*, 21(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1007/BF02033679>
- Croset, V., Rytz, R., Cummins, S. F., Budd, A., Brawand, D., Kaessmann, H., Gibson, T. J., & Benton, R. (2010). Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. *PLoS Genetics*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001064>
- Crowley-Gall, A., Date, P., Han, C., Rhodes, N., Andolfatto, P., Layne, J. E., & Rollmann, S. M. (2016). Population differences in olfaction accompany host shift in *Drosophila mojavensis*. *Proc. R. Soc. B* 283, 283, 9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2016.1562>
- Cruz-López, L., Malo, E. A., Toledo, J., Virgen, A., Del Mazo, A., & Rojas, J. C. (2006). A new potential attractant for *Anastrepha obliqua* from *Spondias mombin* fruits. *Journal of Chemical Ecology*, 32(2), 351–365. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-9006-7>

- Cui, Z., Si, P., Liu, L., Chen, S., Wang, Y., Li, X., Zhou, J. J., & Zhou, Q. (2022). Push-pull strategy for integrated control of *Bactrocera minax* (Diptera, Tephritidae) based on olfaction and vision. *Journal of Applied Entomology*, *146*, 1243–1251. <https://doi.org/10.1111/jen.13067>
- Culliney, T. W. (2014). Crop Losses to Arthropods. In *Integrated Pest Management: Pesticide Problems, Vol. 3* (Pimentel, D., and Peshin, R., eds), pp. 201–225. Dordrecht, Netherlands: Springer (pp. 201–225). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5>
- Cunningham, J. P., Carlsson, M. A., Villa, T. F., Dekker, T., & Clarke, A. R. (2016). Do Fruit Ripening Volatiles Enable Resource Specialism in Polyphagous Fruit Flies? *Journal of Chemical Ecology*, *42*(9), 931–940. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0752-5>
- Dalby-Ball, G., & Meats, A. (2000). Effects of fruit abundance within a tree canopy on the behaviour of wild and cultured Queensland fruit flies, *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera:Tephritidae). *Australian Journal of Entomology*, *39*, 201–207. <https://doi.org/10.1046/j.1440-6055.2000.00167.x>
- Dandeneau, R. D., & Zerenner, E. H. (1979). An Investigation of Glasses for Capillary Chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, *2*, 351–356. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jhrc.1240020617>
- Daniel, C., & Wyss, E. (2010). Field applications of *Beauveria bassiana* to control the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi*. *Journal of Applied Entomology*, *134*, 675–681. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01486.x>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2 : more models , new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, *9*(8), 1. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Darwin, C. (1871). The descent of man and selection in relation to sex. London, UK: John Murray.
- David, C., Kennedy, J., & Ludlow, A. (1983). Finding of a sex pheromone source by gypsy moths released in the field. *Nature*, *303*, 804–806. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/303804a0>
- Davis, T. S., Crippen, T. L., Hofstetter, R. W., & Tomberlin, J. K. (2013). Microbial Volatile Emissions as Insect Semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, *39*, 840–859. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0306-z>
- de Belle, J., & Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science*, *263*(5147), 692–695. <https://doi.org/10.1126/science.8303280>
- de Bruyne, M., Clyne, P., & Carlson, J. R. (1999). Odor coding in a model olfactory organ: The *Drosophila* maxillary palp. *Journal of Neuroscience*, *19*(11), 4520–4532. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-11-04520.1999>
- de Bruyne, M., Foster, K., & Carlson, J. R. (2001). Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron*, *30*(2), 537–552. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00289-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00289-6)

- de Bruyne, M., & Warr, C. G. (2006). Molecular and cellular organization of insect chemosensory neurons. *BioEssays*, 28(1), 23–34. <https://doi.org/10.1002/bies.20338>
- de Bruyne, M., & Baker, T. C. (2008). Odor detection in insects: Volatile codes. *Journal of Chemical Ecology*, 34(7), 882–897. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9485-4>
- de Fouchier, A., Walker, W. B., Montagné, N., Steiner, C., Binyameen, Muhammad Schlyter, F., Chertemps, T., Maria, A., François, M.-C., Monsempes, C., Anderson, P., Hansson, B. S., Larsson, M. C., & Jacquin-Joly, E. (2017). Functional evolution of Lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. *Nature Communications*, 8(15709), 11. <https://doi.org/10.1038/ncomms15709>
- de Meyer, M. (2001). On the identity of the Natal fruit fly *Ceratitis rosa* KARSCH (Diptera, Tephritidae). *Entomologie*, 71, 55–62. Retrieved from http://biblio.naturalsciences.be/rbins-publications/bulletins-de-linstitut-royal-des-sciences-naturelles-de-belgique-entomologie/bulletin-of-the-royal-belgian-institute-of-natural-sciences-entomology/71-2001/entomologie-71-2001_55-62.pdf
- de Meyer, M, Copeland, R. S., Wharton, R. A., & McPheron, B. A. (2004). On the geographic origin of the Medfly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Proceedings of the 6th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*, 45–53.
- de Meyer, M, & Freidberg, A. (2012). Taxonomic revision of the fruit fly genus *Neoceratitis* Hendel (Diptera: Tephritidae). *Zootaxa*, 3323, 24–39. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3223.1.2>
- de Meyer, M., Quilici, S., Franck, A., Chadhouliati, A. C., Issimaila, M. A., Youssoufa, M. A., Abdoul-Karime, A. L., Barbet, A., Attié, M., & White, I. M. (2012). Records of frugivorous fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacini) from the Comoro archipelago. *African Invertebrates*, 53(1), 1–10. <https://doi.org/10.5733/afin.053.0104>
- de Meyer, M, Mwatawala, M., Copeland, R. S., & Virgilio, M. (2016). Description of new *Ceratitis* species (Diptera: Tephritidae) from Africa, or how morphological and DNA data are complementary in discovering unknown species and matching sexes. *European Journal of Taxonomy*, 2016(233), 1–23. <https://doi.org/10.5852/ejt.2016.233>
- Deguine, J.-P., Ferron, P., & Russel, D. (2008). Protection des cultures: De l'agrochimie à l'agroécologie. *Ed. Quae. Versailles*, 192.
- Deguine, J.-P., Augusseau, X., Insa, G., Jolet, M., Le Roux, K., Marquier, M., Rouse, P., Roux, E., Soupapoullé, Y., & Suzanne, W. (2013). Gestion Agroécologique des Mouches des fruits à La Réunion, GAMOUR. *Innovations Agronomiques*, 28, 59–74.
- Deguine, J.-P., Atiama-Nurbel, T., Douraguia, E., & Rouse, P. (2011a). L'augmentorium, un outil de protection agroécologique des cultures: Conception et évaluation en milieu paysan de l'île de La Réunion. *Cahiers Agricultures*, 20, 261–265. <https://doi.org/10.1684/agr.2011.0488>
- Deguine, J.-P., Atiama-Nurbel, T., & Quilici, S. (2011b). Net choice is key to the augmentorium technique of fruit fly sequestration and parasitoid release. *Crop Protection*, 30(2), 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.10.007>

- Deguine, J.-P., Atiama-Nurbel, T., Aubertot, J.-N., Augusseau, X., Atiama, M., Jacquot, M., & Reynaud, B. (2015). Agroecological management of cucurbit-infesting fruit fly : a review. *Agron. Sustain. Dev.* <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0290-5>
- Deguine, J.-P., Gloanec, C., Laurent, P., Ratnadass, A., & Aubertot, J. N. (2016). Protection agroécologique des cultures. *Ed. Quae. Versailles*, 288.
- Dekker, T., Ibba, I., Siju, K. P., Stensmyr, M. C., & Hansson, B. S. (2006). Report Olfactory Shifts Parallel Superspecialism for Toxic Fruit in *Drosophila melanogaster* Sibling , D . sechellia. *Current Biology*, *16*, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.075>
- Delrio, G., & Cocco, A. (2012). The peach fruit fly, *Bactrocera zonata*: A major threat for Mediterranean fruit crops? In *Acta Horticulturae* (Vol. 940, pp. 557–566). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.940.80>
- Derby, C. D., & Sorensen, P. W. (2008). Neural Processing , Perception , and Behavioral Responses to Natural Chemical Stimuli by Fish and Crustaceans. *J Chem Ecol*, *34*, 898–914. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9489-0>
- Deschepper, P., Vanbergen, S., Zhang, Y., Li, Z., Hassani, I. M., Patel, N. A., Rasolofoarivao, H., Singh, S., Wee, S. L., De Meyer, M., Virgilio, M., & Delatte, H. (2022). *Bactrocera dorsalis* in the Indian Ocean: A tale of two invasions. *Evolutionary Applications*, 48–61. <https://doi.org/10.1111/eva.13507>
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. (2007). The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annual Review OfEntomology*, *52*, 81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Dhillon, M., Singh, R., Naresh, J., & Sharma, H. (2005). The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* : a review of its biology and management. *Journal of Insect Science*, *5*(December 2005), 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jis/5.1.40>
- Díaz-Fleischer, F., & Aluja, M. (1999). Behavior of tephritid flies: A historical perspective. In *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior* (pp. 39–70). <https://doi.org/10.1201/9781420074468>
- Dimbi, S., Maniania, N. K., & Ekesi, S. (2013). Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* in fruit flies and effect of fungal infection on egg laying and fertility. *Insects*, *4*, 206–216. <https://doi.org/10.3390/insects4020206>
- Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A., Ekesi, S., & Mueke, J. K. (2003). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walk. *Mycopathologia*, *156*, 375–382. <https://doi.org/10.1023/B:MYCO.0000003579.48647.16>
- Dolinski, C. (2016). Entomopathogenic nematodes against the main guava insect pests. *BioControl*, *61*, 325–335. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9695-y>
- Döring, T. F., & Chittka, L. (2007). Visual ecology of aphids - a critical review on the role of colours in host finding. *Arthropod Plant Interact*, *1*, 3–16. <https://doi.org/10.1007/s11829-006-9000-1>

- Drew, R. A. I., & Hooper, G. H. S. (1981). The responses of fruit fly species (Diptera: Tephritidae) in Australia to various attractants. *Australian Journal of Entomology*, 20(3), 201–205. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.1981.tb01032.x>
- Drew, R. A. I., Courtice, A. C., & Teakle, D. S. (1983). Bacteria as a natural source of food for adult fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Oecologia (Berlin)*, 60(3), 279–284. <https://doi.org/10.1007/bf00376839>
- Drew, R. A. I. (1987). Behavioural strategies of fruit flies of the genus *Dacus* (Diptera: Tephritidae) significant in mating and host-plant relationships. *Bulletin of Entomological Research*, 77(1), 73–81. <https://doi.org/10.1017/S000748530001155X>
- Drew, R. A. I., & Romig, M. C. (1999). The biology and behavior of flies in the tribe Dacini (Dacinae). In *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior* (pp. 535–546). <https://doi.org/10.1201/9781420074468>
- Drew, R. A. I., Tsuruta, K., & White, I. M. (2005). A new species of pest fruit fly (Diptera: Tephritidae: Dacinae) from Sri Lanka and Africa. *African Entomology*, 13(1), 149–154.
- Dubois, J. (1965). La mouche des fruits malgache et autres insectes des agrumes, pêchers et pruniers à Madagascar. *Fruits*, 435–460.
- Duyck, P.-F., & Quilici, S. (2002). Survival and development of different life stages of three *Ceratitis* spp. (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures. *Bulletin of Entomological Research*, 92(6), 461–469. <https://doi.org/10.1079/ber2002188>
- Duyck, P.-F., Sterlin, J. F., & Quilici, S. (2004). Survival and development of different life stages of *Bactrocera zonata* (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures compared to other fruit fly species. *Bulletin of Entomological Research*, 94, 89–93. <https://doi.org/10.1079/BER2003285>
- Duyck, P.-F., David, P., & Quilici, S. (2006). Climatic niche partitioning following successive invasions by fruit flies in La Réunion. *Journal of Animal Ecology*, 75(2), 518–526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2006.01072.x>
- Duyck, P.-F., Jourdan, H., & Mille, C. (2022). Sequential invasions by fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Pacific and Indian Ocean islands: A systematic review. *Ecology and Evolution*, 12(e8880), 1–10. <https://doi.org/10.1002/ece3.8880>
- Dweck, H. K. M., Ebrahim, S. A. M., Khallaf, M. A., Koenig, C., Farhan, A., Stieber, R., Weißflog, J., Svatos, A., Grosse-Wilde, E., Knaden, M., & Hansson, B. S. (2016). Olfactory channels associated with the *Drosophila* maxillary palp mediate short- and long-range attraction. *eLife*, 5(e14925), 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.14925>
- Dweck, H. K. M., Ebrahim, S. A. M., Retzke, T., Grabe, V., Weißflog, J., Svatoš, A., Hansson, B. S., & Knaden, M. (2018). The Olfactory Logic behind Fruit Odor Preferences in Larval and Adult *Drosophila*. *Cell Reports*, 23(8), 2524–2531. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.085>
- Edwards, C. A., & Thompson, A. R. (1975). Some effects of insecticides on predatory beetles. *Ann. Appl. Biol.*, 80(1), 132–135. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1975.tb01613.x>

- Eigenbrode, S. D., Birch, A. N. E., Lindzey, S., Meadow, R., & Snyder, W. E. (2016). A mechanistic framework to improve understanding and applications of push-pull systems in pest management. *Journal of Applied Ecology*, *53*(1), 202–212. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12556>
- Eirín-López, J. M., Rebordinos, L., Rooney, A. P., & Rozas, J. (2012). The birth-and-death evolution of multigene families revisited. *Genome Dynamics*, *7*, 170–196. <https://doi.org/10.1159/000337119>
- Ekesi, S., & Billah, M. K. (2006). A field guide to the management of economically important tephritid fruit flies in Africa. *Management of Economically Important Tephritid*, 557. Retrieved from <https://www.nhbs.com/a-field-guide-to-the-management-of-economically-important-tephritid-fruit-flies-in-africa-book%0Ahttp://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/661%0Ahttp://www.cabdirect.org/abstracts/20067203855.html%0Ahttps://www.nhbs.com/a-field-gui>
- Ekesi, S., Maniania, N. K., & Mohamed, S. A. (2011). Efficacy of soil application of *Metarhizium anisopliae* and the use of gf-120 spinosad bait spray for suppression of *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) in mango orchards. *Biocontrol Science and Technology*, *21*(3), 299–316. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.545871>
- Ekesi, Sunday, de Meyer, M., Mohamed, S. A., Virgilio, M., & Borgemeister, C. (2016). Taxonomy, Ecology, and Management of Native and Exotic Fruit Fly Species in Africa. *Annual Review of Entomology*, *61*, 219–238. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023603>
- El-Ghany, N. M. A. (2019). Semiochemicals for controlling insect pests. *Journal of Plant Protection Research*, *59*(1), 1–11. <https://doi.org/10.24425/jppr.2019.126036>
- El-Sayed, A. M., Suckling, D. M., Wearing, C. H., & Byers, J. A. (2006). Potential of mass trapping for long-term pest management and eradication of invasive species. *Journal of Economic Entomology*, *99*(5), 1550–1564. <https://doi.org/10.1093/jee/99.5.1550>
- Elgar, M. A., Zhang, D., Wang, Q., Wittwer, B., Pham, H. T., Johnson, T. L., Freelance, C. B., & Coquilleau, M. (2018). Insect antennal morphology: The evolution of diverse solutions to odorant perception. *Yale Journal of Biology and Medicine*, *91*(4), 457–469.
- Emlen, S. T., & Oring, L. W. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, *197*(4300), 215–223.
- Enkerlin, W., & Mumford, J. (1997). Economic Evaluation of Three Alternative Methods for Control of the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in Israel, Palestinian Territories, and Jordan. *Journal of Economic Entomology*. <https://doi.org/10.1093/jee/90.5.1066>
- Epsky, N. D., & Heath, R. R. (1998). Exploiting the interactions of chemical and visual cues in behavioral control measures for pest tephritid fruit flies. *Fla Entomol*, *81*, 273–282.
- Etienne, J. (1972). Les principales Trypétides nuisibles de l'île de La Réunion. *Annales de La Société Entomologique de France*, *8*, 485–491.
- Etienne, J. (1982). Etude systématique, faunistique et écologique des Tephritides de La

Réunion. *Thèse de l'Ecole Pratique Des Hautes Etudes, Paris.*

- Feder, J. L., & Fichak, K. E. (1999). It's about time : the evidence for host plant-mediated selection in the apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella* , and its implications for fitness trade-offs in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91, 211–225.
- Finch, S., & Collier, r. h. (2008). Host Plant Selection by Insects. In: *Capinera, J.L. (Eds) Encyclopedia of Entomology. Springer, Dordrecht.*, 1863–1873.
- Fişek, M., & Wilson, R. I. (2014). Stereotyped connectivity and computations in higher order olfactory neurons. *Nat Neurosci*, 17(2), 280–288. <https://doi.org/10.1038/nn.3613>. Stereotyped
- Fitt, G. P. (2006). Oviposition behaviour of two tephritid fruit flies, *Dacus tryoni* and *Dacus jarvisi*, as influenced by the presence of larvae in the host fruit. *Oecologia (Berlin)*, 62(1984), 37–46. <https://doi.org/10.1007/bf00377370>
- Fletcher, B. S. (1968). Storage and release of a sex pheromone by the Queensland fruit fly, *Dacus tryoni* (diptera: Trypetidae). *Nature*, 219(5154), 631–632. <https://doi.org/10.1038/219631a0>
- Fletcher, B. S. (1987). The biology of Dacine fruit flies. *Annual Review of Entomology. Vol. 32*, 32, 115–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.32.010187.000555>
- Fornasari, L. (2008). Host Specificity of Weed-Feeding Insects. In: *Capinera, J.L. (Eds) Encyclopedia of Entomology. Springer, Dordrecht.*, 1873–1877. <https://doi.org/10.1201/b10187-39>
- Fox, L. R., & Morrow, P. A. (1981). Specialization: Species Property or Local Phenomenon? *Science*, 211(4485), 887–893.
- Franck, A., Deguine, J.-P., & Vincenot, D. (2018). Guide de reconnaissance des Mouches des fruits et des légumes. Application de la protection agroécologique des cultures. *Chambre d'agriculture de La Réunion, CIRAD (Eds)*, 38.
- Frings, H., & Frings, M. (1956). The Loci of Contact Chemoreceptors Involved in Feeding Reactions in Certain Lepidoptera. *The Biological Bulletin*. Woods Hole, Mass, Marine Biological Laboratory,. <https://doi.org/10.2307/1538834>
- Froerer, K. M., Peck, S. L., Mcquate, G. T., Vargas, R. I., Jang, E. B., & Mcinnis, D. O. (2010). Long-Distance Movement of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in Puna, Hawaii: How far can they go? *American Entomologist*, 56(2), 88–95. <https://doi.org/10.1093/ae/56.2.88>
- Furio, M., Bernardes, F., Pazin, M., Pereira, L. C., & Dorta, D. J. (2015). Impact of Pesticides on Environmental and Human Health. *Toxicology Studies-Cells, Drugs and Environment*, 195–233. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/59710> 1.
- Galindo, K., & Smith, D. P. (2001). A large family of divergent *Drosophila* odorant-binding proteins expressed in gustatory and olfactory sensilla. *Genetics*, 159(3), 1059–1072. <https://doi.org/10.1093/genetics/159.3.1059>

- Galvani, G. L., González, A., Roig-Alsina, A. H., & Settembrini, B. P. (2012). Distribution and morphometric studies of flagellar sensilla in Emphorini bees (Hymenoptera, Apoidea). *Micron*, *43*(5), 673–687. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.12.003>
- Gao, Q., & Chess, A. (1999). Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence. *Genomics*, *60*(1), 31–39. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5894>
- Gavriel, S., Jurkevitch, E., Gazit, Y., & Yuval, B. (2011). Bacterially enriched diet improves sexual performance of sterile male Mediterranean fruit flies. *Journal of Applied Entomology*, *135*(7), 564–573. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01605.x>
- Gibbs, A. G., & Crockettj, E. L. (1998). The biology of lipids: integrative and comparative perspectives. *American Zoologist*, *38*(2), 265–267. <https://doi.org/10.1093/icb/38.2.265>
- Gill, H. K., & Garg, H. (2014). Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. In Larramendy M & Soloneski S (eds), *Pesticides – Toxic aspects*. London: IntechOpen (pp. 187–230). Retrieved from <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
- Gill, K. P., van Wilgenburg, E., Macmillan, D. L., & Elgar, M. A. (2013). Density of antennal sensilla influences efficacy of communication in a social insect. *American Naturalist*, *182*(6), 834–840. <https://doi.org/10.1086/673712>
- Goh, S. H., Ooi, K. E., Chuah, C. H., Yong, H. S., Khoo, S. G., & Ong, S. H. (1993). Cuticular hydrocarbons from two species of Malaysian *Bactrocera* fruit flies. *Biochemical Systematics and Ecology*, *21*(2), 215–226. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90039-T](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90039-T)
- Goodner, K., & Rouseff, R. (2011). *Practical Analysis of Flavor and Fragrance Materials*. Wiley, 219. <https://doi.org/10.1002/9781444343137>
- Göpfert, M. C., & Robert, D. (2002). The mechanical basis of *Drosophila* audition. *Journal of Experimental Biology*, *205*(9), 1199–1208. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.9.1199>
- Gouinguéné, S., De Cruz, I., Van Der Pers, J., Wadhams, L., & Marion-Poll, F. (1998). A new method to improve olfactory responses to GC effluents. *Chemical Senses*, *23*(6), 647–652. <https://doi.org/10.1093/chemse/23.6.647>
- Guo, S., & Kim, J. (2007). Molecular evolution of *Drosophila* odorant receptor genes. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(5), 1198–1207. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm038>
- Hafsi, A., Facon, B., Ravigné, V., Chiroleu, F., Quilici, S., Chermiti, B., & Duyck, P. F. (2016). Host plant range of a fruit fly community (Diptera: Tephritidae): Does fruit composition influence larval performance? *BMC Ecology*, *16*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12898-016-0094-8>
- Hallem, E. A., Ho, M. G., & Carlson, J. R. (2004). The Molecular Basis of Odor Coding in the *Drosophila* Antenna. *Cell*, *117*, 965–979. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.012>
- Hallem, E. A., & Carlson, J. R. (2006). Coding of Odors by a Receptor Repertoire. *Cell*, *125*(1),

- 143–160. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.050>
- Hansson, B. S., & Stensmyr, M. C. (2011). Evolution of insect olfaction. *Neuron.*, *72*(5), 698–711. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.003>
- Hassani, M. I., Raveloson-Ravaomanarivo, L. H., Delatte, H., Chiroleu, F., Allibert, A., Nouhou, S., Quilici, S., & Duyck, P.-F. (2016). Invasion by *Bactrocera dorsalis* and niche partitioning among tephritid species in Comoros. *Bulletin of Entomological Research*, *106*(6), 749–758. <https://doi.org/10.1017/S0007485316000456>
- Heath, R. R., Manukian, A., Epsky, N. D., Sivinski, J., Calkins, C. O., & Landolt, P. J. (1993). A bioassay system for collecting volatiles while simultaneously attracting tephritid fruit flies. *Journal of Chemical Ecology*, *19*(10), 2395–2410.
- Heath, R. R., & Manukian, A. (1994). An automated system for use in collecting volatile chemicals released from plants. *J Chem Ecol*, *20*, 593–608. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02059600>
- Held, M., Turlings, T. C. J., Gershenzon, J., Schnee, C., & Ko, T. G. (2006). The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Pnas*, *103*(4), 1129–1134. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508027103>
- Herth, A. (2011). Le bio-contrôle pour la protection des cultures. 15 recommandations pour soutenir les technologies vertes. *Rapport Au Prelier Ministre François Fillon*, 155.
- Hickner, P. V, Rivaldi, C. L., Johnson, C. M., Siddappaji, M., & Raster, G. J. (2016). The making of a pest: Insights from the evolution of chemosensory receptor families in a pestiferous and invasive fly, *Drosophila suzukii*. *BMC Genomics*, *17*(648), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2983-9>
- Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., Van Der Bank, M., ..., & Fazekas, A. J. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(106), 12794–12797.
- Hong, T. K., & Nishida, R. (1998). Ecological significance of male attractant in the defence and mating strategies of the fruit fly, *Bactrocera papayae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *89*, 155–158. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00394.x>
- Howlett, F. M. (1912). The effect of Oil of *Citronella* on two species of *Dacus*. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, *60*(2), 412–418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1912.tb03101.x>
- Howlett, F. M. (1915). Chemical reactions of Fruit-Flies. *Bulletin of Entomological Research*, *6*(3), 297–305.
- Hu, F., Zhang, G.-N., Jia, F.-X., Dou, W., & Wang, J.-J. (2010). Morphological Characterization and Distribution of Antennal Sensilla of Six Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *103*(4), 661–670. <https://doi.org/10.1603/an09170>

