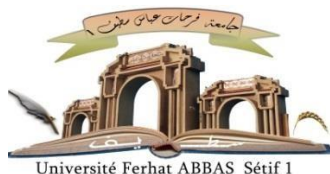


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



## THÈSE

Présentée en Cotutelle entre

L'Université Ferhat ABBAS Sétif1 - Algérie

Faculté des sciences de la nature et de la vie

et l'Université d'Angers – France

COMUE UNIVERSITÉ BRETAGNE LOIRE

ÉCOLE DOCTORALE N° 605

Microbiologie, Virologie, Parasitologie

Pour l'obtention du diplôme de

## DOCTORAT

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Agronomiques

Spécialité: Protection végétale

Par

Lyès MOUMENI

## THÈME

**Insectes xylophages des forêts de pins d'Alep du Nord-Est Algérien et leurs  
symbiotes fongiques**

Soutenue le 15/05/2024 devant le Jury:

<b>Abdelkrim MEBARKIA</b>	Professeur	Université Ferhat ABBAS, Sétif-1, Algérie	Président
<b>Mustapha BOUNECHADA</b>	Professeur	Université Ferhat ABBAS, Sétif-1, Algérie	Directeur de thèse
<b>Jean-Philippe BOUCHARA</b>	Professeur	Université d'Angers, France	Directeur de thèse
<b>Amandine GASTEBOIS</b>	M. C	Université d'Angers, France	Examineur
<b>Christine IMBERT</b>	Professeur	Université de Poitiers, France	Examineur
<b>Fouad MERADSI</b>	M. C	Université de Batna 2, Algérie	Examineur

UR Infections Respiratoires Fongiques (IRF), SFR ICAT, Angers, France, Université d'Angers /  
Amélioration et Développement de la Production Végétale et Animale, Université Ferhat Abbas Sétif 1

# AVANT-PROPOS

Ce travail de doctorat est le fruit d'une collaboration internationale entre :  
**l'Université Ferhat Abbas Setif 1** en Algérie et **l'Université d'Angers** en France,  
dans le cadre d'une convention de cotutelle internationale de thèse.

Il a été réalisé sous la direction de deux directeurs de thèse :

le Pr. Jean-Philippe BOUCHARA de l'Université d'Angers, rattaché à l'Unité de  
Recherche Infections Respiratoires Fongiques (IRF) au sein de la Structure  
Fédérative de Recherche (SFR) ICAT,

et le Pr. Mustapha BOUNECHADA de l'Université Ferhat Abbas Setif 1, affilié au  
Laboratoire d'Amélioration et Développement de la Production Végétale et Animale.

## FINANCEMENT

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse en cotutelle ont été financés de 2017 à 2019 par le partenariat Hubert Curien (PHC) Tassili. Ce programme de coopération scientifique Algéro-Français est géré par Campus France et porté et cofinancé par les deux pays : la France à travers le Ministère de l'Europe et des Affaires Etrangères (MEAE) et le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation français (MESRI) ; et l'Algérie, à travers le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS).



« L'échec est un échec seulement si vous le percevez comme tel.  
Si vous le voyez comme une opportunité d'apprendre et de grandir, alors  
c'est une réussite. »

[Paulo Coelho]

# REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer mon sincère remerciement envers Madame la Professeure **Christine IMBERT** et Monsieur le Professeur **Abdelkrim Mebarkia** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture et à la critique de ce manuscrit.

J'exprime également ma gratitude envers Monsieur **Fouad MERADSI** pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineur de ce travail.

Les mots ne peuvent pas exprimer de manière adéquate ma reconnaissance envers mon co-directeur de thèse, Monsieur le professeur **Jean-Philippe Bouchara**. Sa guidance, son expertise et sa patience ont été d'une importance capitale tout au long de ce travail de recherche. Son engagement inébranlable dans ce projet a été une source d'inspiration incommensurable.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers mon co-directeur, Monsieur le professeur **Mustapha Bounechada**, pour son soutien continu et ses précieux conseils qui ont grandement contribué à la qualité de ce travail.

Je remercie sincèrement Madame la Docteure **Amandine Gastebois**, ma co-encadrante, pour son soutien inestimable. Son expertise et son aide précieuse ont grandement contribué à l'avancement de ce travail, et je lui en suis profondément reconnaissant.

Madame la docteure **Louiza Gilmann**, qui a brillamment géré le projet de cotutelle de thèse, mérite ma sincère reconnaissance pour avoir facilité la réalisation de ce travail de recherche.

Madame **Farida Benia**, je vous remercie sincèrement pour votre soutien constant et vos précieux conseils qui ont éclairé de nombreuses étapes de cette thèse.

Madame la professeure **Sandrine Giraud**, vos conseils éclairés ont grandement contribué à l'enrichissement de cette thèse, et je vous en suis très reconnaissant.

**Wilfried Poirier** et **Hajar Yaakoub** votre générosité à partager votre expérience et votre expertise a été une source d'enrichissement pour ce projet de recherche, et je vous en suis profondément reconnaissant.

**Jérôme Cayon**, **Meline Wery**, votre implication, vos précieuses contributions, et les discussions que nous avons eues ont indéniablement cruciales pour cette thèse. Je remercie également, **Charlotte Godon**, **Julia Razafimandimby**, et **Baptiste Bidon** pour leur précieuse aide.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers les forestiers "Aami" **Amar** et **Henni**, dont la collaboration, le partage de connaissances, et le travail sur le terrain ont été d'une importance cruciale pour la réalisation de cette thèse. Votre dévouement est inestimable.

Ma famille mérite également une mention spéciale. Leur soutien indéfectible, leur compréhension et leur encouragement ont été des piliers essentiels tout au long de cette aventure académique. À tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce travail, je vous adresse mes plus sincères remerciements.

# Sommaire

INTRODUCTION .....	1
Etude bibliographique .....	6
1. Le pin d'Alep .....	6
1.1. Position taxonomique et caractéristiques botaniques.....	6
1.2. Répartition géographique .....	6
1.3. Schémas de distribution en Algérie .....	8
1.3.1. Plage géographique .....	8
1.3.2. Distribution altitudinale .....	8
1.3.3. Facteurs environnementaux.....	9
1.4. Importance du pin d'Alep.....	9
1.4.1. Importance écologique.....	9
1.4.2. Importance économique .....	9
1.4.3. Conservation et gestion des forêts de pins d'Alep .....	10
1.5. Biologie et écologie du pin d'Alep .....	10
1.5.1. Tolérance à la sécheresse .....	10
1.5.2. Adaptation au feu.....	10
1.5.3. Exigences en nutriments et matières inorganiques.....	11
1.6. Ennemis naturels du pin d'Alep.....	11
1.6.1. Insectes nuisibles.....	11
1.6.2. Les micromycètes .....	12
1.6.3. Les nématodes xylophages .....	13
1.6.4. Les mammifères herbivores.....	13
1.6.5. Rôle écologique des ennemis naturels .....	14
1.6.6. Implications pour la gestion et la conservation.....	14
2. Les scolytes .....	14
3. Champignons xylophages.....	20
4. Le bois et ses menaces biologiques .....	23
4.1. Les composants de la paroi cellulaire des plantes ligneuses .....	24
4.1.1. La cellulose .....	24
4.1.2. Les hémicelluloses.....	27
4.1.3. La lignine.....	28
4.2. Dégradation de la lignine .....	30
4.2.1. Etapes précoces de dégradation de la lignine : fragmentation de la lignine ou voies supérieures .....	31
4.2.2. Etapes tardives de la dégradation de la lignine - ouverture des noyaux aromatiques ou voies inférieures .....	37

Travail expérimental .....	46
Etude 1: La prévalence des scolytes du pin d'Alep ( <i>Pinus halepensis</i> ) dans les régions semi-arides du Nord-Est Algérien.....	47
Etude 2: Biodiversité fongique associée aux insectes xylophages du pin d'Alep dans les régions semi-arides du Nord-Est de l'Algérie.....	57
Etude 3: Caractérisation de la réponse transcriptionnelle de <i>Ceratocystiopsis minuta</i> et <i>Aspergillus citrinoterreus</i> en culture sur écorce de pin ou lignine.....	83
Discussion .....	115
Conclusion et perspectives.....	129
Références .....	132

## المخلص

تشكل غابات الصنوبر الحلبي (*Pinus halepensis* Mill.) نظامًا بيئيًا هامًا في المناطق شبه الجافة في الجزائر. ومع ذلك، تواجه هذه الغابات تراجعًا مقلًا منذ عدة عقود، ويرجع ذلك بشكل أساسي إلى تأثيرات التغير المناخي، بما في ذلك موجات الحر والجفاف المتكرر. تضعف هذه العوامل الأشجار وتجعلها أكثر عرضة لهجمات الحشرات الضارة، مثل خنافس القلف والفطريات الممرضة المرتبطة بها.

في هذا السياق، قمنا بدراسة أنواع الحشرات التي تستعمر الصنوبر الحلبي في ثلاث غابات من الأطلس التلي (بوطالب، أولاد تيان وونوغة) في شمال شرق الجزائر. تم تحديد سبع أنواع من خنافس القلف، تنتمي معظمها إلى فصيلة Scolytinae. كانت الأنواع الأكثر وفرة هي *Crypturgus numidicus* و *Orthotomicus erosus* و *Tomicus destruens*. أظهرت النتائج أن خنافس القلف الثانوية، مثل *Crypturgus numidicus*، تستعمر الأشجار التي أضعفها الإجهاد المائي أو حشرات أخرى. بالمقابل، يمكن لأنواع *Orthotomicus erosus* و *Tomicus destruens* مهاجمة الأشجار الحية، مما يزيد من تدهور الغابات. تعيش هذه الحشرات بالتعاون مع فطريات خشبية. تم إجراء دراسة ثانية لتحديد الفطريات المرتبطة بخنافس القلف التي تم جمعها من غابات الصنوبر الحلبي في الجزائر. في المجموع، تم تحديد 37 نوعًا من الفطريات، منها تسعة أنواع معروفة بارتباطها بخنافس القلف. كشفت النتائج أن معظم الفطريات المحددة هي فطريات رمية، تتغذى على المواد العضوية المتحللة. ومع ذلك، تم عزل بعض الأنواع الفطرية، مثل *Ophiostoma ips* و *Ceratocystiopsis minuta* و *Geosmithia lavendula*، وهي معروفة بقدرتها على مهاجمة الأشجار الحية. كما أظهرت الدراسة أيضًا أن جميع الأنواع الفطرية المحددة قادرة على النمو على ركائز لجنوسليلوزية، مثل اللجنين و قلف الصنوبر، مما يشير إلى مشاركتها في تحلل الخشب وإضعاف الأشجار. وقارنت الدراسة الثالثة التركيبية الإنزيمية لـ *Ceratocystiopsis minuta*، وهو فطر ممرض للصنوبر الحلبي، مع تلك الخاصة بـ *Aspergillus citrinoterreus*، وهو فطر رمي. وقد أظهر تحليل RNAseq لترنسكربتوم الفطريين المزروعين على مسحوق قلف الصنوبر أو اللجنين أن *C. minuta* يستخدم اللجنين بصورة تفضيلية، كما يظهره التعبير المفرط للجينات التي تُشفّر الإنزيمات المشاركة في المراحل المتأخرة من تحلل اللجنين أو في استخدام المنتجات المحصلة لإنتاج الطاقة من خلال دورة الحمض الثلاثي الكربوكسيلي. بالمقابل يبدو أن السليلوز هو الجزء المفضل لدى *A. citrinoterreus*. تعزز هذه البيانات فهمنا للعوامل الحيوية المشاركة في تدهور غابات الصنوبر الحلبي في الجزائر. وتزيد عوامل الإجهاد المرتبطة بالتغير المناخي من تفاقم الوضع من خلال إضعاف الأشجار وتعزيز تكاثر الحشرات والفطريات. ويُعد فهم أفضل للتنوع والبيئة والتفاعلات بين هذه الكائنات الضارة أمرًا أساسيًا لتطوير استراتيجيات الإدارة المستدامة لغابات الصنوبر الحلبي وللحفاظ على هذا النظام البيئي الهام.

**الكلمات المفتاحية:** تدهور، خنافس القلف، الصنوبر الحلبي، Ophiostomataceae، الفطريات، اللجنين



## Résumé

Les forêts de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) constituent un écosystème essentiel dans les zones semi-arides d'Algérie. Cependant, ces forêts sont confrontées à un déclin alarmant depuis plusieurs décennies, principalement dû aux effets du changement climatique, notamment les vagues de chaleur et les sécheresses récurrentes. Ces facteurs de stress affaiblissent les arbres et les rendent plus vulnérables aux attaques d'insectes ravageurs, tels que les scolytes, et de leurs agents pathogènes fongiques associés.

Dans ce contexte, nous avons entrepris d'identifier les insectes colonisant le pin d'Alep dans 3 forêts de l'Atlas Tellien (Boutaleb, Ouled Tebbane et Ouennougha) au Nord-Est algérien. Sept espèces de scolytes ont été identifiées, appartenant majoritairement à la sous-famille des Scolytinae. Les espèces les plus abondantes étaient *Crypturgus numidicus*, *Orthotomicus erosus* et *Tomicus destruens*. Les résultats ont montré que les scolytes secondaires, comme *Crypturgus numidicus*, colonisent les arbres déjà affaiblis par d'autres insectes ou par le stress hydrique. En revanche, les espèces *Orthotomicus erosus* et *Tomicus destruens* sont capables d'attaquer des arbres encore vivants, ce qui amplifie le dépérissement des forêts. Ces insectes vivent en association avec des champignons xylophages. Une deuxième étude a été menée pour identifier les champignons associés aux scolytes prélevés dans les forêts de pin d'Alep d'Algérie. Au total, 37 espèces fongiques ont été identifiées, dont neuf espèces connues pour leur association avec les scolytes. Les résultats ont révélé que la majorité des champignons identifiés sont des saprophytes, se nourrissant de matière organique en décomposition. Cependant, certaines espèces fongiques, telles que *Ophiostoma ips*, *Ceratocystiopsis minuta* et *Geosmithia lavendula*, ont été isolées et sont connues pour leur capacité à attaquer des arbres vivants. L'étude a également montré que l'ensemble des espèces fongiques identifiées sont capables de croître sur des substrats lignocellulosiques, tels que la lignine et l'écorce de pin, suggérant leur implication dans la dégradation du bois et l'affaiblissement des arbres. La troisième étude a comparé l'arsenal enzymatique de *Ceratocystiopsis minuta*, un champignon pathogène du pin d'Alep, à celui d'*Aspergillus citrinoterreus*, un champignon saprophyte. L'analyse par RNAseq du transcriptome du pathogène *C. minuta* et du saprophyte *Aspergillus citrinoterreus* cultivés sur poudre d'écorce ou sur lignine démontre pour *C. minuta* l'utilisation préférentielle de la lignine, avec la mise en évidence de la surexpression de gènes impliqués dans les étapes tardives de la dégradation de la lignine ou de l'utilisation des produits obtenus pour la production d'énergie via le cycle de Krebs. À l'inverse, *A. citrinoterreus* semble utiliser préférentiellement la cellulose et serait donc seulement un saproxylophage.

Ces données renforcent notre compréhension des facteurs biotiques impliqués dans le dépérissement des forêts de pin d'Alep en Algérie. Les facteurs de stress liés au changement climatique aggravent la situation en affaiblissant les arbres et en favorisant la prolifération des insectes et des champignons. Une meilleure compréhension de la diversité, de l'écologie et des interactions entre ces organismes nuisibles est essentielle pour développer des stratégies de gestion durable des forêts de pin d'Alep et pour préserver cet écosystème essentiel.

**Mots clés :** Dépérissement, Scolytes, pin d'Alep, Ophiostomataceae, champignons, lignine

## Abstract

Aleppo pine forests (*Pinus halepensis* Mill.) constitute an essential ecosystem in the semi-arid regions of Algeria. However, these forests have been facing an alarming decline for several decades, mainly due to the effects of climate change, including heat waves and recurrent droughts. These stress factors weaken the trees and make them more vulnerable to attacks by harmful insects, such as bark beetles, and their associated fungal pathogens.

In this context, we undertook the identification of insects colonizing Aleppo pine in three forests of the Tell Atlas (Boutaleb, Ouled Tebbane, and Ouennougha) in northeastern Algeria. Seven species of bark beetles were identified, mostly belonging to the subfamily Scolytinae. The most abundant species were *Crypturgus numidicus*, *Orthotomicus erosus*, and *Tomicus destruens*. The results showed that secondary bark beetles, such as *Crypturgus numidicus*, colonize trees already weakened by other insects or water stress. In contrast, *Orthotomicus erosus* and *Tomicus destruens* are capable of attacking living trees, which amplifies forest decline. These insects live in association with xylophagous fungi.

A second study was conducted to identify the fungi associated with bark beetles collected in Aleppo pine forests in Algeria. In total, 37 fungal species were identified, including nine species known for their association with bark beetles. The results revealed that the majority of identified fungi are saprophytes, feeding on decomposing organic matter. However, some fungal species, such as *Ophiostoma ips*, *Ceratocystiopsis minuta*, and *Geosmithia lavendula*, were isolated and are known for their ability to attack living trees. The study also showed that all identified fungal species are capable of growing on lignocellulosic substrates, such as lignin and pine bark, suggesting their involvement in wood degradation and tree weakening.

The third study compared the enzymatic arsenal of *Ceratocystiopsis minuta*, a pathogenic fungus of Aleppo pine, with that of *Aspergillus citrinoterreus*, a saprophytic fungus. RNAseq analysis of the transcriptomes of the pathogen *C. minuta* and the saprophyte *A. citrinoterreus* cultivated on bark powder or lignin demonstrated *C. minuta*'s preferential use of lignin, with overexpression of genes involved in the late stages of lignin degradation or the utilization of the resulting products for energy production via the Krebs cycle. In contrast, *A. citrinoterreus* appears to preferentially use cellulose and would therefore be only a saproxylophage.

These data enhance our understanding of the biotic factors involved in the decline of Aleppo pine forests in Algeria. Stress factors related to climate change exacerbate the situation by weakening trees and promoting the proliferation of insects and fungi. A better understanding of the diversity, ecology, and interactions between these harmful organisms is essential for developing sustainable management strategies for Aleppo pine forests and preserving this crucial ecosystem.

**Keywords:** Decline, Bark beetles, Aleppo pine, Ophiostomataceae, Fungi, Lignin

## Liste des figures

Figure 1 : Le pin d'Alep (A), et les particularités de ses aiguilles (B), de l'écorce (C), et de ses cônes (D, cônes fermés, immatures ; E, cônes ouverts, matures)	7
Figure 2 : Distribution du pin d'Alep dans le bassin méditerranéen	7
Figure 3 : Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie, d'après Seigue (1985)	8
Figure 4 : Chancre et écoulement de résine (A), et dépérissement de pousses (B) causés par <i>Fusarium circinatum</i> .	12
Figure 5 : Cycle de vie des scolytes	19
Figure 6 : Pourriture brune (A), pourriture blanche (B), pourriture fibreuse ou molle (C), et bleuissement (D)	21
Figure 7 : Cellulose, hémicelluloses et lignine dans la paroi des cellules végétales	25
Figure 8 : Structure partielle de la cellulose montrant une unité de cellobiose.	25
Figure 9 : Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose.	27
Figure 10: Structure de certaines hémicelluloses A : longue chaîne de type xylane (bois de feuillus) ; B : longue chaîne de type glucomannane (bois de résineux)	28
Figure 11 : Schéma de la structure de lignine de bois, d'après Zakzeski <i>et al.</i> (2010)	29
Figure 12 : Structure chimique des monolignols.	30
Figure 13 : Schéma de la fragmentation de la lignine conduisant à la production de protocatéchuate et de catéchol	31
Figure 14 : Structure du centre des laccases fongiques.	33
Figure 15 : Le cycle catalytique des LiP.	35
Figure 16 : Oxydation de la lignine par la manganèse peroxydase (MnP)	36
Figure 17 : Les voies mises en œuvre pour l'ouverture des cycles benzéniques en fonction de la nature du composé généré par époulymérisation de la lignine, et nature des produits finaux obtenus.	38
Figure 18 : Les voies principales de catabolisme des composés aromatiques chez les Dikarya	39
Figure 19 : Voies du 3-oxoadipate (branche du protocatéchuate ou 3,4 dihydroxybenzoate) et du gentisate (ou 2,5 dihydroxybenzoate)	40
Figure 20 : Branche du protocatéchuate chez les champignons et les bactéries.	41
Figure 21 : Les deux voies de dégradation du catéchol par les champignons, avec clivage du noyau aromatique en ortho (A) ou en méta (B)	42
Figure 22 : Cluster du gentisate chez <i>Aspergillus fumigatus</i> et <i>Scedosporium apiospermum</i>	43
Figure 23 : Localisation des différentes études réalisées sur les insectes xylophages des conifères en Algérie.	120

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principaux scolytes présents en Algérie et leurs arbres hôtes . .....	17
Tableau 2 : Composition chimique de l'écorce et de l'aubier.....	25
Tableau 3 : Scolytes identifiés dans les forêts de conifères en Algérie, leurs espèces hôtes et leur distribution.....	119

## INTRODUCTION

Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) est l'un des arbres dominants dans le bassin occidental de la méditerranée (Le Houérou, 2005 ; Vennetier *et al.*, 2010 ; Vennetier *et al.*, 2018). C'est un arbre très important dans la dynamique des écosystèmes méditerranéens, car il tolère de nombreux stress abiotiques et pousse dans des sols peu développés (Vennetier *et al.*, 2018). Il est très utilisé pour la reforestation des zones ravagées par les feux de forêt ou dans des zones semi-arides qu'il protège de la désertification. L'exemple le plus marquant en Algérie est le reboisement réalisé dans le cadre du grand projet du barrage vert, à base de pins d'Alep principalement.

Le pin d'Alep est par ailleurs une espèce très intéressante pour les écophysiologistes, notamment pour étudier les processus de résistance et d'adaptation à la sécheresse et au changement climatique. Les graines de pin d'Alep et l'huile qui en est extraite sont également utilisées à des fins nutritionnelles, cosmétiques et thérapeutiques.

Bien que le reboisement des forêts soit la meilleure solution pour contrer le changement climatique, chaque année des milliers d'hectares de forêt sont perdus dans le monde ; on estime à 7 millions d'hectares la perte de forêts chaque année entre 2000 et 2005 (Freer-Smith *et al.*, 2009). En entraînant une réduction de la consommation de dioxyde de carbone, la perte de ces arbres accentue le réchauffement climatique, un phénomène lié à l'augmentation du taux de CO<sub>2</sub> et dont les conséquences sont multiples, avec notamment une élévation progressive des températures et des périodes de sécheresse de plus en plus marquées (Jactel *et al.*, 2019).

Ces conditions climatiques plus chaudes et plus sèches ont-elles aussi un impact sur les forêts du bassin méditerranéen où la fréquence et la durée des sécheresses extrêmes ont augmenté au cours des dernières années (Navarro-Cerrillo *et al.*, 2019) Les périodes répétées de stress hydrique affectent les optimums de développement des arbres forestiers. En outre, la température et la pluviométrie ont un effet sur la disponibilité de l'eau, et jouent un rôle direct sur la limite des aires des espèces forestières (Vennetier, 2007), les arbres situés à la limite de leur aire de distribution étant les plus touchés (Guit *et al.*, 2016). Dans les régions caractérisées par un climat fluctuant de type semi-aride, le stress hydrique en été est un facteur limitant du développement de la flore, avec notamment pour conséquence une altération de la structure et de la composition des forêts (Vennetier, 2007). La réduction de la disponibilité en eau du sol, associée à une évapotranspiration croissante de l'eau, réduit la productivité des forêts et déclenche des épisodes de dépérissement (Navarro-Cerrillo *et al.*, 2019).

Ainsi, le dépérissement des forêts est un phénomène complexe touchant le monde entier et résultant de plusieurs facteurs, principalement abiotiques, mais aussi de facteurs biotiques.

La sécheresse a été identifiée comme la principale préoccupation pour le fonctionnement des écosystèmes forestiers méditerranéens (Helluy *et al.*, 2020). En Algérie, la période de sécheresse entre 1980-2002 fut la plus importante depuis le milieu du XVe siècle, ce qui confirme la transition de régions situées à des latitudes moyennes vers des conditions plus arides (Touchan *et al.*, 2008), avec un impact important sur les écosystèmes forestiers. La sécheresse peut en effet induire la mort de certains arbres et le dépérissement des forêts dans les cas de longues périodes de sécheresse (Helluy *et al.*, 2020).

Le réchauffement climatique a par ailleurs un effet direct ou indirect sur les parasites des forêts par le biais d'interactions entre les arbres hôtes et les ennemis naturels (Jactel *et al.*, 2019).