- Hughes, G. M., Boston, E. S. M., Finarelli, J. A., Murphy, W. J., Higgins, D. G., & Teeling, E. C. (2018). The birth and death of olfactory receptor gene families in Mammalian niche adaptation. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1390–1406. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy028>
- Hurtrel, B., Quilici, S., Jeuffrault, E., Manikom, R., Georger, S., & Gourdon, F. (2002). Etat de siège contre la mouche de la pêche, *Bactrocera zonata* : bilan des opérations de deux années de lutte menées à la Réunion. *Phytoma-La Défense Des Végétaux*, *551*, 18–21.
- Hutchinson, G. E. (1957). Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposya on Quantitative Biology*, *22*, 415–427. <https://doi.org/10.1101/SQB.1957.022.01.039>
- Igor, F., Hapuarachchi, H. C., Tien, W.-P., Razak, M. A. B. A., Lee, C., Tan, C. H., Devine, G. J., & Rašić, G. (2020). Using spatial genetics to quantify mosquito dispersal for control programs. *BMC Biology*, *18*(104), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12915-020-00841-0>
- Il'ichev, A. L., Stelinski, L. L., Williams, D. G., & Gut, L. J. (2006). Sprayable microencapsulated sex pheromone formulation for mating disruption of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Australian Peach and Pear Orchards. *Journal of Economic Entomology*, *99*(6), 2048–2054. <https://doi.org/10.1093/jee/99.6.2048>
- Ishaq, M., Usman, M., Asif, M., & Khan, I. A. (2004). Integrated Pest Management of Mango against Mealy Bug and Fruit Fly. *International Journal of Agriculture and Biology*, *6*, 452–454.
- Jacob, V., Scolari, F., Delatte, H., Gasperi, G., Jacquin-Joly, E., Malacrida, A. R., & Duyck, P. F. (2017). Current source density mapping of antennal sensory selectivity reveals conserved olfactory systems between tephritids and *Drosophila*. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15431-4>
- Jacob, V. (2018). Current source density analysis of electroantennogram recordings : a tool for mapping the olfactory response in an insect antenna. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(287), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00287>
- Jaffar, S., & Lu, Y. (2022). Toxicity of Some Essential Oils Constituents against Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Insects*, *13*(954), 9.
- Jaleel, W., He, Y., & Lü, L. (2019). The response of two *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) to fruit volatiles. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *22*(3), 758–765. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.05.011>
- James, A. T., & Martin, A. J. P. (1952). Gas-liquid partition chromatography. A technique for the analysis of volatile materials. *Internation Congress on Analytical Chemistry*, *77*, 915–932.
- Jang, E. B., Carvalho, L. A., & Stark, J. D. (1997). Attraction of female oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, to volatile semiochemicals from leaves and extracts of a nonhost plant, *Panax (Polyscias guilfoylei)* in laboratory and olfactometer assays. *Canadian Field-Naturalist*, *111*(1), 1389–1401. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006471.46161.8d>

- Jang, Eric B., Raw, A. S., & Carvalho, L. A. (2001). Field attraction of Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) to synthetic stereoselective enantiomers of the ceralure B1 isomer. *Journal of Chemical Ecology*, 27(2), 235–242. <https://doi.org/10.1023/A:1005620203504>
- Jessup, A. J., Dominiak, B., Woods, B., De Lima, C. P. F., Tomkins, A., & Smallridge, C. J. (2007). Area-wide management of fruit flies in Australia. In *Area-wide control of insect pests: from research to field implementation*. Springer Netherlands. (pp. 685–697). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5>
- Jombart, T., Pavoine, S., Devillard, S., & Pontier, D. (2010). Putting phylogeny into the analysis of biological traits: A methodological approach. *Journal of Theoretical Biology*, 264(3), 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.03.038>
- Kaissling, K. E. (1971). Insect olfaction. *Handbook of Sensory Physiology*, 351–431.
- Kamala Jayanthi, P. D., Woodcock, C. M., Caulfield, J., Birkett, M. A., & Bruce, T. J. A. (2012). Isolation and identification of host cues from mango, *Mangifera indica*, that attract gravid female oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Journal of Chemical Ecology*, 38(4), 361–369. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0093-y>
- Kamala Jayanthi, P. D., Kempraj, V., Aurade, R. M., Venkataramanappa, R. K., Nandagopal, B., Verghese, A., & Bruce, T. J. A. (2014). Specific Volatile Compounds from Mango Elicit Oviposition in Gravid *Bactrocera dorsalis* Females. *Journal of Chemical Ecology*, 40(3), 259–266. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0403-7>
- Kamala Jayanthi, P. D., Saravan Kumar, P., & Vyas, M. (2021). Odour Cues from Fruit Arils of *Artocarpus heterophyllus* Attract both Sexes of Oriental Fruit Flies. *Journal of Chemical Ecology*, 552–563. <https://doi.org/10.1007/s10886-021-01269-8>
- Kamali, S., Karimi, J., Hosseini, M., Campos-Herrera, R., & Duncan, L. W. (2013). Biocontrol potential of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* on cucurbit fly, *Dacus ciliatus* (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Science and Technology*, 23(11), 1307–1323. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.835790>
- Karageorgi, M., Bräcker, L. B., Lebreton, S., Minervino, C., Cavey, M., Siju, K. P., Kadow, I. C. G., Gompel, N., & Prud'homme, B. (2017). Evolution of Multiple Sensory Systems Drives Novel Egg-Laying Behavior in the Fruit Pest *Drosophila suzukii*. *Current Biology*, 27, 847–853. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.055>
- Karlson, P., & Lüscher, M. (1959). “Pheromones”: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183(4653), 55–56.
- Katsoyannos, B. I., Boller, E., & Remund, U. (1980). A simple olfactometer for the investigation of sex pheromones and other olfactory attractants in fruit flies and moths. *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 90(1–5), 105–112. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1980.tb03508.x>
- Kaupp, U. B. (2010). Olfactory signalling in vertebrates and insects: Differences and commonalities. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(3), 188–200. <https://doi.org/10.1038/nrn2789>

- Keesey, I. W., Knaden, M., & Hansson, B. S. (2015). Olfactory Specialization in *Drosophila suzukii* Supports an Ecological Shift in Host Preference from Rotten to Fresh Fruit. *Journal of Chemical Ecology*, *41*(2), 121–128. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0544-3>
- Keesey, I. W., Grabe, V., Gruber, L., Koerte, S., Obiero, G. F., Bolton, G., Khallaf, M. A., Kunert, G., Lavista-Llanos, S., Valenzano, D. R., Rybak, J., Barrett, B. A., Knaden, M., & Hansson, B. S. (2019). Inverse resource allocation between vision and olfaction across the genus *Drosophila*. *Nature Communications*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09087-z>
- Keesey, I. W., Grabe, V., Knaden, M., & Hansson, B. S. (2020). Divergent sensory investment mirrors potential speciation via niche partitioning across *Drosophila*. *ELife*, *9*, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.57008>
- Keesey, I. W., Zhang, J., Depetris-Chauvin, A., Obiero, G. F., Gupta, A., Gupta, N., Vogel, H., Knaden, M., & Hansson, B. S. (2022). Functional olfactory evolution in *Drosophila suzukii* and the subgenus *Sophophora*. *IScience*, *25*(5), 104212. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104212>
- Keil, T. A. (1999). Morphology and Development of the Peripheral Olfactory Organs. *Insect Olfaction*, 5–47. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07911-9_2
- Keiser, I., Nakagawa, S., Kobayashi, R. M., Chambers, D. L., Urago, T., & Doolittle, R. E. (1973). Attractiveness of Cue-Lure and the Degradation Product 4-(p-Hydroxyphenyl)-2-Butanone to Male Melon Flies in the Field in Hawaii. *Journal of Economic Entomology*, *66*(1), 112–114. <https://doi.org/10.1093/jee/66.1.112>
- Keller, A., & Vosshall, L. B. (2007). Influence of odorant receptor repertoire on odor perception in humans and fruit flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(13), 5614–5619. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605321104>
- Kemprij, V., Park, S. J., Cameron, D. N. S., & Taylor, P. W. (2022). 1-Octanol emitted by *Oecophylla smaragdina* weaver ants repels and deters oviposition in Queensland fruit fly. *Scientific Reports*, *12*(15768), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20102-0>
- Kennedy, J. S., & Marsh, D. (1974). Pheromone-Regulated Anemotaxis in Flying Moths. *Science*, *184*(4140), 999–1001. <https://doi.org/10.1126/science.184.4140.999>
- Kennedy, J. S. (1977). Olfactory responses to distant plants and other odor sources. In *Chemical Control of Insect Behavior*, Shorey, H. H. and McKelvey, J. J., Eds., John Wiley & Sons, New York,.
- Khan, M. A., Ashfaq, M., Akram, W., & Lee, J.-J. (2005). Management of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) of the Most Perishable Fruits. *Entomological Research*, *35*(2), 79–84. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2005.tb00140.x>
- Khan, M. A. M., Manoukis, N. C., Osborne, T., Barchia, I. M., Gurr, G. M., & Reynolds, O. L. (2017). Semiochemical mediated enhancement of males to complement sterile insect technique in management of the tephritid pest *Bactrocera tryoni* (Froggatt). *Scientific Reports*, *7*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13843-w>
- Kirkness, E. F., Haas, B. J., Sun, W., Braig, H. R., Perotti, M. A., Clark, J. M., Lee, S. H.,

- Robertson, H. M., Kennedy, R. C., Elhaik, E., Gerlach, D., Kriventseva, E. V., Elsik, C. G., Graur, D., Hill, C. A., Veenstra, J. A., Walenz, B., Tubío, J. M. C., Ribeiro, J. M. C., ... Pittendrigh, B. R. (2010). Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(27), 12168–12173. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003379107>
- Klassen, W., & Curtis, C. F. (2005). History of the sterile insect technique. *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, 3–36. https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2_1
- Knaden, M., Strutz, A., Ahsan, J., Sachse, S., & Hansson, B. S. (2012). Spatial Representation of Odorant Valence in an Insect Brain. *Cell Reports*, *1*(4), 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.03.002>
- Knipling, E. F. (1955). Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males. *Journal of Economic Entomology*, *48*, 459–462. <https://doi.org/10.1093/jee/48.4.459>
- Knudsen, G. K., Tasin, M., Aak, A., & Thöming, G. (2018). A Wind Tunnel for Odor Mediated Insect Behavioural Assays. *Journal of Visualized Experiments*, (141), 1–8. <https://doi.org/10.3791/58385>
- Kobayashi, R. M., Ohinata, K., Chambers, D. L., & Fujimoto, M. S. (1978). Sex Pheromones of the Oriental Fruit Fly 1 and the Melon Fly: 1 Mating Behavior, Bioassay Method, and Attraction of Females by Live Males and by Suspected Pheromone Glands of Males. *Environmental Entomology*, *7*(1), 107–112. <https://doi.org/10.1093/ee/7.1.107>
- Kost, C. (2008). Chemical communication. *Encyclopedia of Ecology*, 557–575. https://doi.org/10.1142/9781786340450_0009
- Koul, O., Dhaliwal, G. S., & Cuperus, G. W. (2004). Integrated Pest Management, potential, constraints and challenges. *CABI*, 342.
- Koyama, J., Kakinohana, H., & Miyatake, T. (2004). Eradication of the Melon Fly, *Bactrocera cucuritae*, in Japan : Importance of Behavior , Ecology , Genetics , and Evolution. *Annual Review of Entomology*, *49*(1), 331–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123224>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lamy, F. (2016). Comprendre et manipuler la communication entre les plantes et les insectes pour protéger les cultures : vers l'élaboration d'une stratégie « Push-Pull » pour lutter contre la mouche du chou (*Delia radicum*). *Thèse de Doctorat*. Université de Rennes 1.
- Landolt, P. J., Heath, R. R., & Chambers, D. L. (1992). Oriented flight responses of female Mediterranean fruit flies to calling males , odor of calling males , and a synthetic pheromone blend. *Entomol. Exp. Appl.*, *65*(1977), 259–266. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1992.tb00679.x>

- Larsson, M. C., Domingos, A. I., Jones, W. D., Chiappe, M. E., Amrein, H., & Vosshall, L. B. (2004). Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43(5), 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.019>
- Law, J. H., & Regnier, F. E. (1971). Pheromones. *Annu. Rev. Biochem.*, 40, 533–548. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.40.070171.002533>
- Lebreton, S., Trona, F., Borrero-Echeverry, F., Bilz, F., Grabe, V., Becher, P. G., Carlsson, M. A., Nässel, D. R., Hansson, B. S., Sachse, S., & Witzgall, P. (2015). Feeding regulates sex pheromone attraction and courtship in *Drosophila* females. *Scientific Reports*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep13132>
- Lee, W., Chang, J., Hwang, Y., & Lin, T. (1994). Morphology of the antennal sensilla of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* Hendel (Diptera: Tephritidae). *Zoological Studies*, 33(1), 65–71.
- Legeai, F., Malpel, S., Montagné, N., Monsempe, C., Cousserans, F., Merlin, C., François, M., Maibèche-coisné, M., Gavory, F., Poulain, J., & Jacquin-Joly, E. (2011). An Expressed Sequence Tag collection from the male antennae of the Noctuid moth *Spodoptera littoralis*: a resource for olfactory and pheromone detection research. *BMC Genomics*, 12(86), 18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-86>
- Light, D. M., Jang, E. B., & Flath, R. A. (1992). Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, to the volatile constituents of nectarines. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 63(1), 13–26. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1992.tb02415.x>
- Lingren, P. D., Bryant, V. M., Raulston, J. R., Pendleton, M., Westbrook, J., & Jones, G. D. (1993). Adult Feeding Host Range and Migratory Activities of Com Earworm, Cabbage Looper, and Celery Looper (Lepidoptera: Noctuidae) Moths as Evidenced by Attached Pollen. *Journal of Economic Entomology*, 86(5), 1429–1439. <https://doi.org/10.1093/jee/86.5.1429>
- Linn, C., Feder, J. L., Nojima, S., Dambroski, H. R., Berlocher, S. H., & Roelofs, W. (2003). Fruit odor discrimination and sympatric host race formation in *Rhagoletis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11490–11493. <https://doi.org/10.1073/pnas.1635049100>
- Linz, J., Baschwitz, A., Strutz, A., Dweck, H. K. M., Sachse, S., Hansson, B. S., & Stensmyr, M. C. (2013). Host plant-driven sensory specialization in *Drosophila erecta*. *Proc. R. Soc. B*, 280, 9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.0626>
- Liquido, N. J., Cunningham, R. T., & Nakagawa, S. (1990). Host plants of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) on the island of Hawaii (1949-1985 Survey). *Journal of Economic Entomology*, 83(5), 1863–1878. <https://doi.org/10.1093/jee/83.5.1863>
- Lockey, K. H. (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, 89(4), 595–645. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90305-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90305-7)
- López-Guillén, G., López, L. C., Malo, E. A., & Rojas, J. C. (2011). Olfactory Responses of *Anastrepha obliqua* (Diptera : Tephritidae) to Volatiles Emitted by Calling Males. *Florida*

- Entomologist*, 94(4), 874–881. <https://doi.org/10.2307/23065844>
- López, C., Eizaguirre, M., & Albajes, R. (2003). Courtship and mating behaviour of the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(1), 43–51. <https://doi.org/10.5424/sjar/2003011-8>
- López, M. F., Armendáriz-Toledano, F., Macías Sámano, J. E., Shibayama-Salas, M., & Zúñiga, G. (2014). Comparative study of the antennae of *Dendroctonus rhizophagus* and *Dendroctonus valens* (Curculionidae: Scolytinae): Sensilla types, distribution and club shape. *Annals of the Entomological Society of America*, 107(6), 1130–1143. <https://doi.org/10.1603/AN14069>
- Loudon, C. (2009). Antennae. *Encyclopedia of Insects*, 21–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00006-0>
- Lux, S. A., Copeland, R. S., White, I. M., Manrakhan, A., & Billah, M. K. (2003). A New Invasive Fruit Fly Species from the *Bactrocera dorsalis* (Hendel) Group Detected in East Africa. *International Journal of Tropical Insect Science*, 23(04), 355–361. <https://doi.org/10.1017/s174275840001242x>
- Macfarlane, J., East, R., Drew, R., & Betlinski, G. (1987). Dispersal of Irradiated Queensland Fruit-Flies, *Dacus Tryoni* (Froggatt) (Diptera, Tephritidae), in Southeastern Australia. *Australian Journal of Zoology*, 35(3), 275–281. <https://doi.org/10.1071/ZO9870275>
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96(5), 713–723. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80581-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80581-4)
- Marion-poll, F., & Thiery, D. (1996). Dynamics of EAG responses to host-plant volatiles delivered by a gas chromatograph. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80, 120–123. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-009-1720-0_29
- Marriott, P. J., Shellie, R., & Cornwell, C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography*, 936, 1–22. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)01314-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)01314-0)
- Martin, S., & Drijfhout, F. (2009). A review of ant cuticular hydrocarbons. *Journal of Chemical Ecology*, 35(10), 1151–1161. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9695-4>
- Mazomenos, B. E., & Haniotakis, G. E. (1981). A multicomponent female sex pheromone of *Dacus oleae* Gmelin: Isolation and bioassay. *Journal of Chemical Ecology*, 7(2), 437–444. <https://doi.org/10.1007/BF00995766>
- Mazomenos, B. E., & Haniotakis, G. E. (1985). Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests. *Journal of Chemical Ecology*, 11(3), 397–405. <https://doi.org/10.1007/BF01411425>
- McBride, C. S., & Arguello, J. R. (2007). Five Drosophila Genomes Reveal Nonneutral Evolution and the Signature of Host Specialization in the Chemoreceptor Superfamily. *Genetics*, 177(3), 1395–1416. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.078683>
- McIndoo, N. E. (1926). An Insect Olfactometer. *Journal of Economic Entomology*, 19(3), 545–571. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jee/19.3.545>

- McNair, H. M., & Miller, J. M. (2019). Basic gas chromatography. *Basic Gas Chromatography*, 1–265. <https://doi.org/10.1002/9781119450795>
- Meats, A., & Edgerton, J. E. (2008). Short-and long-range dispersal of the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* and its relevance to invasive potential, sterile insect technique and surveillance trapping. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(9), 1237–1245. <https://doi.org/10.1071/EA07291>
- Meats, A. (2016). Short- and long-range dispersal of the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* and its relevance to invasive potential , sterile insect technique and surveillance trapping. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48, 1237–1245. <https://doi.org/10.1071/EA07291>
- Menet, M. C. (2011). Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2011(437), 41–53. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(11\)71211-4](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(11)71211-4)
- Merli, D., Mannucci, B., Bassetti, F., Corana, F., Falchetto, M., & Malacrida, A. R. (2018). Larval Diet Affects Male Pheromone Blend in a Laboratory Strain of the Medfly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Chemical Ecology*, 44(4), 339–353. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0939-z>
- Metcalf, R. L., & Kogan, M. (1987). Plant volatiles as insect attractants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 5(3), 251–301. <https://doi.org/10.1080/07352688709382242>
- Metcalf, R. L., & Metcalf, E. R. (1992). Plant kairomones in insect ecology and control. *Chapman and Hall. New York*.
- Metcalf, R. L., & Luckmann, W. (1994). Introduction to insect pest management. III Edn. *John Wiley & Sons, New York*, 661.
- Michaud, J. P., & Grant, A. K. (2003). IPM-compatibility of foliar insecticides for citrus: Indices derived from toxicity to beneficial insects from four orders. *Journal of Insect Science*, 3. <https://doi.org/10.1093/jis/3.1.18>
- Millar, J. G. (2000). Polyene hydrocarbons and epoxides: A second major class of lepidopteran sex attractant pheromones. *Annual Review of Entomology*, 45(4), 575–604. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.575>
- Miller, J. R., & Roelofs, W. L. (1978). Sustained-flight tunnel for measuring insect responses to wind-borne sex pheromones. *J Chem Ecol*, 4(2), 187–198.
- Miller, R. M., & McGinley, M. A. (2008). Evaluation of Background Odour in Tedlar and Nalophan Sample Bags. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 4, 590–604. <https://doi.org/10.2175/193864708788808032>
- Mir, S. H., & Mir, G. M. (2016). Lekking Behaviour and Male-Male Rivalry in the Melon Fly *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Behavior*, 29, 379–384. <https://doi.org/10.1007/s10905-016-9568-y>
- Moorhouse, J. E., Yeadon, R., Beever, P. S., & Nesbitt, B. F. (1969). Method for use in studies of insect chemical communication. *Nature*, 223(5211), 1174–1175. <https://doi.org/10.1038/2231174a0>

- Moquet, L., Payet, J., Glenac, S., & Delatte, H. (2021). Niche shift of tephritid species after the Oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) invasion in La Réunion. *Diversity and Distributions*, 27, 109–129. <https://doi.org/10.1111/ddi.13172>
- Moquet, L., Jobart, B., Fontaine, R., & Delatte, H. (2022). Tri-trophic interactions among *Fopius arisanus*, Tephritid species and host plants suggest apparent competition. *Ecology and Evolution*, 13(e9742), 17. <https://doi.org/10.1002/ece3.9742>
- Morris, C. D., & Lounibos, V. L. L. P. (1991). Measuring mosquito dispersal for control programs. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7(4), 608–615. Retrieved from https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/JAMCA_V07_N4_P608-615.pdf
- Münch, D., & Galizia, C. G. (2016). DoOR 2.0 - Comprehensive Mapping of *Drosophila melanogaster* Odorant Responses. *Scientific Reports*, 6(February), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep21841>
- Münkemüller, T., Lavergne, S., Bzeznik, B., Dray, S., Jombart, T., Schiffers, K., & Thuiller, W. (2012). How to measure and test phylogenetic signal. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(4), 743–756. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00196.x>
- Muriithi, B. W., Affognon, H. D., Diiro, G. M., Kingori, S. W., Tanga, C. M., Nderitu, P. W., Mohamed, S. A., & Ekesi, S. (2016). Impact assessment of Integrated Pest Management (IPM) strategy for suppression of mango-infesting fruit flies in Kenya. *Crop Protection*, 81, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.11.014>
- Murlis, J., Elkinton, J. S., & Carde, R. T. (1992). Odor plumes and how insects use them. *Annual Review of Entomology*. Vol. 37, (86), 505–532. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.37.1.505>
- Myrick, A. J., & Baker, T. C. (2012a). Chopper-Modulated Locked in Amplified Gas Chromatography - Electroantennography Part II: Signal Processing and Performance Comparisons. *IEEE Sensors Journal*, 12(10), 2974–2983. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2012.2206380>
- Myrick, A. J., & Baker, T. C. (2012b). Chopper-stabilized gas chromatography-electroantennography: Part I. Background, signal processing and example. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.10.017>
- Myrick, A. J., & Baker, T. C. (2018). Increasing Signal-to-Noise Ratio in Gas Chromatography - Electroantennography Using a Deans Switch Effluent Chopper. *Journal of Chemical Ecology*, 44(2), 111–126. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0916-y>
- Nardi, J. B., Mackie, R. I., & Dawson, J. O. (2002). Could microbial symbionts of arthropod guts contribute significantly to nitrogen fixation in terrestrial ecosystems? *Journal of Insect Physiology*, 48, 751–763.
- Nation, J. L. (1990). Biology of pheromone release by male caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Chemical Ecology*, 16(2), 553–572.
- Nei, M., & Rooney, A. P. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene

- families. *Annual Review of Genetics*, 39(11), 121–152. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.112240>
- Ni, Y., Su, M., Qiu, Y., Jia, W., & Du, X. (2016). ADAP-GC 3.0: Improved Peak Detection and Deconvolution of Co-eluting Metabolites from GC/TOF-MS Data for Metabolomics Studies, 88(17), 8802–8811. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02222>.ADAP-GC
- Niogret, J., Montgomery, W. S., Kendra, P. E., Heath, R. R., & Epsky, N. D. (2011). Attraction and Electroantennogram Responses of Male Mediterranean Fruit Fly to Volatile Chemicals from *Persea*, *Litchi* and *Ficus* Wood. *Journal of Chemical Ecology*, 37(5), 483–491. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-9953-0>
- Nishida, R., Tan, K. H., Serit, M., Lajis, N. H., Sukari, A. M., Takahashi, S., & Fukami, H. (1988). Accumulation of phenylpropanoids in the rectal glands of males of the Oriental fruit fly, *Dacus dorsalis*. *Experientia*, 44(6), 534–536. <https://doi.org/10.1007/BF01958941>
- Nishida, R., Shelly, T. E., Whittier, T. S., & Kaneshiro, K. Y. (2000). α -Copaene, a potential rendezvous cue for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*? *Journal of Chemical Ecology*, 26(1), 87–100. <https://doi.org/10.1023/A:1005489411397>
- Nishida, R., Tan, K., Wee, S., Hee, A. K., & Toong, Y. (2004). Phenylpropanoids in the fragrance of the fruit fly orchid, *Bulbophyllum cheiri*, and their relationship to the pollinator, *Bactrocera papayae*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 245–252. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(03\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(03)00179-0)
- Nojima, S., Linn, C., Morris, B., Zhang, A., & Roelofs, W. (2003). Identification of Host Fruit Volatiles from Hawthorn (*Crataegus* spp.) Attractive to Hawthorn-Origin *Rhagoletis pomonella* Flies. *Journal of Chemical Ecology*, 29(2), 321–336. <https://doi.org/10.1023/a:1022677827233>
- Nordlund, D. A., & Lewis, W. J. (1976). Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 2(2), 211–220. <https://doi.org/10.1007/BF00987744>
- Norrbom, A. (2004). Fruit fly (diptera : Tephritidae) classification and diversity. *Systematic and Entomology Laboratory, ARS, USDA, Department of Entomology, NMNH. SI; The Diptera Site*.
- Noushini, S., Perez, J., Park, S. J., Holgate, D., Mendez Alvarez, V., Jamie, I., Jamie, J., & Taylor, P. (2020). Attraction and Electrophysiological Response to Identified Rectal Gland Volatiles in *Bactrocera frauenfeldi* (Schiner). *Molecules*, 25(6), 1275. <https://doi.org/10.3390/molecules25061275>
- Ochieng, S. A., Park, K. C., & Baker, T. C. (2002). Host plant volatiles synergize responses of sex pheromone-specific olfactory receptor neurons in male *Helicoverpa zea*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 188(4), 325–333. <https://doi.org/10.1007/s00359-002-0308-8>
- Oerke, E.-C. (2006). Crop losses to pests. *Journal Of Agricultural Science*, 144, 31–43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>