Certains insectes nuisibles se nourrissant du tronc des arbres comme les papillons de nuit qui s'attaquent aux pousses ou aux tiges des pins, sont affectés par la sécheresse, tandis que les scolytes, les insectes broyeur de feuilles (sauterelles, criquets, fourmis ...), les insectes mineurs, les insectes gallicoles et les saprophiles bénéficient des conditions sèches. Cependant, ces tendances générales sont modulées par l'intensité du stress hydrique, avec des réponses généralement non linéaires. À titre d'exemple, les scolytes sont bien connus pour engendrer des épidémies en cas de sécheresse sévère, alors que des arbres modérément stressés peuvent être plus résistants à ces insectes.

D'autres ravageurs comme la chenille processionnaire du pin (*Thaumetopoea pityocampa*) peuvent fragiliser les arbres, et ainsi les rendre vulnérables à d'autres insectes dits xylophages comme les scolytes, qui profitent de la moindre résistance des arbres pour les coloniser en creusant des galeries sous l'écorce, ce qui peut mener à leur dépérissement et éventuellement engendrer leur mort.

Enfin, les scolytes favorisent l'installation des champignons xylophages dans leurs galeries. Ces derniers bénéficient du transport par les insectes d'un arbre hôte à un nouvel arbre ; inversement, ils offrent aux insectes de la nourriture en dégradant les composants du bois (cellulose, hémicellulose et lignine) grâce à leurs enzymes. Cette association est rendue possible par la présence, au niveau de la cuticule des insectes, de structures hébergeant les spores des champignons, appelées mycangium.

Dans l'Est Algérien, les forêts domaniales de Bou-Taleb, Ouled Tebanne et Ouanougha, constituées principalement de pin d'Alep, ont connu une dégradation importante. Les feux de forêt ont accentué cette dégradation, et malgré l'apparition et l'accentuation du phénomène de dépérissement du pin d'Alep, peu d'études se sont intéressées aux insectes xylophages et à leurs symbiotes fongiques dans les forêts de pins d'Alep. Il est donc nécessaire et indispensable de réaliser un état des lieux des espèces ravageuses présentes dans nos forêts de pins d'Alep, afin de définir des stratégies de gestion ou de lutte pour contrer d'éventuelles épidémies de xylophages ravageurs et ainsi protéger notre flore forestière.

Dans ce contexte de réchauffement climatique global dont on parle depuis une trentaine d'années, mais qui devient aujourd'hui évident aux yeux de tous, à l'origine de périodes de sécheresse de plus en plus fréquentes qui fragilisent les arbres et les rendent plus vulnérables à l'attaque des prédateurs et aux intempéries (pluies diluviennes à l'origine d'inondations catastrophiques, et tempêtes), nous avons voulu dresser un premier état des lieux de la diversité des insectes xylophages dans les forêts de pins d'Alep de l'Est Algérien. Les forêts de pins d'Alep, en tant qu'écosystèmes forestiers essentiels, abritent une grande variété de scolytes, qui colonisent les arbres stressés ou morts. Cette biodiversité est d'une importance capitale pour l'équilibre de ces écosystèmes et pour la régénération naturelle des forêts.

De plus, notre étude vise également à identifier les champignons xylophages associés à ces insectes. Les champignons xylophages sont des organismes essentiels à la décomposition du bois. Ils sont souvent hébergés par les insectes xylophages et jouent un rôle fondamental dans le processus de dégradation du bois. En étudiant ces champignons, nous cherchons à mieux appréhender leur diversité et leur fonction dans la dégradation des composants du bois.

Après ce recensement des insectes xylophages présents dans les forêts de pins d'Alep et des espèces fongiques associées à ces insectes, nous avons étudié certaines enzymes de dégradation produites par ces champignons. Ces enzymes ont la capacité de décomposer des polymères complexes tels que la cellulose, l'hémicellulose et la lignine, qui sont les principaux constituants du bois.

Les données ainsi obtenues contribueront à une meilleure compréhension de l'écologie des forêts de pins d'Alep, de la biodiversité des insectes et des champignons xylophages, ainsi que des processus de dégradation du bois. L'acquisition de ces connaissances est un premier pas vers une gestion forestière durable, la conservation de la biodiversité et la compréhension des cycles biogéochimiques dans les écosystèmes forestiers méditerranéens.

Cette étude s'inscrit également dans une approche de santé intégrée (One Health) puisque nous avons, en arrière-pensée, la détection parmi les symbiotes fongiques d'espèces potentiellement pathogènes pour l'homme et l'identification de leur habitat naturel, le réchauffement climatique global pouvant s'accompagner de l'installation de nouvelles espèces d'insectes xylophages et ainsi de l'émergence de nouveaux pathogènes fongiques dans des contrées jusqu'alors épargnées.



## **Étude bibliographique**

# Étude bibliographique

## 1. Le pin d'Alep

Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) est une espèce conifère indigène de la région méditerranéenne qui joue un rôle significatif dans les écosystèmes du bassin méditerranéen, y compris en Algérie. Son histoire remonte à l'Antiquité, où il était reconnu pour ses propriétés bénéfiques, tant pour la construction que pour d'autres usages. Ce chapitre vise à étudier les adaptations écologiques et les schémas de distribution de *Pinus halepensis* en Algérie. Comprendre ces aspects est essentiel pour une conservation efficace et la gestion durable de cette espèce précieuse.

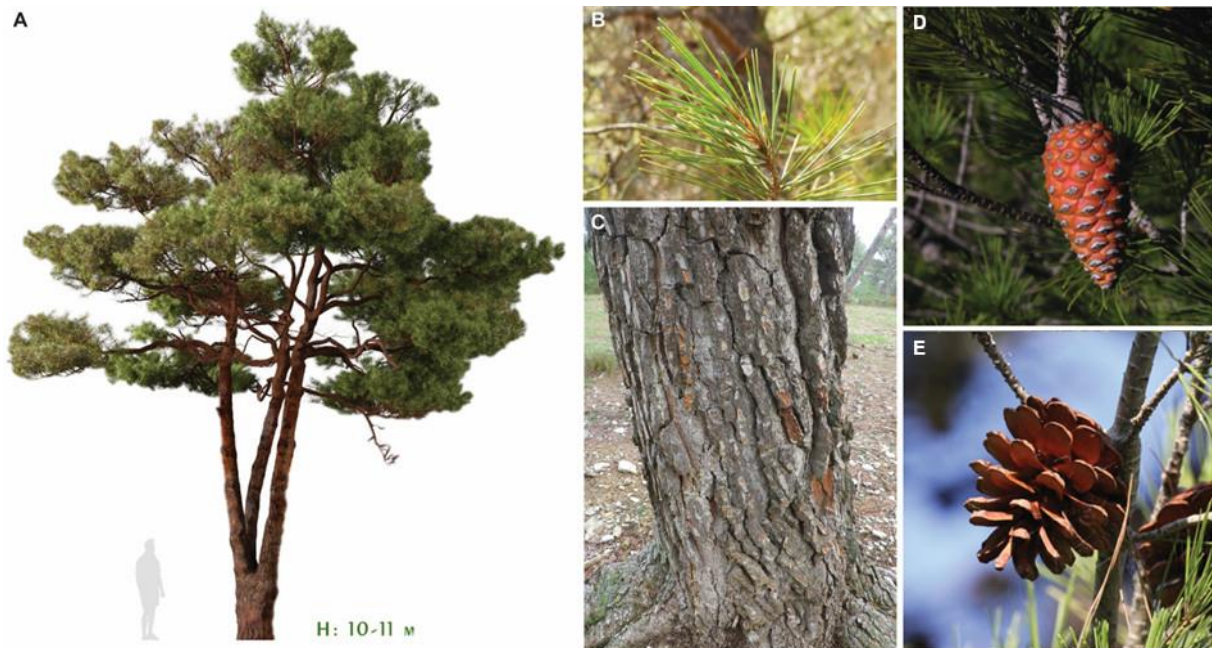
### 1.1. Position taxonomique et caractéristiques botaniques

Le pin d'Alep appartient au groupe des Gymnospermes, c'est à dire les plantes à graines par opposition aux plantes à fleurs que sont les Angiospermes. Un très grand nombre de gymnospermes ne sont connus aujourd'hui qu'à l'état de fossiles, et les gymnospermes actuels appartiennent au groupe des Acrogymnospermes, qui sont pour la plupart des plantes ligneuses arborescentes ou arbustives. Ce sont des plantes pérennes, et à de très rares exceptions près comme le gingko, le mélèze ou le cyprès chauve, sempervirentes (c'est-à-dire à feuillage persistant).

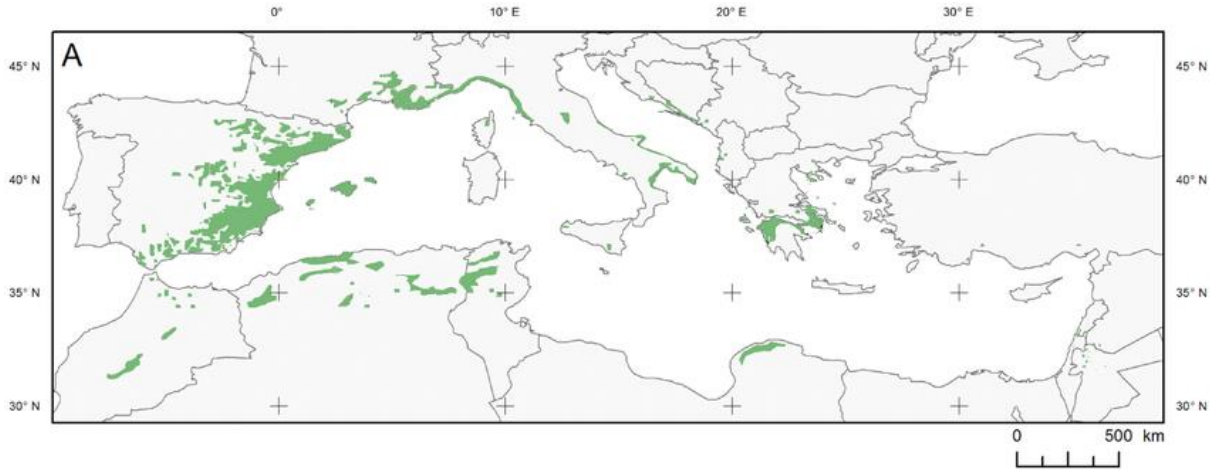
Le Pin d'Alep (ordre des Pinales, famille des Pinaceae) est un arbre conifère (Figure 1) de taille moyenne à grande, pouvant atteindre une hauteur de 15 à 25 mètres (Farjon, 2010). Il présente un tronc tortueux dont l'écorce se fissure avec l'âge. Ses caractéristiques botaniques comprennent des aiguilles persistantes, groupées par deux à l'extrémité des rameaux, mesurant généralement de 6 à 12 cm de long, et des cônes matures de 5 à 12 cm de long, de forme oblongue et dotés d'écailles épaisses et ligneuses (Mauri *et al.*, 2016). Ses graines, d'environ 5 mm de longueur, sont dotées d'une aile de 1 à 3 cm de long qui facilite leur dispersion.

### 1.2. Répartition géographique

*Pinus halepensis* est improprement appelé pin d'Alep, car c'est une autre espèce de pin, *Pinus brutia*, que l'on rencontre principalement dans la région d'Alep en Syrie. *Pinus halepensis* est quant à lui rencontré tout autour du bassin méditerranéen (Figure 2), une zone située autour de la mer Méditerranée qui connaît un véritable bioclimat de type méditerranéen (Richardson, 1998).



**Figure 1 : Le pin d'Alep (A), et les particularités de ses aiguilles (B), de l'écorce (C), et de ses cônes (D, cônes fermés, immatures ; E, cônes ouverts, matures).**



**Figure 2 : Distribution du pin d'Alep dans le bassin méditerranéen d'après de Luis *et al.* (2013).**

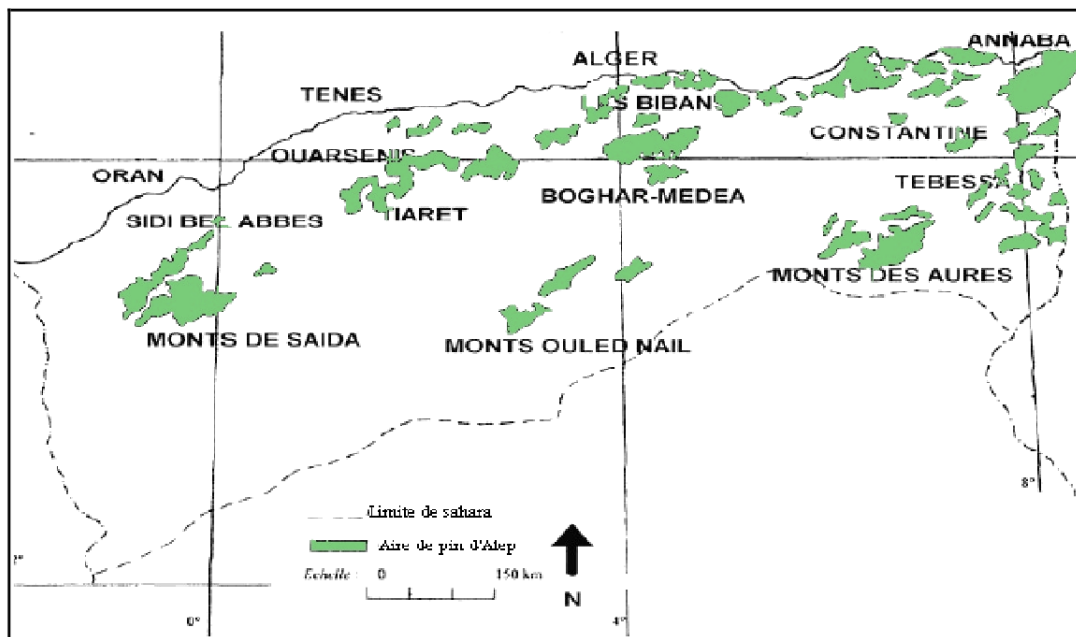
On le rencontre notamment en Espagne, en Grèce et dans le sud de la France, mais aussi sur les côtes italiennes, serbes, croates et bosniaques. Il est également présent en Albanie, en Turquie, au Liban, en Israël et en Lybie, ainsi que dans les pays du Maghreb.

Le pin d'Alep est bien adapté aux conditions environnementales méditerranéennes. Il tolère des étés chauds et secs ainsi que des hivers doux et pluvieux (Ne'eman et Osem, 2021). En Algérie, il se trouve principalement dans les régions côtières, notamment dans les montagnes de l'Atlas Tellien, où il forme des peuplements purs ou mixtes, dans lesquels il est associé à d'autres espèces de pins et de chênes (Lapie et Maige, 1914 ; Nahal, 1962).

### 1.3. Schémas de distribution en Algérie

#### 1.3.1. Plage géographique

La distribution de *Pinus halepensis* en Algérie s'étend sur une large gamme d'habitats, principalement dans les régions du nord et de la côte (Figure 3). Elle s'étend depuis les montagnes de l'Atlas Tellien dans le nord-est jusqu'aux montagnes de l'Aurès à l'est, avec des populations dispersées dans la région de Kabylie (Nahal, 1962). En Algérie, les forêts de pin d'Alep occupent plus de 850 000 hectares (Goussanem, 2000).



**Figure 3 : Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie, d'après Seigue (1985).**

#### 1.3.2. Distribution altitudinale

En Algérie, *P. halepensis* présente une distribution altitudinale allant du niveau de la mer à environ 1 500 mètres d'altitude (Kadik, 1986). L'espèce prospère généralement à des altitudes plus basses le long de la côte méditerranéenne, cédant la place

progressivement aux chênes et aux cèdres à des altitudes plus élevées, dans les montagnes de l'Atlas.

### 1.3.3. Facteurs environnementaux

La distribution du pin d'Alep en Algérie est influencée par divers facteurs environnementaux, notamment la température, les précipitations et les caractéristiques du sol. On le trouve couramment dans des zones au climat méditerranéen, caractérisé par des hivers doux et humides et des étés chauds et secs, ce qui est typique des régions côtières du nord (Guit *et al.*, 2015).

## 1.4. Importance du pin d'Alep

### 1.4.1. Importance écologique

Le pin d'Alep joue un rôle crucial dans les écosystèmes méditerranéens en Algérie. Il offre un habitat pour de nombreuses espèces animales et végétales et contribue à la biodiversité régionale (Richardson, 1998). Ses aiguilles, lorsqu'elles tombent au sol, créent une litière qui protège le sol contre l'érosion et favorise la formation de sols forestiers riches en matière organique (de Pagter *et al.*, 2023).

### 1.4.2. Importance économique

Outre son importance écologique, le pin d'Alep présente une incidence économique importante en Algérie. Il est exploité pour son bois, qui est utilisé dans la construction, la menuiserie et la fabrication de meubles. Le bois de pin d'Alep est également utilisé comme source d'énergie, en particulier dans les zones rurales (Boulâcheb, 2010 ; Tatar, 2012). Par conséquent, la gestion durable de cette ressource est essentielle pour maintenir son utilisation à long terme.

De manière plus anecdotique, le pin d'Alep possède également un intérêt nutritionnel, cosmétique et médicinal en raison de la teneur élevée de l'huile extraite de ses graines en acides gras insaturés et en composants anti-oxydants. L'huile de pin d'Alep, qui est connue pour ses propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes, présente une odeur délicate et pénètre rapidement la peau sans laisser de film gras. En médecine traditionnelle, les bourgeons, les aiguilles, l'huile essentielle qui en est extraite, et la résine sont utilisés depuis fort longtemps comme expectorant, antiseptique et anti-rhumatismal (Bellakhdar, 1997 ; Bruneton, 1999). 16 constituants ont été identifiés dans l'huile essentielle des aiguilles de pin d'Alep du Nord-est Algérien, parmi lesquels prédominent le  $\beta$ -caryophyllène (31 à 32%), l' $\alpha$ -pinène (21 à 24%) et le  $\beta$ -myrcène (9 à 19%) (Sadou *et al.*, 2015). Dans une autre étude réalisée par Dob *et al.* (2005), 41 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle des aiguilles de pin d'Alep, avec

pour composants majoritaires le  $\beta$ -caryophyllène (40%), l' $\alpha$ -humulène (7,9%) et l'aromadendrène (7,1%). Tous ces composés, de structure terpénique (monoterpènes comme l' $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -myrcène ou sesquiterpènes comme le  $\beta$ -caryophyllène, l' $\alpha$ -humulène et l'aromadendrène, qui résultent de la condensation de deux ou trois unités d'isoprène, respectivement) présentent des propriétés antiseptiques et aromatiques. À titre d'exemple, le  $\beta$ -caryophyllène, qui est dépourvu d'effets indésirables, est utilisé comme additif (exhausteur de goût) dans l'alimentation. Il est approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) aux USA où il bénéficie du statut GRAS (*Generally Recognized as Safe*) ; de même l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a approuvé son utilisation dans l'alimentation humaine ou animale, ainsi que dans les cosmétiques.

#### 1.4.3. Conservation et gestion des forêts de pins d'Alep

La conservation du Pin d'Alep en Algérie est cruciale compte tenu de son rôle écologique et de son importance économique. Des pratiques de gestion forestière durable sont nécessaires pour préserver les populations naturelles de cette espèce, tout en répondant aux besoins économiques des communautés locales (Bentouati et Bariteau, 2005 ; Benderradji *et al.*, 2006). Des efforts de reboisement et de restauration écologique sont également mis en œuvre pour réhabiliter les zones dégradées et promouvoir la régénération naturelle de cette espèce.

### 1.5. Biologie et écologie du pin d'Alep

Le pin d'Alep présente, habituellement, une grande capacité d'adaptation écologique, ce qui lui permet de prospérer dans diverses conditions environnementales. Ces capacités d'adaptation comprennent :

#### 1.5.1. Tolérance à la sécheresse

L'une des adaptations clés de *P. halepensis* est sa remarquable tolérance à la sécheresse. L'espèce a développé des mécanismes tels qu'une conductance stomatique réduite, des systèmes racinaires profonds et une cuticule cireuse pour minimiser les pertes d'eau pendant les périodes de sécheresse prolongée (Veullen *et al.*, 2023). Cette caractéristique lui permet de résister aux conditions arides et semi-arides qui prévalent dans de nombreuses régions de l'Algérie.

#### 1.5.2. Adaptation au feu

*Pinus halepensis* a développé une stratégie originale pour faire face aux incendies, un événement courant dans la région méditerranéenne. L'espèce présente des cônes sérotineux (Figure 1) qui restent fermés, leurs écailles étant recouvertes d'une résine,

mais s'ouvrent lorsqu'ils sont exposés à des températures élevées, ce qui permet la libération des graines et la régénération de la forêt après les incendies (Pausas *et al.*, 2004 ; Elvira *et al.*, 2021). Cette particularité contribue à la persistance des pins d'Alep dans les zones sujettes aux incendies en Algérie.

### 1.5.3. Exigences en nutriments et matières inorganiques

Le pin d'Alep montre une préférence pour les sols bien drainés avec une teneur limitée en éléments nutritifs. Il s'adapte bien aux sols pauvres en éléments nutritifs que l'on trouve dans de nombreuses régions de l'Algérie, où la concurrence avec d'autres espèces d'arbres est réduite (Kadik, 1986).

## 1.6. Ennemis naturels du pin d'Alep

Le pin d'Alep fait face à de nombreuses menaces biotiques dans son habitat naturel. Plusieurs ennemis naturels, notamment les insectes, les micromycètes et les herbivores, peuvent avoir un impact sur sa santé et sa répartition.

### 1.6.1. Insectes nuisibles

**Les scolytes (Scolytidae)** : Les scolytes sont des insectes coléoptères nuisibles, particulièrement importants pour le pin d'Alep. Des espèces comme *Ips sexdentatus* et *Orthotomicus erosus* attaquent les arbres affaiblis, souvent en raison du stress hydrique. Les infestations peuvent entraîner la mort des branches et des arbres. Les scolytes du pin d'Alep creusent des galeries dans l'écorce des arbres pour pondre leurs œufs. Après éclosion, les larves se nourrissent de la sève de l'arbre, ce qui peut entraîner sa mort. Les arbres ont un mécanisme de défense contre les scolytes, en produisant de la résine qui bloque les insectes au moment de l'attaque. Les arbres attaqués présentent des trous caractéristiques de 2 à 3 mm de diamètre, situés au tronc ou à la base des rameaux, ainsi que des signes d'affaiblissement, tels que des aiguilles jaunâtres ou brunes, des aiguilles qui tombent prématurément, des rameaux secs, et un aspect général affaibli ou dépérissant.

**Les chenilles processionnaires** : Les chenilles processionnaires du pin d'Alep (*Thaumetopoea pityocampa*) sont des larves de lépidoptères de nuit de la famille des Notodontidae. Elles sont de couleur brune et mesurent environ 2 cm de long. A leur dernier stade de développement, elles descendent le long du tronc de l'arbre contrairement à la processionnaire du chêne qui effectue tout son cycle de développement dans l'arbre hôte. Les processionnaires du pin se déplacent alors en procession, en file indienne, d'où leur nom, et vont s'enfouir dans le sol où elles vont se transformer en chrysalide. Puis l'insecte se transforme en papillon qui sort du sol, les individus mâles et femelles s'accouplent et les femelles vont pondre leurs œufs à

l'extrémité des branches d'un nouvel arbre. Les larves tissent des nids de soie dans l'arbre colonisé, d'où elles sortent la nuit pour se nourrir. Elles se nourrissent des aiguilles de pin, et peuvent causer la défoliation des arbres, ce qui les affaiblit et les rend plus vulnérables aux maladies et aux autres insectes.

**Les sphécides (Diprionidae)** : Les sphécides des pins, comme *Diprion pini*, entraînent la chute des aiguilles des pins d'Alep, affectant leur croissance et leur vitalité. Les épidémies de sphécides peuvent ainsi entraîner une défoliation étendue et réduire la vigueur des arbres.

#### 1.6.2. Les micromycètes

**Les pathogènes fongiques** : Divers pathogènes fongiques peuvent affecter les pins d'Alep. *Fusarium circinatum*, l'agent causal de la maladie du chancre-résineux, représente une menace importante. Il peut provoquer des lésions résineuses et la mort des branches, aboutissant finalement à la mort des arbres (Figure 4).