- Olsson, S. B., Linn, C. E., & Roelofs, W. L. (2006). The chemosensory basis for behavioral divergence involved in sympatric host shifts. I. Characterizing olfactory receptor neuron classes responding to key host volatiles. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 192(3), 279–288. <https://doi.org/10.1007/s00359-005-0069-2>
- Ono, H., Hee, A. K., & Jiang, H. (2021). Recent Advancements in Studies on Chemosensory Mechanisms Underlying Detection of Semiochemicals in Dacini Fruit Flies of Economic Importance (Diptera : Tephritidae). *Insects*, 12(106), 23. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/insects12020106> Academic
- Ono, H. (2022). Functional characterization of an olfactory receptor in the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, that responds to eugenol and isoeugenol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 258(110696), 8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110696>
- Opp, S. B., & Prokop, R. J. (1979). Approaches and Methods for Direct Behavioral Observation and Analysis of Plant-Insect Interactions. In *In Insect-plant interactions*. J. R. Miller et al. (eds.), Springer (pp. 1–22).
- Orian, A. J. E., & Moutia, L. A. (1960). Fruit flies (Trypetidae) of economic importance in Mauritius. *Revue Agricole et Sucriere de l'Ile Maurice*, 39(3).
- Ormeño, E., Goldstein, A., & Niinemets, Ü. (2011). Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(7), 978–989. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.04.006>
- Ouedraogo, S. N. (2011). Dynamique spatio temporelle des mouches des fruits (Diptera, Tephritidae) en fonction des facteurs biotiques et abiotiques dans les vergers de manguiers de l'Ouest du Burkina Faso. Université de Paris Est.
- Pan, J. W., Li, Q., Barish, S., Okuwa, S., Zhao, S., Soeder, C., Kanke, M., Jones, C. D., & Volkan, P. C. (2017). Patterns of transcriptional parallelism and variation in the developing olfactory system of *Drosophila* species. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08563-0>
- Paoli, M., Münch, D., Haase, A., Skoulakis, E., Turin, L., & Galizia, C. G. (2017). Minute Impurities Contribute Significantly to Olfactory Receptor Ligand Studies : Tales from Testing the Vibration Theory. *ENeuro*, 4(3), 1–10. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1523/ENEURO.0070-17.2017>
- Papadopoulos, N. T., Katsoyannos, B. I., Kouloussis, N. A., Economopoulos, A. P., & Carrey, J. R. (1998). Effect of adult age, food, and time of day on sexual calling incidence of wild and mass-reared *Ceratitis capitata* males. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 89, 175–182. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00397.x>
- Park, S. K., Shanbhag, S. R., Dubin, A. E., De Bruyne, M., Wang, Q., Yu, P., Shimoni, N., D'Mello, S., Carlson, J. R., Harris, G. L., Steinbrecht, R. A., & Pikielny, C. W. (2002). Inactivation of olfactory sensilla of a single morphological type differentially affects the response of *Drosophila* to odors. *Journal of Neurobiology*, 51(3), 248–260. <https://doi.org/10.1002/neu.10057>
- Pask, G. M., & Ray, A. (2016). Insect Olfactory Receptors: An Interface between Chemistry

- and Biology. *Chemosensory Transduction: The Detection of Odors, Tastes, and Other Chemostimuli*, 101–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801694-7.00006-8>
- Pavoine, S., Ollier, S., Pontier, D., & Chessel, D. (2008). Testing for phylogenetic signal in phenotypic traits: New matrices of phylogenetic proximities. *Theoretical Population Biology*, 73(1), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2007.10.001>
- Pelosi, P., Zhou, J. J., Ban, L. P., & Calvello, M. (2006). Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(14), 1658–1676. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5607-0>
- Pelosi, P., Iovinella, I., Zhu, J., Wang, G., & Dani, F. R. (2017). Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. *Biological Reviews*, 93(1), 184–200. <https://doi.org/10.1111/brv.12339>
- Pettersson, J. (1970). An Aphid Sex Attractant. *Insect Systematics & Evolution*, 1(1), 6–93. <https://doi.org/10.1163/187631271x00095>
- Pettis, J. S., Higo, H. A., Pankiw, T., & Winston, M. L. (1997). Queen rearing suppression in the honey bee - Evidence for a fecundity signal. *Insectes Sociaux*, 44(4), 311–322. <https://doi.org/10.1007/s000400050053>
- Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Physiology and Metabolism*, 5(3), 237–243. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(02\)00251-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00251-0)
- Pichersky, E., Noel, J. P., & Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. *Science*, 311(5762), 808–811. <https://doi.org/10.1126/science.1118510>
- Picimbon, J. F. (2002). Les péri-récepteurs chimiosensoriels des insectes. *Medecine/Sciences*, 18(11), 1089–1094. <https://doi.org/10.1051/medsci/200218111089>
- Picimbon, J. F., Dietrich, K., Angeli, S., Scaloni, A., Krieger, J., Breer, H., & Pelosi, P. (2000). Purification and molecular cloning of chemosensory proteins from *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44(3), 120–129. [https://doi.org/10.1002/1520-6327\(200007\)44:3<120::AID-ARCH3>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1520-6327(200007)44:3<120::AID-ARCH3>3.0.CO;2-H)
- Pinero, J. C., Souder, S. K., Cha, D. H., Collignon, R. M., & Vargas, R. I. (2021). Age-dependent response of female melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), to volatiles emitted from damaged host fruits. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 24, 759–763. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2021.06.011>
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- Prokopy, Ronald J. (1972a). Evidence for a Marking Pheromone Detering Repeated Oviposition in Apple Maggot Flies. *Environmental Entomology*, 1(3), 326–332. <https://doi.org/10.1093/ee/1.3.326>
- Prokopy, Ronald J. (1972b). Response of Apple Maggot Flies to Rectangles of Different Colors

- and Shades. *Environmental Entomology*, 1(6), 720–726.
<https://doi.org/10.1093/ee/1.6.720>
- Prokopy, R. J., & Economopoulos, A. P. (1976). Color responses of *Ceratitidis capitata* flies. *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 80(1–4), 434–437.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1976.tb03346.x>
- Prokopy, Ronald J., & Koyama, J. (1982). Oviposition Site Partitioning in *Dacus Cucurbitae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 31(4), 428–432. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1982.tb03172.x>
- Prokopy, Ronald J., Green, T. A., Olson, W. A., Vargas, R. I., Kanehisa, D., & Wong, T. T. Y. (1989). Discrimination by *Dacus dorsalis* Females (Diptera: Tephritidae) against Larval-Infested Fruit. *The Florida Entomologist*, 72(2), 319. <https://doi.org/10.2307/3494913>
- Prokopy, R. J., Papaj, D. R., Hendrichs, J., & Wong, T. T. Y. (1992). Behavioral responses of *Ceratitidis capitata* flies to bait spray droplets and natural food. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 64(3), 247–257. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1992.tb01615.x>
- Pyke, B., Rice, M., Sabine, B., & Zalucki, M. (1987). The push-pull strategy - Behavioural Control of Heliothis. *The Australian Cotton Grower*, 7–9.
- Quilici, S., Franck, A., Peppuy, A., Dos Reis Correia, E., Mouniama, C., & Blard, F. (2002a). Comparative Studies of Courtship Behavior of *Ceratitidis* Spp. (Diptera: Tephritidae) in Reunion Island. *Florida Entomologist*, 85(1), 138–142. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0138:CSOCBO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0138:CSOCBO]2.0.CO;2)
- Quilici, S., Hurtrel, B., Messing, R. H., Montagneux, B., Barbet, A., Gourdon, F., Malvolti, A., & Simon, A. (2002b). Successful acclimatization of *Psytalia fletcheri* (Braconidae: Opiinae) for biological control of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), on Réunion Island. *6th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*, 457–459.
- Quilici, S., Duyck, P.-F., Rousse, P., Gourdon, F., Simiand, C., & Franck, A. (2005). La mouche de la pêche sur mangue, goyave, etc... à la Réunion, évolution des recherches et des méthodes de lutte. *Phytoma-La Défense Des Végétaux*, 584, 44–47.
- Ramaekers, A., Claeys, A., Kapun, M., Mouchel-Vielh, E., Potier, D., Weinberger, S., Grillenzoni, N., Dardalhon-Cuménal, D., Yan, J., Wolf, R., Flatt, T., Buchner, E., & Hassan, B. A. (2019). Altering the Temporal Regulation of One Transcription Factor Drives Evolutionary Trade-Offs between Head Sensory Organs. *Developmental Cell*, 50(6), 780–792.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.07.027>
- Ramasamy, S., Ometto, L., Crava, C. M., Revadi, S., Kaur, R., Pisani, D., Dekker, T., Anfora, G., & Rota-stabelli, O. (2016). The evolution of olfactory gene families in *Drosophila* and the genomic basis of chemical-ecological adaptation in *Drosophila suzukii*. *Genome Biology and Evolution*, 8(8), 28. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw160>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst. Biol.*, 67(5), 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>

- Reinhard, J. (2004). Insect chemical communication. *ChemoSense*, 6(4), 16.
- Riedl, H., & Hislop, R. (1985). Visual Attraction of the Walnut Husk Fly (Diptera: Tephritidae) to Color Rectangles and Spheres. *Environmental Entomology*, 14(6), 810–814. <https://doi.org/10.1093/ee/14.6.810>
- Robacker, D. C., & Hart, W. G. (1986). Behavioral responses of male and female Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens*, to male-produced chemicals in laboratory experiments. *Journal of Chemical Ecology*, 12(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/BF01045589>
- Robertson, H. M., Warr, C. G., & Carlson, J. R. (2003). Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14537–14542. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335847100>
- Robertson, H. M., & Wanner, K. W. (2006). The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Research*, 16(11), 1395–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.5057506>
- Roelofs, W. L. (1995). Chemistry of sex attraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(1), 44–49. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.44>
- Ronquist, F., Mark, P. Van Der, & Ayres, D. L. (2012). MrBayes 3 . 2 : Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space, (May 2014). <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rouessac, F., Rouessac, A., & Cruché, D. (1992). *Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes* (DUNOD). Paris.
- Rousse, P., Gourdon, F., & Quilici, S. (2006). Host specificity of the egg pupal parasitoid *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae) in La Reunion. *Biological Control*, 37(3), 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.12.008>
- Rull, J., Lasa, R., Aluja, M., Ordano, M., & Guille, L. (2013). Temporal dynamics of diversity in a tropical fruit fly (Tephritidae) ensemble and their implications on pest management and biodiversity conservation, 1557–1575. <https://doi.org/10.1007/s10531-013-0468-6>
- Ruther, J., Meiners, T., & Steidle, J. L. M. (2002). Rich in phenomena-lacking in terms. A classification of kairomones. *Chemoecology*, 12(4), 161–167. <https://doi.org/10.1007/PL00012664>
- Ryckewaert, P., Deguine, J.-P., Brévault, T., & Vayssières, J.-F. (2010). Fruit flies (Diptera: Tephritidae) on vegetable crops in Reunion Island (Indian Ocean): state of knowledge, control methods and prospects for management. *Fruits*, 65(2), 113–130. <https://doi.org/10.1051/fruits/20010006>
- Sakurai, T., Nakagawa, T., Mitsuno, H., Mori, H., Endo, Y., Tanoue, S., Yasukochi, Y., Touhara, K., & Nishioka, T. (2004). Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47), 16653–16658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407596101>

- Sarwar, M. (2015). The Role of Male Annihilation Technique to Get Rid of Notorious Fruit Flies (Tephritidae: Diptera) in Fruit and Vegetable Farms Annihilation Technology. *International Journal of Animal Biology*, 1(5), 260–265.
- Schneider, D. (1957). Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. *Zeitschrift Für Vergleichende Physiologie*, 40(1), 8–41. <https://doi.org/10.1007/bf00298148>
- Schneider, D. (1964). Insect Antennae. *Annual Review of Entomology*, 9(1), 103–122. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.09.010164.000535>
- Schoonhoven, L. M., van Loon, J. J. A., & Dicke, M. (2005). Insect-plant biology. 2nd Ed. Oxford University Press, Oxford, 440. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com/lib/lancaster/reader.action?docID=422809&ppg=228>
- Schorkopf, D. L. P., Molnár, B. P., Solum, M., Larsson, M. C., Millar, J. G., Kárpáti, Z., & Dekker, T. (2019). False positives from impurities result in incorrect functional characterization of receptors in chemosensory studies. *Progress in Neurobiology*, 181(101661), 7. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101661>
- Schröder, R., & Hilker, M. (2008). The relevance of background odor in resource location by insects: A behavioral approach. *BioScience*, 58(4), 308–316. <https://doi.org/10.1641/B580406>
- Schutze, M. K., Virgilio, M., Norrbom, A., & Clarke, A. R. (2017). Tephritid Integrative Taxonomy: Where We Are Now, with a Focus on the Resolution of Three Tropical Fruit Fly Species Complexes. *Annual Review of Entomology*, 62, 147–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035518>
- Seada, M. A. (2015). Antennal morphology and sensillum distribution of female cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 68, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.01.005>
- Shanbhag, S. R., Müller, B., & Steinbrecht, R. A. (1999). Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster* 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 28, 377–397. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19880215\)61:4<744::AID-CNCR2820610418>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19880215)61:4<744::AID-CNCR2820610418>3.0.CO;2-M)
- Shaurub, E. S. H., Soliman, N. A., & Sabbour, M. M. (2021). Development of the soil-inhabiting stages of *Ceratitis capitata* infected with entomopathogenic nematodes: insights on survival. *Invertebrate Reproduction and Development*, 65(3), 155–162. <https://doi.org/10.1080/07924259.2021.1920482>
- Shelly, T. E. (2001). Feeding on methyl eugenol and *Fagraea berteriana* flowers increases long-range female attraction by males of the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 84(4), 634–640.
- Shelly, T. E. (2010). Effects of methyl eugenol and raspberry ketone/cue lure on the sexual behavior of *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae). *Applied Entomology and Zoology*, 45(3), 349–361. <https://doi.org/10.1303/aez.2010.349>

- Shelly, T. E. (2018). Sexual Selection on Leks : A Fruit Fly Primer. *Journal of Insect Science*, 18(3), 1–16. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iey048>
- Shorey, H. H. (1973). Behavioral responses to insect pheromones. *Annual Review of Entomology*, 18(1), 349–381. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.18.010173.002025>
- Shuttleworth, A., & Johnson, S. D. (2022). GC-MS/FID/EAD : A method for combining mass spectrometry with gas chromatography-electroantennographic detection. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.1042732>
- Siderhurst, M. S., & Jang, E. B. (2006). Female-Biased Attraction of Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), to a Blend of Host Fruit Volatiles From *Terminalia catappa* L. *J Appl Ecol*, 32, 2513–2524. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9160-6>
- Siderhurst, M. S., & Jang, E. B. (2010). Cucumber volatile blend attractive to female melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). *Journal of Chemical Ecology*, 36(7), 699–708. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9804-4>
- Silbering, A. F., Rytz, R., Grosjean, Y., Abuin, L., Ramdya, P., Jefferis, G. S. X. E., & Benton, R. (2011). Complementary function and integrated wiring of the evolutionarily distinct *Drosophila* olfactory subsystems. *Journal of Neuroscience*, 31(38), 13357–13375. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2360-11.2011>
- Soliman, N. A., Al-amin, S. M., Mesbah, A. E., Ibrahim, A. M. A., & Mahmoud, A. M. A. (2020). Pathogenicity of three entomopathogenic fungi against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(49), 8. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00235-y>
- Song, E., de Bivort, B., Dan, C., & Kunes, S. (2012). Determinants of the *Drosophila* Odorant Receptor Pattern. *Developmental Cell*, 22(2), 363–376. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.015>
- Sookar, P., Permalloo, S., Gungah, B., Alleck, M., Seewooruthun, S., & Soonnoo, A. (2006). An area wide control of fruit flies in Mauritius. In *Fruit Flies of Economic Importance to Applied Knowledge Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, 10-15 September 2006, Salvador, Brazil* (pp. 261–269).
- Stange, G. (1992). High resolution measurement of atmospheric carbon dioxide concentration changes by the labial palp organ of the moth *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Comparative Physiology A*, 171(3), 317–324. <https://doi.org/10.1007/BF00223962>
- Steck, K., Veit, D., Grandy, R., Mathews, Z., Verschure, P., Hansson, B. S., & Knaden, M. (2012). A high-throughput behavioral paradigm for *Drosophila* olfaction - The Flywalk. *Scientific Reports*, 2(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep00361>
- Steinbrecht, R. A., Ozaki, M., & Ziegelberger, G. (1992). Immunocytochemical localization of pheromone-binding protein in moth antennae. *Cell & Tissue Research*, 270(2), 287–302. <https://doi.org/10.1007/BF00328015>
- Steinbrecht, R. A. (1996). Structure and function of insect olfactory sensilla. *CIBA Foundation Symposia*, 1(200), 158–177. <https://doi.org/10.1002/9780470514948.ch13>

- Steiner, L. F., & Lee, R. K. S. (1955). Large-Area Tests of a Male-Annihilation Method for Oriental Fruit Fly Control. *Journal of Economic Entomology*, 48(3), 311–317. <https://doi.org/10.1093/jee/48.3.311>
- Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., ... Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, 94(3), 665–676. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01354-7>
- Stensmyr, M. C., Dekker, T., & Hansson, B. S. (2003). Evolution of the olfactory code in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1531), 2333–2340. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2512>
- Stephens, A. E. A., Kriticos, D. J., & Leriche, A. (2007). The current and future potential geographical distribution of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Bulletin of Entomological Research*, 97, 369–378. <https://doi.org/10.1017/S0007485307005044>
- Stern, V. M., Smith, R. F., Bosch, van den R., & Hagen, K. S. (1959). The integrated control concept. *Hilgardia*, 29, 81–101.
- Stocker, R. F. (2001). *Drosophila* as a Focus in Olfactory Research: Mapping of Olfactory Sensilla by Fine Structure, Odor Specificity, Odorant Receptor Expression, and Central Connectivity. *Microscopy Research and Technique*, 55, 284–296. <https://doi.org/10.1002/jemt.1178>
- Suh, E., Bohbot, J. D., & Zwiebel, L. J. (2014). Peripheral olfactory signaling in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 6, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.10.006>
- Tait, C., Batra, S., Ramaswamy, S. S., Feder, J. L., & Olsson, S. B. (2016). Sensory specificity and speciation: A potential neuronal pathway for host fruit odour discrimination in *Rhagoletis pomonella*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1845). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2101>
- Tait, C., Kharva, H., Schubert, M., Kritsch, D., Sombke, A., Rybak, J., Feder, J. L., & Olsson, S. B. (2021). A reversal in sensory processing accompanies ongoing ecological divergence and speciation in *Rhagoletis pomonella*. *Proc. R. Soc. B*, 288, 9.
- Tan, H. K., & Nishida, R. (1995). Incorporation of Raspberry Ketone in the Rectal Glands of Males of the Queensland Fruit Fly, *Bactrocera tryoni* FROGGATT (Diptera: Tephritidae). *Applied Entomology and Zoology*, 30(3), 494–497. <https://doi.org/10.1303/aez.30.494>
- Tan, K. H., & Nishida, R. (2000). Mutual Reproductive Benefits Between a Wild Orchid, *Bulbophyllum patens*, and *Bactrocera* Fruit Flies via a Floral Synomone. *Journal of Chemical Ecology*, 26(2), 533–546. <https://doi.org/10.1023/A:1005477926244>
- Tan, K. H., Nishida, R., Jang, E. B., & Shelly, T. E. (2014). Pheromones, Male Lures, and Trapping of Tephritid Fruit Flies. *Springer: Dordrecht, The Netherlands*, 15–74. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9193-9>
- Tan, K. H., & Nishida, R. (2020). Sex Pheromone and Mating Competition after Methyl Eugenol Consumption in the *Bactrocera dorsalis* Complex. In *Fruit Fly Pests* (pp. 147–

- 153). <https://doi.org/10.1201/9780367812430-23>
- Tasin, M., Bäckman, A. C., Coracini, M., Casado, D., Ioriatti, C., & Witzgall, P. (2007). Synergism and redundancy in a plant volatile blend attracting grapevine moth females. *Phytochemistry*, *68*, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.015>
- Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U. S. R., & Schnitzler, J. P. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant Journal*, *45*(4), 540–560. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02612.x>
- Tierney, A. J. (1986). The evolution of learned and innate behavior: Contributions from genetics and neurobiology to a theory of behavioral evolution. *Animal Learning & Behavior*, *14*(4), 339–348. <https://doi.org/10.3758/BF03200077>
- Tobin, P. C., & Blackburn, L. M. (2008). Long-Distance Dispersal of the Gypsy Moth (Lepidoptera : Lymantriidae) Facilitated Its Initial Invasion of Wisconsin. *Environmental Entomology*, *37*(1), 87–93. [https://doi.org/10.1603/0046-225X\(2008\)37\[87:LDOTGM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2008)37[87:LDOTGM]2.0.CO;2)
- Toledo, J., Rasgado, M. A., Ibarra, J. E., Gómez, A., Liedo, P., & Williams, T. (2006). Infection of *Anastrepha ludens* following soil applications of *Heterorhabditis bacteriophora* in a mango orchard. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *119*, 155–162. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00412.x>
- Turlings, T. C. J., Tumlinson, J. H., & Lewis, W. J. (1990). Exploitation of Herbivore-Induced Plant Odors by Host-Seeking Parasitic. *Science*, *250*(4985), 1251–1253, 250(4985), 1251–1253. <https://doi.org/10.1126/science.250.4985.1251>
- Turlings, T. C. J., Davison, A. C., & Tamò, C. (2004). A six-arm olfactometer permitting simultaneous observation of insect attraction and odour trapping. *Physiological Entomology*, *29*(3), 45–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2004.0362.x>
- Usman, M., Gulzar, S., Wakil, W., Wu, S., Piñero, J. C., Leskey, T. C., Nixon, L. J., Oliveira-Hofman, C., Toews, M. D., & Shapiro-Ilan, D. (2020). Virulence of Entomopathogenic Fungi to *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) and Interactions with Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Economic Entomology*, *113*(6), 2627–2633. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa209>
- van der Goes van Naters, W., & Carlson, J. R. R. (2007). Receptors and Neurons for Fly Odors in *Drosophila*. *Current Biology*, *17*(7), 606–612. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.043>
- Vargas, R. I., Piñero, J. C., & Leblanc, L. (2015). An Overview of Pest Species of *Bactrocera* Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) and the Integration of Biopesticides with Other Biological Approaches for Their Management with a Focus on the Pacific Region. *Insects*, *6*, 297–318. <https://doi.org/10.3390/insects6020297>
- Vargas, R. I., Piñero, J. C., & Miller, N. W. (2018). Effect of Physiological State on Female Melon Fly (Diptera : Tephritidae) Attraction to Host and Food Odor in the Field. *Journal of Economic Entomology*, *XX*(XX), 1–5. <https://doi.org/10.1093/jee/toy092>
- Vayssières, J.-F. (1999). *Les relations insectes-plantes chez les Dacini (Diptera : Tephritidae)*

- ravageurs des Cucurbitaceae à La Réunion. Thèse de Doctorat. Université de Créteil, Paris, France.
- Vayssières, J. F., Delvare, G., Maldès, J. M., & Auerlenc, H. P. (2001). Inventaire préliminaire des arthropodes ravageurs et auxiliaires des cultures maraichères sur l'île de La Réunion. *Insect Science and Its Application*, 21(1), 1–22. <https://doi.org/10.1017/S1742758400020002>
- Vayssières, J., Sinzogan, A., & Bokonon-Ganta, A. (2008a). Fiche technique: Les mouches des fruits du genre *Ceratitis* [Diptera: Tephritida] en Afrique de l'Ouest, (April), 4.
- Vayssières, J.-F., Sinzogan, A., & Bokonon-Ganta, A. (2008b). The new invasive fruit fly species, *Bactrocera invadens* Drew Tsuruta & White. *Iita-Cirad*, (April), 3.
- Venard, R., & Jallon, J. M. (1980). Evidence for an aphrodisiac pheromone of female *Drosophila*. *Experientia*, 36(2), 211–213. <https://doi.org/10.1007/BF01953737>
- Verschut, T. A., Farnier, K., Cunningham, J. P., Carlsson, M. A., & Genta, F. A. (2018). Behavioral and Physiological Evidence for Palp Detection of the Male-Specific Attractant Cuelure in the Queensland Fruit Fly (*Bactrocera tryoni*). *Frontiers in Physiology*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00990>
- Vet, L. E. M., Lenteren, J. C. V., Heymans, M., & Meelis, E. (1983). An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. *Physiological Entomology*, 8, 97–106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1983.tb00338.x>
- Vickers, C. E., Gershenzon, J., Lerda, M. T., & Loreto, F. (2009). A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology*, 5, 283–291. <https://doi.org/10.1038/nchembio.158>
- Viladerbo. (1946). Aperçu des moyens de lutte à employer contre “la mouche des fruits” *Ceratitis capitata* wied”. *Fruits d’Outre-Mer*, 1(14), 435–437.
- Vogt, R. G., & Riddiford, L. M. (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293, 161–163.
- Vosshall, L. B., Amrein, H., Morozov, P. S., Rzhetsky, A., & Axel, R. (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 96(5), 725–736. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80582-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80582-6)
- Vosshall, L. B., Wong, A. M., & Axel, R. (2000). An Olfactory Sensory Map in the Fly Brain. *Cell*, 102, 147–159. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00021-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00021-0)
- Vreysen, M. J. B., Robinson, A. S., & Hendrichs, J. (2007). Area-wide control of insect pests : From research to field implementation. *Springer: Dordrecht, The Netherlands*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5>
- Walsh. B. (1867). The apple-worm and the apple maggot. *The American Journal of Horticulture*, 2, 338–343.
- Wang, Y., Fang, G., Xu, P., Huang, Y., Niu, C., Correspondence, S. Z., Gao, B., Liu, X., Qi,