**Figure 4 : Chancre et écoulement de résine (A), et dépérissement de pousses (B) causés par *Fusarium circinatum*.**

**Les symbiotes mycorhiziens** : Bien qu'ils ne soient pas des pathogènes traditionnels, les changements dans les associations mycorhiziennes peuvent affecter la santé des pins d'Alep. Les modifications des communautés mycorhiziennes dues aux stress environnementaux peuvent altérer l'absorption des nutriments et la résilience des arbres. L'espèce mycorhizienne la plus connue chez les pins d'Alep est *Pisolithus tinctorius*. Ce champignon ectomycorhizien établit des associations symbiotiques avec les pins d'Alep. Il est bien adapté aux conditions environnementales difficiles, telles



que la sécheresse, et joue de ce fait un rôle important dans la santé des arbres (Diaz *et al.*, 2010; Sebastiana *et al.*, 2020).

#### 1.6.3. Les nématodes xylophages

Les nématodes du pin sont des parasites microscopiques qui s'attaquent aux pins et à d'autres conifères. *Bursaphelenchus xylophilus* est l'espèce la plus connue. Elle est originaire d'Amérique du Nord, mais a été introduite dans de nombreuses régions du monde, notamment en Europe et en Asie. Les nématodes du pin sont transmis par des insectes vecteurs, tels que *Monochamus galloprovincialis*. Ces nématodes causent la maladie du flétrissement du pin dont les symptômes comprennent le rougissement des aiguilles ou leur chute, et le dessèchement des branches. Les arbres infectés peuvent dépérir en quelques semaines.

La maladie du flétrissement du pin est un problème majeur pour les forêts de conifères dans le monde entier. Il est donc important de prendre des mesures pour limiter la propagation de ce parasite afin de protéger les forêts de conifères, d'autant plus qu'il n'existe pas de traitement curatif contre cette maladie. Les mesures de lutte se concentrent donc sur la prévention de la propagation du parasite. Ces mesures comprennent l'utilisation de variétés de pins résistantes, la lutte contre les insectes vecteurs et la mise en place de zones de quarantaine.

Plusieurs espèces de nématodes qui parasitent les cultures maraichères ont été identifiées en Algérie (*Meloidogyne incognita*, *Helicotylenchus pseudorobus* et *Tylenchorhynchus Longidorus*). Néanmoins aucune de ces espèces n'a été rapportée comme parasite des pins (Ouanouki et Ighili, 1988 ; Hadj-Sadok *et al.*, 2011 ; Hoceini *et al.*, 2020).

A l'inverse, *Bursaphelenchus xylophilus* n'est pas présent en Algérie, mais la région méditerranéenne est menacée par cette maladie, d'autant plus que *Monochamus galloprovincialis*, qui est le principal vecteur des nématodes du pin en Europe, est présent dans de nombreux pays méditerranéens, notamment en Algérie.

Il est donc important de surveiller les forêts de conifères dans cette région afin de détecter rapidement l'introduction du nématode du pin.

#### 1.6.4. Les mammifères herbivores

La pression du bétail est un facteur important qui peut limiter la régénération naturelle des pins d'Alep. Le broutage par les mammifères, tels que les chèvres, les moutons et les bovins, affecte les jeunes pousses, qui sont les plus vulnérables aux dommages (Benderradji *et al.*, 2006 ; Bouzahar, 2022).

### 1.6.5. Rôle écologique des ennemis naturels

Les ennemis naturels peuvent avoir des rôles écologiques complexes dans la régulation des populations de *Pinus halepensis*. Les scolytes, par exemple, peuvent attaquer sélectivement les arbres affaiblis, contribuant ainsi à la santé de la forêt en éliminant les individus sensibles. Les pathogènes fongiques peuvent également jouer un rôle dans l'éclaircissement des peuplements trop denses.

Contrairement aux hypothèses courantes, les infestations d'insectes forestiers atténueraient l'intensité des feux de forêts (Littell *et al.*, 2010 ; Meigs *et al.*, 2016). En modifiant la structure et la composition des forêts à l'échelle des peuplements et des régions, ces insectes contribuent à l'hétérogénéité à l'échelle du paysage, ce qui pourrait renforcer la résistance et la résilience des forêts aux incendies.

### 1.6.6. Implications pour la gestion et la conservation

Comprendre les dynamiques entre *Pinus halepensis* et ses ennemis naturels est essentiel pour une gestion forestière efficace et les pratiques de conservation. Des stratégies de gestion intégrée des ravageurs, telles que la surveillance et l'éclaircissage sélectif, peuvent contribuer à atténuer les impacts des insectes et des maladies. La promotion de la diversité et de la résilience forestières peut également renforcer la résistance aux ennemis naturels.

## 2. Les scolytes

La sous-famille des Scolytinae représente les ravageurs les plus importants des forêts de conifères dans le monde. Apparus, il y a 280 millions d'années, ils sont regroupés dans 250 genres. Environ 40 espèces sont connues dans le bassin méditerranéen (Lieutier *et al.*, 2016). En Algérie, 17 espèces de scolytes ont été recensées (Lieutier *et al.*, 2016).

Une seule génération de scolytes est produite par année ; cependant, lorsque les conditions météorologiques sont favorables, certaines espèces peuvent produire deux générations par an (Hedgren et Schroeder, 2004 ; Jönsson *et al.*, 2011). Seules quelques espèces de scolytes sont considérées comme des insectes nuisibles en raison de leur capacité à coloniser en masse et à tuer les arbres sains lors des épidémies. En méditerranée, *Tomicus destruens* est considéré comme le scolyte le plus dévastateur.

Lors d'épidémies massives, les conséquences économiques peuvent être dévastatrices pour la sylviculture (Christiansen et Bakke, 1988) car les galeries maternelles et les galeries larvaires du scolyte pénètrent profondément dans le

phloème, perturbant le flux de nutriments de l'arbre ; par ailleurs, les scolytes sont associés dans ces galeries, à des pathogènes fongiques des genres *Ceratocystis* et *Ophiostoma*. Les associations entre différentes espèces de champignons ascomycètes et les scolytes sont bien connues (Francke-Grosmann, 1967 ; Krokene et Solheim, 1996 ; Paine *et al.*, 1997 ; Six, 2003), et plusieurs études ont montré que les champignons des genres *Ceratocystis* et *Ophiostoma* notamment peuvent tuer les arbres même en l'absence de scolytes (Solheim, 1988 ; Hardings, 1989 ; Solheim, 1991 ; Hardings, 1995 ; Krokene et Solheim, 1996 ; Solheim et Krokene, 1998 ; Salle *et al.*, 2005).

En Algérie, ces insectes ont été peu étudiés, en particulier pour le pin d'Alep qui est l'une des espèces les plus touchées. Selon l'espèce de l'arbre hôte et son état sanitaire, ces insectes peuvent pulluler rapidement et occasionner des dégâts importants dans les forêts. Plusieurs espèces de scolytes ont été identifiées sur le cèdre de l'Atlas. Parmi elles, *Cryphalus piceae* est l'espèce primaire la plus abondante dans toutes les cédraies de l'Atlas, suivie de *Phloeosinus cedri* qui est aussi une espèce primaire qui peut coloniser des arbres vivants affaiblis par le stress hydrique. Ces deux espèces de scolytes peuvent réaliser des attaques simultanées et cohabiter. D'autres espèces secondaires, telles que *Cisdygma corioli* et *Scolytus amygdale*, s'attaquent uniquement aux arbres déjà fragilisés (Fabre *et al.*, 1999 ; Latifa, 2013 ; Boukerker et Si Bachir, 2015). En Algérie, on retrouve également *Cryphalus piceae* sur *Abies numidica* dans les Babors (Peyerimhoff, 1919) ; il s'agit d'une espèce dévastatrice compte tenu de sa capacité à s'attaquer à des arbres jeunes (Fabre *et al.*, 1999).

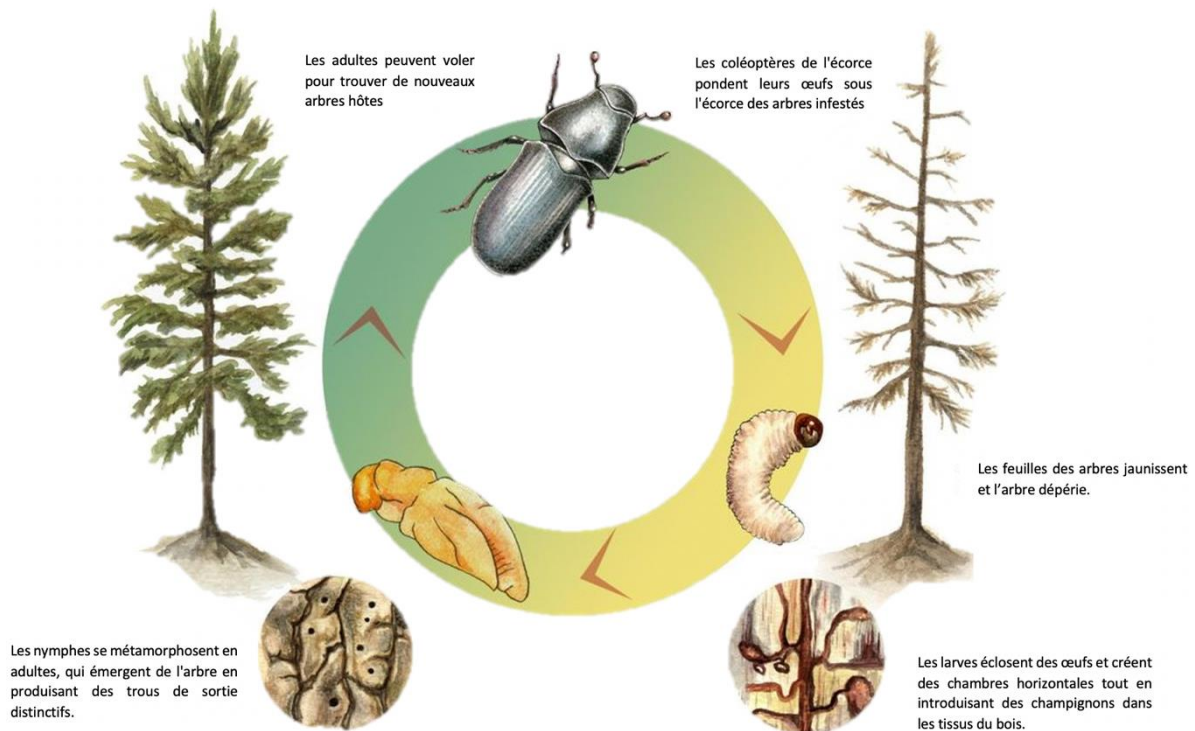
Les espèces capables de coloniser le pin d'Alep sont les plus répandues, avec des espèces primaires comme *Tomicus destruens* qui peut coloniser des arbres vivants, suivi par d'autres espèces telles que *Orthotomicus erosus*, *Pityogenes bidentatus*, *Hylurgus micklitzi*, *Cryphalus numidicus*. *Tomicus destruens* est une espèce qui est souvent confondue avec *Tomicus piniperda* ; il s'en distingue par un cycle précoce qui débute en automne (Chakali, 2004), alors que les autres espèces ont un cycle qui débute à la fin de l'hiver ou au printemps.

*Tomicus destruens* (qu'on appelle communément hylésine destructeur) est un insecte ravageur qui provoque des dégâts considérables dans les peuplements de pins d'Alep en Algérie. Cet insecte est monovoltine, c'est-à-dire qu'il ne produit qu'une génération par an. Au printemps, les imagos émergent des arbres morts ou affaiblis et s'alimentent

sur les jeunes pousses. Ils se dispersent en automne, et s'accouplent. Les femelles pondent leurs œufs dans des galeries creusées dans l'écorce des arbres adultes. Les larves se nourrissent du bois et provoquent le dépérissement des arbres attaqués. L'ampleur des pertes sylvicoles dépend essentiellement de l'état physiologique des arbres. Les arbres affaiblis, par la sécheresse ou les maladies par exemple, sont plus vulnérables aux attaques de l'hylésine destructeur (Chakali, 2005 ; Chakali, 2007). Les espèces qui arrivent après les attaques de l'hylésine destructeur comme *Orthotomicus erosus*, bénéficient de l'affaiblissement des arbres précédemment attaqués par l'hylésine.







**Figure 5 : Cycle de vie des scolytes,**  
d'après Twiddy (2010).

Les champignons ont développé des interactions avec différents arthropodes et les ancêtres des *Curculionoidea* avant l'évolution des scolytes (Farrell *et al.*, 2001). L'association entre deux organismes tels qu'un champignon et un coléoptère permet une extension d'un habitat déjà connu ou une possibilité d'utiliser une nouvelle niche, et d'éviter la compétition (Mueller *et al.*, 2005).

Certains scolytes ne peuvent pas obtenir tous leurs nutriments essentiels en consommant du bois et dépendent donc pour l'apport en nutriments d'une autre source alimentaire, comme un champignon symbiotique, afin de compléter leur cycle de vie (Clayton, 1964). Les insectes comportent en général de 6 à 10% d'azote ; ils dépendent, par conséquent, d'un apport élevé en azote pour pouvoir se reproduire. Il a été démontré que la croissance et le succès de la reproduction des scolytes sont liés à l'apport alimentaire pendant le stade larvaire, une forte concentration d'azote augmentant la survie des larves et les nymphes (Ayres *et al.*, 2000). Pendant le stade larvaire, la teneur en azote de l'alimentation peut être augmentée par l'inoculation d'un champignon mutualiste, ce qui peut donner à la larve un avantage en termes de survie lorsque les conditions sont favorables. Cependant, il a également été démontré qu'un champignon défavorable peut avoir l'effet inverse sur la survie des larves : par exemple, l'antagoniste *Ophiostoma minus* a un effet nuisible sur le scolyte *Dendroctonus frontalis* (Ayres *et al.*, 2000). Une larve de *D. frontalis* qui réussit à se

nourrir d'un champignon mutualiste crée une petite chambre d'alimentation ; en revanche, une larve de *D. frontalis* qui se nourrit de phloème infecté par *O. minus* produit un schéma d'alimentation sinueux qui se termine souvent par la mort de la larve (Ayres *et al.*, 2000).

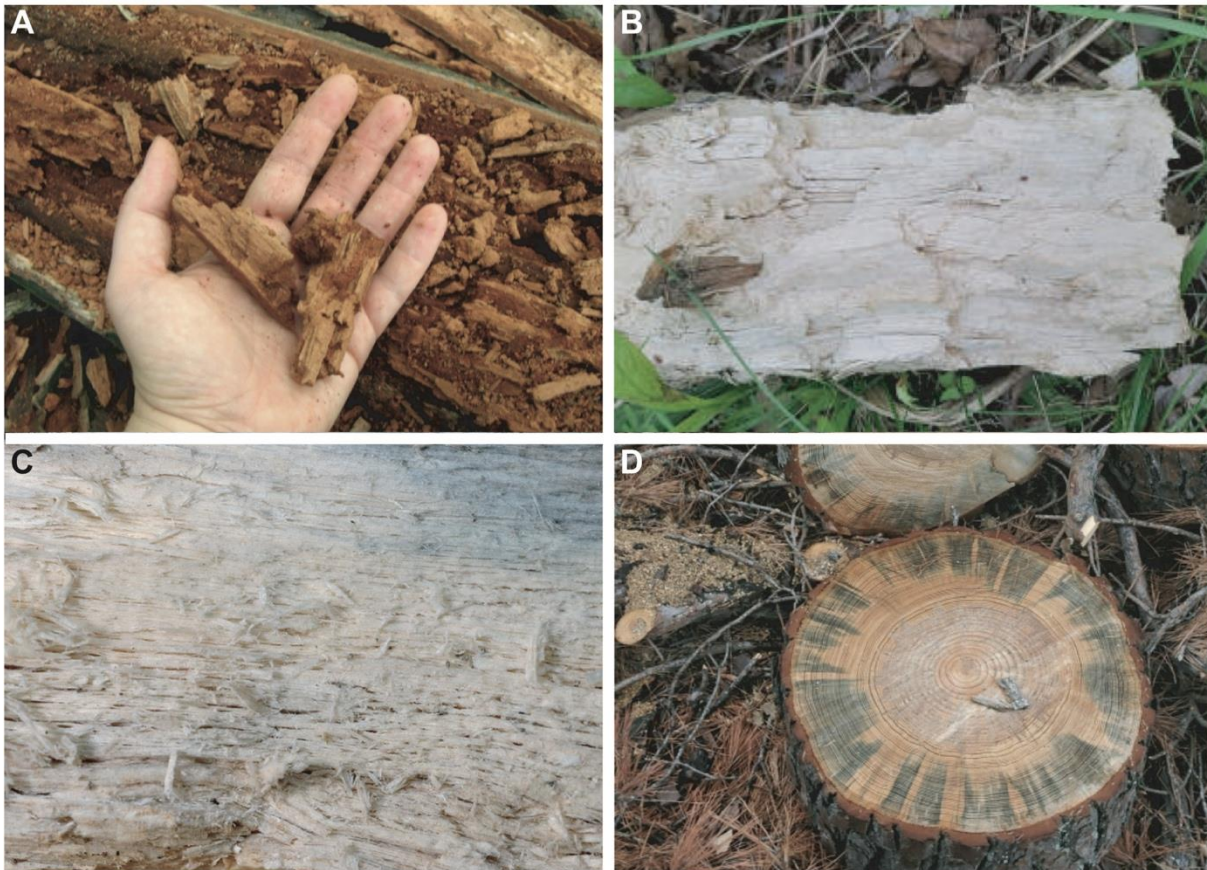
Les scolytes à *Ambrosia* qui se nourrissent de xylème, et les champignons qui leur sont associés ont subi une co-évolution, qui a conduit à la réussite de leur association. L'ectosymbiose qui s'établit entre l'insecte et une espèce fongique nutritive permet aux insectes de nourrir leurs larves à partir du mycélium qui s'est développé dans le substrat du bois, le champignon ayant été inoculé lors de la ponte des œufs (Carlile et Watkinson, 1994 ; Six, 2003). Le champignon est transporté dans des structures hautement spécialisées sur leur exosquelette, appelées mycangium (Carlile & Watkinson, 1994 ; Paine *et al.*, 1997 ; Six, 2003). La progéniture du coléoptère est obligatoirement dépendante de l'apport en nutriments, en acides aminés, vitamines et stéroïdes, obtenus à partir du champignon qui est cultivé par la femelle sur les parois de la galerie (Clayton, 1964 ; Kok *et al.*, 1970).

Les scolytes peuvent extraire la plupart des nutriments dont ils ont besoin du phloème et ne sont pas obligés d'avoir un symbiote fongique ; cependant, les larves sans symbiote fongique doivent consommer davantage de tissu de phloème pour maintenir leurs besoins nutritionnels (Clayton 1964 ; Ayres *et al.* 2000).

### 3. Champignons xylophages

Le nombre exact des champignons capables de dégrader le bois est inconnu, mais selon Gilbertson (1980), environ 1700 espèces de champignons peuvent dégrader le bois et la plupart de ces espèces sont saprotrophes : elles dégradent le bois des arbres morts. Ces champignons jouent donc un rôle important dans le recyclage de la matière organique. Les espèces fongiques impliquées dans la décomposition du bois peuvent altérer la structure des éléments de l'arbre hôte (la cellulose, l'hémicellulose et la lignine). Les champignons xylophages digèrent un ou plusieurs composants du bois ce qui mène à sa pourriture. Selon l'aspect du bois en décomposition, on distingue plusieurs formes de pourritures, les pourritures brunes, les pourritures fibreuses ou blanches et les pourritures molles (Figure 6A-C ; Cooke et Rayner, 1984).





**Figure 6 : Pourriture brune (A), pourriture blanche (B), pourriture fibreuse ou molle (C), et bleuissement (D).**

Les champignons des pourritures brunes et blanches sont généralement des *Basidiomycètes* avec quelques exceptions ; inversement, les champignons des pourritures molles sont généralement des *Ascomycètes*. Dans ces trois groupes (quels groupes il y a quatre type de pourritures et deux familles de champignon), les champignons en cause sont étroitement liés sur le plan taxonomique (Boddy *et al.*, 2008). Globalement, les Basidiomycètes dominent aux premiers stades de la décomposition du bois, tandis que les Ascomycètes dominent aux stades ultérieurs.

La plupart des champignons xylophages se développent sur du bois mort, mais ils peuvent coloniser les arbres vivants soumis à un stress extrême (Butin, 1995 ; Boddy *et al.*, 2008).

**Les champignons de la pourriture brune** sont capables de métaboliser la cellulose et les hémicelluloses, alors que la lignine n'est que peu modifiée chimiquement, ce qui désintègre la structure cellulaire qui se brise en carrés de couleur brune (Cooke et Rayner, 1984 ; Butin, 1995 ; Deacon, 1997 ; Boddy *et al.*, 2008).

Les champignons de la pourriture brune sont capables de se développer sur la cellulose, mais n'hydrolysent pas directement le substrat en règle générale ; dans ce but, ils utilisent le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui est produit suite à la dégradation

des hémicelluloses. Les molécules de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui diffusent à travers les parois cellulaires des cellules végétales, provoquent une décomposition du bois, ce qui est un moyen efficace d'accéder aux ressources en azote qui sont limitées dans le bois (Cooke et Rayner, 1984 ; Deacon, 1997). Parmi ce groupe de champignons, *Gloeophyllum trabeum* est l'espèce la plus étudiée avec *Serpula lacrymans* qui sont des champignons qui posent des problèmes pour le bois de construction (Janusz *et al.*, 2017).

**Les champignons de la pourriture fibreuse ou blanche** sont capables d'utiliser presque simultanément tous les composants structurels du bois (lignine, cellulose et hémicelluloses), laissant le bois humide et spongieux avec une décoloration blanche. (Cooke et Rayner, 1984 ; Butin, 1995 ; Deacon, 1997 ; Boddy *et al.*, 2008). Les espèces appartenant au genre *Ganoderma* et d'autres champignons comme *Phlebia radiata* et *Lentinula edodes* sont les plus répandus.

La dégradation de la lignine dépend de la disponibilité de l'oxygène ; en effet, les enzymes fongiques nécessaires à la dégradation de la lignine sont essentiellement des oxydases, telles que la glucose oxydase ou la manganèse peroxydase, qui oxydent les composants structurels du bois (Deacon, 1997).

Les champignons de la pourriture brune se développent principalement sur le bois des conifères ; on les trouve également, à une échelle moindre cependant, dans les forêts de feuillus, tandis que les agents de la pourriture blanche sont des espèces importantes dans la décomposition du bois à la fois dans les forêts de conifères et les forêts de feuillus (Boddy *et al.*, 2008).

**Les champignons de la pourriture molle** sont représentés par des espèces Ascomycètes. Dans ce groupe, on retrouve des espèces appartenant aux genres *Daldinia*, *Hypoxylon* et *Xylaria*, ainsi que des champignons phytopathogènes comme *Alternaria alternata* et *Botrytis cinerea*. Comme les agents de la pourriture brune, ces champignons ne peuvent dégrader que la cellulose et les hémicelluloses, la lignine n'étant que légèrement modifiée (Butin, 1995 ; Deacon, 1997 ; Boddy *et al.*, 2008). Ils sont moins spécialisés et sont communs dans la dégradation de la litière (Deacon, 1997). Leur développement est lent et se produit à la surface ou près de la surface du bois où ils provoquent un ramollissement spongieux (Cooke et Rayner, 1984 ; Boddy *et al.*, 2008). Les champignons de la pourriture molle se trouvent plus souvent dans les forêts de feuillus, mais ils peuvent utiliser dans une moindre mesure le bois de conifères (Boddy *et al.*, 2008). Les champignons responsables de la pourriture molle sont capables de coloniser le bois avec une teneur en eau et en azote élevée (Deacon, 1997).

**Champignons de bleuissement.** Les champignons du bleuissement, également appelés "champignons ophiostomatoidés" (Wingfield *et al.*, 1993), sont des espèces ascomycètes filamenteuses appartenant aux genres *Ceratocystis*, *Ceratocystiopsis*, *Ophiostoma* et *Grosmannia* (Wingfield *et al.*, 1993 ; Butin, 1995 ; Ayres *et al.*, 2000 ; Kirsits, 2004). Les champignons ophiostomatoidés ont évolué il y a environ 200 millions d'années (Berbee et Taylor, 2001) et les *Ophiostoma* et *Ceratocystis* se sont séparés de la division principale 30 millions d'années plus tard (Farrell *et al.*, 2001). La croissance des hyphes de ces champignons dans l'aubier provoque une décoloration bleu-gris foncé du bois (Figure 6D), d'où le nom de champignons de bleuissement communément utilisé ; ce processus de bleuissement constitue un problème sérieux pour l'exploitation des forêts (Seifert, 1993 ; Butin, 1995).

Contrairement aux agents des différents types de pourriture, ces champignons ne sont pas capables d'utiliser les composants structurels du bois (Cooke et Rayner, 1984 ; Seifert, 1993 ; Butin, 1995 ; Kirsits, 2004). Ils facilitent cependant l'établissement secondaire des agents de pourriture, car les arbres colonisés par les champignons de bleuissement sont soumis à un stress plus important (Cooke et Rayner, 1984).

Les champignons de bleuissement sont souvent associés aux scolytes. Certaines espèces de scolytes transportent les spores fongiques dans le mycangium (Carlile et Watkinson, 1994 ; Paine *et al.*, 1997) ; cependant, les spores sont en général transportées soit attachées à l'exosquelette du scolyte, soit via l'intestin de l'insecte où elles ne sont pas digérées (Furniss *et al.*, 1990 ; Paine *et al.*, 1997).

#### 4. Le bois et ses menaces biologiques

La structure du bois des arbres est composée de différents types de cellules : les trachéides, qui acheminent les liquides verticalement et assurent le soutien mécanique ; les cellules radiales, qui transportent les liquides horizontalement et stockent les nutriments ; les rayons parenchymateux ; et les trachéides radiales. Sur le plan biochimique, le bois est constitué de cellulose, d'hémicelluloses, et de lignine principalement. Les différences entre ces composés et leurs proportions donnent lieu à diverses utilisations du bois (Schirp *et al.*, 2003). Parmi les principales utilisations du bois, on trouve la construction, l'utilisation comme combustible et la production de papier. La demande mondiale est en constante augmentation, les principaux exportateurs étant les États-Unis, le Canada, le Brésil et la Russie.

Composante essentielle de la biomasse et de la nécromasse dans les écosystèmes forestiers, le bois est vulnérable aux agents biologiques qui altèrent sa structure. Parmi les plus pertinents figurent les champignons, responsables de la pourriture qui dégrade

la structure du bois (Son *et al.*, 2010 ; Abdelkader et Hamed, 2012). D'autres agents altèrent aussi son esthétique, en particulier les ophiostomatoidés. Ces derniers altèrent peu la cellulose et la lignine de la paroi cellulaire, mais peuvent affecter les propriétés mécaniques du bois (Schirp *et al.*, 2003 ; Ruiz et Lanfranco, 2008 ; Nkuekam *et al.*, 2012). Par ailleurs, dans certaines conditions d'humidité et de température, ces champignons peuvent se développer rapidement, entraînant une coloration indésirable de l'aubier (Figure 6) allant du bleu au noir. Ce bois est alors considéré comme de qualité secondaire, avec une perte importante dans sa valeur économique pour les entreprises forestières spécialisées dans les conifères (Seifert, 1993). Il est également important de noter que les marchés internationaux imposent des réglementations empêchant l'entrée de ces produits compte tenu du risque de contamination d'autres produits (Lanfranco *et al.*, 2004).

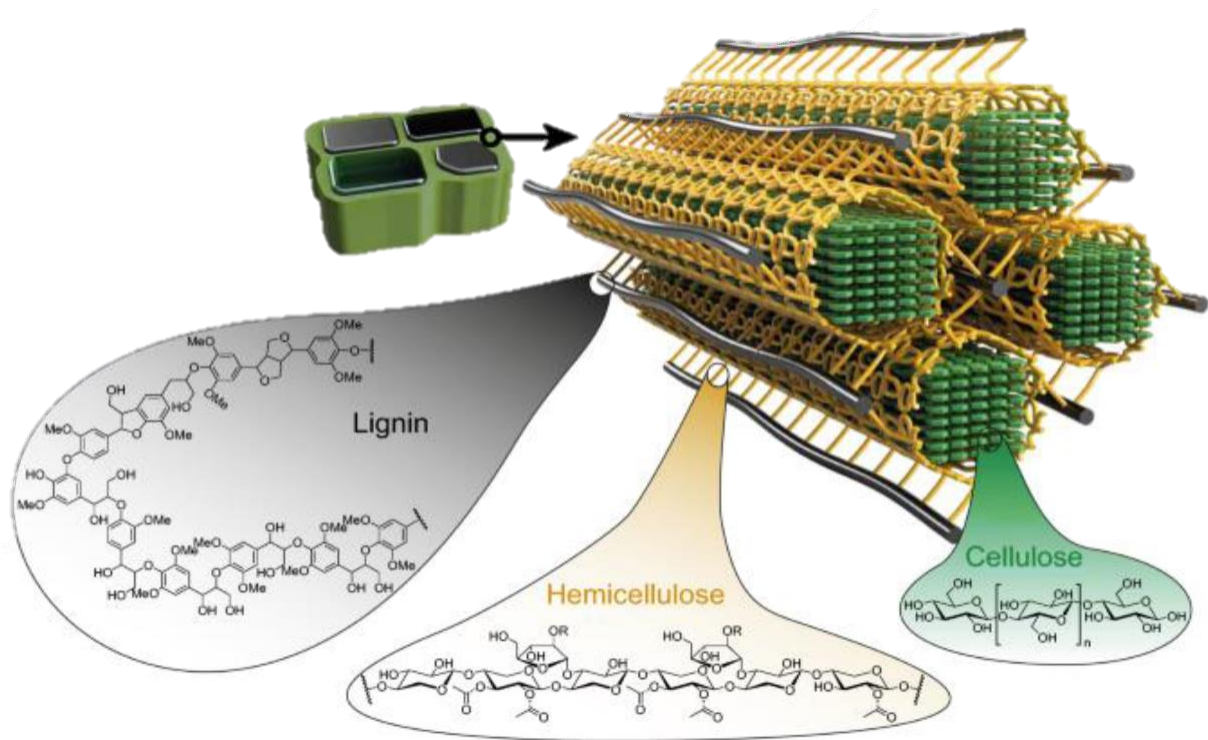
#### **4.1. Les composants de la paroi cellulaire des plantes ligneuses**

Comme la paroi des plantes herbacées, la paroi cellulaire des plantes ligneuses comprend différents polysaccharides, cellulose et hémicelluloses, mais son originalité réside dans sa forte teneur en lignine (Figure 7).

##### **4.1.1. La cellulose**

La cellulose est le polymère le plus abondant sur Terre, puisqu'il représente environ 33% de la biomasse végétale, et joue un rôle crucial dans le métabolisme des plantes, formant la structure de base des parois cellulaires.

C'est un polymère linéaire de glucose, avec des chaînes disposées parallèlement les unes aux autres et maintenues ensemble par des liaisons hydrogène, ce qui confère à la cellulose une grande stabilité et une résistance mécanique remarquable. L'unité de base de la cellulose est le cellobiose (Figure 8) qui est un disaccharide composé de deux molécules de glucose reliées entre elles par une liaison  $\beta$ -(1→4). La cellulose prédomine dans l'aubier (environ 40 à 50%), tandis que sa teneur dans l'écorce est un peu plus faible, d'environ 20 à 30% (Tableau 2).

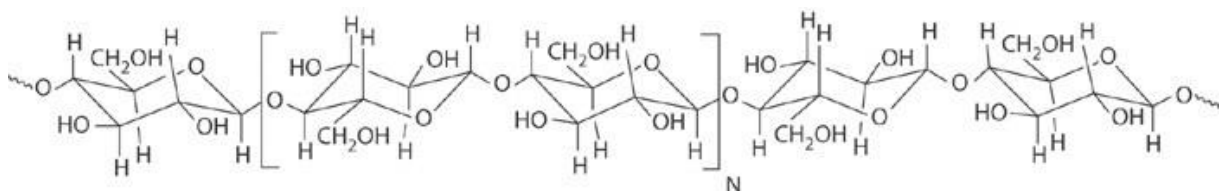


**Figure 7 : Cellulose, hémicelluloses et lignine dans la paroi des cellules végétales.**

**Tableau 2 : Composition chimique de l'écorce et de l'aubier, d'après Nhguele (2008).**

	Résineux		Feuillus	
	Aubier	Ecorce	Aubier	Ecorce
<b>Lignine</b>	25-30	45-55	18-25	40-50
<b>Polysaccharides</b>	66-72	30-48	74-80	32-45
<b>Extractibles</b>	2-9	2-25	2-5	2-10
<b>Cendres</b>	0,2-0,6	< 20	0,2-0,6	< 20

Les teneurs sont exprimées en pourcentage de la masse anhydre.



**Figure 8 : Structure partielle de la cellulose montrant une unité de cellobiose.**

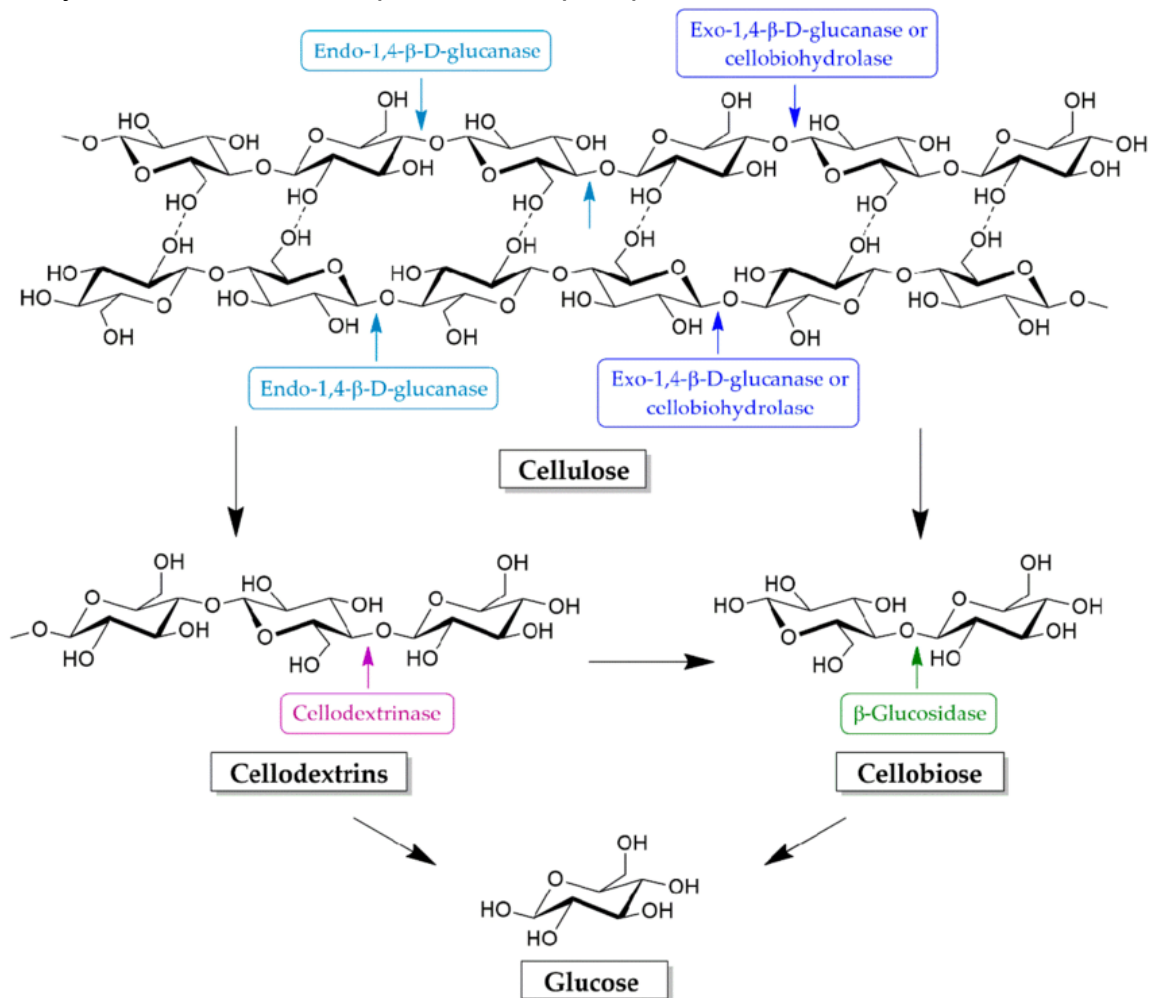
La cellulose dont la masse moléculaire varie entre 200 000 et 2 000 000, est constituée d'unités de glucose (entre 1250 et 12 500 unités) reliées par des liaisons  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), avec à l'extrémité non réductrice de la chaîne un groupement OH libre sur le carbone 4, et à l'extrémité réductrice de la chaîne un groupement OH libre sur le carbone 1 de l'unité de glucose terminale. Ce polysaccharide est donc proche de l'amylose, hormis le fait que les unités de glucose sont reliées entre elles par des liaisons alpha-(1 $\rightarrow$ 4) pour l'amylose.

La cellulose est un composé très stable avec une demi-vie estimée entre 5 et 8 millions d'années. Elle présente en effet une structure particulière avec aux extrémités des zones dites cristallines, accessibles à l'eau (qui représentent environ 65% de la cellulose présente dans le bois) et au centre une zone dite non cristalline ou amorphe, peu accessible à l'eau. De ce fait, la dégradation enzymatique de ce polysaccharide est un processus complexe, impliquant plusieurs types d'enzymes qui vont agir séquentiellement pour transformer le polysaccharide en unités glucose utilisables pour la production d'ATP. Ces enzymes, dites cellulases, sont largement distribuées parmi les champignons, notamment chez les agents de la pourriture brune et de la pourriture blanche comme *Trichoderma reesei* dont les cellulases ont fait l'objet de nombreuses études, mais aussi les *Aspergillus* (*A. niger* par exemple) ou les *Fusarium* (*F. oxysporum* par exemple). Les agents de la pourriture brune (*Poria placenta*, *Lenzites trabea*, *Coniophora puteana*, et *Tyromyces palustris* par exemple) ou de la pourriture blanche (*Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor* notamment) jouent également un rôle important dans la dégradation de la cellulose, mais les premiers sont dépourvus d'exoglucanases et interviennent seulement pendant les phases précoces de la dégradation du bois, alors que les seconds interviennent surtout dans la dégradation de la lignocellulose.

La dégradation complète de la cellulose nécessite l'intervention de trois types de cellulases (Figure 9) :

- des endoglucanases qui hydrolysent les liaisons osidiques dans la région amorphe de la molécule, et conduisent à des fragments de taille variable.
- des exoglucanases qui hydrolysent les liaisons osidiques dans les régions cristallines terminales de la molécule, à partir de leur extrémité réductrice ou non réductrice, conduisant à des  $\beta$ -glucanes et des cellodextrines (1, 4- $\beta$ -D-glucane glucanohydrolases) ou à des unités de cellobiose par fragmentation progressive des  $\beta$ -glucanes (1, 4- $\beta$ -D-glucane cellobiohydrolases). Ces exoglucanases dégradent également les produits d'hydrolyse de la région amorphe générés par les endoglucanases ;
- et les  $\beta$ -glucosidases qui dégradent le cellobiose et libèrent les unités de glucose.

Deux autres types de cellulases sont décrits, à savoir les cellulases oxydatives qui dépolymérisent la cellulose par attaque radicalaire, et les cellobiose phosphorylases qui hydrolysent le cellobiose en présence de phosphate et non d'eau.

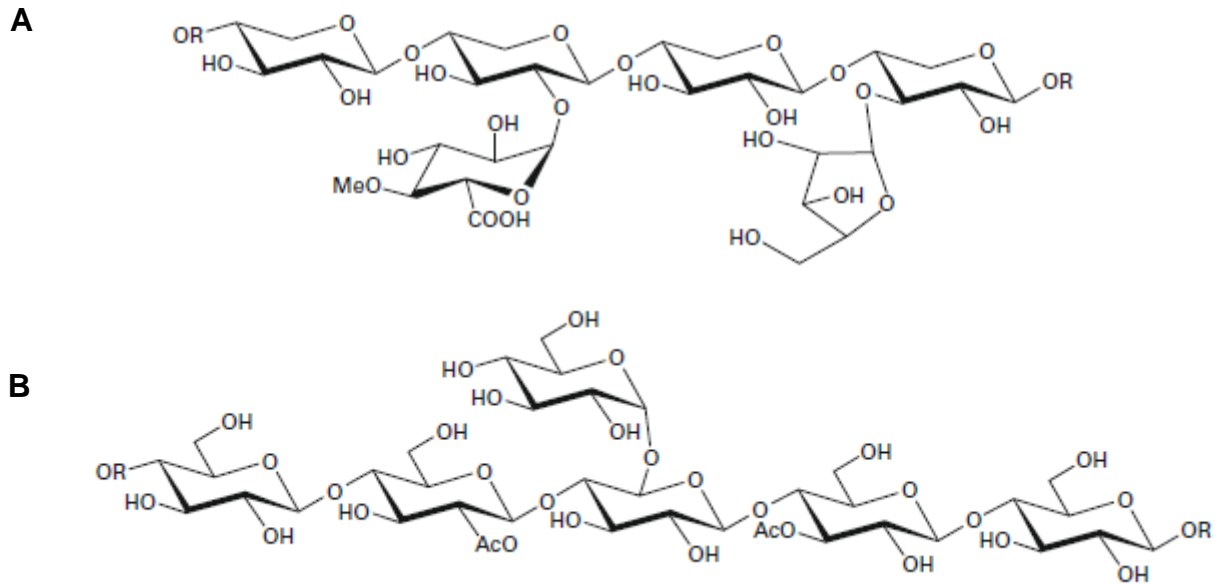


**Figure 9 : Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose.**

#### 4.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polysaccharides présents dans la paroi des cellules végétales. Elles sont moins abondantes que la cellulose. Elles sont composées d'une grande variété d'oses ou dérivés d'oses, notamment le xylose, le glucose, le galactose, l'arabinose, le mannose et l'acide glucuronique (Figure 10). La structure des hémicelluloses est plus complexe que celle de la cellulose, car il s'agit de polysaccharides ramifiés, avec de nombreuses substitutions. Les plus étudiées sont les xylanes, qui sont des polymères ramifiés constitués d'unités de xylose.

Dans la paroi des cellules végétales, les hémicelluloses sont associées à la cellulose par des liaisons hydrogène, ce qui contribue à la résistance et à la rigidité des parois cellulaires. Néanmoins, leur structure ramifiée confère à la paroi une certaine flexibilité, ce qui est essentiel pour la croissance et le mouvement des plantes.



**Figure 10: Structure de certaines hémicelluloses.**

**A : longue chaîne de type xylane (bois de feuillus) ; B : longue chaîne de type glucomannane (bois de résineux).**

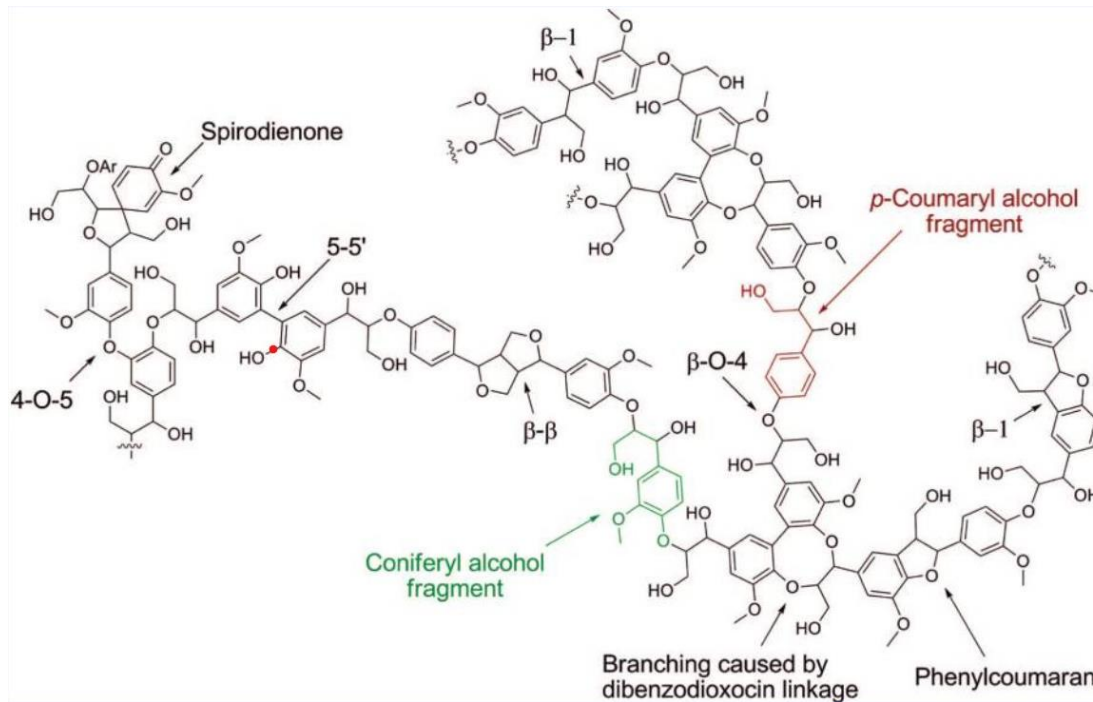
#### 4.1.3. La lignine

La lignine est un polymère complexe présent dans la paroi des cellules végétales. Il s'agit de la deuxième substance naturelle la plus abondante dans la biosphère, après la cellulose ; c'est en effet un composant majeur du bois, mais il est également présent de manière significative dans d'autres matières végétales telles que l'écorce, les feuilles et la paille.

La lignine est un polymère amorphe extrêmement résistant, ce qui rend sa dégradation très complexe. Cette résistance provient de la structure de ce polymère hautement substitué, dans lequel les monomères sont liés par des liaisons covalentes, donc très robustes. Ces liaisons sont notamment difficiles à rompre, ce qui confère à la lignine une grande résistance à l'attaque enzymatique.

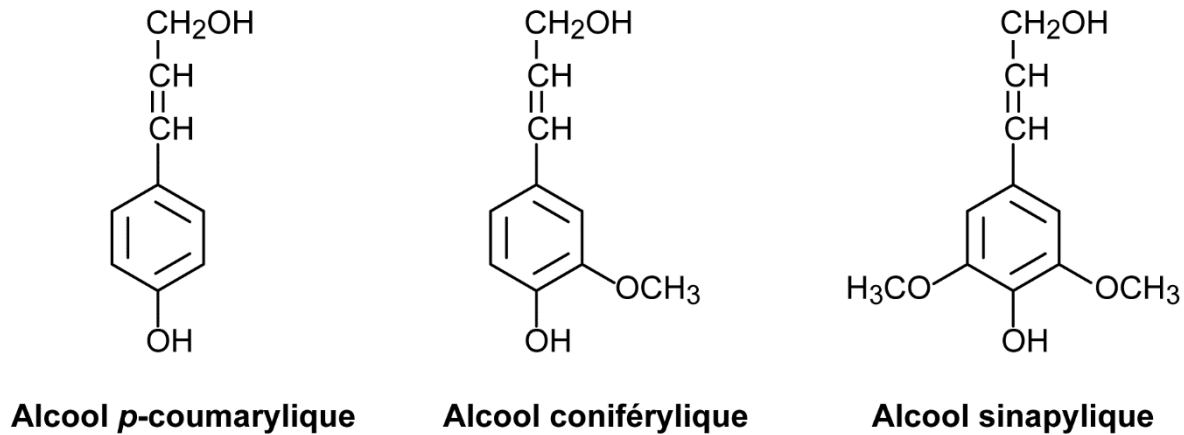
Ce polymère principalement aromatique est composé d'unités phénylpropane (Figure 11) reliées entre elles par des liaisons éther (C-O-C) ou par des liaisons C-C, l'ensemble réalisant un édifice tridimensionnel très complexe.





**Figure 11 : Schéma de la structure de lignine de bois,**  
d'après Zakzeski *et al.* (2010).

La lignine est synthétisée à partir de trois précurseurs, que sont l'alcool *p*-coumarylique (Figure 12A), l'alcool coniférylique (Figure 12B) et l'alcool sinapylique (Figure 12C). L'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique sont les précurseurs majeurs dans la biosynthèse de la lignine des feuillus alors que l'alcool coniférylique est le précurseur prédominant dans la biosynthèse de la lignine des résineux. A l'inverse, l'alcool *p*-coumarylique est un précurseur mineur dans la synthèse de la lignine des résineux comme des feuillus (Adler, 1977). Ainsi, il est difficile de donner une composition exacte de la lignine qui varie de façon importante suivant le type de biomasse.



**Figure 12 : Structure chimique des monolignols.**

Un grand nombre de microorganismes comme les bactéries et les champignons filamenteux sont capables de dégrader la lignine. Ces microorganismes produisent un ensemble d'enzymes connues sous le nom d'enzymes lignolytiques. Les enzymes lignolytiques sont des enzymes oxydatives capables de décomposer le polymère de lignine.