- X., Zhang, G., Cao, S., Li, Z., Ren, X., Wang, H., Cao, Y., Pereira, R., & Zhan, S. (2022). Behavioral and genomic divergence between a generalist and a specialist fly. *Cell Reports*, 41(111654), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111654>
- Webster, B., & Cardé, R. T. (2017). Use of habitat odour by host-seeking insects. *Biological Reviews*, 92(2), 1241–1249. <https://doi.org/10.1111/brv.12281>
- Weinberger, K., & Lumpkin, T. A. (2007). Diversification into Horticulture and Poverty Reduction: A Research Agenda. *World Development*, 35(8), 1464–1480. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2007.05.002>
- Wertheim, B., Van Baalen, E. J. A., Dicke, M., & Vet, L. E. M. (2005). Pheromone-mediated aggregation in nonsocial arthropods: An evolutionary ecological perspective. *Annual Review of Entomology*, 50(94), 321–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123329>
- Wharton, R. A. (1989). Classical biological control of fruit-infesting Tephritidae. In *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control (World Crop Pests)*, ed. AS Robinson, G Hooper (Vol. 3, pp. 303–313).
- White, I. M., & Elson-Harris, M. . (1992). Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. *C.A.B. International, Wallingford, UK.*, 601.
- White, I. M., de Meyer, M., & Stonehouse, J. (2000). A review of native and introduced fruit flies (Diptera, Tephritidae) in the Indian Ocean islands of Mauritius, Réunion, Rodrigues and Seychelles. In *Proceedings of the Indian Ocean Commission, Regional Fruit Fly Symposium, Flic en Flac, Mauritius, 5th-9th June, 2000.* (pp. 15–21).
- Wilson, E. O. (1963). Pheromones. *Scientific American*, 208(5), 100–114.
- Wilson, E. O., & Regnier, F. E. (1971). The Evolution of the Alarm-Defense System in the Formicine Ants. *The American Naturalist*, 105(943), 279–289. <https://doi.org/10.1086/282724>
- Wood, D. L., Browne, L. E., Silverstein, R. M., & Rodin, J. O. (1966). Sex pheromones of bark beetles-I. Mass production, bio-assay, source, and isolation of the sex pheromone of *Ips confusus* (LeC.). *Journal of Insect Physiology*, 12, 523–536. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(66\)90091-6](https://doi.org/10.1016/0022-1910(66)90091-6)
- Wyatt, T. D. (2010). Pheromones and signature mixtures: Defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 196(10), 685–700. <https://doi.org/10.1007/s00359-010-0564-y>
- Xu, X., Van Stee, L. L. P., Williams, J., Beens, J., Adahchour, M., Vreuls, R. J. J., Brinkman, U. A. T., & Lelieveld, J. (2003). Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 3(3), 665–682. <https://doi.org/10.5194/acp-3-665-2003>
- Yao, C. A., Ignell, R., & Carlson, J. R. (2005). Chemosensory coding by neurons in the coeloconic sensilla of the *Drosophila* antenna. *Journal of Neuroscience*, 25(37), 8359–8367. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2432-05.2005>

- Yew, J. Y., & Chung, H. (2015). Insect pheromones: An overview of function, form, and discovery. *Progress in Lipid Research*, 59, 88–105. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.06.001>
- Zhang, X., Wei, C., Miao, J., Zhang, X., Wei, B., Dong, W., & Xiao, C. (2019). Chemical Compounds from Female and Male Rectal Pheromone Glands of the Guava Fruit Fly, *Bactrocera correcta*. *Insects*, 10(78), 1–10. <https://doi.org/10.3390/insects10030078>
- Zhou, X., Slone, J. D., Rokas, A., Berger, S. L., Liebig, J., Ray, A., Reinberg, D., & Zwiebel, L. J. (2012). Phylogenetic and Transcriptomic Analysis of Chemosensory Receptors in a Pair of Divergent Ant Species Reveals Sex-Specific Signatures of Odor Coding. *PLoS Genetics*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002930>

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Article sur les phéromones de la mouche du melon *Zeugodacus cucurbitae*

1

1 **Female melon fruit flies, *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), are attracted by**
2 **a synthetic blend derived from male epicuticular chemistry**

3

4 Vincent Jacob¹, Gaëlle Ramiaranjatovo^{1,2}, Emma Persyn^{1,2,3}, Antonio Pompeiano⁴, Aleš
5 Machara⁵, Pavlína Kyjaková⁵, Toulassi Atiama-Nurbel^{1,2,6}, Giovanni Benelli⁷, Marc De
6 Meyer⁸, Lucie Vaníčková^{4,*}

7

8 ¹ CIRAD, UMR PVBMT, 7, ch de l'IRAT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

9 ² Université de la Réunion, UMR PVBMT, 7, ch de l'IRAT, F-97410 Saint-Pierre, La
10 Réunion, France

11 ³ Institute of Ecology & Environmental Sciences of Paris, Department of Sensory Ecology,
12 INRAE, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France

13 ⁴ Department of Forest Botany, Dendrology and Geobiocoenology, Faculty of Forestry and
14 Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, CZ-61300 Brno, Czech
15 Republic

16 ⁵ Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS, Flemingovo nám. 2, CZ-16000
17 Prague, Czech Republic

18 ⁶ Armeflhor, 1, chemin de l'Irfa, Bassin Martin, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

19 ⁷ Department of Agriculture, Food and Environment, University of Pisa, via del Borghetto 80,
20 IT-56124 Pisa, Italy

21 ⁸ Invertebrates Section, Royal Museum for Central Africa, Leuvensesteenweg 13, B-3080
22 Tervuren, Belgium

23

24 * Corresponding author. Email: lucie.vanickova@mendelu.cz, phone: +420 545 133 290,
25 ORCID: 0000-0001-7744-3246

26

Abstract

The melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett), is considered the most destructive pest of melons and other related cucurbit crops worldwide. Despite the potential of behaviour-based control strategies, little is known about its mate choice mechanisms. Herein, we investigated the production and chemoreception of cuticular hydrocarbons in both sexes of *Z. cucurbitae*, and the behavioural response they induce. The epicuticular composition of *Z. cucurbitae* males and females was studied relying to two-dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometric detection and interpreted using multivariate factorial analysis. A consistent differentiation of the chemical profiles over time was observed. In young individuals the chemical profiles did not differ between sexes, while sex-specific differences were noted in mature flies. The fly olfactory sensitivity to these compounds was explored through gas chromatography coupled to chopped triple electroantennography and electropalpography detectors. This extensive exploration of the pest olfactory sensitivity highlighted three male components, which as a blend induced a robust attractiveness of unmated naïve females in a six-choice olfactometer. The responsiveness of other Tephritidae species (a polyphagous species *Bactrocera dorsalis* and another cucurbit specialist *Dacus demmerezi*) to whole body extracts of *Z. cucurbitae* was also investigated, concluding that *Z. cucurbitae* uses species-specific olfactory receptors to detect these compounds. In addition, the palps were sensitive to a female-specific component with minute production in males, 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane. Overall, this study sets the stage for a tephritid lure based on pheromones and targeting females, with potential implications in pest management.

48

Keywords: behaviour-based control; cuticular hydrocarbons; pheromones; age-dependent production; GC×GC-TOFMS; GC-EAD; GC-EPD

51

Author Contributions

LV, TAN, VJ, GB, GR, EP, and MM conceived and designed research. LV, TAN, AM, PK, VJ, GR and EP conducted experiments. LV, VJ, AP analysed data. LV, VJ, GB, and MM wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

56

57 **Introduction**

58

59 The melon fruit fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae), formerly
60 known as *Bactrocera cucurbitae* or *Dacus cucurbitae*, is one of the most widespread and
61 destructive fruit fly pests infesting over 45 plant species, most of which belong to the
62 Cucurbitaceae family and include several commercially grown crops (White and Elson-Harris
63 1992; Dhillon et al. 2005; De Meyer et al. 2015). According to the recent macrogeographic
64 population structure studies, the melon fly originated in Central Asia, and expanded its range
65 to East Asia and Hawaii, as well as to Africa and the islands of the western Indian Ocean
66 (Virgilio et al. 2010). Since 1972, *Z. cucurbitae* has been the subject of eradication programs
67 in the southernmost part of Japan (Koyama et al. 2004), and has been repeatedly detected in
68 other parts of the world, e.g. California (USA) (Papadopoulos et al. 2013). Since 2000, *Z.*
69 *cucurbitae* has spread throughout large parts of Africa (while it was confined to restricted
70 range in eastern Africa before then) (De Meyer et al. 2015). Virgilio et al. (2010) stressed that
71 the anthropogenic transport is the most plausible promoter of the large-scale dispersal of the
72 melon fruit fly. The eradication programs mainly rely on Sterile Insect Technique (SIT).
73 However, the successful application of SIT depends on effective implementation of
74 knowledge about genetics, behaviour, chemical ecology, and dispersal strategies of *Z.*
75 *cucurbitae*. The melon fruit fly shows mating compatibility among different populations, and
76 limited intraspecific and morphological variability [for a review see De Meyer et al. (2015)].
77 Sex pheromones are, together with other semiochemicals, key tools for tephritid population
78 management (Benelli et al. 2014a, b). In this framework, the research on long-lasting
79 dispensers of male and female-borne pheromones may help to improve the population-
80 monitoring and mass-trapping assays (Gil-Ortiz 2012).

81 In the melon fly, it has been reported that both sexes produce volatile compounds eliciting
82 selective attraction of the opposite sex (Benelli et al. 2014a). *Zeugodacus cucurbitae* males
83 produce courtship calls by stridulation of the wings, and also emit sex and aggregation
84 pheromones at dusk (Kuba and Sokei 1988). They form leks where each male fights to defend
85 a small territory for mating purposes (Kuba and Koyama 1985; Koyama et al. 2004), a typical
86 feature of many tephritid species (Benelli 2015a). The aggregation pheromone attracts other
87 males to form leks (Kuba et al. 1984), whereas the sex pheromone is emitted by the males,
88 attracting conspecific virgin females (Sugimoto 1979; Suzuki and Koyama 1980, 1981; Kuba
89 and Sokei 1988). The male emissions consist of chemically diverse compounds, such as linear
90 hydrocarbons, amides, pyrazines, esters, alcohols, and acids (Sugimoto 1979; Suzuki and

91 Koyama 1980, 1981; Baker et al. 1982; Ohinata et al. 1982; Kuba and Sokei 1988; Nishida et
92 al. 1990). The pheromone-like volatiles extracted from *Z. cucurbitae* male rectal glands and
93 their possible roles in the courtship behaviour have been studied earlier (Baker et al. 1982;
94 Perkins et al. 1990; Nishida et al. 1993; Tan 2000; Koyama et al. 2004) The volatiles
95 produced by *Z. cucurbitae* females contain a variety of 1,7-dioxaspiro[5.5]undecanes (DSU)
96 and *N*-(3-methylbutyl)acetamide (3MA), where the biological role of spiroacetals remains
97 unclear (Baker and Bacon 1985). Notably, there is no information available on the temporal
98 production pattern of sex pheromones in this species. Moreover, it is still unclear if *Z.*
99 *cucurbitae* males can produce the female scent (e.g. DSU and/or 3MA) when they are young,
100 as reported for other tephritid species, e.g. the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi)
101 (Benelli et al. 2013, 2014a). Overall, limited knowledge is still available concerning the
102 epicuticular composition in *Z. cucurbitae* (Carlson and Yocom 1986), pointing out the need of
103 further research. Focusing on variation of epicuticular chemistry in relation to age and sex is
104 of particular importance for a better understanding of insect chemical communication
105 (Vaničková et al. 2012).

106 Cuticular hydrocarbons (CHs) are important components of the insect surface lipids and they
107 often count for the majority (up to 90%) of epicuticular lipids (Goh et al. 1993). These non-
108 polar compounds serve primarily as a protection against desiccation. They can also play an
109 important role in the inter- and intra-specific recognition, with special reference to mate
110 recognition and territorial displays (Blomquist and Bagnères 2010; Everaerts et al. 2010;
111 Benelli 2015b; Vaničková et al. 2017). In tephritid flies, CHs have been used specifically for
112 species delimitation and chemotaxonomy of cryptic species complexes, such as the
113 *Anastrepha fraterculus* complex or the so-called *Ceratitis* FAR complex (Vaničková 2012;
114 Vaničková et al. 2014, 2015a, b, c). Within the *Bactrocera* genus, a clear species segregation
115 of complex cuticular profiles of *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock from *Bactrocera*
116 *dorsalis* (Hendel) was observed. Results supported both taxonomic synonymization of
117 *Bactrocera invadens* Drew, Tsuru & White, *Bactrocera papayae* Drew & Hancock, and
118 *Bactrocera philippinensis* Drew & Hancock with *B. dorsalis*, as well as the exclusion of *B.*
119 *carambolae* from *B. dorsalis* (Vaničková et al. 2017). In addition to CHs, abundant complex
120 mixtures of sex-specific oxygenated lipids (3 fatty acids and 22 fatty acid esters) with
121 unknown functions have been identified in epicuticle extracts from females of *B. dorsalis* and
122 *B. carambolae* species. Furthermore, similar outcomes as observed in *Bactrocera* may
123 potentially also be found in *Zeugodacus*, and the characterization presented herewith may be
124 the basis for such chemotaxonomic studies.

125 In this scenario, the present study investigated the chemical composition of the epicuticle of
126 young and sexually mature *Z. cucurbitae* males and females, identifying the age- and sex-
127 specific differences and age-specific dynamics of semiochemicals' production. Results were
128 interpreted in relation to the age of flies, using multivariate analysis, since it has been reported
129 that gradual age-related dynamics are of relevance in the monitoring and control of insect pest
130 populations (Reeves et al. 2010). To explore the role of these compounds in chemical
131 communication within the species, the olfactory sensitivity of insects was investigated.
132 Responses to synthetic compounds were tested with triple electroantennography (EAG₃) and
133 electropalpography (EPG). Whole body extracts of mature virgin females and males were
134 analysed through chopped gas chromatography coupled with EAG₃ (GC-EAD₃) and EPG
135 (GC-EPD) detectors. The responsiveness of mature virgin males and females, young males,
136 and mature females from other tephritid species to the whole-body extract of *Z. cucurbitae*
137 males were compared. Finally, the attractiveness of mature unmated females toward a
138 synthetic blend including the electrophysiologically active male compounds was tested in a
139 six-choice olfactometer.

140

141 **Materials and methods**

142

143 ***Insects***

144 Larvae of *Z. cucurbitae* and *Dacus demmerezi* (Bezzi) were reared on zucchini (*Cucurbita*
145 *pepo* L.). *Bactrocera dorsalis* larvae were reared on an artificial diet following Duyck and
146 Quilici (2002). Briefly, the diet was composed by dehydrated carrot powder, brewer's yeast,
147 sugar, dehydrated potato, water, Nipagin/sodium benzoate, HCl, agar and wheat germ. All
148 flies were reared in CIRAD, UMR PVBMT (La Réunion, France) at 25±1 °C, R.H. 65±10 %
149 and 12:12 h (L:D) photoperiod. *Zeugodacus cucurbitae* were separated by sex 1-2 days after
150 emergence, fed with sugar, water and proteins, and used for electrophysiological experiments
151 at age 15-25 days after emergence, unless specified otherwise. 100 pupae of the same *Z.*
152 *cucurbitae* laboratory population were used for chemical analyses. Immediately after
153 emergence, the insects were separated by sex and stored into different glass chambers (30 ×
154 20.5 × 16 cm).

155

156 ***Extraction of epicuticular compounds***

157 Starting from day five of emergence until day 30 (i.e., at days 5, 15, 25, 30), five male and
158 five female flies were immobilized (-18 °C) and placed for 15 min into a desiccator to remove

159 the surface moisture. The compounds of the whole-body surface were extracted individually
160 with 0.5 mL hexane (Fluka, Germany) for 5 min in small glass vials. An internal standard (1-
161 bromodecane, 5 ng per 1 mL of extract) was used for the quantification. Each extract was
162 concentrated to approximately 100 μ L by a constant flow of nitrogen and stored in a freezer (-
163 18 °C) until analysis. Concerning electrophysiology samples, flies were anaesthetized with
164 CO₂. Forty males were pulled together in 6 mL of hexane (Sigma-Aldrich) and 120 females
165 were pulled together in 12 mL of hexane for 5 min. Each extract was concentrated, first under
166 reduced pressure at room temperature using a rotavapor (Hei-VAP, Heidolph, Schwabach,
167 Germany), then with a constant flow of nitrogen for reaching a final volume of 200 μ L.
168 Extractions were performed in the afternoon (3 pm local time). For behavioural assays, 250
169 males aged 15 to 20 days old were pulled together in 25 mL for 5 min. The solution was then
170 concentrated as for the electrophysiology samples up to about 500 μ L. This was further
171 diluted at 0.1 or 0.033 v/v in paraffin oil. Data for the two dilutions were pulled together.

172

173 *Chemical analyses*

174 The compound identification and quantification from the hexane body washes of males and
175 females were performed on a LECO Pegasus 4D instrument (LECO Corp., St. Joseph, MI,
176 USA) equipped with a non-moving quad-jet cryomodulator. A DB-5 column (J&W Scientific,
177 Folsom, CA, USA; 30 m \times 250 μ m i.d. \times 0.25 μ m film) was used for GC in the first
178 dimension. The second-dimension analysis was performed on a polar BPX-50 column (SGE
179 Inc., Austin, TX, USA; 2 m \times 100 μ m i.d. \times 0.1 μ m film). Helium was used as a carrier gas at
180 a constant flow of 1 mL min⁻¹. The temperature program for the primary GC oven was as
181 follows: 80 °C for 2 min, then 80–300 °C at 10 °C min⁻¹, and finally a 10 min hold at 320 °C.
182 The program in the secondary oven was 10 °C higher than in the primary one and was
183 operated in an iso-ramping mode. The modulation period, the hot-pulse duration and the cool
184 time between the stages were set to 3.0, 0.4 and 1.1 s, respectively. The transfer line to the
185 TOFMS was operated at 260 °C. The source temperature was 250 °C with a filament bias
186 voltage of -70 eV. The data-acquisition rate was 100 Hz (scans s⁻¹) for the mass range of 29–
187 400 amu. The detector voltage was 1750V. For each sample, 1 μ L was injected in the splitless
188 mode. The inlet temperature was 200 °C. The purge time was 60 s at a flow of 60 mL min⁻¹.
189 The data was processed and consecutively visualized on 2D and 3D chromatograms using
190 LECO ChromaTOFTM software. The first to be analysed under the given conditions was a
191 mixture of *n*-alkanes C₈-C₃₂ (1 \times 10⁻³ μ g μ L⁻¹, Sigma-Aldrich), followed by the samples. LECO
192 ChromaTOFTM is equipped with a retention index (RI) calculation function. The compounds

193 were identified by a comparison of their MS fragmentation patterns, retention times and RI
194 (Baker et al. 1982; Carlson and Yocom 1986; Nishida et al. 1990; Perkins et al. 1990; Goh et
195 al. 1993; Vaničková 2012; Vaničková et al. 2014).

196

197 ***Synthesis of 2-methoxy-N-(3-methylbutyl)acetamide***

198 To a solution of isoamylamine (0.096 g; 1.11 mmol), methoxyacetic acid (0.10 g; 1.11 mmol)
199 and triethylamine (0.20 g; 2.0 mmol) in dry dichloromethane (5 mL) was added *N,N,N',N'*-
200 tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (0.46 g; 1.22 mmol). The
201 reaction mixture was stirred overnight and then was quenched by an addition of 5% aqueous
202 solution of citric acid (5 mL). The organic layer was separated, washed with water (2 mL),
203 brine (2 mL) and was evaporated under reduced pressure. Standard column chromatography
204 (silica gel, eluent ethyl acetate) of the residue afforded 0.16 g (90 %) of the title compound;
205 spectral data agreed with literature values (Baker et al. 1982). ¹H NMR (401 MHz, CDCl₃) δ
206 3.90 (s, 2H), 3.43 (s, 3H), 3.36 – 3.23 (m, 2H), 1.81 – 1.57 (m, 1H), 1.49 – 1.38 (m, 2H), 0.94
207 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.4, 72.0, 59.2, 38.4, 37.1, 25.8, 22.4.
208 HRMS (ESI⁺): *m/z* calculated for C₈H₁₈O₂N = 160.1332; found = 160.1331 [M+H]⁺.

209

210 ***Odour delivery system***

211 For electrophysiology experiments, a charcoal-filtered and humidified air stream (23 mL s⁻¹,
212 air speed 60 cm s⁻¹) was continuously delivered to the insect antenna through a 7-mm glass
213 tube held at 4 mm. Stimuli were applied by inserting 15 cm upstream a Pasteur pipette
214 containing a small piece of filter paper loaded with 1 μL of an odorant solution. Odorant
215 solutions consisted in compounds diluted in hexane, or pure hexane for control stimulations.
216 A puff of air (200 ms duration, 5 mL s⁻¹) was delivered through the pipette with a solenoid
217 valve (LHDA-1233215-H, Lee Company, France) controlled by a digital output module (NI
218 9472, National Instr., Nanterre, France) and the software Labview (National Instr., France).
219 For each experiment, the compounds were applied in random order. For each compound, a
220 control stimulus (0 ng) was followed by three consecutive stimuli with increasing quantity of
221 compound (1, 100 or 10,000 ng). Time intervals of 1 minute were applied between
222 consecutive puffs, except after the stimuli with 10,000 ng of a compound where 2 min were
223 applied. 2-methoxy-*N*-(3-methylbutyl)acetamide (2M3MA) was tested in an independent set
224 of experiments, and was systematically followed by stimulation with ethyl decanoate at the
225 dose 10² ng, the response to which was similar between the two sets of experiments

226 (Wilcoxon's rank sum test, $p=0.27$). The compounds used in this study were commercially
227 available chemicals (chemical purity > 98%) purchased from Sigma-Aldrich.

228 For GC-EAD₃ and GC-EPD experiments, antennae and palps were stimulated through a GC
229 (Clarus 580, Perkin Elmer) equipped with a Rxi-5ms column (Restek, 30m × 0.32mm i.d.,
230 0.25 μm film) and injected with the hexane body washes. The temperature program for the
231 GC was as follow: 1 min at 70°C, ramp at 8°C min⁻¹ up to 270 °C, hold 10 min. The
232 compound identity was confirmed with a GC-MS injection with a similar phase column. The
233 column was branched to a D-Swafer Dean's Switch (Perkin Elmer) to modulate the output
234 between the flame ionization detector (FID) and the EAD₃ at 0.5 Hz, copying the chopped
235 GC-EAD setup suggested by Myrick and Baker (2018). The three solenoid valves used for
236 modulation were controlled by the NI 9472 digital output module and the software LabView.
237 The gauge pressure was set at 15 psi with Nitrogen as a makeup gas in one branch of the D-
238 swafer and measured at 12 psi in the other branch. The helium flow in the column was set at 2
239 mL C min⁻¹, whereas the total flow send in the odour delivery system insect was around 25
240 mL C min⁻¹ (N₂ + He).

241

242 ***Electrophysiology assays***

243 The flies were secured in a plastic tube and the protruding head was fixed with dental wax,
244 leaving the antennae and maxillary palp exposed. For EAG₃ and GC-EAD₃, the scapes (1st
245 antennal segments, no olfactory functions) were further fixed with silicon adhesive (Kwik-Sil,
246 WPI, Hitchin, UK). Glass capillary electrodes (tip diameter 1-2 μm) were filled with 120 mM
247 NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 4 mM MgCl₂ and 10 mM HEPES. The reference electrode
248 was inserted in the right eye. For EAG₃ and GC-EAD₃, three recording electrodes,
249 simultaneously leant against the left funiculus, were positioned latero-proximally, latero-
250 distally, and at the centre of the medial face. For EPG and GC-EPD, one single electrode was
251 leant against the left maxillary palp. The signal was amplified (x1000), band-pass filtered
252 (0.1Hz to 1kHz) with a 4-channel differential amplifier (Model 1700, AM-Systems, Sequim,
253 USA), and digitized at 500 Hz (NI 9215, National instr.) with the Labview software. In all
254 recordings, a control stimulus with 1-octen-3-ol (chemical purity > 98%, Sigma-Aldrich) was
255 applied before and after the runs to ensure responsiveness.