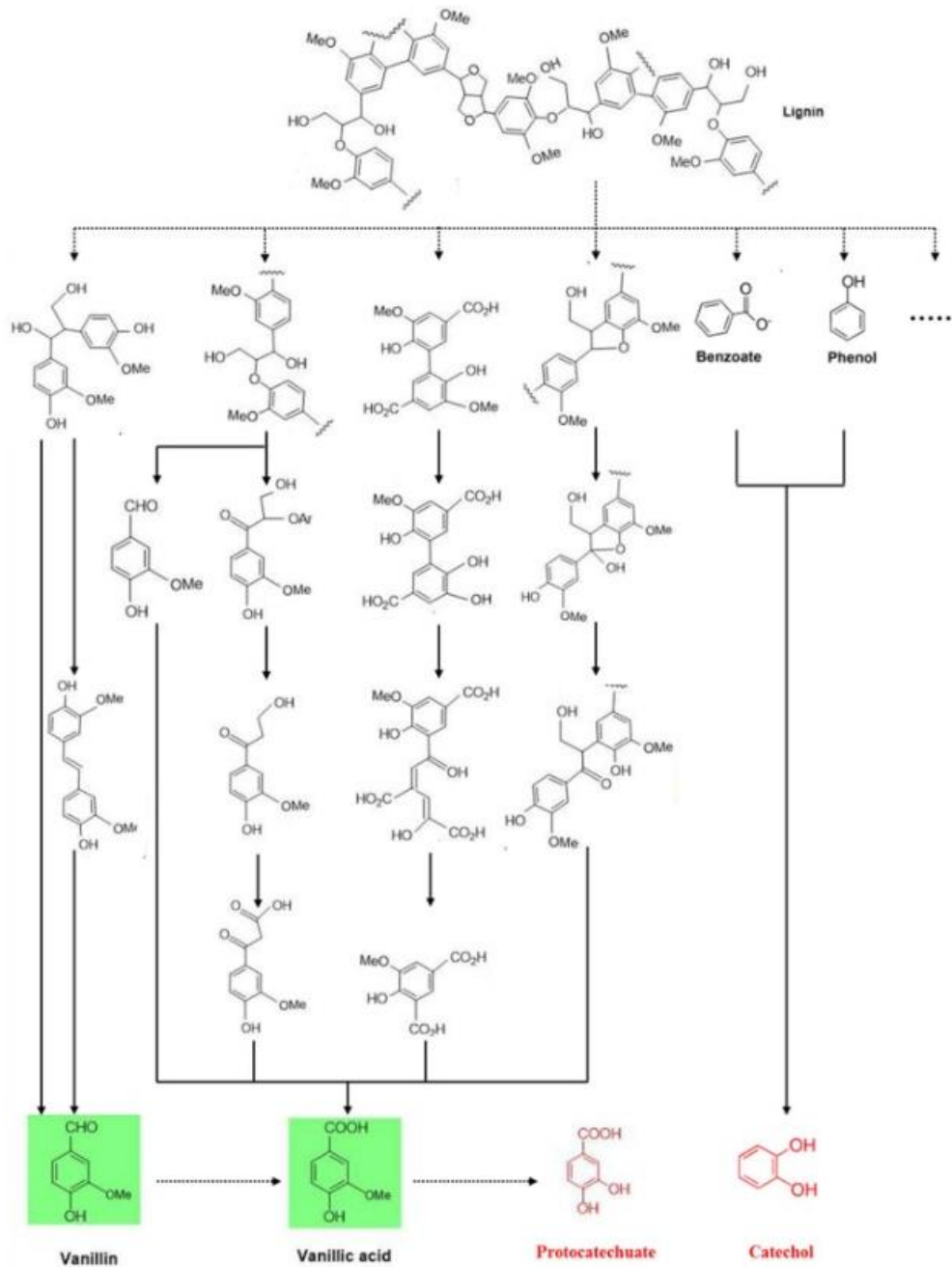
#### 4.2. Dégradation de la lignine

De nombreuses enzymes produites par divers microorganismes, notamment des champignons de pourriture et des bactéries, interviennent dans la dégradation de la lignine. Les champignons sont les plus efficaces dans la dégradation de ce polymère ce qui explique le petit nombre d'études réalisées chez les bactéries (Janusz *et al.*, 2017). Il existe néanmoins des bactéries capables de dégrader la lignine ; il s'agit principalement d'actinomycètes, d'Alphaprotéobactéries et de bêtaprotéobactéries.

La dégradation de la lignine par les champignons est un processus complexe qui implique diverses enzymes lignolytiques. Il s'agit d'enzymes oxydatives qui décomposent le polymère de lignine en oxydant les molécules de lignine. Elles peuvent être divisées en deux groupes : les enzymes primaires de modification de la lignine ou "*Lignin-modifying enzymes* (LME)" qui sont secrétées et comprennent des hémoprotéines à activité peroxydase et oxydase et les enzymes auxiliaires de dégradation de la lignine ou "*Lignin-degrading auxiliary* (LDA)" comme les glyoxal oxydases, des aryl alcool oxydase ou des quinones reductases. Ces enzymes dissocient les liaisons entre les monomères, puis les monomères sont transformés en acides organiques qui rentrent dans le cycle de Krebs.

#### 4.2.1. Etapes précoces de dégradation de la lignine : fragmentation de la lignine ou voies supérieures

Au cours de cette phase qui correspond à la fragmentation progressive du polymère, les monomères aromatiques sont progressivement libérés, et transformés principalement en protocatéchuate et en catéchol (Figure 13).



**Figure 13 : Schéma de la fragmentation de la lignine conduisant à la production de protocatéchuate et de catéchol.**

Les enzymes intervenant dans les étapes primaires de dégradation de la lignine incluent des phénoloxydases appelés laccases, et des peroxydases à structure hémunique : les Lignine Peroxydases (LiP), les Manganèse Peroxydases (MnP), les Peroxydases Versatiles (VPs) et les Peroxydases Décolorantes de Pigments (DyPs).

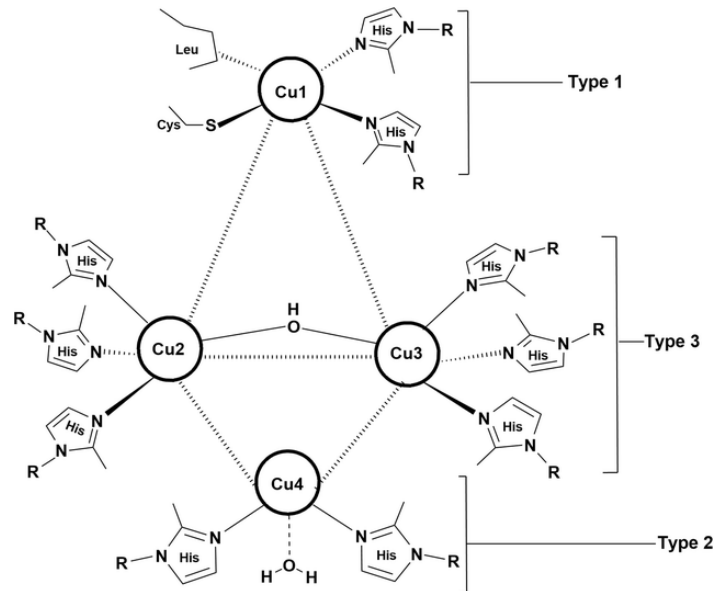
**Les laccases.** Les laccases font partie de la famille des *multicopper oxydases*. Ces enzymes comportent plusieurs atomes de cuivre et catalysent l'oxydation des composés phénoliques. Ce sont les enzymes lignolytiques les plus importantes du complexe ligninolytique des champignons xylophages. Pour le règne des *Fungi*, ces enzymes ont été étudiées principalement chez les Basidiomycètes, mais il en existe aussi chez les Ascomycètes.

Les laccases oxydent divers composés aromatiques, notamment les groupements phénoliques caractéristiques de la lignine, les amines aromatiques, les benzénothiols et les hydroxyindoles, en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons. De plus, elles peuvent également catalyser l'oxydation de composés métalliques inorganiques et organiques : les laccases peuvent oxyder le Mn(II) pour former du Mn(III) et des composés organométalliques tels que le complexe  $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{2-}$  en  $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-}$  (Garcia-Ruiz *et al.*, 2014). Les laccases sont largement répandues dans le règne végétal et fongique. Il en existe également chez certaines bactéries, telles que *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis* et *Sinorhizobium meliloti* (Pawlik *et al.*, 2016) et chez les insectes (Suderman *et al.*, 2006).

La localisation cellulaire des laccases est associée à leurs différentes fonctions physiologiques et dépend de l'organisme producteur de l'enzyme. On trouve les laccases sous forme de protéines extracellulaires, de protéines périplasmiques et de protéines intracellulaires. Ceci contraste avec d'autres enzymes ligninolytiques qui sont le plus souvent extracellulaires. Dans le règne végétal, les laccases sont principalement des enzymes intracellulaires impliquées dans la synthèse de la lignine (Morozova *et al.*, 2007). Concernant les champignons, la plupart produisent à la fois des laccases intracellulaires et d'autres extracellulaires. Les laccases intracellulaires des champignons, ainsi que les laccases bactériennes périplasmiques, semblent jouer un rôle important dans la transformation des composés phénoliques de faible masse moléculaire à l'intérieur de la cellule (Baldrian, 2006).

Les laccases fongiques sont des métalloprotéines multifonctionnelles qui participent à divers processus biologiques, notamment la pathogénèse, la détoxification, la dégradation de la lignine et la régulation du développement pour les champignons supérieurs. À titre d'exemple, certaines laccases sont impliquées dans la polymérisation finale du dihydroxynaphtalène (DHN), qui conduit à différents pigments de type DHN-mélanine.

Les laccases appartiennent au groupe des oxydases polyphénoliques comportant des atomes de cuivre dans leur site catalytique. Le site actif contient trois types d'atomes de cuivre généralement ancrés sur des résidus histidyl : T1Cu, T2Cu et T3Cu (Figure 14).



**Figure 14 : Structure du centre des laccases fongiques.**

Les laccases ont une préférence pour les groupements phénoliques de la lignine en raison de leur structure aléatoire et de leur faible potentiel redox. Cependant, en présence de médiateurs de petite masse moléculaire, elles peuvent également oxyder des composés aromatiques non phénoliques à fort potentiel d'oxydoréduction.

L'oxydation des substrats s'effectue en trois temps, Dans un premier temps, le substrat subit une oxydation grâce au transfert d'un électron de l'atome de cuivre présent dans le site T1 (passant de  $\text{Cu}^{2+}$  à  $\text{Cu}^+$ ). Cette réaction d'oxydation du substrat se poursuit par le transfert de trois autres électrons à partir du cluster tri-nucléaire. Ce transfert de quatre électrons vers le substrat est essentiel pour réduire complètement l'enzyme. Enfin, la dernière étape implique la réduction de l'oxygène ( $\text{O}_2$ ), ce qui entraîne la libération de deux molécules d'eau à la fin de la réaction, tout en permettant aux atomes de cuivre de retrouver leur état initial. Le premier produit de la réaction est un radical phénoxy instable qui peut être converti ultérieurement en quinone par la laccase (Boeriu, 2013). La plupart des champignons produisent plusieurs isoformes de laccases, dont le nombre dépend de divers facteurs, notamment l'espèce fongique en cause et les conditions de croissance.

**Les peroxydases de modification de la lignine "Lignin-modifying peroxidases (LMP)".** La super-famille des catalase-peroxydases comprend trois classes :

- la classe I comprend les peroxydases hémiques procaryotiques et eucaryotiques localisées dans les organites intracellulaires ;
- la classe II englobe les peroxydases hémiques fongiques : LiP, MnP, VPs et DyPs (Zamocky *et al.*, 2014). Les enzymes de ce groupe contiennent la protoporphyrine IX (Rosini, 2015) ;
- et la classe III comprend les peroxydases hémiques végétales.

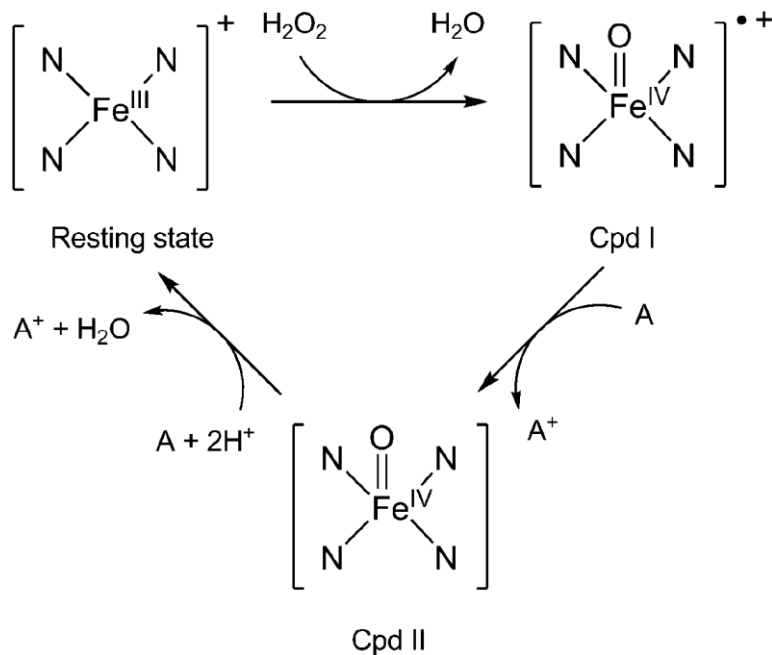
**Lignine peroxidases.** Les LiP sont des enzymes globulaires qui contiennent un groupement prosthétique fer-hémique qui est responsable de l'activité catalytique de l'enzyme. Ce sont des enzymes monométalliques, ce qui signifie qu'elles contiennent un seul groupement prosthétique.

Les LiP sont des enzymes non spécifiques qui peuvent attaquer les polymères de lignine. Elles sont capables d'oxyder différents composés phénoliques aromatiques et une variété de composés non phénoliques, ainsi que de nombreuses autres molécules organiques. La LiP produite par *Phanerochaete chrysosporium* présente une structure globulaire ; elle est composée de huit hélices  $\alpha$  majeures et huit hélices  $\alpha$  mineures avec peu de feuilletts  $\beta$  ; elle est organisée en deux domaines formant une cavité centrale qui constitue le site actif de l'enzyme comportant un ion ferrique.

La LiP contient deux sites de glycosylation, deux sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  et quatre ponts disulfures qui stabilisent la structure tridimensionnelle de cette enzyme. La masse moléculaire des LiP varie de 35 à 48 kDa et leur pH optimal de fonctionnement est compris entre 3,1 et 4,7. Le potentiel redox élevé des LiPs rend ces enzymes capables d'oxyder des substrats qui ne sont pas oxydés par d'autres peroxydases.

Le cycle catalytique de la LiP ressemble à celui des autres peroxydases. Dans chaque cycle, l'enzyme native est oxydée par  $\text{H}_2\text{O}_2$  et génère un composé intermédiaire I qui se présente sous la forme d'un cation radical oxo porphyrine [ $\text{Fe(IV)} = \text{O}^+$ ]. Ensuite, l'enzyme est soumise à deux étapes de réduction à un seul électron par le substrat donneur d'électrons, tel que l'alcool vératrylique (VA), conduisant à la formation transitoire du composé II [ $\text{Fe(IV)} = \text{O}^+$ ] et d'un cation radical ( $\text{VA}^+$ ). Le composé II oxyde ensuite la deuxième molécule de VA, et retourne alors à son stade natif pour initier un nouveau cycle catalytique de LiP. La VA, comme le Mn(III), joue le rôle de médiateur

de transfert redox de faible masse moléculaire entre l'enzyme et son substrat polymérique (Wong, 2009).



**Figure 15 : Le cycle catalytique des LiP.**

**Les manganèse peroxydases (MnP).** Les manganèse peroxydases (MnP) sont des enzymes importantes dans le processus d'oxydation de la lignine. Elles ont été identifiées pour la première fois chez *Phanerochaete chrysosporium* (Glenn et Gold, 1985). Depuis lors, on en a retrouvé chez d'autres Basidiomycètes, notamment *Panus tigrinus* (Lisov *et al.*, 2003), *Lenzites betulinus* (Hoshino *et al.*, 2002) et *Agaricus bisporus* (Lankinen *et al.*, 2001). Il est à noter que des recherches ont également documenté la présence de MnP chez diverses bactéries, levures et moisissures.

Les MnP partagent des similitudes structurales avec les LiP : elles sont caractérisées par deux domaines composés d'hélices alpha et un site actif renfermant un groupement hémique. Elles comportent cinq ponts disulfure et deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui contribuent à maintenir l'activité enzymatique. Le site de liaison du Mn(II) est composé des groupements acide carboxylique libre d'un résidu glutamyl et d'un résidu aspartyl, situé à proximité du macrocycle porphyrine. Les MnP présentent une masse moléculaire variable, allant de 38 à 62,5 kDa ; il s'agit de protéines fortement glycosylées puisqu'elles comportent de 4 à 18% de sucres, et présentent un pH optimal très variable, allant de 2,9 à 7,1 (Sigoillot *et al.*, 2012).

Le cycle catalytique des MnP partagent également des similitudes avec celui des LiP, mais s'en distingue par l'utilisation du Mn(II) comme substrat réducteur. Ce processus génère du Mn(III), qui interagit avec la structure de la lignocellulose. En présence d'acides organiques tels que l'oxalate, le fumarate, le glyoxylate et le malate, le Mn(III)

est chélaté ; il agit comme un médiateur redox de faible masse moléculaire et permet l'oxydation des substrats organiques via le transfert d'électrons ou l'abstraction d'électrons. De plus, les acides organiques favorisent la libération du Mn(III) du site actif de l'enzyme (Niladevi, 2009).

Le Mn(II) joue un rôle essentiel en tant que médiateur redox pour permettre à l'enzyme d'accomplir son cycle catalytique. Toutefois, un excès de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut conduire à la formation du composé III, une forme inactive de l'enzyme, de manière identique à ce qui se produit avec les LiP (Wariishi *et al.*, 1988 ; Manavalan *et al.*, 2015).

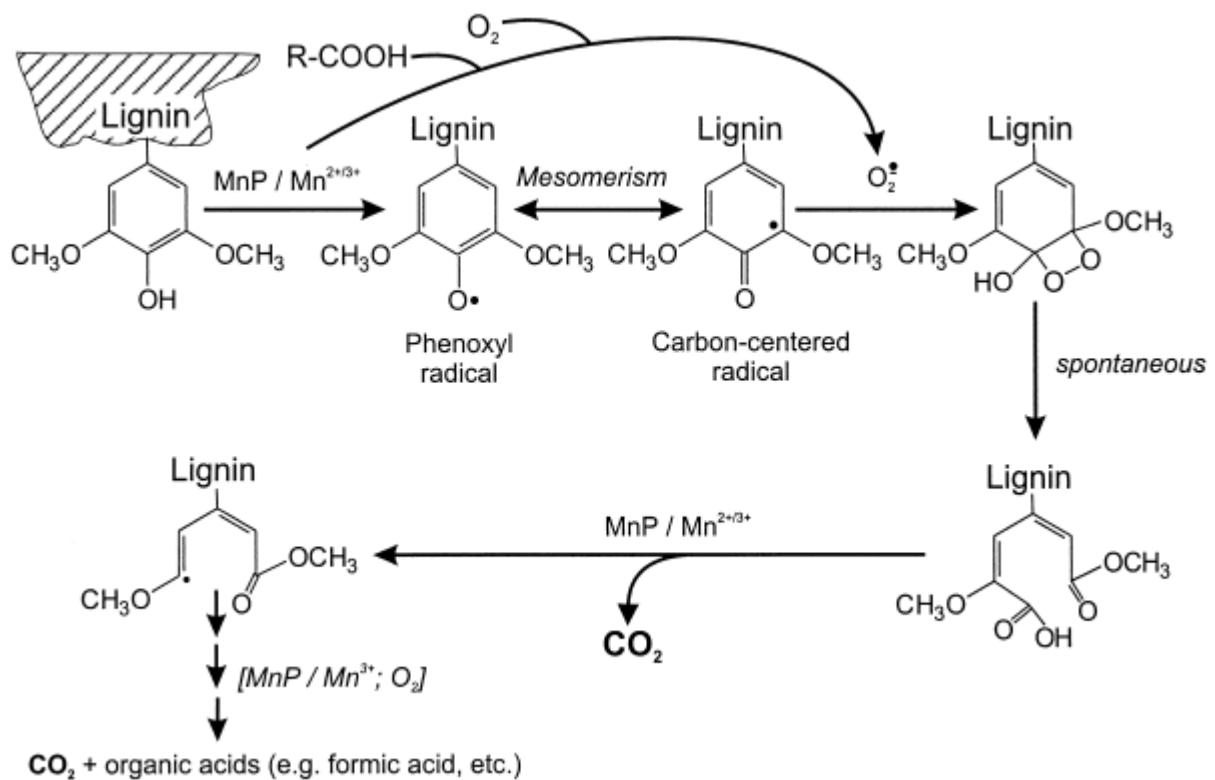


Figure 16 : Oxydation de la lignine par la manganèse peroxydase (MnP).

**Les versatile peroxydases (VP).** Il s'agit de peroxydases ligninolytiques de structure héminique. Elles sont dotées d'une architecture moléculaire hybride, combinant des sites actifs d'oxydation des MnP et des LiP (Ruiz-Duenas *et al.*, 2009). Elles sont capables d'oxyder le Mn<sup>2+</sup> comme la MnP, et les composés non phénoliques à haut potentiel d'oxydoréduction comme la LiP (Garcia-Ruiz *et al.*, 2014). Elles ont été décrites pour la première fois chez *Pleurotus eryngii* (Martinez *et al.*, 1996).

Les VP sont des glycoprotéines sécrétées sous la forme de plusieurs isoenzymes de masse moléculaire comprise entre 40 et 45 kDa et de pH optimum compris entre 3,4 et 3,9.



Le cycle catalytique de la VP combine les cycles des autres peroxydases fongiques, la LiP et la MnP. Contrairement à la MnP classique, la VP est capable de catalyser l'oxydation indépendante du  $Mn^{2+}$  d'amines simples et de monomères phénoliques (Perez-Boada *et al.*, 2005).

Bien que la VP de *P. eryngii* catalyse l'oxydation de  $Mn^{2+}$  en  $Mn^{3+}$  par  $H_2O_2$ , elle diffère des MnP classiques par son activité indépendante du manganèse, ce qui lui permet d'oxyder des phénols substitués et des colorants synthétiques, ainsi que les substrats des LiP (Camarero *et al.*, 1999).

**Les peroxydases décolorantes de pigments (DyP).** La famille des DyP ou *Dye-decolorizing peroxidases* constitue une classe de peroxydases de structure héminique non apparentées aux peroxydases LME classiques. Elles ne présentent aucune similitude de séquence primaire ou de structure avec les LiP, MnP et VP et se retrouvent chez les champignons et les bactéries (Sugano, 2009). Les DyP ont une large spécificité de substrat et fonctionnent bien dans des conditions de pH faibles (3-4). Elles oxydent les substrats typiques des peroxydases, ainsi que des colorants synthétiques à fort potentiel d'oxydoréduction de la famille des anthraquinones qui ne sont pas convertis par les autres peroxydases.

Les DyP sont davantage rencontrées chez les bactéries, alors qu'un petit nombre seulement est signalé chez les champignons et les eucaryotes supérieurs. De nombreuses études ont démontré que les DyPs jouent un rôle essentiel dans la dégradation de la lignine.

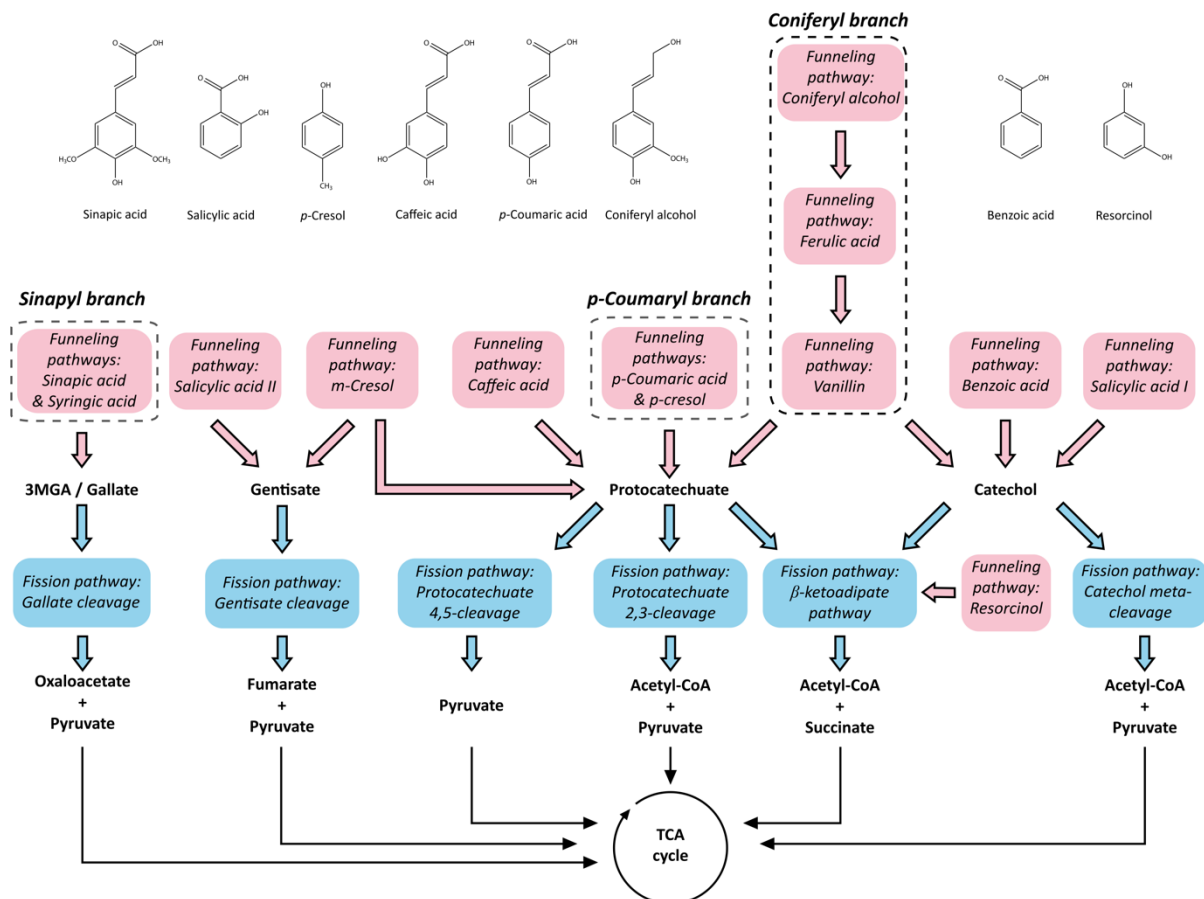
Les DyPs sont classées en quatre sous-classes : A, B, C et D. La plupart des DyPs bactériennes sont des enzymes cytoplasmiques et appartiennent aux sous-classes B et C. Les DyPs appartenant à la sous-classe A présentent une séquence signal appelée "Tat-signal", responsable de leur libération dans le milieu extracellulaire. La sous-classe D comprend principalement des enzymes d'origine fongique.

4.2.2. Etapes tardives de la dégradation de la lignine - ouverture des noyaux aromatiques ou voies inférieures :

Les intermédiaires centraux peuvent finalement être convertis en composés à haute valeur ajoutée via le clivage de l'anneau aromatique et l'intégration des composés finaux dans le cycle de Krebs comme l'acétyl-CoA, le succinate et le fumarate, ou encore le pyruvate par déshydrogénation en acétyl-CoA ou l'oxaloacétate par sa transformation en malate ou en alpha-cétoglutarate.

Le catabolisme des intermédiaires centraux implique le clivage du noyau aromatique par des dioxygénases. De nombreuses voies de catabolisme sont décrites

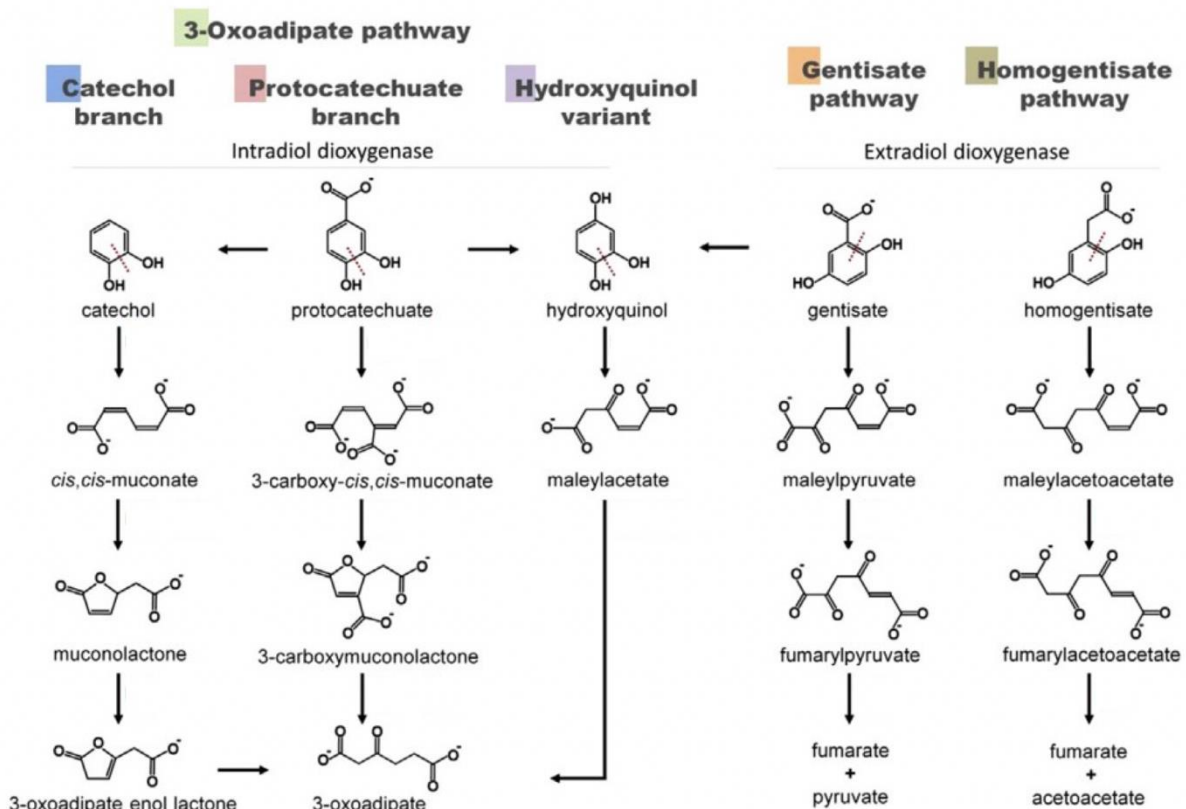
convergeant vers un petit nombre d'intermédiaires qui subissent un clivage ortho ou méta du noyau benzénique, catalysé respectivement par des intradiol dioxygénases (clivage de la liaison entre les deux groupements alcool tertiaire) et des extradiol dioxygénases (clivage d'une liaison adjacente à un des groupements alcool tertiaire) (Harwood et Parales, 1996 ; Vaillancourt *et al.*, 2006). Les voies métaboliques mises en œuvre diffèrent selon la nature du composé intermédiaire généré par la dépolymérisation de la lignine, comme indiqué dans la Figure 17.



**Figure 17 : Les voies mises en œuvre pour l'ouverture des cycles benzéniques en fonction de la nature du composé généré par épolymérisation de la lignine, et nature des produits finaux obtenus, d'après Brink *et al.* (2019).**

Le terme de funneling pathway désigne les voies cataboliques initiales permettant de réduire progressivement le polymère pour aboutir aux composés centraux (que sont le gallate, le gentisate, le protocatéchuete et le catéchol) à partir desquels s'effectuera l'ouverture du cycle benzénique. Les voies cataboliques initiales correspondantes aux trois monolignols (alcool sinapylque, alcool coumarylique, et alcool conférylique) constitutifs de la lignine sont encadrées en pointillé. TCA : cycle des acides tricarboxyliques, aussi appelé cycle de Krebs.

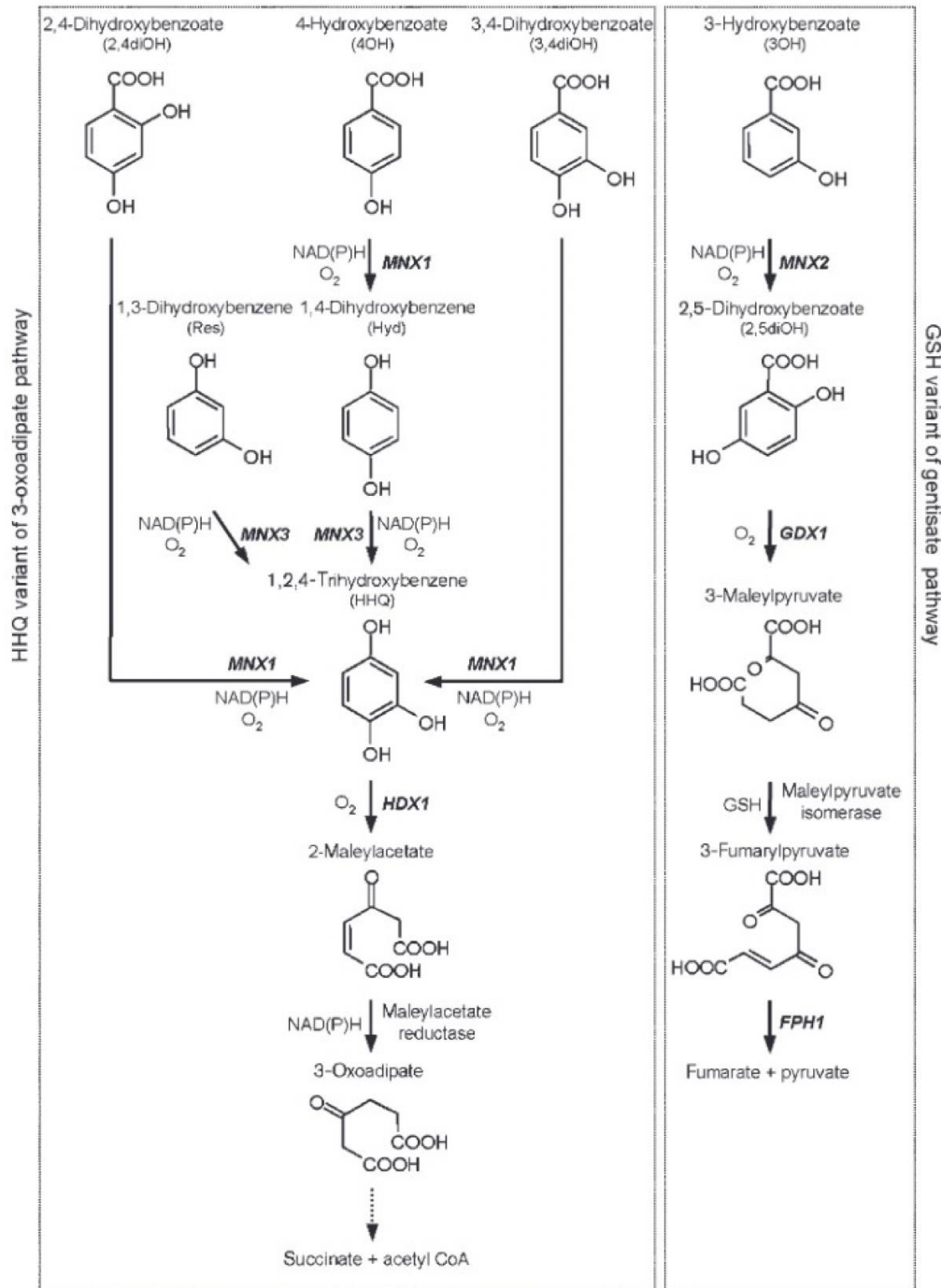
Comme indiqué ci-dessus, plusieurs voies cataboliques convergent vers un nombre limité de voies centrées autour d'une dioxygénase permettant l'ouverture du noyau aromatique. A ce jour, quatre voies ont été décrites chez les champignons : les voies du gallate, du 3-oxoadipate (beta-cétoadipate), du gentisate et de l'homogentisate (Figure 18). Néanmoins, peu de choses sont connues sur la voie du gallate qui a été signalée chez *Phanerochaete chrysosporium* (Leatham *et al.*, 1983) et *Penicillium simplicissimum* (Patel *et al.*, 1992). Chez ce dernier, le gallate serait transformé en dihydrogallate, qui rejoindrait ensuite la voie du 3-oxoadipate après transformation en protocatéchuate (Patel *et al.*, 1992).



**Figure 18 : Les voies principales de catabolisme des composés aromatiques chez les Dikarya**

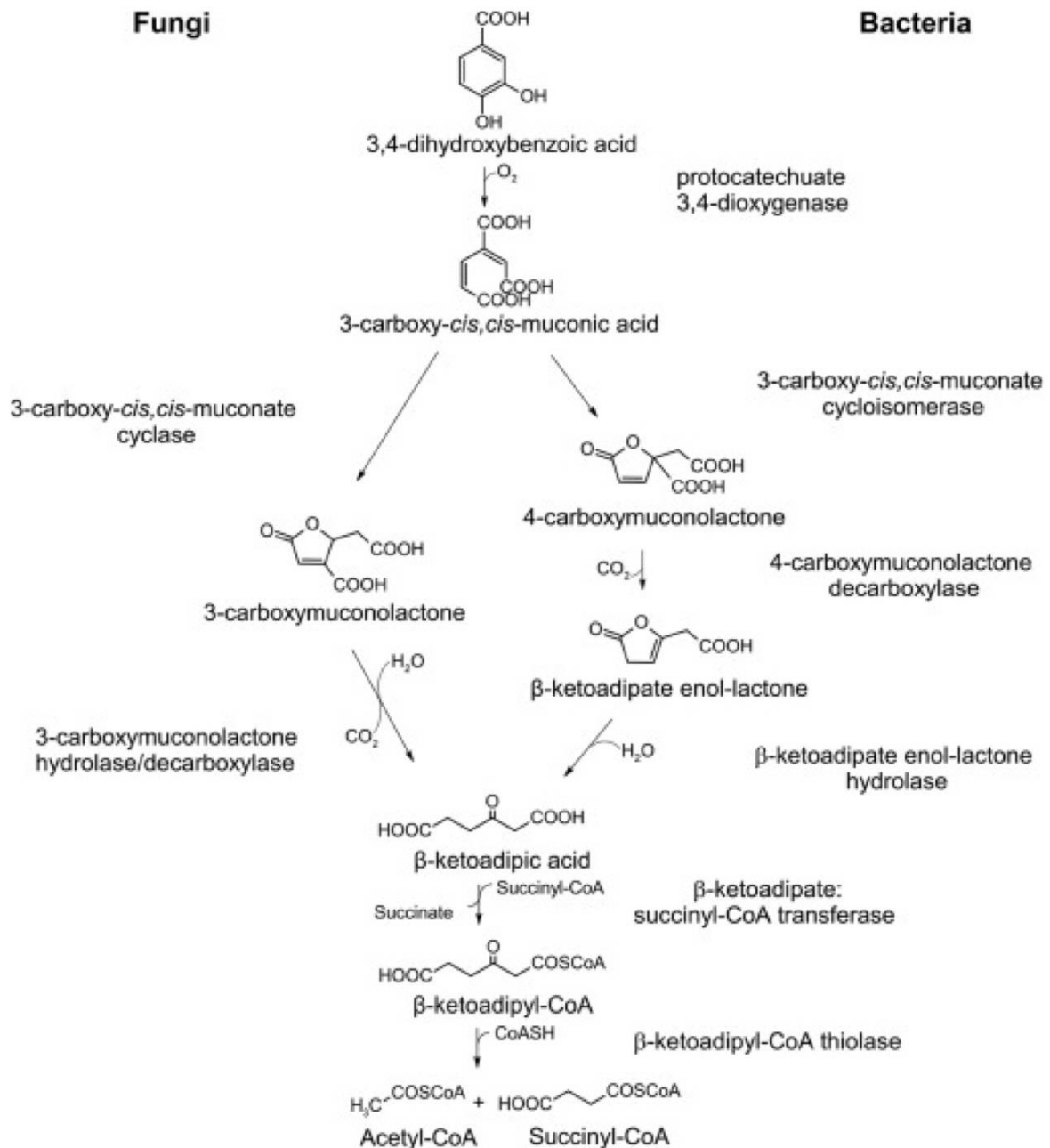
La voie du 3-oxoadipate comprend deux branches principales, celle du catéchol et celle du protocatéchuete, mais une variante est également décrite résultant de la conversion du protocatéchuete en hydroxyquinol.

**La voie du 3-oxoadipate (bêta-cétoadipate).** Cette voie est centrée sur le protocatéchuate (ou 3,4 dihydroxybenzoate) dont le noyau aromatique peut être ouvert directement par une enzyme spécifique, ou être converti en catéchol ou en hydroxyquinol (Figure 19). Chacune de ses trois branches fait intervenir une dioxygénase spécifique qui permettra l'ouverture du cycle benzénique, avec production finale de 3-oxoadipate.



**Figure 19 : Voies du 3-oxoadipate (branche du protocatéchuate ou 3,4 dihydroxybenzoate) et du gentisate (ou 2,5 dihydroxybenzoate).**

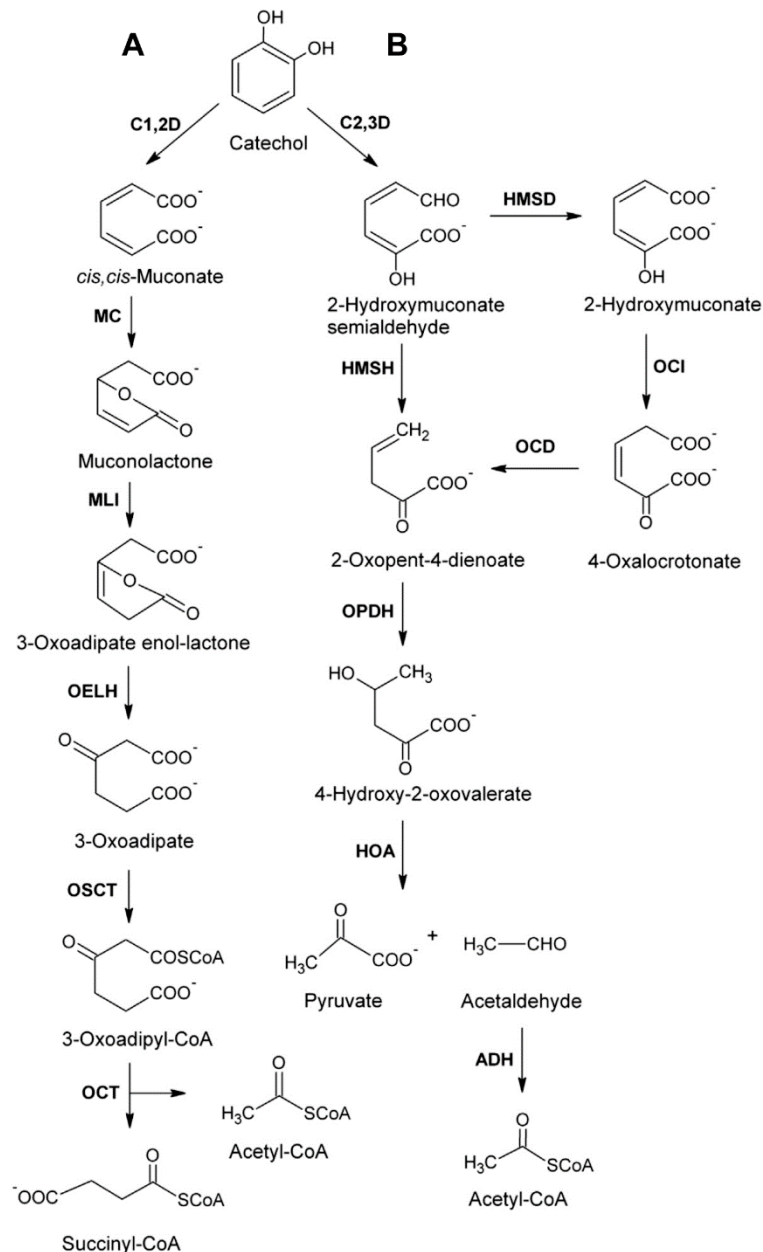
*Branche du protocatéchuate.* Cette voie fait intervenir une intradiol dioxygénase, la protocatéchuate 3,4-dioxygénase, qui catalyse l'oxydation du protocatéchuate en 3-carboxy-*cis,cis*-muconate qui est ensuite converti en 3-carboxymuconolactone, puis en bêta-cétoadipate (Wells et Ragauskas, 2012).



**Figure 20 : Branche du protocatéchuate chez les champignons et les bactéries.**

*La branche du catéchol.* Comme pour le protocatéchuate, le noyau benzénique du catéchol peut être clivé par intervention d'une intradiol dioxygénase, la catéchol 1,2-dioxygénase, avec pour produit final le 3-oxoadipate. Néanmoins à côté de cette voie

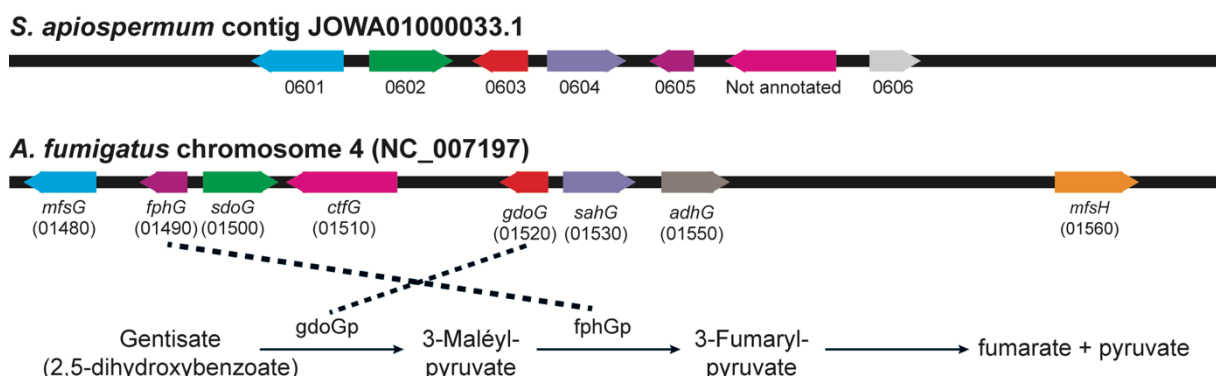
de clivage dite clivage en ortho, il a été décrit chez de nombreuses espèces de champignons filamenteux une seconde voie possible, dite clivage en méta, qui implique l'intervention d'une extradiol dioxygénase, la catéchol 2,3-dioxygénase ; cette enzyme transforme le catéchol en 2-hydroxymuconate semi-aldéhyde qui sera converti via l'hydroxyvalérate en pyruvate et acétyl-CoA (Figure 21).



**Figure 21 : Les deux voies de dégradation du catéchol par les champignons, avec clivage du noyau aromatique en ortho (A) ou en méta (B).**

*La branche de l'hydroxyquinol.* Cette voie de dégradation, plus directe que les deux autres branches, fait intervenir une hydroxyquinol 1,2-dioxygénase qui permet l'ouverture du cycle benzénique, puis une réductase qui conduit au 3-oxooadipate (Martins, 2019).

**La voie du gentisate.** Cette voie métabolique débute elle-aussi par l'intervention d'une intradiol dioxygénase, la gentisate 1,2-dioxygénase qui permet l'ouverture du cycle benzénique, et aboutit à la production de fumarate et de pyruvate grâce à l'intervention de deux autres enzymes : une maléylpyruvate isomérase et une fumarylpyruvate hydrolase. Cette voie métabolique a été largement étudiée chez *Aspergillus fumigatus* pour son implication dans la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques comme le phénanthrène et le naphthalène (Romero-silva *et al.*, 2013). Les gènes codant les enzymes intervenant dans cette voie métabolique sont organisés en cluster ; ils sont en effet regroupés dans une même région du génome et sous la dépendance d'un même facteur de transcription, ce qui semble être une caractéristique commune à de nombreux champignons filamenteux comme en témoigne l'identification par Rougeron *et al.* (2018) d'un cluster très voisin dans le génome de *Scedosporium apiospermum* (Figure 22).



**Figure 22 : Cluster du gentisate chez *Aspergillus fumigatus* et *Scedosporium apiospermum*, d'après Rougeron *et al.* (2018).**

Les gènes codant les enzymes impliquées dans la dégradation du gentisate (*gdoG* : gentisate dioxygénase et *fphG* : maléylpyruvate isomérase, aussi appelée fumarylpyruvate hydrolase) sont organisés en cluster, qui comprend également un gène codant un facteur de transcription (*stfG* dont l'orthologue, omis lors de l'annotation automatique du génome par Augustus, a été identifié avec l'aide de l'algorithme Blastx), et un gène codant une protéine d'efflux de type MFS (*mfsG*). Le cluster comprend également des gènes codant d'autres enzymes intervenant dans la dégradation de la lignine : *sdoG* (lignostilbène alpha,bêtahydrolase), *sahG* (salicylate déshydrogénase), et chez *A. fumigatus*, *adhG* (aldéhyde déshydrogénase). Il n'y a pas d'orthologue du gène *adhG* dans le cluster de *S. apiospermum* qui, à l'inverse, comprend un gène codant une quinone oxydoréductase (*SAPIO\_CDS0606*). Les numéros indiqués correspondent au numéro d'accèsion des gènes correspondants dans GenBank (dans cette base de données, ces numéros sont précédés du préfixe AFUA\_4G pour *A. fumigatus* (souche Af293) ou SAPIO\_CDS pour *S. apiospermum* (souche IHEM 14462)). Chez *S. apiospermum*, les gènes orthologues sont représentés avec une même couleur.