256

257 ***Behavioural assays***

258 Orientation preferences of mature (11 to 25 days after emergence) naive (no exposure to male
259 odours) virgin females were tested in a six-choice olfactometer replicated from (Biasazin et

260 al. 2018). Experiments were performed in the morning (around 10 am) or in the afternoon
261 (around 3 pm). 30 females were starved respectively during 6 or 16 h, then released into an
262 arena consisting of a glass cage (420×420×420 mm) topped with six circularly arranged traps
263 and pierced in the five other faces by ventilation holes (diameter 120 mm, covered with an
264 insect proof mesh). The number of flies in each trap was counted 30 min after insertion. Each
265 trap consisted of a circular opening (diameter 50 mm) covered with a glass funnel (height 45
266 mm, basal diameter 60 mm) inside a trapping chamber consisting of a closed glass cylinder
267 (diameter 70 mm, height 50 mm). The trapping chamber was connected through a small hole
268 (diameter 5 mm) to an odorized chamber consisting of another glass cylinder (diameter 70
269 mm, height 50 mm). The setup was lighted through 6 light bulbs positioned above each trap
270 and diffracted using an opaque white plexiglass panel. A charcoal-filtered and humidified air
271 flow (0.5 L.min⁻¹) was injected through each trap via the odorized chamber. An open
272 Eppendorf containing a piece of filter paper loaded with 10 µL of an odorant solution was put
273 inside the odorized chambers. The odorant solutions consisted in paraffin oil (control), a male
274 whole-body extract, or a synthetic blend. Each part was thoroughly cleaned between
275 experiments and the trap parts put in an oven (300 °C, 4 hours) for deodorization. We
276 performed two sets of experiments; first, male whole-body extract was tested vs. control, then
277 the synthetic blend was tested vs. control. Both modalities were disposed alternately on three
278 traps each with a rotation between experiments.

279

280 ***Data analysis***

281 The patterns of the epicuticular composition of *Z. cucurbitae* depending on age or sex were
282 analysed by multiple factorial analysis (MFA) (Escofier and Pagès 2008). Prior to the MFA
283 the peaks of the 45 compounds were integrated in LECO ChromaTOF™ software and
284 exported. The relative peak areas as well as absolute amounts of all the substances were
285 calculated. MFA allows analysing a set of observations described by several groups of
286 variables within the same framework, with a normalization of the individual data sets. The
287 analysis derives an integrated picture of the observations and of the relationships between the
288 groups of variables. MFA was performed in two steps. First, a principal component analysis
289 (PCA) was computed on each data set, which is then “normalized” by dividing all its elements
290 by the square root of the first eigenvalue obtained from its PCA. Then, the normalized data
291 sets were merged to form a single matrix and a global PCA is performed on this matrix. The
292 individual data sets were then projected onto the global analysis to analyse communalities and
293 discrepancies. The coordinates of each variable are the correlation coefficients with the two

294 first principal components. Compounds significantly contributing to MFA dimensions were
295 used to explain differences among sexes and age groups (normal law adjustment test on
296 compounds correlation coefficients, $\alpha=0.05$).

297 A heat map was used to visualize the complex data sets organised as matrices. Heat maps
298 make it possible to identify differences in the relative amounts of CHs between genders and
299 age-groups, with different compounds tending to form small clusters according to their
300 quantities. The dendrograms were created using correlation-based distances and the Ward
301 method of agglomeration was applied (Key 2012). To boost the understanding of the
302 differences and similarities between individual age groups, we focused on the compounds
303 used to construct factor maps. Compounds that are significantly correlated ($\alpha=0.05$) to the
304 two first dimensions are assigned in Table 1 by corresponding correlation and *P*-values. In
305 detail, 37 compounds were selected for their statistical relevance in the first dimension of
306 MFA, while two compounds were chosen from the second dimension of MFA. All
307 computations were performed with R 3.0.3 (R Core TEAM 2014); R packages *FactoMineR*
308 (Husson et al. 2013), and *gplots* (Warnes and et al 2013) were used.

309 For quantifying the EAG₃ and EPG response amplitudes to synthetic compounds, the
310 recordings were filtered with a Gaussian convolution with a width of 20 ms. The amplitude
311 was defined as the maximum negative peak in the 0.5 s following stimulation minus the
312 average value in the 0.5 s preceding stimulation. The response to the first control stimulus
313 was subtracted. The amplitudes were averaged between the three recording positions for
314 EAG₃. GC-EAD₃ and GC-EPD recordings stimulated with GC were down sampled at 10Hz.
315 The power of the EAD₃ and EPD recordings at 0.5 Hz (frequency of modulation of the GC
316 output) was estimated with a Morlet's wavelet transform (cran R package "*Rwave*", function
317 *vwt*). The EAD₃ power at 0.5 Hz was then averaged between the three positional recordings.
318 The amplitude of responses was defined as the maximum power in EAD₃ or EPD in 5 s-time
319 windows manually time-locked on the FID peaks, subtracted with a reference level. The
320 reference level was defined as the median of maximum power in EAD₃ or EPD in 5 s-moving
321 windows encompassing the entire GC run. Signal to noise ratio were estimated with *z*
322 statistics, *z* being the amplitude of responses divided by the standard deviation of the
323 maximum power in 5 s-moving windows encompassing the entire GC run.

324 In all the electrophysiological and behavioural data, bootstrap statistics on median values
325 were used, including the 95% confidence interval (c.i.), unless stated otherwise (number of
326 repetitions above 1000). For GC-EPD response to female whole body extract, males (*n*=3)
327 and females (*n*=5) were combined for bootstrapping. Comparison between species was

328 qualitative observations, since the number of repetitions is too low for statistical analysis.
329 Dose-sensitivity of EAG₃ antennal responses were tested with an ANOVA, with the different
330 doses considered as factors. For behavioural data, we tested if the number of trapped females
331 depended on treatment using a generalized mixed linear model (glmm, Poisson family) with
332 trap position, experiment identification number and timing (morning or afternoon) as random
333 factors.

334

335 **Results**

336

337 *Cuticular hydrocarbons of Z. cucurbitae vary with sex and age*

338 Chemical analyses of the whole-body extracts of *Z. cucurbitae* males and females resulted in
339 identification of 45 compounds, consisting of a chemically diverse mixture of 10 linear and
340 22 methyl branched hydrocarbons, 7 esters, a pyrazine, two amides, two terpenes, and one
341 unidentified compound (Table 1). The chain-length of the carbon backbones ranged from C₁₀
342 to C₃₀. The most prominent peaks identified in all chromatograms were hexacosane (34 in
343 Table 1 and Fig. 1, a21 in Fig. 2), a mixture of 11-/13-/15-methylhexacosanes (35, a22), and
344 mixture of 12-/14-methylhexacosanes (37, a24) (Fig. 1, 2).

345 A comparison of the chemical profiles of adult virgin males and females revealed qualitative
346 and quantitative differences in the composition of the hexane body washes. Male-specific
347 compounds were identified as tetramethylpyrazine (TMP) (4, b2), 2-methoxy-*N*-(3-
348 methylbutyl)acetamide (2M3MA) (9, b4), ethyl decanoate (14, c1), ethyl 4-hydroxybenzoate
349 (19, c2), ethyl tetradecanoate (20, c3), and ethyl hexadecanoate (21, c4). To visualize
350 quantitative patterns across all identified compounds and age groups a heat map was
351 constructed (Fig. 2). Compounds from the same chemical class formed small clusters (Fig. 2).
352 TMP (b2), 3MA (b3), and 2M3MA (b4) were present in higher concentrations in older males
353 (15-, 20-, 30-days-old) relative to young males (5-days-old) (Fig. 2).

354 In females, older flies (15- and 25-days-old) had higher amounts of a blend of 10-/12-/14-
355 methyloctacosanes (a29) when compared to younger females or males (5-days-old) (Fig. 2).
356 Interestingly, the female specific pheromone compound DSU (a4) was identified in sexually
357 mature males (15- and 25-days-old) (Table 1, Fig. 2).

358 Significantly different chemical patterns were confirmed in both genders when running
359 multiple factorial analysis (MFA) based on 45 compounds classified in three chemically
360 distinct groups (Fig. 3). Factorial axis 1 (72.68 % of the variance) separated the samples
361 according to the sex, whereas the second axis (11.63 % of the variance) separated the female

362 samples according to the age (Fig. 3A). CHs were mostly positively correlated to the first
363 dimension, whereas the esters and three non-hydrocarbon compounds (b2, b3, b4) are
364 negatively correlated to the first dimension. However, squalene (b5) was the main compound
365 responsible for the separation in the second axis (Fig. 3B).

366

367 ***Z. cucurbitae antennae are sensitive to three male compounds***

368 The whole-body extract of 40 *Z. cucurbitae* males was analysed through chopped GC-EAD₃
369 (Fig. 4). For eight females and seven males *Z. cucurbitae*, electroantennograms were
370 simultaneously recorded and averaged at three positions scanning the surface of the funiculus.
371 Responses to three compounds, i.e., TMP, ethyl decanoate, and 2M3MA, were noted. Both
372 female and male EAD₃ responded significantly to 2M3MA (females: $z=2.18$, c.i. 1.57 - 3.02,
373 $p<0.001$ bootstrap; males: $z=1.47$, c.i. 0.03 - 1.97, $p=0.03$ bootstrap). Response to ethyl
374 decanoate was significant in males ($z=0.57$, c.i. -0.3 - 0.96, $p=0.03$ bootstrap) but not in
375 females ($z=0.41$, c.i. -0.17 - 0.94, $p=0.27$ bootstrap), however there was no significant
376 difference between sexes ($p=0.77$ bilateral bootstrapped difference in median). Females
377 responded significantly to TMP ($z=0.4$, c.i. 0.24 - 0.56, $p=0.008$ bootstrap), while the same
378 was not true for males ($z=0.01$, c.i. -0.12 - 0.16, $p=0.33$ bootstrap); the difference between
379 sexes was significant ($p=0.023$ bilateral bootstrapped difference in median). A small response
380 to ethyl paraben ($z=0.38$, c.i. -0.06 - 0.71, $p=0.025$ bootstrap) was observed in males, and a
381 small response to ethyl laurate ($z=0.18$, c.i. 0.04 - 0.24, $p=0.022$ bootstrap) was noted in
382 females.

383 The whole-body extract of males was then analysed through chopped GC-EAD₃ performed in
384 nine young males aged seven days after emergence. Young males responded to 2M3MA
385 ($z=1.33$, c.i. 1.12 - 3.08, $p<0.001$ bootstrap), ethyl decanoate ($z=0.88$, c.i. 0.21 - 1.29, $p<0.001$
386 bootstrap), ethyl paraben ($z=0.30$, c.i. 0.12 - 0.35, $p<0.001$ bootstrap) and ethyl laurate
387 ($z=0.14$, c.i. 0.07 - 0.28, $p=0.01$ bootstrap). The response patterns in younger males was
388 similar to older males, except a higher response to 2M3MA ($p=0.042$ bilateral bootstrapped
389 difference in median).

390

391 ***Z. cucurbitae maxillary palps but not antennae are sensitive to DSU produced by females***

392 The whole-body extract of 120 *Z. cucurbitae* females was analysed through chopped GC-
393 EAD₃ (Fig. 5). Electroantennograms were recorded simultaneously and averaged at three
394 antennal positions of six males and four females. A significant response to 2M3MA was

395 observed both in females and males ($z=1.25$, c.i. 0.53 - 1.42, $p<0.001$ bootstrap, female and
396 males combined $n=10$).

397 Then, GC-EPD recordings were carried out to evaluate the responses evoked by whole-body
398 extracts (fig.6). The analysis of the female body extract revealed a strong response in the
399 palps of both sexes to the female compound DSU ($z=6.77$, c.i. 4.51 - 10.00, $p<0.001$
400 bootstrap, both sexes combined, $n=8$). While analysing the male body extract with GC-EPD, a
401 small but significant response was observed in males ($z=1.39$, c.i. 0.15 - 2.56, $p<0.001$
402 bootstrap, $n=8$), but not in females ($z=0.27$, c.i. -0.05 - 2.5, $p=0.31$, bootstrap test, $n=9$). The
403 response levels of EPD to male body extracts did not differ significantly between males and
404 females at the timing of DSU release ($p=0.32$, bilateral bootstrapped difference in median).

405

406 ***Stimulations with synthetic compounds suggest a lack of sensitivity of Z. cucurbitae to*** 407 ***3MA***

408 The antennae and the palps of females and males *Z. cucurbitae* were stimulated with synthetic
409 compounds at different doses while recording EAG₃ and EPG (Fig. 7). Electroantennogram
410 response patterns did not vary with the position of recording, thus recordings at the three
411 positions were averaged for each fly. Dose-sensitive antennal responses were found to TMP
412 (females: $F_{3,24}=10.03$, $p<0.001$; males $F_{3,20}=7.17$, $p=0.002$), DSU (females: $F_{3,24}=5.31$,
413 $p<0.01$; males $F_{3,20}=5.46$, $p<0.01$), 2M3MA (females: $F_{3,20}=13.1$, $p<10^{-4}$; males $F_{3,20}=25.9$,
414 $p<10^{-6}$) and to ethyl decanoate (females: $F_{3,24}=17$, $p<10^{-5}$; males $F_{3,20}=20.06$, $p<10^{-5}$). A small
415 dose-sensitive response to ethyl myristate was observed in males ($F_{3,20}=4.91$, $p=0.01$) but not
416 in females ($F_{3,24}=1.16$, $p=0.35$). No response was observed to 3MA (females: $F_{3,24}=0.61$,
417 $p=0.61$; males $F_{3,20}=0.15$, $p=0.93$) or ethyl palmitate (females: $F_{3,24}=1.01$, $p=0.41$; males
418 $F_{3,20}=0.15$, $p=0.93$). No significant difference was observed between sexes (bilateral
419 bootstrapped difference in median, $p>0.1$ for all dose/compound tested). To ensure that the
420 responses were not due to impurities, we performed a GC-EAD₃ analysis of an iso-massic
421 solution of synthetic compounds with a female *Z. cucurbitae* and confirmed qualitatively a
422 response to TMP, 2M3MA, ethyl decanoate and ethyl myristate. The palps of both females
423 and males responded to DSU in a dose-sensitive manner (females: $F_{3,20}=10.45$, $p<0.001$;
424 males $F_{3,20}=6.20$, $p<0.01$). The other tested compounds did not elicit palp responses.

425

426 ***Natural and synthetic male blends attract Z. cucurbitae virgin females***

427 The attractiveness of mature virgin females toward the male extract was tested in a six-choice
428 olfactometer at morning and afternoon experiments (Fig. 8). After 30 minutes, 25 % (c.i. 11.7

429 - 33.3 %, n=20) of the females were trapped, of which 60 % (c.i. 52 - 77.5 %) were by the
430 natural extract. More females were trapped by the natural extract than by the control solution
431 (glmm Poisson family, $p < 0.05$) with no impact of the part of the day (random effect, $p = 0.2$).
432 We then tested the attractiveness of a synthetic blend consisting in a mixture of TMP, 3MA,
433 2M3MA, ethyl decanoate, ethyl myristate and ethyl palmitate in a respective ratio of
434 15:100:25:2:2:5 (FID peak amplitude) diluted at 100 ng/ μ L in paraffin oil. 36.7 % (c.i. 23.3 –
435 50 %, n=21) of the females were trapped, of which 62.5 % (c.i. 53.9 – 73.3 %) were by the
436 synthetic blend. More females were trapped by the synthetic blend than by the control
437 solution (glmm Poisson family, $p < 0.01$) with no impact of the part of the day (random effect,
438 $p = 0.18$).

439

440 ***The olfactory sensitivity to Z. cucurbitae hydrocarbons is species-specific***

441 Evolutionary processes might result in the specific detection by *Z. cucurbitae* of the
442 compounds involved in conspecific recognition. Therefore, chopped GC-EAD₃ assays were
443 conducted to compare the antennal sensitivity of *Z. cucurbitae*, *D. demmerezi* and *B. dorsalis*
444 females to the whole-body extracts of *Z. cucurbitae* males (Fig. 9). The responses to TMP and
445 ethyl decanoate noted in *Z. cucurbitae* were not observed in other species. *Bactrocera*
446 *dorsalis* antennae responded to 2M3MA ($z = 0.96, 1.05, 0.94$ and 0.96) as *Z. cucurbitae* did
447 ($z = 2.18$, c.i. 1.57 - 3.02), while the same was not true for *D. demmerezi* ($z = 0.66, 0.63$ and -
448 0.71). A response to 3MA was observed in *B. dorsalis* ($z = 0.58, 0.72, 0.29$ and 0.23) but not in
449 *Z. cucurbitae* ($z = 0.08$, c.i. -0.23 - 0.26), while a response to ethyl paraben was observed in *D.*
450 *demmerezi* (1.21, 1.52 and 1.14) but not in *Z. cucurbitae* ($z = -0.12$, c.i. -0.33 - 0.25).

451

452

453 **Discussion**

454

455 In this paper we investigated the epicuticular composition of male and female melon flies at
456 different age after emergence, and the chemoreception of the identified volatile compounds by
457 both sexes. It led to the elaboration of a synthetic pheromone blend that attracts *Z. cucurbitae*
458 females in a 6-choice olfactometer. The melon fly is added to the short list of Tephritidae
459 species for which a synthetic pheromone attractant of females is known, which includes
460 *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Jang et al. 1994), *Bactrocera carambolae* Drew & Hancock
461 (Wee and Tan 2005) and *B. oleae* (Carpita et al. 2012; Canale et al. 2013, 2015). This finding
462 may lead to the development of novel tools for the sustainable management of this pest,

463 although an optimization of the blend would require further laboratory, semi-field, and field
464 behavioural assays.

465 Our findings highlighted that the epicuticular composition of *Z. cucurbitae* is influenced by
466 age and sex. Regarding the CH components of the melon fruit fly cuticle, our results are
467 partially in agreement with the earlier research by Goh et al. (1993) and Carlson and Yocom
468 (1986). Nevertheless, these authors identified CHs up to C₃₆ in males and females of two
469 populations of *B. dorsalis* complex (from Malaysia) and one population of *Z. cucurbitae*
470 (from Hawaii). *Zeugodacus cucurbitae* from Hawaii were characterized by the presence of
471 11-/13-/15-methylnonacosanes, 3-methylnonacosane and triacontane on their cuticle (Carlson
472 and Yocom 1986), whereas the more intense compounds identified in the present study were a
473 mixtures of methylhexacosanes. The differentiation of the chemical profiles of same insect
474 species living in geographically diverse habitat has been previously documented in several
475 groups, including termites (Haverty et al. 1997, 2000), ants (Blight et al. 2012; Fox et al.
476 2012), wasps (Bonelli et al. 2015), and fruit flies (Alves et al. 2010; Bontonou et al. 2013;
477 Jennings et al. 2014). Recent studies on the chemical profiles of the populations belonging to
478 the same tephritid species indicate that they differ according to geoclimatic conditions such as
479 relative humidity, altitude, and relative temperature (Vaničková et al. 2015c, b, a).
480 Nevertheless, future studies focused on the elucidation of the mechanisms involved in the
481 differentiation of the chemical profiles of geographically distinct melon flies are needed.

482 Herein, the chemical profiles of *Z. cucurbitae* virgin males and females revealed qualitative
483 and quantitative differences in their composition. Male flies produce relatively small
484 quantities of 3MA, 2M3MA, methyl, ethyl, and propyl 4-hydroxybenzoate, and a large
485 quantity of 1,3-nonanediol endogenously in their rectal glands (Ohinata et al. 1982; Baker and
486 Bacon 1985; Nishida et al. 1990; Perkins et al. 1990; Fletcher and Kitching 1995; Tan 2000).
487 The quantities stored in the rectal glands increase with age starting from two weeks after
488 eclosion (Nishida et al. 1993). In the present study, we pointed out that the production of the
489 male-specific pheromone components on the cuticle increased with age, and young males (i.e.
490 5-days-old flies) do not produce these compounds, i.e., 3MA and ethyl esters of decanoic,
491 tetradecanoic and hexadecanoic acids. However, we did not observe any differences in the
492 antennal sensitivity of 7-days-old and mature males, suggesting that the chemoreception of
493 these compounds is already functional at this age.

494 The female-specific pheromone compound DSU has been firstly identified here in sexually
495 mature males of *Z. cucurbitae*. The EPG of *Z. cucurbitae*, which can be considered as a
496 specific detector of DSU, confirmed this observation. DSU was first reported by Baker and

497 Bacon (1985) in the aeration extracts from melon fly females, which were attractive for
498 males. In our study, young (5-days-old) and old (30-days-old) males of melon fly do not
499 produce the DSU, while the sexually mature flies (15-, 25-days-old) produce minor quantities
500 of this compound. Males releasing a female sex pheromone attract rivals and elicit courtship
501 behaviour, male-male mating attempts may distract males from courting females, thus DSU
502 production being not advantageous for males (Ruther and Steiner 2008; Benelli et al. 2013). A
503 potential explanation would be that DSU plays a role triggering aggression in males fighting
504 for courtship sites (Kuba and Koyama 1985; Koyama et al. 2004; Benelli 2015a, b). We
505 observed that both a synthetic spiroacetal and fly-born DSU are essentially detected by
506 olfactory receptor neurons located in the maxillary palps, notwithstanding a small antennal
507 response. Noteworthy, such involvement of the palps was reported for the detection of the
508 male attractant methyl eugenol (Chieng et al. 2018) and cue lure (Verschut et al. 2018) in
509 related tephritid species.

510 Some of the components identified here, namely TMP, 3MA and series of ethyl esters, are
511 putative sex attractants for *Z. cucurbitae* females (Baker et al. 1982; Fletcher 1989; Nishida et
512 al. 1990; Perkins et al. 1990; Fletcher and Kitching 1995). 3MA has been suggested to elicit
513 activation and increased flight activity of female *Z. cucurbitae* (Baker et al. 1982), but the
514 exact role of the other components was not defined (Fletcher and Kitching 1995). The
515 electrophysiological data included here shed light of their relative importance. By decreasing
516 order, we observed an olfactory response to 2M3MA, DSU, ethyl decanoate and TMP, with
517 no obvious difference between sexes apart perhaps to TMP. We also observed a weak EAG₃
518 response to ethyl myristate and no response to ethyl palmitate, but this might be due to the
519 lower volatility of these compounds. On the other hand, we did not observe any neuronal
520 response to natural or synthetic 3MA. The use of three points electroantennography and EPG
521 allows scanning the activity of most olfactory receptor neurons of the insect (Jacob 2018;
522 Ramiaranjatovo et al. 2023) and decreases the probability of missing an olfactory response.
523 These results suggest that 3MA might not have a pheromone role for *Z. cucurbitae*, but it
524 might be contradicted with the observation of a behavioural response to this compound in the
525 future.

526 Even if the mix of cuticular hydrocarbons differs quantitatively and qualitatively among
527 Dacini species, many compounds or compound derivatives are shared (Baker and Bacon
528 1985; Carlson and Yocom 1986; Goh et al. 1993; Fletcher and Kitching 1995; Benelli et al.
529 2014a; Vaničková et al. 2017; Noushini et al. 2020). As in *Drosophila* (Symonds and
530 Wertheim 2005), the mode of evolution of the pheromone composition of Tephritidae might

531 be more gradual than saltatory. Furthermore, the sex-specificity of the chemical profiles may
532 be driven by the sexual selection if the chemical composition of the cuticle is used as a
533 pheromone signal, as reported in *Drosophila* spp. (Bontonou and Wicker-Thomas 2014).
534 Many olfactory receptors are functionally conserved among tephritid species (Jacob et al.
535 2017). However, rapid changes in the olfactory pathways involved in pheromone detection
536 can contribute to the reproductive isolation between species (Dekker et al. 2015). Few studies
537 focused on the electrophysiological response of Dacini species to cuticular hydrocarbons
538 (Canale et al. 2013, 2015; Levi-Zada et al. 2020; Noushini et al. 2020). An EPD response to
539 DSU was detected in *Bactrocera frauenfeldi* (Schiner) (Noushini et al. 2020), suggesting that
540 palp-sensitivity to spiroacetals is a widespread trait among Dacini species. *Bactrocera oleae*
541 and *Bactrocera zonata* (Saunders) might be more sensitive than *Z. cucurbitae* to C14-C16
542 ethyl esters, since we did not observe the EAG responses reported in these species (Canale et
543 al. 2015; Levi-Zada et al. 2020). However, we found an increased antennal sensitivity of *Z.*
544 *cucurbitae* compared to other Dacini species to the *Z. cucurbitae* compounds TMP and ethyl
545 decanoate, even if EAG response to TMP was reported in *B. zonata* (Levi-Zada et al. 2020).
546 We also observed similar EAD responses in *Z. cucurbitae* and *B. dorsalis* to 2M3MA which
547 might have a specific ecological role. Finally, *B. dorsalis* but not *Z. cucurbitae* was sensitive
548 to 3MA, and this compound elicited an anemotaxis behaviour in the sibling species *B.*
549 *carambolae* (Wee and Tan 2005). These observations suggest that different compounds and
550 olfactory pathways might be involved in pheromone detection across Dacini species.
551 Overall, our detailed analysis and identification of cuticular components add basic knowledge
552 to the chemical ecology of *Z. cucurbitae*. Furthermore, our findings may be further considered
553 as a baseline for age estimation for the melon flies used in eradication programs. For
554 screening purposes, the analysis can be performed on the more widely available GC with a
555 flame-ionization detector, and the RI determined here can be used for semiochemicals
556 identification. Moreover, the information presented here may be considered further as bases
557 for comparison and characterization of wild and mass-reared populations of *Z. cucurbitae*.