**La voie de l'homogentisate.** C'est une voie décrite comme étant principalement impliquée dans la dégradation de composés phénoliques et dans le catabolisme de la phénylalanine et la tyrosine. Cette voie qui aboutit à la production de fumarate et d'acétoacétate, fait également intervenir une intradiol dioxygénase, l'homogentisate 1,2-dioxygénase, qui clive le noyau benzénique après hydroxylation de l'homogentisate en 4-hydroxyhomogentisate.



**Travail expérimental**

Ce projet de thèse se focalise sur l'exploration des insectes xylophages potentiellement responsables du déclin des forêts de pin d'Alep dans la région semi-aride de l'est Algérien. Il inclut l'étude de leurs champignons associés ainsi que de leur arsenal enzymatique impliqué dans la colonisation des arbres. Le projet est composé de trois études distinctes :

**Étude 1** : Cette première étude, publiée en 2021, vise à identifier les insectes xylophages présents dans trois forêts des régions semi-arides du Nord-Est de l'Algérie. Elle évalue la distribution des insectes xylophages collectés à partir des arbres touchés, et comprend l'identification des espèces impliquées.

**Étude 2** : L'étude suivante, dont le manuscrit est prêt pour publication, se penche sur l'identification des espèces de champignons associées aux scolytes échantillonnés lors de la première étude. Elle analyse la capacité de ces champignons à produire des enzymes participant à l'utilisation des constituants du bois comme source de carbone.

**Étude 3** : La troisième étude, actuellement en cours de finalisation pour publication, se concentre sur la réponse transcriptionnelle à l'utilisation d'écorce de pin ou de lignine purifiée comme seule source de carbone, chez deux des espèces fongiques isolées à partir des scolytes. Son objectif est de caractériser les enzymes de ces champignons impliquées dans la dégradation de la lignine, un composant majeur du bois.

## Étude 1: La prévalence des scolytes du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) dans les régions semi-arides du Nord-Est Algérien.

Les forêts de pin d'Alep représentent un écosystème majeur dans les zones semi-arides d'Algérie. Cependant, ces écosystèmes fragiles connaissent un déclin alarmant depuis quelques décennies. Les événements climatiques extrêmes liés au changement climatique, comme les vagues de chaleur et les sécheresses, affaiblissent considérablement ces pinèdes. Cela les rend plus sensibles aux attaques d'insectes ravageurs.

Parmi les insectes xylophages affectant le pin d'Alep, les scolytes jouent un rôle prédominant. Certains scolytes sont capables d'attaquer des arbres encore vivants lorsque ceux-ci sont affaiblis. Leur prolifération conduit souvent à des épisodes de mortalité massive d'arbres, d'autant plus qu'ils permettent de transporter des champignons phytopathogènes.

Bien que le rôle aggravant des scolytes et de leurs associés fongiques soit largement documenté ailleurs, très peu d'études se sont intéressées à la diversité des espèces présentes dans les forêts algériennes et à leurs interactions écologiques.

Cette étude s'intéresse à la diversité des espèces d'insectes xylophages présentes dans les forêts de pins d'Alep des régions semi-arides du Nord-Est algérien. Des échantillonnages ont été réalisés dans trois forêts majeures de la région : Boutaleb, Ouled Tebben et Ouenougha.

Au total, sept espèces de scolytes ont été identifiées, appartenant majoritairement à la sous-famille des Scolytinae. L'espèce la plus abondante était *Crypturgus numidicus*, suivie de *Orthotomicus erosus* et *Tomicus destruens*. Seules ces deux dernières espèces ont été trouvées sur des arbres vivants, les autres ne colonisant que les arbres morts.

*Orthotomicus erosus* et *T. destruens* sont des espèces présentes dans toute la région méditerranéenne et capables d'attaquer des pins affaiblis. Elles utilisent des phéromones d'agrégation pour mener des attaques massives. Les espèces du genre *Crypturgus* comme *C. numidicus* et *C. mediterraneus* sont des scolytes secondaires colonisant les arbres déjà attaqués par d'autres insectes.

Les genres *Hylurgus* et *Aphanommata* ne sont présents que sur des arbres morts. *Hylurgus micklitzii* était présent dans les trois forêts, tandis que *H. ligniperda* n'a été retrouvé que dans une seule forêt.

Cette étude constitue la première investigation de la diversité des scolytes dans cette région d'Algérie. Elle permet de mieux comprendre leur répartition et leur rôle dans le dépérissement des forêts de pin d'Alep, aggravé par les effets du changement climatique. Une meilleure compréhension de ces facteurs pourrait permettre d'élaborer des stratégies de gestion durable de ces écosystèmes menacés.

## Investigating the prevalence of Bark beetles of *Pinus halepensis* in the North East semi-arid region of Algeria

LYÈS MOUMENI<sup>1,2,\*</sup>, AMANDINE GASTEBOIS<sup>2</sup>, LOUIZA GILLMANN<sup>2</sup>, NICOLAS PAPON<sup>2</sup>,  
FARIDA BENIA<sup>1</sup>, JEAN-PHILIPPE BOUCHARA<sup>2</sup>, MUSTAPHA BOUNECHADA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'amélioration et de développement de la production végétale et animale (LADPVA), Ferhat Abbas University Setif 1, Setif, Algeria.

\*email: lyes.moumeni@etud.univ-angers.fr.

<sup>2</sup>Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, GEIHP, EA3142, Université d'Angers. SFR 4208 ICAT, France.

Manuscript received: 7 October 2020. Revision accepted: 18 June 2021.

**Abstract.** Moumeni L, Gastebois A, Gillmann L, Papon N, Benia F, Bouchara J-P, Bounechada M. 2021. Investigating the prevalence of Bark beetles of *Pinus halepensis* in the North East semi-arid region of Algeria. *Biodiversitas* 22: 2755-2762. Aleppo pine is the most common tree in the semi-arid forests of Algeria. Despite its high resistance to drought and adaptability to all types of soils, the effects of climate change are affecting it directly and indirectly. Stressed trees indeed are subject to bark beetle attacks. In this study, we sampled the bark beetles directly from the affected pine trees. Six species belonging to the Scolytinae subfamily were identified. *Tomicus detruens* and *Orthotomicus erosus* were widely spread and present in the three studied forests, where they were found to colonize living trees while *Crypturgus numidicus*, *Crypturgus mediterraneus*, *Hylurgus ligniperda* and *Hylurgus micklitzii* colonized only dead trees. Together with future identification of the microfungi associated with these xylophagous insects, these data may help to define prevention measures to fight the decline of Aleppo pine forests observed in some parts of Eastern Algeria.

**Keywords:** Aleppo pine, bark beetles, forest decline, Scolytinae, semi-arid

### INTRODUCTION

The Aleppo pine (*Pinus halepensis*) is the most common tree in Algeria and it has a very important place in the balance of Mediterranean ecosystems. Global warming and its consequences like repeated heatwaves and drought have a significant impact on trees and their predators, resulting in an increased mortality and forest decline (Morcillo et al. 2019). However, trees can withstand the stresses and avoid dieback when favorable conditions return, but biotic factors such as pests can aggravate the stress and lead to their death (Anderegg et al. 2015). Common pests are the pine processionary caterpillars and bark beetles (Lieutier et al. 2016; Bao et al. 2020). These last insects develop in lignified stems and feed on vascular tissues, from the shoots to the tree trunk. Most species develop on decaying trees or dead wood but some species can also colonize stressed living trees (Paine et al. 1997). The females dig a gallery under the bark to deposit their eggs into the cambium (Davi et al. 2020).

Global warming and its effects cause stress and weaken the defense of fragile trees, which facilitates the development of species already existing in the territory and potentially the introduction of new species of bark beetles (Suárez-Vidal et al. 2019). The attack occurs at different levels of plant vitality; some species develop on healthy plants, but many select hosts that are physiologically stressed or injured. The strategy of mass attack is used to

overwhelm the defenses of the host. For example, with the aggressive Mediterranean species *Tomicus destruens*, the bored galleries damage the vascular system (xylem or phloem) and the cambium, resulting in various physiological imbalances (Chakali 2007; Lieutier et al. 2017). Other bark beetle species attack recently dead trees and introduce symbiotic fungi (Ambrosia), and the hatched larvae then feed on the mycelium of these fungi. Some of the bark beetles are known for their association with xylophagous fungi, which can aggravate the mechanical damage caused by the insects leading to dieback. Saproxylophagous insects that only develop in deadwood, are not considered as pests (Sauvion et al. 2013).

Bark beetles or Scolytinae belong to Curculionidae. They are represented worldwide by 6,000 species grouped in 29 tribes (Alonso-Zarazaga and Lyal 2009). In Algeria, 17 coniferous bark beetle species are monitored (Lieutier et al. 2016), but the bark beetle fauna of Algeria was not reviewed recently, and most of the existing records are old. Therefore, the geographical distribution of bark beetle species in Algeria remains to be further clarified. There are no studies that focus on bark beetles in the study region despite the recent forest decline phenomenon.

The main objective of our study was to investigate the distribution of bark beetle species responsible for the decline of the Aleppo pine in the Central-Est semi-arid region of Algeria.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area

The study was carried out in a semi-arid region located in the Hodna and the Bibans Mountains, in North-Eastern Algeria, between 35°41'05.2" and 36°11'34.0" latitude (N) and 4 and 5° longitude (E), and at an altitude of 900-1300 m.

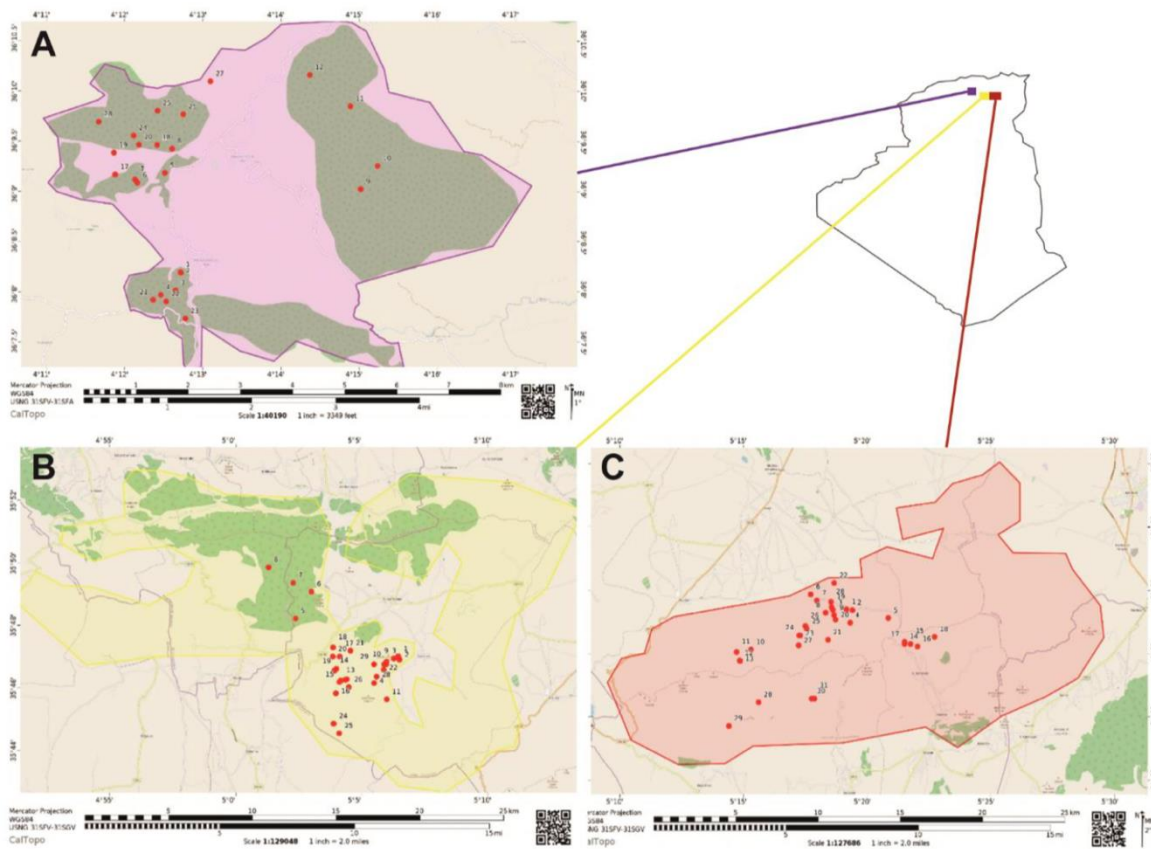
The three forests of Boutaleb, Ouled Tebben and Ouenougha were selected for sampling, taking into account the forest dieback, the surface area of the forests and their ecological importance in the region (Figure 1). The study area is part of the semi-arid bioclimatic domain. Twenty-three, 25 and 30 sites were investigated in the Boutaleb, Ouled Tebben and Ouenougha forests, respectively (Figure 1).

The Boutaleb forest (28427 ha) is located between the high Setifian plains to the north and the Hodna basin to the south (35°44'21.1"N 5°19'47.9"E, 950-1886 m asl.). The annual rainfall is 468 mm and the mean annual temperature is 13.3°C. The Boutaleb massif is exclusively made up of sedimentary rocks (marl, limestone, dolomite and clays with a lesser extension). The vegetation is composed of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.), Atlas cedar (*Cedrus allantica* Manetti), holm oak (*Quercus ilex* L.), narrow-leaved mock privet (*Phillyrea angustifolia* L. Rouy), turpentine tree (*Pistacia terebinthus* L.), lentisk (*Pistacia*

*lentiscus* L.), Phoenician juniper (*Juniperus phoenicea* L.), cade juniper (*Juniperus oxycedrus* L.), rosemary (*Salvia jordanii* J.B.Walker), globe daisies (*Globularia alypum* L.) and hairy thyme (*Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* Desf.).

The Ouled Tebben forest or Righa Dahra (14932 ha) is located in the east of the Boutaleb forest between the high Setifian plains to the north and the Hodna basin to the south. It is in the middle of three provinces Setif, Bordj Bou Arréridj and M'sila (35°48'36.3"N 5°08'58.5"E, 700-1500 m asl.). The annual rainfall is 396 mm and the mean annual temperature is 14.17°C. The majority of the massif is made of hard dolomitic limestones and marls. The most widespread forest formations in the area are composed of Aleppo pine, holm oak, Atlas cedar, Phoenician juniper, cade juniper, globe daisies, narrow-leaved mock privet, oriental hawthorn (*Crataegus laciniata*), and Eucalyptus tree (*Eucalyptus* sp.).

The Ouannougha forest (17671 ha) is a part of the mountain range of Bibans, it is located in the province of Bordj Bou Arréridj (36°09'35.2"N, 4°12'16.8"E, 900-1280 m asl.), 420 mm of precipitation falls annually with a mean annual temperature of 15.6 °C. The trees composing this forest are Aleppo pine, holm oak, Atlas cedar, Phoenician juniper, and cade juniper.



**Figure 1.** Localization of the sampling sites in Ouenougha (A) Ouled Tebben (B) and Boutaleb (C) forests in North-Eastern Algeria

**Table 1.** Sampling dates for each forest studied

Sampling	Date		
	Boutaleb	Ouled Tebben	Ouenougha
1	2017/05/24	2017/05/28	2017/06/05
2	2017/06/08	2017/06/11	2017/06/13
3	2017/06/22	2017/06/25	2017/06/26
4	2017/07/05	2017/07/06	2017/07/09
5	2017/08/19	2017/07/22	2017/07/23
6	2017/08/05	2017/08/13	2017/08/10
7	2017/08/19	2017/09/04	2017/08/23

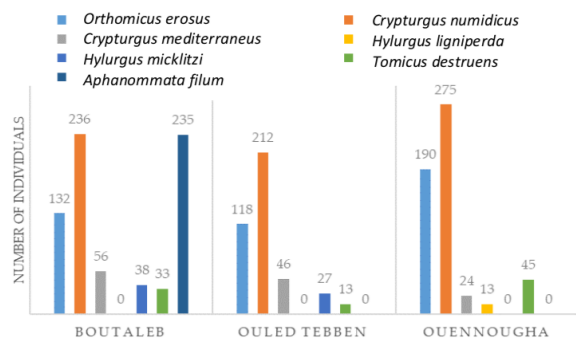
**Bark beetles collection and identification**

Bark beetles were collected from *Pinus halepensis* trees in the three forests. The sampling began in May 2017 and was carried out every 15 days for each forest until September 2017 (Table 1).

At least five colonized trees were chosen randomly in every sampling day, based on direct observation of the bark (trunk, branches) and the presence of boring dust or pitch tubes as indicators of bark beetle infestation. Geographic coordinates were noted for every tree. The bark was removed to access the galleries and collect *in situ* all present insects, placed in sterile microtubes and then stored at 4°C. In addition, bark of the same trees was put in plastic bags and examined in the laboratory to collect the insects. The total number of beetles collected for each sampling site was estimated.

Collected insects were observed under a stereomicroscope and grouped in morphotypes for the identification with keys according to their taxonomic characteristics ( Balachowsky 1949; Gil and Pajares 1986; Wood 1986; Alonso-Zarazaga 1988; Pfeffer 1995; Alonso-Zarazaga and Lyal 2009).

Reference individuals for each species were stored in ethanol.



**Figure 2.** Number of individuals for each species in the three studied forests

**RESULTS AND DISCUSSION**

**Identification**

In this study, 1629 specimens were collected and identified from 76 Aleppo pine trees. The Boutaleb forest was the most affected with a total number of individuals collected of 666 followed by the Ouenougha and Ouled Tebben forests with 547 and 416 individuals, respectively (Figures 2, 3, and Table 3). A total of 7 species were identified, 6 belonging to the Scolytinae subfamily and one to the Cossoninae subfamily (Table 2).

**Scolytinae subfamily**

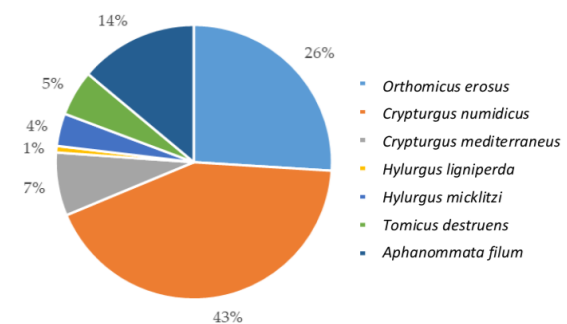
Tibiae armed on apical and/or lateral margins either by spines or socketed denticles, apical mucro formed by mesal element (compared to *Protihijlastes* structure); male spiculum gastrale present, antennal club variable, with or without sutures, head narrower than pronotum; pronotum almost never with constriction near middle, pronotum edged on the sides and back. When visible, scutellum usually flushes with elytral surface, often flattened (Wood 1986).

**Ipini tribe Bedel, 1888**

Eye shallowly sinuate with lower half narrower than above; protibia with 3-4 socketed teeth; antennal club rarely obliquely truncate (*Pityokteines*. *Orthotomicus*), procoxae contiguous, intercoxal piece longitudinally emarginate to absent, never complete; elytra moderately sulcate to elaborately excavated, with lateral margin usually armed by tubercles or spines; pronotum more strongly declivous on anterior third, asperities usually larger; worldwide (Wood 1986)

*Orthomicus erosus* Wollaston, 1857 (Mediterranean pine beetle)

Close to the genus *Ips*, from which it is distinguished by the straightness of its declivity whose apical edge is not explained backward.



**Figure 3.** Number of individuals for each species in the three studied forests

**Table 2.** Identified species in the three forests

Sub family	Tribe	Species	Common name	Habitat	Host species
Scolytinae	Ipini	<i>Orthomicus erosus</i>	Mediterranean pine beetle	Central Europe, Mediterranean area, Sardinia, Atlantic Islands, British Islands, North Africa, Central Asia, China. Introduced in South Africa, Chile, Finland, Sweden, Fiji Islands, and United States	<i>Pinus radiata</i> , <i>P. pinea</i> , <i>P. sylvestris</i> , <i>P. pinaster</i> , <i>P. halepensis</i> , <i>P. nigra</i>
		<i>Crypturgus numidicus</i>		Bosnia Herzegovina, Bulgaria, Croatia, France, Greece, Italy, Malta, Spain, Algeria, Tunisia, Turkey.	<i>Pinus halepensis</i> , <i>P. pinaster</i> , <i>P. pinea</i> , <i>P. nigra</i> , <i>P. brutia</i> , <i>Abies numidica</i> , <i>A. pinsapo</i> , <i>Cedrus libani</i>
	Crypturgini	<i>Crypturgus mediterraneus</i>		Croatia, France, Greece, Italy Portugal, Spain, Algeria, Morocco, Tunisia, Cyprus, Turkey	<i>Pinus halepensis</i> , <i>P. pinaster</i> , <i>P. nigra</i> , <i>P. brutia</i>
		<i>Hylurgus ligniperda</i>	Red-haired pine bark beetle	Central and South Europe, Caucasus, Turkey, Algeria, New Zealand. the Canary Islands, the United States, South Africa, Australia, Chile, Brazil, Uruguay and Sri Lanka	<i>Pinus pinaster</i> , <i>P. brutia</i> , <i>P. halepensis</i> , <i>P. pinea</i> .
	Hylurgini	<i>Hylurgus micklitzi</i>		Northern Africa, Mediterranean regions of Europe, Asia Minor, Caucasus	<i>P. halepensis</i> , <i>P. brutia</i> , <i>P. pinaster</i> , <i>P. pinea</i> and <i>P. nigra</i>
Cossoninae	Rhyncolini	<i>Tomicus destruens</i>	Pine shoot beetle	Algeria, Tunisia, Morocco, France, Croatia, Slovenia, Serbia, Bosnia Herzegovina and Montenegro, Greece, Italy, Portugal, Spain, Madeira Islands, Cyprus, Israel, Turkey, and South-Western Asia.	<i>P. halepensis</i> , <i>P. pinaster</i> , <i>P. pinea</i> , <i>P. brutia</i> and <i>P. canariensis</i> .
		<i>Aphanommata filum</i>		Italy, Spain, France, Algeria, Bulgaria, Croatia and Albania	<i>Pinus</i> sp.

Note: Balachowsky (1949); Gil and Pajares (1986); Pfeffer (1995); Haack (2004); Lopez et al. (2007); Lieutier et al. (2016); Skuhrovec et al. (2018)

**Table 3.** Number of individuals collected for each species in the three forests studied at each sampling date.

Site and date of sampling	Number of individuals						
	<i>O. erosus</i>	<i>C. numidicus</i>	<i>C. mediterraneus</i>	<i>H. ligniperda</i>	<i>H. micklitzi</i>	<i>T. destruens</i>	<i>A. filum</i>
<b>Boutaleb forest</b>							
2017/05/24	/	24	/	/	/	28	30
2017/06/08	/	22	/	/	/	3	25
2017/06/22	/	44	/	/	/	/	32
2017/07/05	32	50	/	/	/	/	21
2017/07/19	22	17	20	/	1	/	33
2017/08/05	37	25	10	/	12	/	44
2017/08/19	26	29	26	/	3	/	50
Total	117	211	56	0	16	31	235
<b>Ouled Tebben forest</b>							
2017/05/28	15	49	/	/	/	13	/
2017/06/11	18	24	/	/	9	/	/
2017/06/25	30	48	/	/	/	/	/
2017/07/06	7	26	10	/	11	/	/
2017/07/22	10	32	17	/	7	/	/
2017/08/13	20	32	49	/	/	/	/
2017/09/04	18	/	/	/	/	/	/
Total	118	212	46	0	27	13	0
<b>Ouenougha forest</b>							
2017/06/05	30	42	/	/	/	15	/
2017/06/13	22	37	/	/	/	11	/
2017/06/26	18	32	/	/	/	9	/
2017/07/09	37	48	/	/	/	10	/
2017/07/23	31	44	9	4	/	/	/
2017/08/10	36	33	15	/	/	/	/
2017/08/23	16	29	/	9	/	/	/
Total	190	275	24	13	0	45	0



Adults are 3 to 3.8 mm in size, orange or yellowish when young and black at maturity. Dorsally the head is not visible, the anterior of the pronotum has transverse spicule bands. The antennae is composed of 5 segments, the second one is shorter than the first. Antennae mace sutures are procurved upwards in their middle in an arc shape. The margin of the elytral declivity is concave with 4 teeth on each side, the second ones are the largest and fused to the base of the third one. The teeth are more reduced in the females, presenting 3 small denticles, since the third pair is small. Elytra with deep and regular striae, smooth or punctuated interstriae with long intervals. Pilosity is present all over the body (Balachowsky 1949; Wood 1986; Lopez et al. 2007).