558

559 **Acknowledgments**

560 First of all we are grateful to the late Serge Quilici who initiated this collaborative work. The
561 authors sincerely acknowledge support provided by the International Atomic Energy Agency
562 (IAEA) via the Coordinated Research Project ‘Simultaneous Application of SIT and MAT to
563 Enhance Pest *Bactrocera* Management’ under the contract no. 23126/R0. We are grateful to
564 Radka Nagy (IOCB, Czech Republic) for assistance with chemical analyses. We are grateful

565 to the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences (RVO:
566 61388963). The authors thank Eva Hoarau, Robin Comte, Theodor Lieby and Theo Costantini
567 for their contribution to data collection, Jim Payet and Serge Glénac for rearing the insects,
568 and Sebastian Larsson Herrera and Teun Dekker for providing the six-choice olfactometer.
569 The authors greatly acknowledge the Plant Protection Platform (3P, IBISA) and Jérôme
570 Minier together with the Agrifood platform (CIRAD UMR Qualisud). This work was funded
571 by the Conseil Régional de la Réunion, the Conseil Départemental de la Réunion, the
572 European Regional Development Fund (ERDF), the European Agricultural Fund for Rural
573 Development (EAFRD) and the Centre de Coopération Internationale en Recherche
574 Agronomique pour le Développement (CIRAD). This work was carried on within the
575 framework of the Technological Research Unit “Biocontrol in Tropical Agriculture”.

576

577 **References**

578

- 579 Alves H, Rouault JD, Kondoh Y, et al (2010) Evolution of cuticular hydrocarbons of
580 hawaiian drosophilidae. *Behav Genet* 40:694–705. [https://doi.org/10.1007/s10519-010-](https://doi.org/10.1007/s10519-010-9364-y)
581 9364-y
- 582 Baker R, Bacon AJ (1985) The identification of spiroacetals in the volatile secretions of two
583 species of fruit fly (*Dacus dorsalis*, *Dacus cucurbitae*). *Experientia* 41:1484–1485
- 584 Baker R, Herbert RH, Lomer RA (1982) Chemical components of the rectal gland secretions
585 of male *Dacus cucurbitae*, the melon fly. *Experientia* 38:232–233
- 586 Benelli G (2015a) Aggression in tephritidae flies: Where, when, why? Future directions for
587 research in integrated pest management. *Insects* 6:38–53.
588 <https://doi.org/10.3390/insects6010038>
- 589 Benelli G (2015b) Should I fight or should I flight? How studying insect aggression can help
590 integrated pest management. *Pest Manag Sci* 71:885–892.
591 <https://doi.org/10.1002/ps.3974>
- 592 Benelli G, Bonsignori G, Stefanini C, et al (2013) The production of female sex pheromone in
593 *Bactrocera oleae* (Rossi) young males does not influence their mating chances. *Entomol*
594 *Sci* 16:47–53. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2012.00538.x>
- 595 Benelli G, Daane KM, Canale A, et al (2014a) Sexual communication and related behaviours
596 in Tephritidae: Current knowledge and potential applications for Integrated Pest
597 Management. *J Pest Sci* (2004) 87:385–405. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0577-3>
- 598 Benelli G, Giunti G, Canale A, Messing RH (2014b) Lek dynamics and cues evoking mating

- 599 behavior in tephritid flies infesting soft fruits: Implications for behavior-based control
600 tools. *Appl Entomol Zool* 49:363–373. <https://doi.org/10.1007/s13355-014-0276-9>
- 601 Biasazin TD, Larsson Herrera S, Kimbokota F, Dekker T (2018) Translating olfactomes into
602 attractants : shared volatiles provide attractive bridges for polyphagy in fruit flies. *Ecol*
603 *Lett* 22:108–118. <https://doi.org/10.1111/ele.13172>
- 604 Blight O, Berville L, Vogel V, et al (2012) Variation in the level of aggression, chemical and
605 genetic distance among three supercolonies of the Argentine ant in Europe. *Mol Ecol*
606 21:4106–4121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05668.x>
- 607 Blomquist G, Bagnères A (2010) *Insect hydrocarbons biology, biochemistry, and chemical*
608 *ecology*. Cambridge University Press, New York
- 609 Bonelli M, Lorenzi MC, Christidès JP, et al (2015) Population diversity in cuticular
610 hydrocarbons and mtDNA in a mountain social wasp. *J Chem Ecol* 41:22–31.
611 <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0531-0>
- 612 Bontonou G, Denis B, Wicker-Thomas C (2013) Interaction between temperature and male
613 pheromone in sexual isolation in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol* 26:2008–2020.
614 <https://doi.org/10.1111/jeb.12206>
- 615 Bontonou G, Wicker-Thomas C (2014) Sexual communication in the *Drosophila* genus.
616 *Insects* 5:439–458. <https://doi.org/10.3390/insects5020439>
- 617 Canale A, Benelli G, Germinara GS, et al (2015) Behavioural and electrophysiological
618 responses to overlooked female pheromone components in the olive fruit fly, *Bactrocera*
619 *oleae* (Diptera: Tephritidae). *Chemoecology* 25:147–157.
620 <https://doi.org/10.1007/s00049-014-0183-0>
- 621 Canale A, Germinara SG, Carpita A, et al (2013) Behavioural and electrophysiological
622 responses of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae), to male-
623 and female-borne sex attractants. *Chemoecology* 23:155–164.
624 <https://doi.org/10.1007/s00049-013-0131-4>
- 625 Carlson DA, Yocom SR (1986) Cuticular hydrocarbons from six species of tephritid fruit
626 flies. *Arch Insect Biochem Physiol* 3:397–412. <https://doi.org/10.1002/arch.940030407>
- 627 Carpita A, Canale A, Raffaelli A, et al (2012) (Z)-9-tricosene identified in rectal gland
628 extracts of *Bactrocera oleae* males: First evidence of a male-produced female attractant
629 in olive fruit fly. *Naturwissenschaften* 99:77–81. [https://doi.org/10.1007/s00114-011-](https://doi.org/10.1007/s00114-011-0868-y)
630 [0868-y](https://doi.org/10.1007/s00114-011-0868-y)
- 631 Chieng ACT, Hee AKW, Wee SL (2018) Involvement of the antennal and maxillary palp
632 structures in detection and response to methyl eugenol by male *Bactrocera dorsalis*

- 633 (Diptera: Tephritidae). *J Insect Sci* 18:1–5. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iey104>
- 634 De Meyer M, Delatte H, Mwatawala M, et al (2015) A review of the current knowledge on
635 *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera, tephritidae) in Africa, with a list of species
636 included in *Zeugodacus*. *Zookeys* 540:539–557.
637 <https://doi.org/10.3897/zookeys.540.9672>
- 638 Dekker T, Revadi S, Mansourian S, et al (2015) Loss of *Drosophila* pheromone reverses its
639 role in sexual communication in *Drosophila suzukii*. *Proc R Soc B Biol Sci* 282:.
640 <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3018>
- 641 Dhillon MK, Singh R, Naresh JS, Sharma HC (2005) The melon fruit fly, *Bactrocera*
642 *cucurbitae*: A review of its biology and management. *J Insect Sci* 5:40–46.
643 <https://doi.org/10.1093/jis/5.1.40>
- 644 Duyck PF, Quilici S (2002) Survival and development of different life stages of three
645 *Ceratitidis* spp. (Diptera : Tephritidae) reared at five constant temperatures. *Bull Entomol*
646 *Res* 92:461–469. <https://doi.org/10.1079/BER2002188>
- 647 Escofier B, Pagès J (2008) Analyses factorielles simples et multiples: Objectifs, méthodes et
648 interprétation, 4th editio. Dunod, Paris
- 649 Everaerts C, Farine JP, Cobb M, Ferveur JF (2010) *Drosophila* cuticular hydrocarbons
650 revisited: Mating status alters cuticular profiles. *PLoS One* 5:e9607.
651 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009607>
- 652 Fletcher BS (1989) Life history strategies of tephritid fruit flies. In: Robinson, A S, Hooper, G
653 H (eds) *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, vol 3B. Elsevier,
654 Amsterdam, Netherlands, pp 195–208
- 655 Fletcher MT, Kitching W (1995) Chemistry of Fruit Flies. *Chem Rev* 95:789–828.
656 <https://doi.org/10.1021/cr00036a001>
- 657 Fox EGP, Pianaro A, Solis DR, et al (2012) Intraspecific and intracolony variation in the
658 profile of venom alkaloids and cuticular hydrocarbons of the fire ant *Solenopsis*
659 *saevissima* smith (Hymenoptera: Formicidae). *Psyche* (London).
660 <https://doi.org/10.1155/2012/398061>
- 661 Gil-Ortiz R (2012) Development of new ecological long-lasting dispensers of semiochemicals
662 for the control of *Bactrocera oleae* (Rossi). *Pest Manag Sci* 71:1685–1693.
663 <https://doi.org/10.1002/ps.3415>
- 664 Goh SH, Ooi KE, Chuah CH, et al (1993) Cuticular hydrocarbons from two species of
665 Malaysian *Bactrocera* fruit flies. *Biochem Syst Ecol* 21:215–226.
666 [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90039-T](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90039-T)

- 667 Haverty MI, Collins MS, Nelson LJ, Thorne BL (1997) Cuticular hydrocarbons of termites of
668 the British Virgin Islands. *J Chem Ecol* 23:927–964.
669 <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006381.75185.86>
- 670 Haverty MI, Woodrow RJ, Nelson LJ, Grace JK (2000) Cuticular hydrocarbons of termites of
671 the Hawaiian Islands. *J Chem Ecol* 26:1167–1191.
672 <https://doi.org/10.1023/A:1005479826651>
- 673 Husson F, Josse J, Lê S, Mazet J (2013) FactoMineR: Multivariate exploratory data analysis
674 and data mining with R
- 675 Jacob V (2018) Current source density analysis of electroantennogram recordings : a tool for
676 mapping the olfactory response in an insect antenna. *Front Cell Neurosci* 12:1–19.
677 <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00287>
- 678 Jacob V, Scolari F, Delatte H, et al (2017) Current source density mapping of antennal
679 sensory selectivity reveals conserved olfactory systems between tephritids and
680 *Drosophila*. *Sci Rep* 7: . <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15431-4>
- 681 Jang EB, Light DM, Binder RG, et al (1994) Attraction of female mediterranean fruit flies to
682 the five major components of male-produced pheromone in a laboratory flight tunnel. *J*
683 *Chem Ecol* 20:9–20. <https://doi.org/10.1007/BF02065987>
- 684 Jennings JH, Etges WJ, Schmitt T, Hoikkala A (2014) Cuticular hydrocarbons of *Drosophila*
685 *montana*: Geographic variation, sexual dimorphism and potential roles as pheromones. *J*
686 *Insect Physiol* 61:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.12.004>
- 687 Key M (2012) A tutorial in displaying mass spectrometry-based proteomic data using heat
688 maps. *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 1: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S16-S10>
- 689 Koyama J, Kakinohana H, Miyatake T (2004) Eradication of the melon fly, *Bactrocera*
690 *cucurbitae*, in Japan: importance of behavior, ecology, genetics, and evolution. *Annu*
691 *Rev Entomol* 49:331–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123224>
- 692 Kuba H, Koyama J (1985) Mating behavior of wild melon flies, *Dacus Cucurbitae* Coquillett
693 (Diptera: Tephritidae) in a field cage: courtship behavior. *Appl Entomol Zool* 20:365–
694 372. <https://doi.org/10.1303/aez.20.365>
- 695 Kuba H, Koyama J, Prokopy RJ (1984) Mating behavior of wild melon flies, *Dacus*
696 *cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae) in a field cage: distribution and behavior of
697 flies. *Appl Entomol Zool* 19:367–373. <https://doi.org/10.1303/aez.19.367>
- 698 Kuba H, Sokei Y (1988) The production of pheromone clouds by spraying in the melon fly,
699 *Dacus cucurbitae* coquillett (Diptera: Tephritidae). *J Ethol* 6:105–110.
700 <https://doi.org/10.1007/BF02350875>

- 701 Levi-Zada A, Levy A, Rempoulakis P, et al (2020) Diel rhythm of volatile emissions of males
702 and females of the peach fruit fly *Bactrocera zonata*. J Insect Physiol 120:103970.
703 <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103970>
- 704 Myrick AJ, Baker TC (2018) Increasing signal-to-noise Ratio in gas chromatography -
705 electroantennography using a Deans switch effluent chopper. J Chem Ecol 44:111–126.
706 <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0916-y>
- 707 Nishida R, Iwahashi O, Tan KH (1993) Accumulation of *Dendrobium superbum*
708 (orchidaceae) fragrance in the rectal glands by males of the melon fly, *Dacus cucurbitae*.
709 J Chem Ecol 19:713–722. <https://doi.org/10.1007/BF00985003>
- 710 Nishida R, Tan KH, Takahashi S, Fukami H (1990) Volatile components of male rectal
711 glands of the melon fly, *Dacus Cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae). Appl
712 Entomol Zool 25:105–112. <https://doi.org/10.1303/aez.25.105>
- 713 Noushini S, Perez J, Park SJ, et al (2020) Attraction and electrophysiological response to
714 identified rectal gland volatiles in *Bactrocera frauenfeldi* (schiner). Molecules 25:1–14.
715 <https://doi.org/10.3390/molecules25061275>
- 716 Ohinata K, Jacobson M, Kobayashi RM, et al (1982) Oriental fruit fly and melon fly:
717 biological and chemical studies of smoke produced by males. J Environ Sci Heal Part A
718 Environ Sci Eng 17:197–216. <https://doi.org/10.1080/10934528209375028>
- 719 Papadopoulos NT, Plant RE, Carey JR (2013) From trickle to flood: The large-scale, cryptic
720 invasion of California by tropical fruit flies. Proc R Soc B Biol Sci 280:.
721 <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1466>
- 722 Perkins M V., Kitching W, Drew RAI, et al (1990) Chemistry of fruit flies: Composition of
723 the male rectal gland secretions of some species of south-east asian dacinae. Re-
724 examination of *Dacus cucurbitae* (melon fly). J Chem Soc Perkin Trans 1 1111–1117.
725 <https://doi.org/10.1039/p19900001111>
- 726 R Core TEAM (2014) R: A language and environment for statistical computing, 3.0.3. R
727 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- 728 Ramiaranjatovo G, Reynaud B, Jacob V (2023) Triple electroantennography: honing the
729 scope of insect olfaction. under Rev
- 730 Reeves WK, Peiris KHS, Scholte EJ, et al (2010) Age-grading the biting midge *Culicoides*
731 *sonorensis* using near-infrared spectroscopy. Med Vet Entomol 24:32–37.
732 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2009.00843.x>
- 733 Ruther J, Steiner S (2008) Costs of female odour in males of the parasitic wasp *Lariophagus*
734 *distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae). Naturwissenschaften 95:547–552.

- 735 <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0357-0>
- 736 Sugimoto A (1979) Smoke emission by the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett. Japanese
737 J Appl Entomol Zool 23:40–42. <https://doi.org/10.1303/jjaez.23.40>
- 738 Suzuki Y, Koyama J (1981) Courtship behavior of the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett
739 (Diptera : Tephritidae). Appl Entomol Zool 16:164–166.
740 <https://doi.org/10.1303/aez.16.164>
- 741 Suzuki Y, Koyama J (1980) Temporal aspects of mating behavior of the melon fly, *Dacus*
742 *Cucurbitae* Coquillett (Diptera : Tephritidae): a comparison between laboratory and wild
743 strains. Appl Entomol Zool 15:215–224. <https://doi.org/10.1303/aez.15.215>
- 744 Symonds MRE, Wertheim B (2005) The mode of evolution of aggregation pheromones in
745 *Drosophila* species. J Evol Biol 18:1253–1263. [https://doi.org/10.1111/j.1420-](https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00971.x)
746 [9101.2005.00971.x](https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00971.x)
- 747 Tan K-H (2000) Sex pheromone components in defense of melon fly, *Bactrocera cucurbitae*
748 against asian house gecko, *Hemidactylus frenatus*. Journal Chem Ecol 26:697–704.
749 <https://doi.org/10.1023/A:1005480206023> CITATIONS
- 750 Vaníčkova L (2012) Chemical ecology of fruit flies genera *Ceratitis* and *Anastrepha*. Faculty
751 of food and biochemical Technology
- 752 Vaníčkova L, Břizová R, Mendonça AL, et al (2015a) Intraspecific variation of cuticular
753 hydrocarbon profiles in the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) species
754 complex. J Appl Entomol 139:679–689. <https://doi.org/10.1111/jen.12204>
- 755 Vaníčkova L, Břizová R, Pompeiano A, et al (2015b) Cuticular hydrocarbons corroborate the
756 distinction between lowland and highland Natal fruit fly (Tephritidae, *Ceratitis rosa*)
757 populations. Zookeys 540:507–524. <https://doi.org/10.3897/zookeys.540.9619>
- 758 Vaníčkova L, Břizová R, Pompeiano A, et al (2015c) Characterisation of the chemical
759 profiles of Brazilian and Andean morphotypes belonging to the *Anastrepha fraterculus*
760 complex (Diptera, tephritidae). Zookeys 540:193–209.
761 <https://doi.org/10.3897/zookeys.540.9649>
- 762 Vaníčkova L, Nagy R, Pompeiano A, Kalinová B (2017) Epicuticular chemistry reinforces
763 the new taxonomic classification of the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera:
764 Tephritidae, Dacinae). PLoS One 12:e0184102.
765 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184102>
- 766 Vaníčkova L, Svatoš A, Kroiss J, et al (2012) Cuticular hydrocarbons of the south American
767 fruit fly *Anastrepha fraterculus*: variability with sex and age. J Chem Ecol 38:1133–
768 1142. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0177-8>

- 769 Vaničková L, Virgilio M, Tomčala A, et al (2014) Resolution of three cryptic agricultural
770 pests (*Ceratitis fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa*, Diptera: Tephritidae) using cuticular
771 hydrocarbon profiling. Bull Entomol Res 104:631–638.
772 <https://doi.org/10.1017/S0007485314000406>
- 773 Verschut TA, Farnier K, Cunningham JP, Carlsson MA (2018) Behavioral and physiological
774 evidence for palp detection of the male-specific attractant cuelure in the queensland fruit
775 fly (*Bactrocera tryoni*). Front Physiol 9:1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00990>
- 776 Virgilio M, Delatte H, Backeljau T, De Meyer M (2010) Macrogeographic population
777 structuring in the cosmopolitan agricultural pest *Bactrocera cucurbitae* (Diptera:
778 Tephritidae). Mol Ecol 19:2713–2724. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04662.x)
779 [294X.2010.04662.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04662.x)
- 780 Warnes G, et al (2013) gplots: Various R programming tools for plotting data. R package
781 version 2.12.1
- 782 Wee S-L, Tan K-H (2005) Female sexual response to male rectal volatile constituents in the
783 fruit fly, *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). Appl Entomol Zool 40:365–372.
784 <https://doi.org/10.1303/aez.2005.365>
- 785 White IM, Elson-Harris (1992) Fruit flies of economic significance: their identification and
786 bionomics, CAB Intern. Wallingford

787

788 Captions

789 **Table 1** Compounds identified by GC×GC-TOFMS in the hexane body washes of
790 *Zeugodacus cucurbitae* virgin males and females of 4 different age groups.

791

792 **Fig. 1** GC×GC-TOFMS analysis of 15-days-old *Zeugodacus cucurbitae* female and male
793 cuticle body washes. The intensity of the signals is colour-coded from blue (zero) to red
794 (maximum). The numbers correspond to the compounds listed in Table 1.

795

796 **Fig. 2** Heat map of the 45 compounds (columns) and the four age groups (5-, 15-, 25-, 30-
797 days-old) of *Zeugodacus cucurbitae* males (m) and females (f) (rows) from GC×GC-TOFMS
798 dataset. Colour patterns of the columns differentiate chemical classes of compounds (blue =
799 cuticular hydrocarbons a1-32, red = nonhydrocarbon compounds b1-5, yellow = esters c1-c8).
800 The dendrograms are created using correlation-based distances and the Ward method of
801 hierarchical clustering ($p < 0.05$).

802

803 **Fig. 3** Multiple factor analyses (MFA) of transformed GC×GC-TOFMS data of 45
804 compounds identified in *Zeugodacus cucurbitae* males and females from 4 age groups. (A)
805 Score plot describing the age groups and variables (chemical classes). (B) Vector
806 representation of the contribution of each compound to the distinction of age groups and
807 sexes. The coordinates of each variable are the correlation coefficients with the two first
808 principal components. Key: md5-30 - male 5- to 30-days-old, fd5-30 - female 5- to 30-days-
809 old, blue CH a1-32 - cuticular hydrocarbons, red nnHC b1-5 - nonhydrocarbon compounds,
810 yellow Esters c1-8 - esters, respectively.

811

812 **Fig. 4** GC-EAD₃ analysis of the whole-body extract of *Zeugodacus cucurbitae* male. (A)
813 Typical recording in a *Z. cucurbitae* female. The modulation at 0.5 Hz of the FID recording
814 includes the tail of the solvent peak (hexane) superimposed with three FID peaks. Below,
815 electroantennograms are simultaneously recorded at three antennal positions (black). The
816 power of the signal at 0.5 Hz is also included (red). The three signals are averaged for
817 subsequent analysis. (B) Population analysis. A mixture of alkanes was injected in the GC to
818 be used at reference times, and the number of carbons corresponding to each peak is
819 indicated. The FID signal corresponds to an independent injection of the whole-body extract
820 without modulating the GC output. Below, the EAD₃ time plots show the median (black line)
821 and 95 % bootstrap c.i. (grey area) of EAD₃ power at 0.5 Hz averaged on the three recording
822 positions. The three-time plots correspond respectively to the mature female, mature male and
823 immature male of *Z. cucurbitae*. The number of flies is indicated for each plot. Red thick lines
824 below the time plots show the timing when a significant EAD₃ signal was observed ($p < 0.05$,
825 bootstrap comparison with a threshold defined as mean + 3 SE of the mean EAD₃ signal
826 during the first 90 s of the runs). The significant peaks at 2 min are a response to the solvent
827 hexane. Each peak is identified with a number and the timing of the analysed response is
828 indicated with dash lines. (C) The bar plot shows median and 95 % bootstrap c.i. of EAD₃
829 quantified at the timings corresponding to the 10 identified compounds. TMP:
830 tetramethylpyrazine; 3MA: *N*-(3-methylbutyl)acetamide; DSU: 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane;
831 2M3MA: 2-methoxy-*N*-(3-methylbutyl)acetamide; ED: ethyl decanoate; EPar: ethyl paraben;
832 EL: ethyl laurate; MA: myristyl aldehyde; EM: ethyl myristate; EP: ethyl palmitate. * $p < 0.05$,
833 Response significance is indicated: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, bootstrap. On the X axis, “d”
834 stands for days.

835

836 **Fig. 5** GC-EAD₃ analysis of the whole-body extract of *Zeugodacus cucurbitae* female. (A)
837 Population analysis. The FID signal corresponds to an independent injection of the whole-
838 body extract without modulating the GC output. Below, the EAD₃ time plots show the median
839 (black line) and 95% bootstrap c.i. (grey area) of EAD₃ power at 0.5 Hz averaged on the three
840 recording positions. The two-time plots correspond respectively to the mature female and
841 mature male of *Z. cucurbitae*. The number of flies is indicated for each plot. Red thick lines
842 below the time plots show the timing when a significant EAD₃ signal was observed ($p < 0.05$,
843 bootstrap comparison with a threshold defined as mean + 3 SE of the mean EAD₃ signal
844 during the first 90 s of the runs). The significant peaks at 2 min are a response to the solvent
845 hexane. Each peak is identified with a number and the timing of the analysed response is
846 indicated with dash lines. (B) The bar plot shows median and 95% bootstrap c.i. of EAD₃
847 quantified at the timings corresponding to the 10 identified compounds. TMP:
848 tetramethylpyrazine; 3MA: *N*-(3-methylbutyl)acetamide; DSU: 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane;
849 2M3MA: 2-methoxy-*N*-(3-methylbutyl)acetamide; ED: ethyl decanoate; EPar: ethyl paraben;
850 EL: ethyl laurate; MA: myristyl aldehyde; EM: ethyl myristate; EP: ethyl palmitate. * $p < 0.05$,
851 Response significance is indicated: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, bootstrap. On the X axis, “d”
852 stands for days.

853

854

855 **Fig. 6** GC-EPD analysis of the whole-body extract of *Zeugodacus cucurbitae* female and
856 male. (A) Typical recording in a male. FID peaks are barely visible due to the
857 superimposition with the tail of the solvent peak (hexane). Same convention as in Fig. 4A. (B)
858 GC-EPD of *Z. cucurbitae* female and male in response to whole body extract of a female.
859 Same conventions as in Fig. 4. (C) GC-EPD *Z. cucurbitae* female and male in response to
860 whole body extract of a male. Same conventions as in Fig. 4. (D) The bar plot shows median
861 and 95 % bootstrap c.i. of EPD quantified at the timings corresponding to the 10 identified
862 compounds. TMP: tetramethylpyrazine; 3MA: *N*-(3-methylbutyl)acetamide; DSU: 1,7-
863 dioxaspiro[5.5]undecane; 2M3MA: 2-methoxy-*N*-(3-methylbutyl)acetamide; ED: ethyl
864 decanoate; EPar: ethyl paraben; EL: ethyl laurate; MA: myristyl aldehyde; EM: ethyl
865 myristate; EP: ethyl palmitate. * $p < 0.05$, Response significance is indicated: ** $p < 0.01$, ***
866 $p < 0.001$, bootstrap. On the X axis, “d” stands for days. For female whole-body extract (top),
867 females and males’ response were combined for p -value calculation (***) due to low number
868 of tested flies. On the X axis, “d” stands for days.

869

870

871 **Fig. 7** Dose-response curves of EAG₃ and EPG in mature *Zeugodacus cucurbitae* to synthetic
872 compounds. (A) For each sex, each tested compound and dose, the graph shows the median
873 and 95% bootstrap confidence interval of EAG₃ response levels. The response levels
874 correspond to the average response of the three recording electrodes. Significant dose-
875 sensitivity are indicated (ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$). Red: females,
876 black: males. TMP: tetramethylpyrazine; 3MA: *N*-(3-methylbutyl)acetamide; 2M3MA: 2-
877 methoxy-*N*-(3-methylbutyl)acetamide; ED: ethyl decanoate; EM: ethyl myristate; EP: ethyl
878 palmitate; DSU: 1,7-dioxaspiro[5.5]undecane. (B) median and 95 % bootstrap confidence
879 interval for EPG response levels. Same convention as in (A).

880

881 **Fig. 8** Attractiveness of mature virgin female *Zeugodacus cucurbitae* in a six-choice
882 olfactometer. (A) Gardner-Altman estimation plot comparing the paired percentage of females
883 trapped with a natural male extract and a control solution. Data are plotted on the left axes as
884 a slope graph: each paired set of observations is connected by a line, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$
885 (generalized linear mixed model, Poisson family). A preference index (difference divided by
886 the sum) is plotted on the right with a boxplot illustrating the quartile distribution and with a
887 bootstrap sampling distribution of the median value superimposed with its 95 % confidence
888 interval (thick vertical line). (B) Gardner-Altman estimation plot comparing the paired
889 percentage of females trapped with the synthetic blend and a control solution. Same
890 conventions as in panel (A).

891

892 **Fig. 9** Cross-specific comparison of GC-EAD₃ analysis of the whole-body extract of
893 *Zeugodacus cucurbitae* males. Same conventions as in Fig. 4.

894

895

Table 1. Compounds identified by GC×GC-TOFMS in the hexane body washes of virgin *Zeugodacus cucurbitae* males and females of four different age groups.

No.	Group ^a	Compound	RI ^b	Correlation ^c	P-value	Male				Female			
						day 5	day 15	day 25	day 30	day 5	day 15	day 25	day 30
1	a1	Decane ^d	1001	0.88	0.004	+	+	+	+	+	+	++	+
2	b1	δ-3-Carene ^d	1025	0.88	0.004	+	+	+	+	+	+	+	+
3	a2	4-Methyldecane ^d	1055	0.88	0.004	++	++	+	+	++	++	+++	++
4	b2	Tetramethylpyrazine ^d	1095	-0.96	0.0002	+	++++	++++	+++	-	-	-	-
5	a3	Undecane ^d	1102	0.88	0.004	++	+	+	+	++	+	++	++
6	b3	N-(3-Methylbutyl)acetamide ^d	1136	-0.96	0.0001	-	++++	++++	++++	-	++	-	-
7	a4	1,7-Dioxaspiro[5.5]undecane ^d	1152	0.73	0.039	-	+	+	-	++	++	++	++
8	a5	Dodecane ^d	1209	0.91	0.002	++	++	++	++	++	++	+++	++
9	b4	2-Methoxy-N-(3-methylbutyl)acetamide ^d	1271	-0.96	0.0002	-	++	+++	+++	-	-	-	-
10	a6	3-Methyldodecane ^d	1279	0.86	0.006	++	+	+	+	++	+	++	++
11	a7	Tridecane ^d	1302	0.84	0.009	+	+	+	+	+	+	+	+
12	a8	10-Methyltridecane ^d	1321	0.79	0.019	+	+	+	+	+	+	++	+
13	a9	11-/13-/15-Methyltridecane ^d	1339	0.84	0.009	+	+	+	+	+	+	+	+
14	c1	Ethyl decanoate ^d	1394	-0.96	0.0002	-	+	+	+	-	-	-	-
15	a10	Tetradecane ^d	1402	0.91	0.001	++	+	+	+	++	+	++	+
16	a11	Methyltetradecane ^d	1484	0.90	0.002	+	+	+	+	+	+	+	+
17	a12	Pentadecane ^d	1502	0.88	0.004	+	+	+	+	+	+	+	+
18	a13	11-/13-/15-Methylpentadecane ^d	1536	0.92	0.001	+	+	+	+	+	+	+	+
19	c2	Ethyl 4-hydroxybenzoate ^d	1693	-0.96	0.0001	-	+	+	+	-	-	-	-
20	c3	Ethyl tetradecanoate ^d	1816	-0.75	0.033	-	+	+	+	-	-	-	-
21	c4	Ethyl hexadecanoate ^d	2003	-0.95	0.0004	-	+	+	+	-	-	-	-
22	c5	Ethyl-9,12,15-octadecatrienoate ^d	2176	-0.92	0.001	+	+	+	+	-	+	-	-
23	c6	Ethyl octadecanoate ^d	2202	-0.98	0.00001	+	+	+	+	-	+	-	-
24	c7	Ethyl icosanoate ^d	2280	-0.95	0.0003	-	+	+	+	-	+	-	-
25	a14	Tricosane	2300	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-

26	c8	Vinyl 2-ethylhexanoate	2411	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
27	a15	7,11-Dimethyltricosane ^d	2472	0.89	0.003	++	+	+	+	++	+	+	++
28	a16	4,6-/4,10-Dimethyltricosane ^d	2503	0.88	0.004	++	+	+	+	++	++	++	++
29	a17	10-/12-Methylpentacosane ^d	2523	0.88	0.004	++	+	+	+	++	++	++	++
30	a18	9,13-Dimethyltetracosane ^d	2543	0.90	0.002	++	++	+	+	++	++	++	++
31	b5	Squalene ^e	2554	-0.97	0.0001	+	+	+	+	+	+	+	+
32	a19	2-Methylpentacosane ^d	2564	0.88	0.004	++	++	+	++	+++	++	++	+++
33	a20	Methylpentacosane	2585	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++
34	a21	Hexacosane ^d	2605	0.90	0.002	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++++
35	a22	11-/13-/15-Methylhexacosane ^d	2625	0.93	0.001	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
36	a23	Unknown ^d	2656	0.80	0.016	+	+	+	+	+	+	+	+
37	a24	12-/14-Methylhexacosane ^d	2677	0.94	0.0004	++++	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
38	a25	Heptacosane	2708	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
39	a26	11-/13-/15-Methylheptacosane	2728	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
40	a27	Methylheptacosane ^d	2748	0.91	0.002	+	+	+	+	+	+	+	+
41	a28	Methylheptacosane ^d	2789	0.92	0.001	+++	++	++	++	++	+++	++	+++
42	a29	10-/12-/14-Methyloctacosane	2830	-	-	+	+	+	+	+	+	++	+
43	a30	12,14-Dimethylheptacosane ^d	2860	0.91	0.002	++	+	+	+	++	++	++	++
44	a31	Nonacosane ^d	2900	0.91	0.002	++	+	+	+	++	++	++	++
45	a32	Methylnonacosane ^e	2993	-0.76	0.0001	-	+	+	+	-	+	+	+

^a Group in which were the compounds separated according to their chemical character, a – cuticular hydrocarbons, b – non-hydrocarbon compounds, c – esters.

^b Retention index on DB-5 column.

^c Correlation coefficient to the corresponding axis.

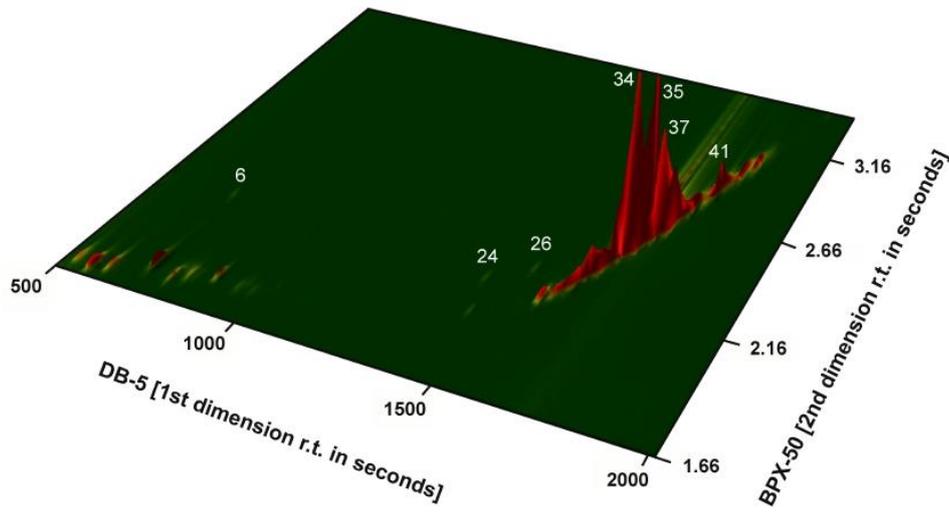
^d Compound significantly correlated ($\alpha = 0.05$) to the first dimension of the individual factor map (Fig. 3).

^e Compound significantly correlated ($\alpha = 0.05$) to the second dimension of the individual factor map (Fig. 3). + ≤ 1 %; ++ < 5 %; +++ < 10 %; ++++ ≥ 10 %.

Fig. 1

female 15-day-old

TIC 57



male 15-day-old

TIC 57

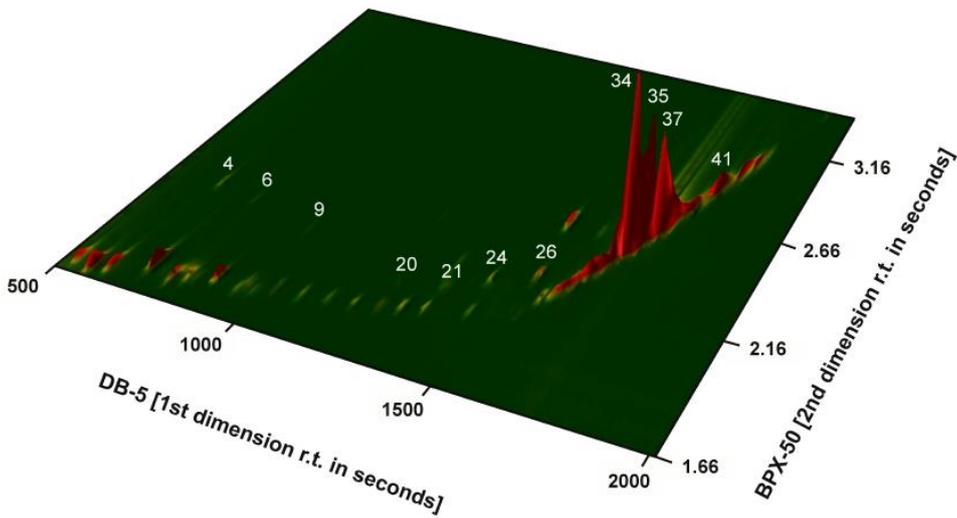


Fig. 2

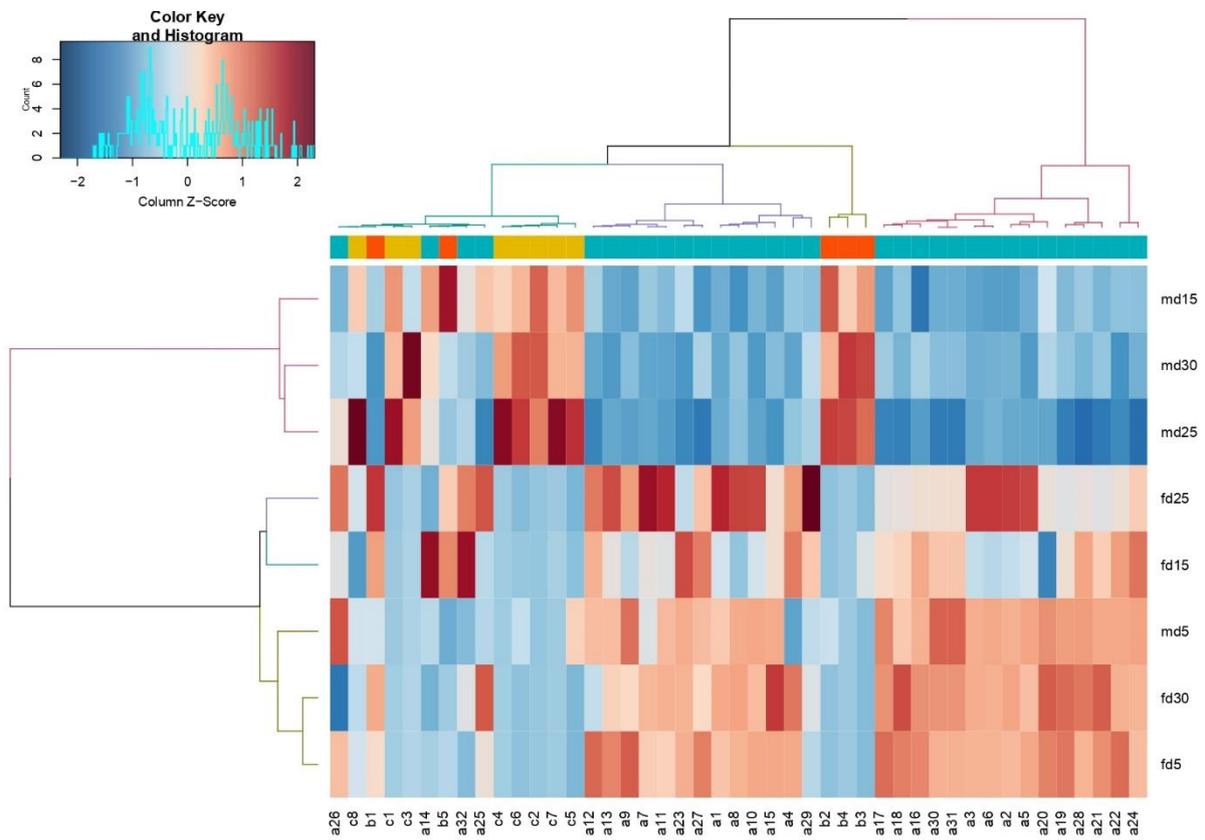


Fig. 3

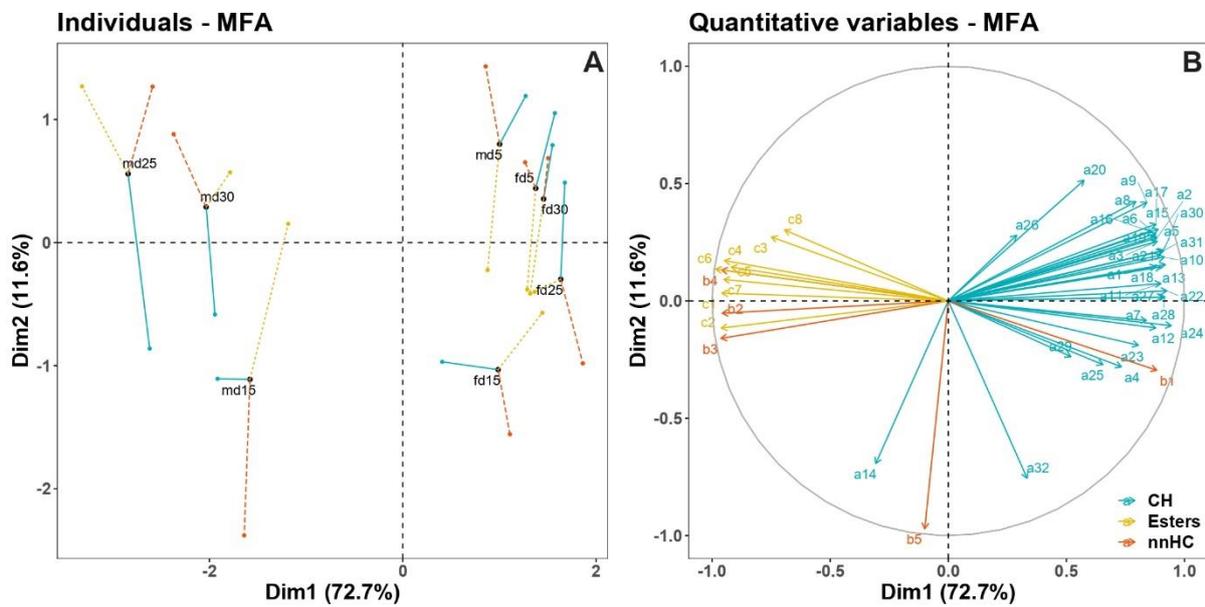


Fig. 4

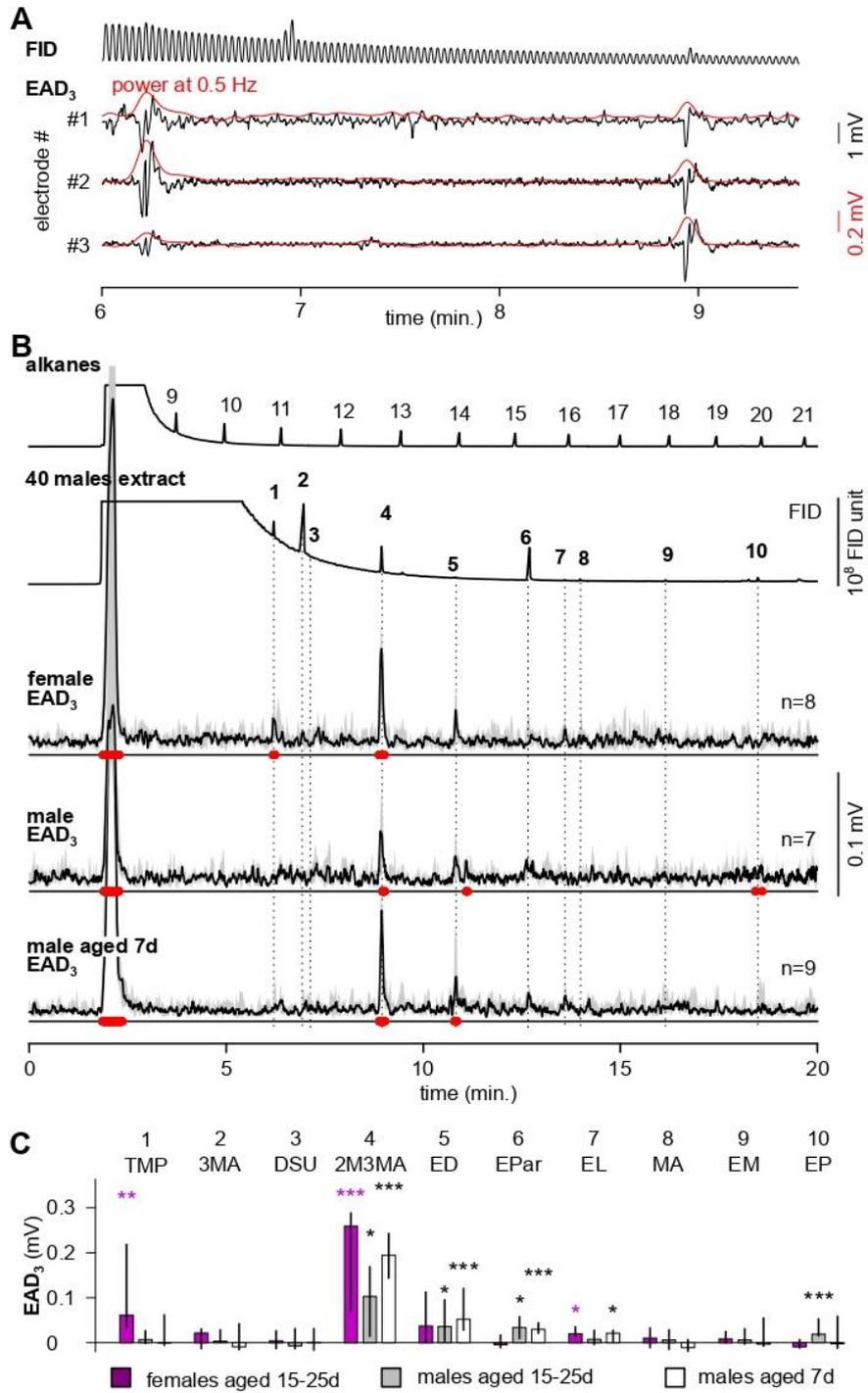


Fig. 5

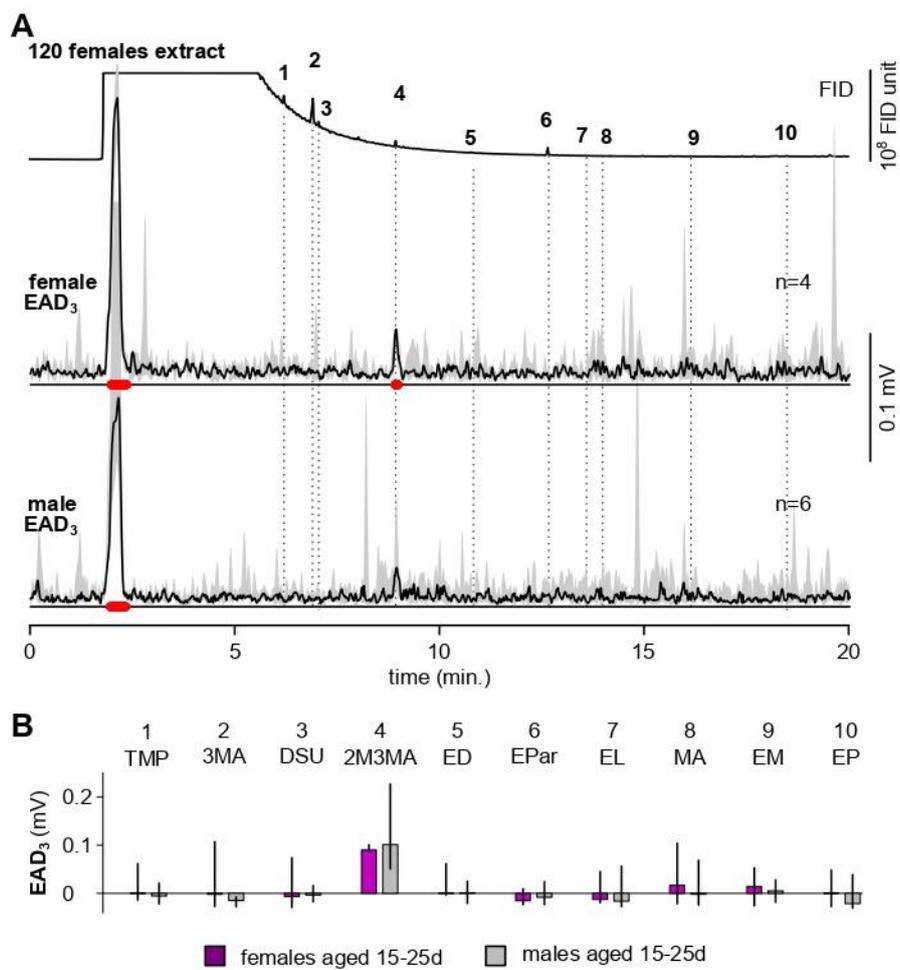


Fig. 6

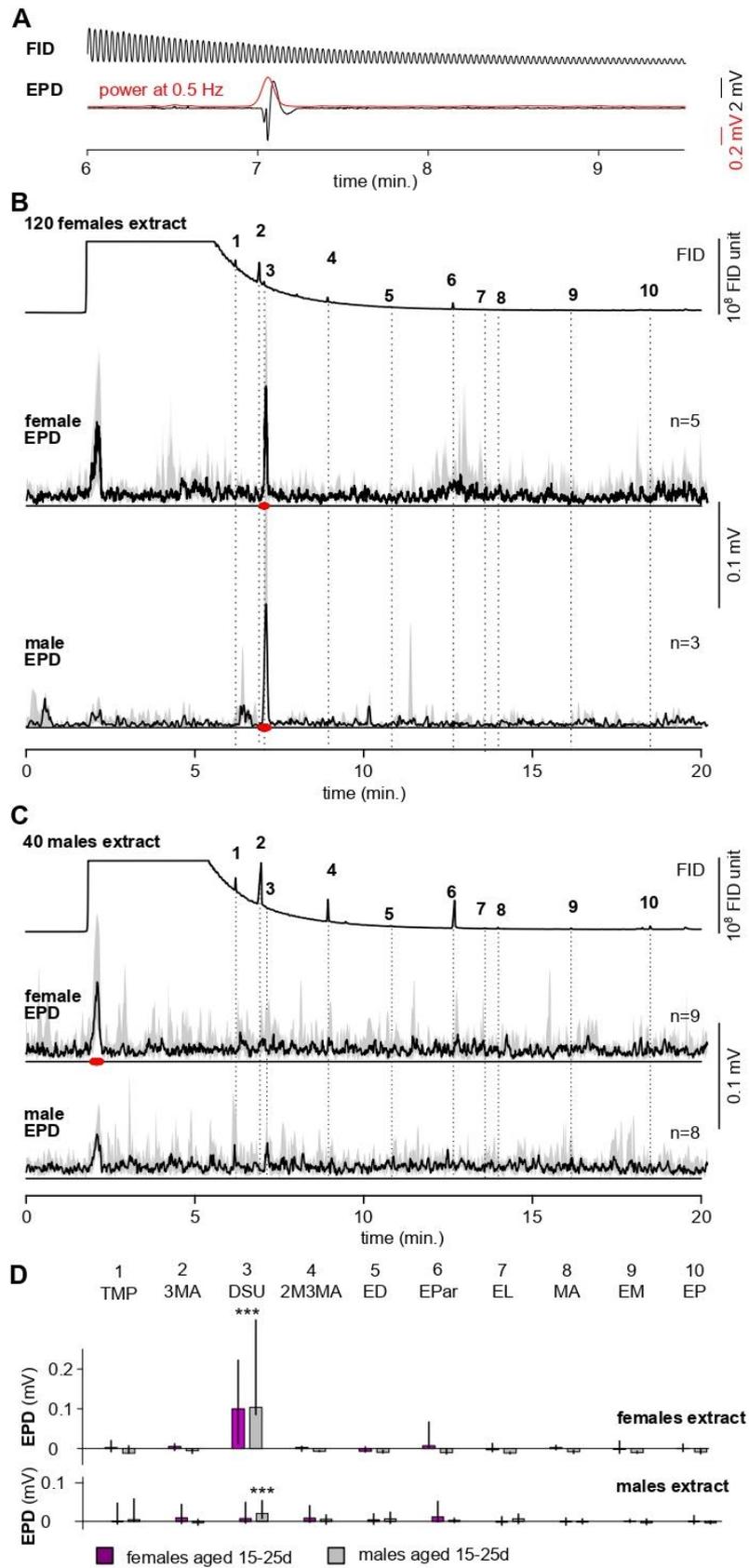


Fig. 7

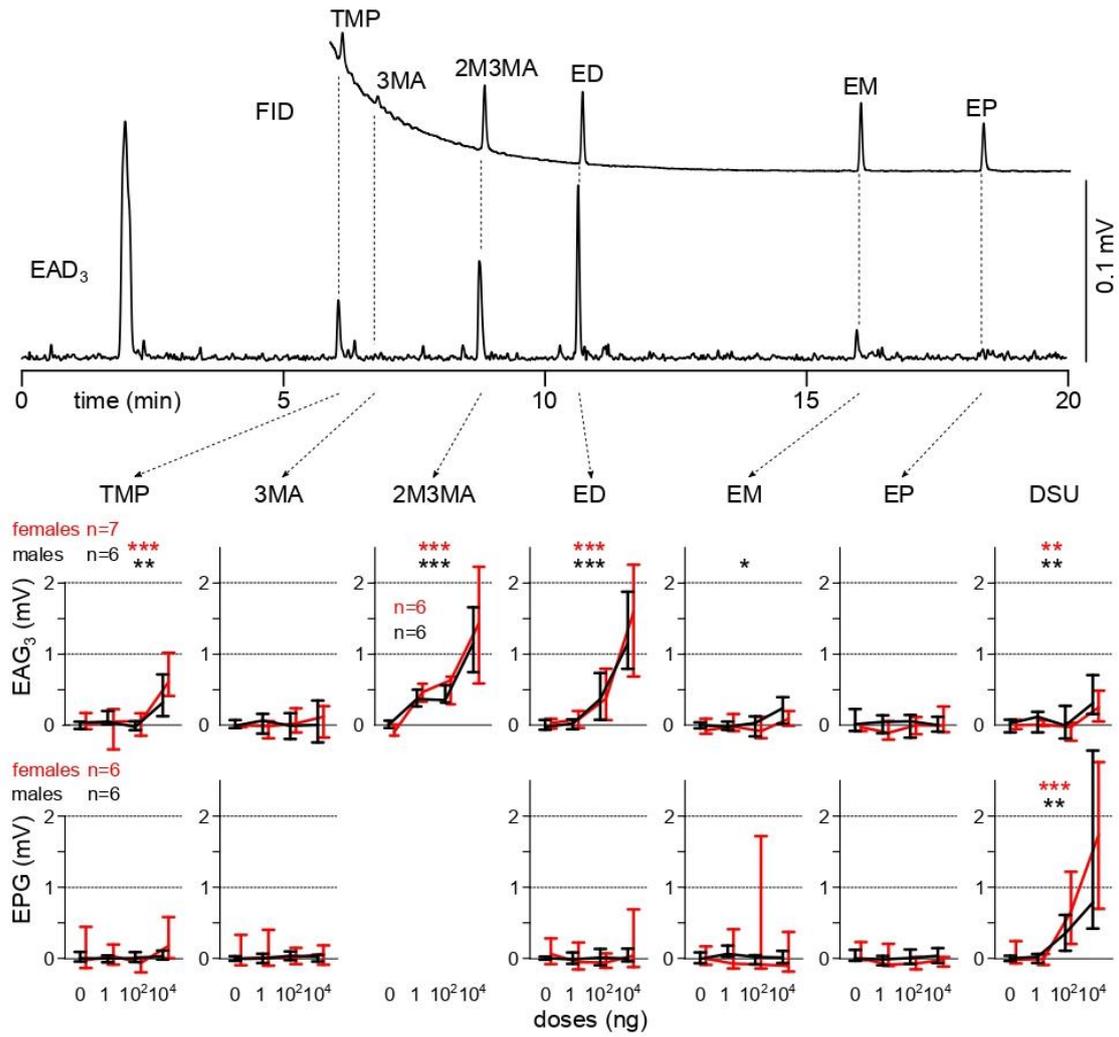


Fig. 8

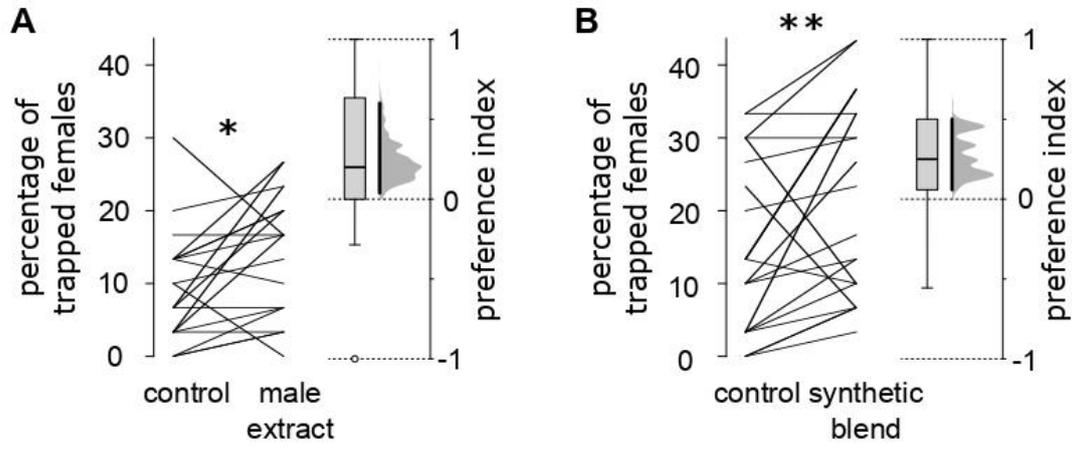
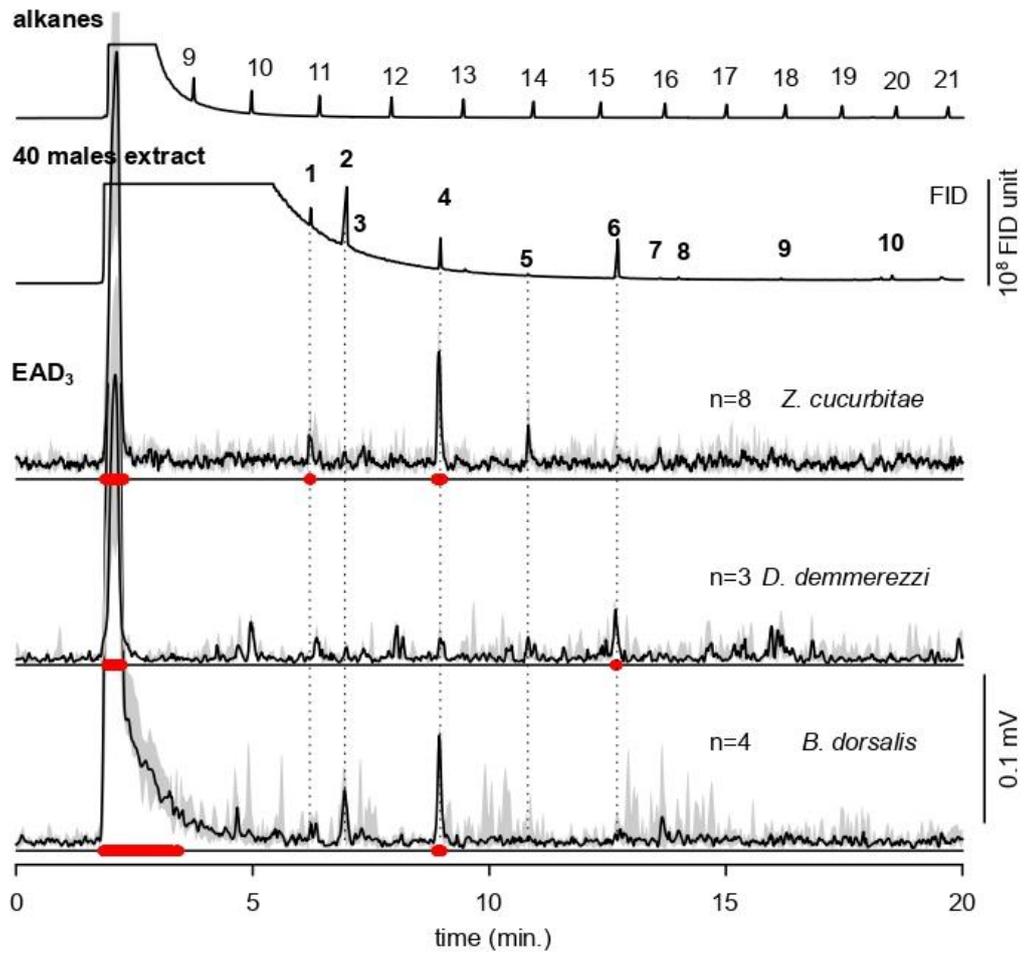
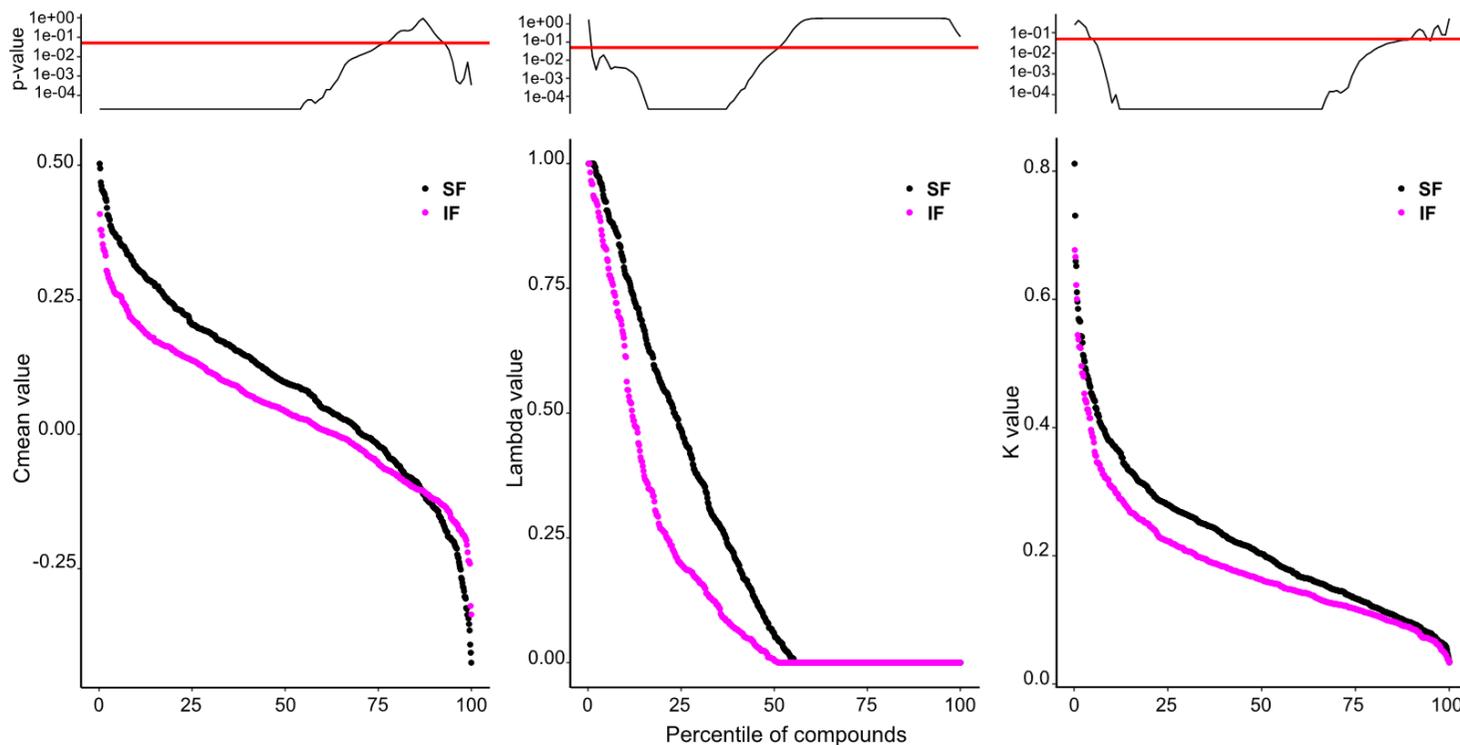


Fig. 9

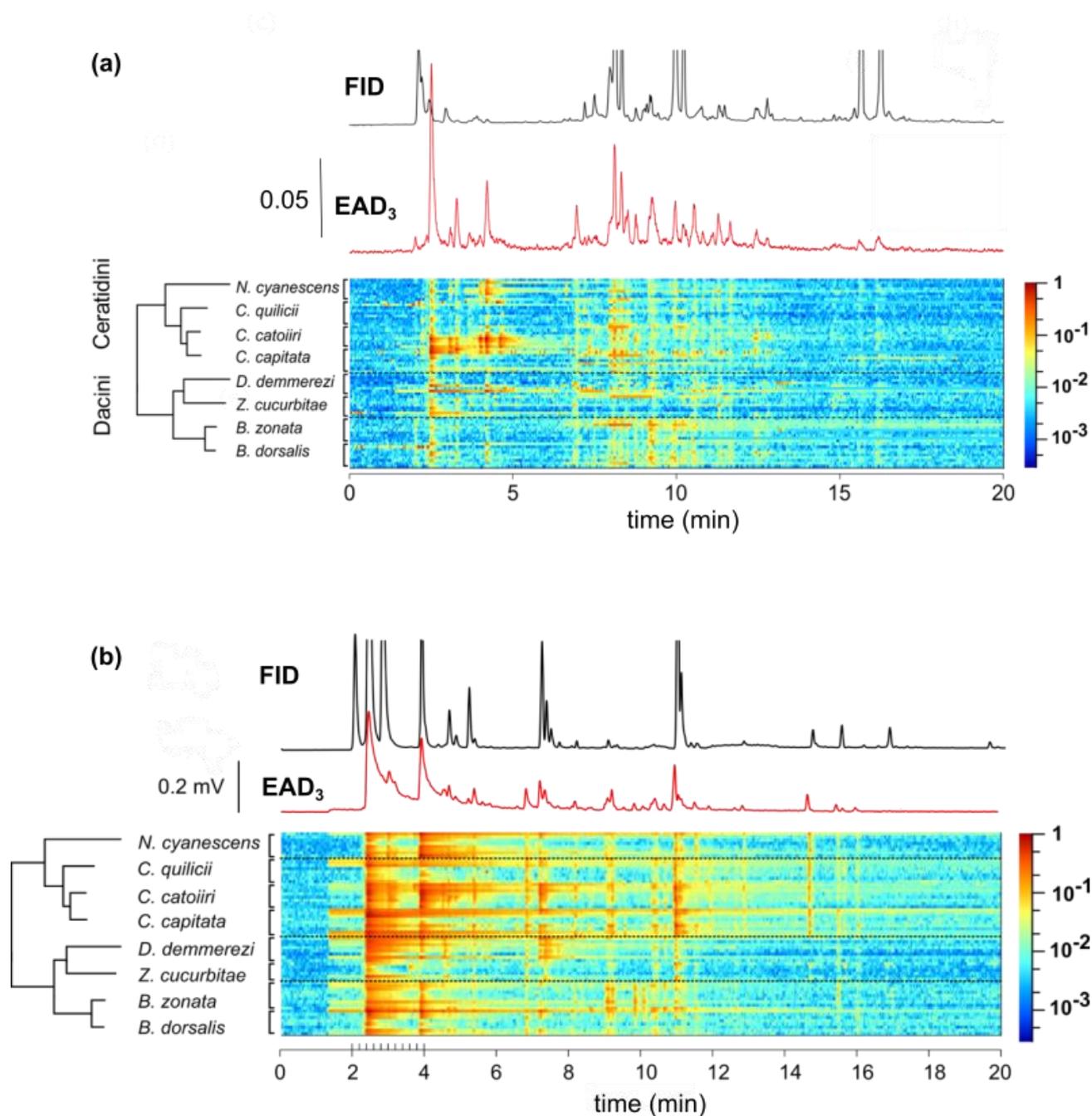


Annexe 2 : Signal phylogénétique des composés des fruits intacts et fruits coupés selon les indices C_{mean} d'Abouheif, λ de Pagel et K de Bloomberg.



Les trois graphiques représentent respectivement de gauche à droite les signaux phylogénétiques des fruits de chaque composé volatil selon les indices C_{mean} d'Abouheif, λ de Pagel et K de Bloomberg. Chaque point représente un composé et les composés des fruits intacts (IF) sont représentés en magenta et ceux des fruits coupés (SF) en noirs. Les valeurs de l'indice du signal phylogénétique sont triées par ordre décroissant et sont représentés en fonction de leurs rangs en pourcentage. 100% signifie 511 composés pour les fruits intacts et 665 composés pour les fruits coupés. Les courbes en haut représentent les p-value du bootstrap des différences de percentiles entre les composés des fruits intacts et des fruits coupés. Le trait rouge représente le seuil de significativité de 5%.

Annexe 3 : Analyse GC-EAD₃ sur les différentes espèces de mouches des fruits étudiées avec l'émission volatile de mangues mûres (a) et de goyaviers (b).



Les courbes en noir (en haut) représentent les chromatogrammes du FID avec les différents pics de composés. Les courbes en rouge représentent la moyenne des EAG sur les trois positions de l'antenne. Les « heatmap » représentent l'intensité de réponses des individus à chaque composé et dont chaque ligne est un enregistrement GC-EAG₃ avec une fréquence de hachage du signal du GC à 1 Hz. Pour chaque espèce de mouches des fruits, 4 à 8 répétitions ont été réalisées.

Annexe 4 : Valorisation des résultats de recherche

Articles :

- Ramiaranjatovo, G., Reynaud, B., & Jacob, V. (2023). Triple electroantennography captures the range and spatial arrangement of olfactory sensory neuron response on an insect antenna. *Journal of Neuroscience Methods*, 390, 109842.
- Ramiaranjatovo, G., Charlery de la Masselière, M., Comte, R., Duyck, P.-F., Reynaud, B., Jacob, V. Fruit discriminating olfactory systems as an adaptation of Tephritidae fruit flies to polyphagy. (En cours de préparation)
- Jacob, V., Ramiaranjatovo, G., Persyn, E., Pompeiano, A., Machara, A., Kyjaková, P., Atiama-Nurbel, T., Benelli, G., de Meyer, M., Vaníčková, L. Female melon fruit flies, *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), are attracted by a synthetic blend derived from male epicuticular chemistry. (En cours de révision)

Communications orales en congrès nationaux et internationaux :

- Participation pour une communication orale à la conférence internationale 4th TEAM meeting 2020, La Grande Motte, France : « The compounds emitted by hostfruits of tephritid species correlate with fruits phylogeny »
- Participation pour une communication orale à la conférence « 21st annual meeting of the French Club for Invertebrate Neurobiology », Juin 2021 (en distanciel) : « Shared volatile compounds among the various host-fruits shape Tephritidae olfactory system »
- Participation pour présentation de poster à la conférence internationale « 36th annual meeting of International Society of Chemical Ecology (ISCE) », 5-10 septembre 2021 (en distanciel) : « Shared volatile compounds among the various host-fruits drive fruit flies olfactory system (Diptera: Tephritidae) »
- Participation pour une communication orale à la conférence « International Society of Chemical Ecology (ISCE) and Asia-Pacific Association of Chemical Ecologists (APACE), joint meeting », Kuala Lumpur Malaisie, 8-12 août 2022. Obtention de prix

« ISCE Travel Awards » : « Fruit flies (Diptera: Tephritidae) olfactory systems specialise in various hosts »

- Participation pour une communication orale à la conférence « 11th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance (ISFFEI), Sydney Australie, 13-18 novembre 2022 : « Fruit flies (Diptera: Tephritidae) olfactory systems specialise in discriminating their various hosts »

Résumé

Les signaux olfactifs sont d'une importance cruciale pour la localisation d'hôte par les insectes, afin que ces derniers effectuent leurs besoins primaires nécessaires à leur survie et à celle de leurs progénitures. Les insectes s'orientent en détectant et discriminant les composés volatils émis par leurs hôtes via leurs organes olfactifs. La diversité d'information portée par les multiples composés volatils présents dans l'environnement contraint les insectes à utiliser des stratégies olfactives efficaces. Toutefois, ces stratégies demeurent peu connues pour les espèces à large gamme d'hôte comme les mouches des fruits Tephritidae. Cette famille d'insecte inclue des clades explorant diverses gammes d'hôtes, allant d'une gamme d'hôte plus large pour les espèces généralistes et une gamme d'hôte plus restreinte pour les espèces spécialistes. Ainsi cette thèse a comme objectif d'étudier comment les systèmes olfactifs des mouches des fruits se sont adaptés à la perception des fruits hôtes. Le travail effectué n'apporte pas seulement une connaissance fondamentale sur l'aspect évolutif de l'olfaction des insectes, mais sert également de guide pour la recherche d'attractifs pour plusieurs espèces d'insectes ravageurs. De plus, des développements de nouvelles méthodes en écologie chimique ont été réalisés au cours de cette thèse afin de mener à bien cette investigation.

Cette thèse se concentre sur *Bactrocera dorsalis*, une espèce très compétitive et polyphage, et sur sept autres espèces de Tephritidae qui engendrent des impacts économiques importants sur les cultures fruitières et légumières dans les îles du sud-ouest de l'océan Indien. Les analyses des émissions volatiles de 28 espèces de fruits hôtes de mouches des fruits a permis d'identifier les contraintes évolutives associées à chaque composé des fruits. Nous avons mis en évidence l'existence de composés communs à plusieurs fruits et des composés spécifiques à une ou quelques espèces de fruits. Les analyses en électroantennographie triple (EAG₃) et en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur d'électroantennographie triple (GC-EAD₃) effectué sur les différentes espèces de mouches des fruits mettent en exergue une corrélation négative entre les activités antennaires et la diversité des fruits émetteurs. Les tests comportementaux ont montré que *Bactrocera dorsalis* préfère les composés spécifiquement émis par quelques espèces de fruits aux composés communs entre les fruits lorsque ceux-ci sont présentés à faible concentration. L'hypothèse d'une adaptation à la polyphagie pour les espèces généralistes pourrait expliquer ces observations. Une perspective à cette étude est donc de tester le potentiel de piégeage d'un leurre combinant des composés communs de fruits avec quelques composés spécifiques afin d'augmenter la sensibilité olfactive et l'attractivité des mouches.

Mots clés : attractif, *Bactrocera dorsalis*, composés volatils, écologie chimique, GC-EAG, GC-MS.

Abstract

Olfactory signals are crucially important for host localization by insects, in order to perform their primary needs for survival and that of their offspring. Insects orient themselves by detecting and discriminating volatile compounds emitted by their hosts via their olfactory organs. The diversity of information carried by the multiple volatile compounds present in the environment forces insects to use efficient olfactory strategies. However, little is known about these strategies for species with a wide host range, such as the Tephritidae fruit flies. This family of insects includes clades exploring various host ranges, ranging from a wider host range for generalist species to a more restricted host range for specialist species. Thus, this thesis aims to study how the olfactory systems of fruit flies have adapted to the perception of their host fruits. The work carried out not only provides fundamental knowledge on the evolutionary aspect of insect olfaction, but also serves as a guide for the search of attractants for several insect pest species. In addition, the development of new methods in chemical ecology was conducted during the course of this thesis in order to carry out this investigation.

This thesis focuses on *Bactrocera dorsalis*, a highly competitive and polyphagous species, and seven other species of Tephritidae that cause significant economic impacts on fruit and vegetable crops in the southwestern Indian ocean islands. Analyses of the volatile emissions of 28 host species of fruit flies allowed the identification of evolutionary constraints associated to each fruit compound. We highlighted the existence of shared compounds between several fruits species and specific compounds to one or a few fruit species. The triple electroantennography (EAG₃) and gas chromatography coupled with a triple electroantennography detector (GC-EAD₃) analyses carried out on the different species of fruit flies show a negative correlation between the antennal activities and the diversity of the emitting fruits. Behavioural bioassays showed that *Bactrocera dorsalis* prefers compounds specifically emitted by a few fruit species to shared compounds between fruits when these are presented at low concentration. A hypothesis of adaptation to polyphagy for generalist species could explain these observations. A perspective to this study is therefore to test the trapping potential of a lure combining shared fruit compounds with some specific compounds in order to increase the olfactory sensitivity and attractiveness of the fruit flies.

Keywords: attractant, *Bactrocera dorsalis*, volatile compounds, chemical ecology, GC-EAG, GC-MS