Galleries: Irregular star-shaped gallery with 2 or 3 arms, 4 to 8 cm long, sub-cortical in decaying trees.

#### **Crypturgini tribe LeConte, 1876**

Small size species, antennal funicle 2-or 3-segmented, club with sutures on posterior face about equal to those on anterior face; pronotum feebly declivous on anterior half and unarmed, punctuated, reticulate in many species (Balachowsky 1949; Wood 1986).

#### *Crypturgus numidicus* Ferrari, 1867

The genus *Crypturgus* comprises the smallest species within Scolytidae (0.8-1.5 mm). *Crypturgus* species exhibit a narrow-shaped and cylindrical elongated body (Figure 4), and a brown or black colour with shiny or matt reflections. Antenna funiculus is composed of 2 short segments, with an oval-shaped club provided with a fine and incomplete digitula, diffuse sutures rejected at the end. Long and narrow elytra, evenly rounded declivity. Breeding in the bark of the trunk and branches of decaying pines previously infested by more aggressive species such *Orthomicus*, egg galleries forming a confused system partially bored into the bark thickness.

Has a size of 1.5-1.6 mm, antenna funiculus composed of 2 segments, antenna head formed by a single segment. Light colored, pronotum and underside of body more or less dark brown, elytra are much lighter and yellowish. Reflections slightly shiny. Stocky, broad, robust species, especially in the female, whose apical brushes of the elytra are very dense. Pronotum totally dotted. It has a convex and smooth elytral declivity, without a denticular processes, bristles of the interstriae at least twice as long as the striae. Limited to the Mediterranean region.

Galleries: forming a marbled network that penetrates the thickness of the bark, rapidly reducing it to a spongy mass that is abandoned as soon as it dries out.

Nests in the bark of the trunk and branches of dying pine trees attacked by more aggressive species.

Other scientific names: *Crypturgus abbreviatus* Eggers, *Crypturgus barbeyi* Strohmeyer, *Crypturgus brevipennis* Reitter

#### *Crypturgus mediterraneus* Eichhoff, 1889

Has a size of 1,1-1,5 mm. Longer, slender shape (Figure 4). Silks of interstriae shorter and more regular than in *C.*

*numidicus*, arranged in a single row. Pronotum longer than wide with parallel sides beyond the middle, with dense and tight punctuation, devoid of short bristle brushes at the apex of the elytra replaced with scattered silks denser than on the rest of the elytra.

Galleries: forming an irregular network that penetrates the thickness of the bark. Nests in the bark of the trunk of dying pine trees attacked by more aggressive species.

Host plants: *Pinus halepensis*, *P. pinaster*, *P. nigra*, *P. brutia* (Pfeffer 1995).

#### **Hylurgini tribe Gistel, 1848**

Pronotum, elytra and abdomen fully free of scales. Anterolateral areas of pronotum unarmed; precoxal costa on prothorax absent. Antennal funicle composed of 5 to 7 segments. Head extended forward in form of short rostrum. Mesal surface of elytra at suture with interlocking groove and flange continued to base without a series of nodules or cavities immediately behind scutellum (Balachowsky 1949; Wood 1986).

#### *Hylurgus ligniperda* Fabricius, 1787

Elongated and cylindrical in appearance, with a size of 4.5-5.8 mm. General color of the body is black-brown with reddish antennae (Figure 4). Pronotum and elytra are dark brown in color. Dotted and hairy pronotum, with a smooth longitudinal midline. Pronotum coarsely and uniformly punctuated over its entire surface by large closely spaced dots of irregular diameter and not very deep. Posterior edge of pronotum is straight. Lateral pronotum hairiness are less abundant but longer than the sides of elytra hairiness. Antenna is composed of 6 segments. Elytra with irregular hairiness. Striations formed by a row of large, regularly spaced, shallow circular dots. Wide but rough interstriae.

#### *Hylurgus micklitzii* Wachtl, 1881

Has a size of 3.2-4.4 mm. Differs from *H. ligniperda* by its smaller size (Figure 4). Another differential character, from *H. ligniperda*, is the length of the lateral silks of the pronotum, which are the same size as the elytrals, while they are longer in *H. ligniperda*.

Galleries: At the base of the trunk of which it nests, driving its oblique galleries into the thickness of the bark. Can also grow on large bare roots. The mother gallery measures 10-16 cm, the larval galleries are numerous, irregular, long and intertwined (Balachowsky 1949).

#### *Tomicus destruens* Wollaston, 1865

Adults are 3.0-5.3 in size. Antennae funiculus formed by 6 segments. Shiny black and finely dotted pronotum inclined forwards in relation to the elytra. Brown elytra in mature adults (Figure 4). Interstriae with a row of granules, except in the second interstriae of the elytral declivity, where the granules disappear.

Galleries: The female bore a longitudinal uniramous gallery in the middle-upper part of stem and large branches, sapwood is little affected. The tunnel is about 8 to 10 cm long and 3 to 4 mm wide, the larval galleries develop in the bark thickness without affecting sapwood.

**Cossoninae subfamily**

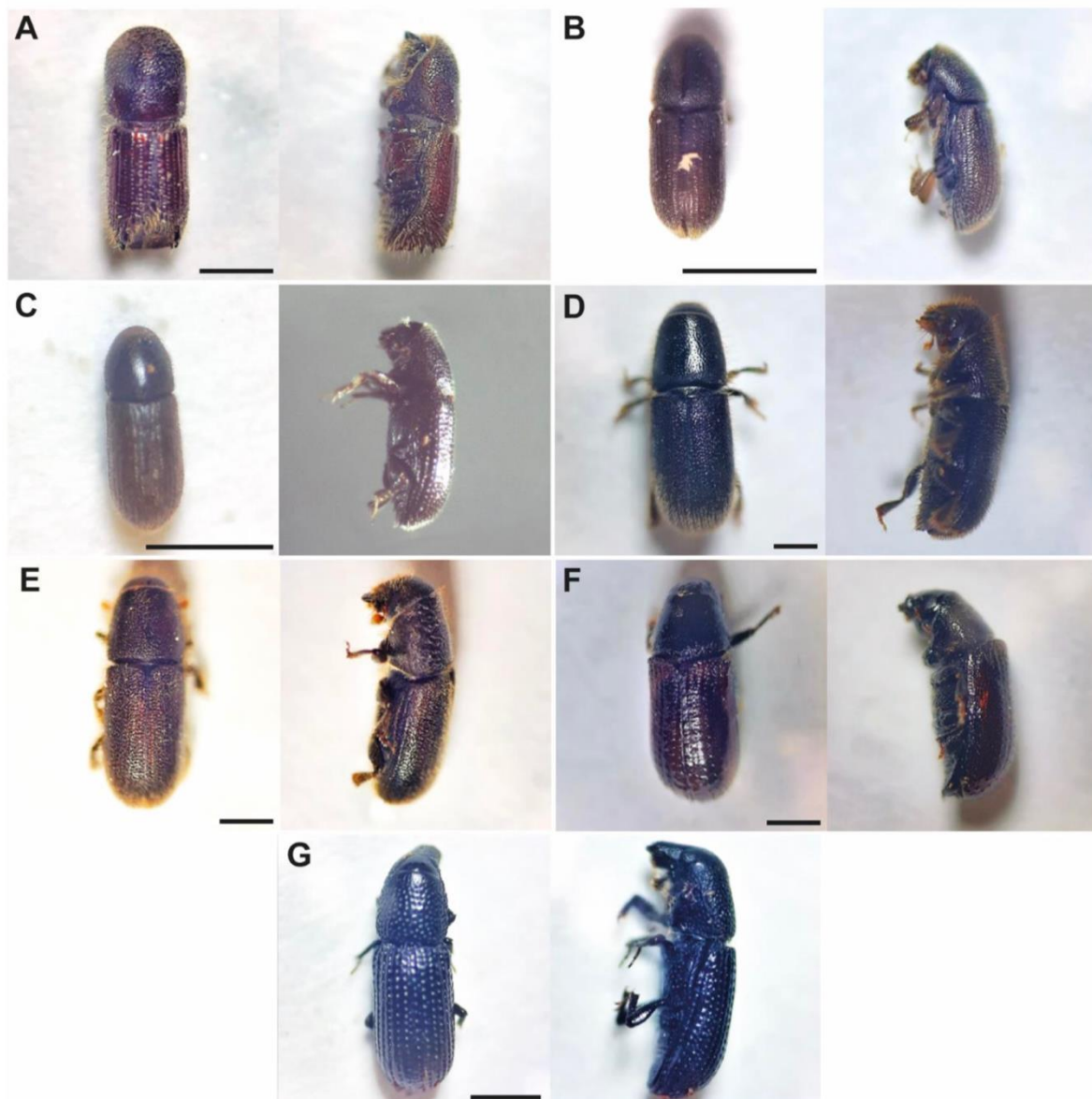
Round eyes, long procoxal part of prosternum, hypostomal spine, terminal curved uncus, inner grooming comb.

**Rhyncolini tribe Le Conte, 1876**

Mesoventrite more or less strongly depressed below level of metaventrite. Procoxal cavities narrowly separated.

*Aphanommata filum* Mulsant & Rey, 1858

Eyes slightly visible in dorsal view, flat, situated low on head, in lateral view with ventral margin of rostrum directed towards middle or lower one-half of eye. Adults are 2.30-2.80 mm in size, pronotum presenting rough and dense punctures (Figure 4), the space between the punctures is smaller than the diameter of punctures. Sides of pronotum are parallel (Alonso-Zarazaga 1988; Skuhrovec et al. 2018).



**Figure 4.** The different species of bark beetles identified. A. *Orthotomicus erosus*; B. *Crypturgus numidicus*; C. *Crypturgus mediterraneus*; D. *Hylurgus ligniperda*; E. *Hylurgus micklitzii*; F. *Tomicus destruens*; G. *Aphanommata filum*

## Discussion

This study investigated the diversity of bark beetle species in the North-Eastern region of Algeria for the first time. Seven species were identified, unevenly distributed between the three forests. *Crypturgus numidicus* was the most abundant species in the three forests, followed by *Orthomicus erosus* and *Tomicus destruens*.

*Orthomicus erosus* and *T. destruens* were the only species found on living trees. These two species are common on *Pinus* throughout the Mediterranean basin including the semi-arid regions in Algeria (Balachowsky 1949; Chakali 2004; Lopez et al. 2007; Lieutier et al. 2016). All Mediterranean bark beetles that are able to colonize living trees use the host exhaustion strategy. Species such as *O. erosus*, *H. ligniperda*, and *C. micklitzi* use aggregation pheromones to attract other individuals and thus massively attack the trees (Lieutier et al. 2016). On the other hand, *Tomicus destruens* is attracted by terpenes emitted from wounds in trees attacked by pioneer bark beetles. All these bark beetle species are associated with xylophagous fungi which probably play a role in the colonization of the host trees.

*Tomicus destruens* has been reported on Aleppo pines in the Djelfa region (Chakali 2004). Another study showed the presence of *T. destruens* in the Tlemcen region in the extreme east of Algeria (Nichane et al. 2013). Females of *T. destruens* preferentially seek for the northern slopes of the relief and the southern side of the tree to make their maternal gallery. According to Chakali (2007), Mediterranean pine forests have been confronted with *T. destruens* over the last two decades. This species is multiplying rapidly due to the physiological stress of Aleppo pines caused by climate change (Chakali 2004; Guit et al. 2016). This species which has long been confused with the neighboring species *Tomicus piniperda*, is responsible for the dieback of Aleppo pine forests in the semi-arid regions of Algeria (Guit et al. 2016).

It is clear that the colonization of Aleppo pines is initiated by *T. destruens*, a more aggressive primary species, followed by *O. erosus* which is considered a secondary species (Lopez et al. 2007; Sangüesa-Barreda et al. 2015; Lieutier et al. 2016). Attacks by these two bark beetle species in coniferous forests rely on two complementary factors: the existence of trees weakened by stress and a certain level of pest population (Lieutier and Levieux 1985).

In the region of Zaragoza in Spain, galleries of *O. erosus* occupy a large area of the attacked trees compared to *T. destruens*. The density of galleries of *O. erosus* on attacked Aleppo pine trees was higher than that of *T. destruens* (Sangüesa-Barreda et al. 2015). In Algeria, *O. erosus* can also colonize Atlas cedar trees (Talbi and Bouhraoua 2015). In a recent survey in Europe, *O. erosus* was the most commonly found species in Portugal, Spain, France, Greece, Italy and Hungary (Faccoli et al. 2020). When reaching a high population density, *O. erosus* can overwhelm the host defenses, thus causing tree mortality (Faccoli et al. 2020).

Although *O. erosus* is considered an important pest in many regions of the Mediterranean basin, many consider it

a secondary pest. In our study, *O. erosus* was found on living trees in Boutaleb forest, suggesting that it can be a serious pest in semi-arid regions.

Species of the genus *Crypturgus* are secondary bark beetles that occupy biotypes previously colonized by other species and do not affect healthy trees (Lieutier et al. 2016). For instance, very often trees colonized by *O. erosus* or *T. destruens* are later colonized by *Crypturgus numidicus*. Very few studies have focused on this species, which is common throughout Algeria and the most common bark beetle in the forests studied here. It was reported for the first time in the Babors massif (Peyerimhoff 1919). In the three forests studied, *C. numidicus* was sampled from the bark of trees colonized by *O. erosus*. This confirms that this species nests in the bark of trunks and branches of dying Pine trees attacked by other bark beetles (Balachowsky 1949). Taking advantage of the entrances to the galleries of other species, the galleries of *C. numidicus* are bored irregularly throughout the thickness of the Aleppo pine bark, and these galleries are abandoned as soon as the bark dries out (Balachowsky 1949). *Crypturgus mediterraneus* is poorly spread and was detected here only in the forests of Boutaleb and Ouled Tebben. This species which has been little studied, is often misidentified as *C. numidicus* (Balachowsky 1949). *C. mediterraneus* has been sampled in the thick bark of the trunks of trees colonized by *O. erosus*, where it uses the gallery systems of other species to penetrate and lay eggs. The larval galleries are highly branched and start from the galleries of other species (Lieutier et al. 2016). This species colonizes the middle or upper part of the trunks of Aleppo pines (Markalas 1997).

*Hylurgus* species are secondary bark beetles, attacking only weak or dead trees. *Hylurgus micklitzi* was present in all of the studied forests, but it was found only in decayed trees. By contrast, *H. ligniperda* was present only in Ouennougha forest. Females settle in the basal part of the trunk and exposed roots of dead or weakened trees. Several authors have reported the presence of these species in Algeria (Balachowsky 1949; Pfeffer 1995), and for instance, Nichane (2013) reported the presence of *H. ligniperda* in the region of Tlemcen.

*Aphanommata filum* live in conifer trunks, it has already been observed in Algeria (Folwaczny 1973; Alonso-Zarazaga 1988). This poorly known species were abundantly found under the trunk bark of Aleppo pines in the Boutaleb forest, with galleries dug into the sapwood of dead trees. This is consistent with the findings of H. Jordal (Jordal 2014), which showed that Rhyncolini species live in the wood and under the bark of dead trees, adults lay eggs in excavated tunnels, and show similar behavior as Scolytidae.

In conclusion, 6 bark beetle species and one Cossoninae species were recorded for the first time in the center of the East region of Algeria. The diversity of bark beetles in the studied region is low compared to other countries. Among the individuals collected, *T. destruens* and *O. erosus* were the only species found in living trees, demonstrating that *O. erosus* is also capable of attacking stressed trees while it is usually considered as a secondary beetle. Secondary

species such as *C. numidicus*, *C. mediterraneus*, *H. ligniperda* and *H. micklitzii* do not represent a serious threat to Aleppo pine trees. Nevertheless, further studies are needed to extend the sampling, for instance, to other region forests, to obtain a larger picture of the diversity of bark beetles partly responsible for the decline of Aleppo pine forests in eastern Algeria.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to Ain Ouelmen, Ouled Tebben and Haraza Forest districts, Algeria for helping us to access the different sites. This research was funded by Program Hubert Curien Tassili (PHC code 17MDU977).

#### REFERENCES

- Alonso-Zarazaga MA. 1988. The genus *Aphanommata* Wollaston, 1873 in the Old World (Coleoptera: Curculionidae, Cossoninae). *Insect Syst Evol* 19: 325-331. DOI: 10.1163/187631289X00195.
- Alonso-Zarazaga MA, Lyal CHC. 2009. A catalogue of family and genus-group names in *Scolytinae* and *Platypodinae* with nomenclatural remarks (Coleoptera: Curculionidae). *Zootaxa* 2258: 1-134. DOI: 10.11646/zootaxa.2258.1.1.
- Anderegg WRL, Hicke JA, Fisher RA, Allen CD, Aukema J, Bentz B, Hood S, Lichstein JW, Macalady AK, Mcowell N, Pan Y, Raffa K, Sala A, Shaw JD, Stephenson NL, Tague C, Zeppel M. 2015. Tree mortality from drought, insects, and their interactions in a changing climate. *New Phytol* 208: 674-683. DOI: 10.1111/nph.13477.
- Balachowsky A. 1949. Coléoptères Scolytides. Faune de France No 50. Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles, Paris. [French]
- Bao YB, Na L, Han A, Guna A, Wang F, Liu X, Zhang J, Wang C, Tong S, Bao YH. 2020. Drought drives the pine caterpillars (*Dendrolimus* spp.) outbreaks and their prediction under different RCPs scenarios: A case study of Shandong Province, China. *For Ecol Manag* 475: 118446. DOI: 10.1016/j.foreco.2020.118446.
- Chakali G. 2004. Statut spécifique de l'hylésine *Tomicus* (Coleoptera-Scolytidae) de la région semi-aride de Djelfa (Algérie). *Annales de l'Institut National Agronomique* 25: 31-41. [French]
- Chakali G. 2007. Stratégie d'attaque de l'hylésine *Tomicus destruens* (Wollaston 1865) (Coleoptera: Scolytidae) sur le pin d'Alep en zone semi-aride (Algérie, Djelfa). *Ann Soc Entomol Fr* 43: 129-137. DOI: 10.1080/00379271.2007.10697502. [French]
- Davi H, Durand-Gillmann M, Damesin C, Delzon S, Petit C, Rozenberg P, Sabatier SA, Chadœuf J, Boutte B, Boivin T. 2020. Distribution of endemic bark beetle attacks and their physiological consequences on *Pinus halepensis*. *For Ecol Manag* 469: 118187. DOI: 10.1016/j.foreco.2020.118187.
- Faccoli M, Gallego D, Branco M, Brockerhoff EG, Corley J, Coyle DR, Hurley BP, Jactel H, Lakatos F, Lantschner V, Lawson S, Martínez G, Gómez DF, Avtzis D. 2020. A first worldwide multispecies survey of invasive Mediterranean pine bark beetles (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Biol Invasions* 22: 1785-1799. DOI: 10.1007/s10530-020-02219-3.
- Folwaczny B. 1973. Identification table of the Palaearctic Cossoninae (Coleoptera, Curculionidae) without the genera occurring only in China and Japan, together with information on distribution. *Entomologische Blätter für Biologie und Systematik der Käfer* 65: 180.h
- Gil LA, Pajares JA. 1986. Los escolítidos de las coníferas en la Península Ibérica. Monografías INIA 53, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. [Spanish]
- Guit B, Nedjimi B, Chakali G, Guibal F. 2016. État sanitaire des peuplements de pin d'Alep (*Pinus halepensis* MILL.) Dans le massif forestier de Senalba (Djelfa, Algérie). *Rev Ecol-Terre Vie* 71: 156-167. [French]
- Haack RA. 2004. *Orthotomicus erosus*: A new pine-infesting bark beetle in the United States. *Newslett Michigan Entomol Soc* 49: 3.
- Jordal BH. 2014. Cossoninae. In: Leschen B (eds). *Arthropoda: Insecta: Coleoptera. Volume 3: Morphology and Systematics (Phytophaga)*. DeGruyter, Germany.
- Lieutier F, Mendel Z, Faccoli M. 2016. Bark beetles of Mediterranean conifers. In: Timothy P, François L (eds.). *Insects and Diseases of Mediterranean Forest Systems*. Springer, Nederland. DOI: 10.1007/978-3-319-24744-1\_6.
- Lieutier F, Levieux J. 1985. Les relations conifères-scolytides: importance et perspectives de recherches. *Annales des sciences forestières, INRA/EDP Sciences* 42 : 359-370. [French]
- Lieutier F, Bermudez-Torres K, Cook J, Harris MO, Legal L, Sallé A, Schatz B, Giron D. 2017. From plant exploitation to mutualism. *Adv Bot Res* 81: 55-109. DOI: 10.1016/bs.abr.2016.10.001.
- Lopez S, Ochoa PR, Carlos Iturrondobeitia J, Goldarazena A. 2007. Los Escolítidos de las Coníferas del País Vasco: Guía Práctica para su identificación y control. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco, Spain. [Spanish]
- Markalas S. 1997. Frequency and distribution of insect species on trunks in burnt pine forests of Greece. *Mitt Schweiz Entomol Ges* 70: 57-61.
- Morcillo L, Gallego D, González E, Vilagrosa A. 2019. Forest decline triggered by phloem parasitism-related biotic factors in Aleppo Pine (*Pinus halepensis*). *Forests* 10: 608. DOI: 10.3390/f10080608.
- Nichane M, Bouchikhi Tani Z, Anouar Khelil M. 2013. Contribution à l'étude de l'entomofaune de quelques espèces résineuses de la région des Traras Occidentaux (Tlemcen-Algérie). *Leban Sci J* 14: 25-31. [French]
- Paine TD, Raffa KF, Harrington TC. 1997. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Ann Rev Entomol* 42: 179-206. DOI:10.1146/annurev.ento.42.1.179.
- Peyerimhoff P. 1919. Notes sur la biologie de quelques Coléoptères phytophages du Nord Africain (3ème série). *Ann Soc Entomol Fr* 88: 169-258. [French]
- Pfeffer A. 1995. Zentral und westpaläarktische. Borken und Kernkäfer. Basel. [Germany]
- Sangüesa-Barreda G, Linares JC, Camarero JJ. 2015. Reduced growth sensitivity to climate in bark-beetle infested Aleppo pines: Connecting climatic and biotic drivers of forest dieback. *For Ecol Manag* 357: 126-137. DOI: 10.1016/j.foreco.2015.08.017.
- Sauvion N, Calatayud P-A, Thiéry D, Marion-Poll F. 2013. Interactions insectes-plantes. In: Sauvion N, Calatayud P-A, Thiéry D, Marion-Poll F. *Vector-Borne Phytopathogenic Bacteria*. Quae Editions, IRD Editions. DOI: 10.4000/books.irdeditions.22185.
- Skuhrovec J, Hlaváč P, Batelka J. 2018. Review of Cape Verde *Aphanommata* Wollaston, 1873 (Coleoptera: Curculionidae: Cossoninae) with description of new species, larva and notes on biology and distributional patterns. *Diversity* 10: 28. DOI: 10.3390/d10020028.
- Suárez-Vidal E, Sampedro L, Voltas J, Serrano L, Notivol E, Zas R. 2019. Drought stress modifies early effective resistance and induced chemical defenses of Aleppo pine against a chewing insect herbivore. *Environ Exp Bot* 162: 550-559. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.04.002.
- Talbi Y, Bouhraoua RT. 2015. Complexe xylophage associé au dépérissement du cèdre de l'atlas au Bézema (Algérie). *Leban Sci J* 16: 97. [French]
- Wood SL. 1986. A reclassification of the subfamilies and tribes of Scolytidae (Coleoptera). *Great Basin Naturalist Memoirs* 10: 111.

## Étude 2: Biodiversité fongique associée aux insectes xylophages du pin d'Alep dans les régions semi-arides du Nord-Est de l'Algérie.

Il est incontestable que le déclin des peuplements de pin d'Alep est en grande partie imputable aux conséquences du changement climatique, notamment les sécheresses récurrentes qui affaiblissent les arbres. Néanmoins, la prolifération d'insectes xylophages, tels que les scolytes, elle-aussi liée au réchauffement climatique global, est également une cause importante du dépérissement des forêts. Les champignons associés aux scolytes, qui pourraient donc jouer également un rôle dans la mortalité des arbres, constitue un autre domaine de recherche encore peu exploré en Algérie.

C'est dans ce contexte qu'a été menée la présente étude, visant à caractériser les champignons associés à des scolytes prélevés dans trois massifs forestiers en Algérie de mai à septembre 2017. Après isolement des champignons par lavage des insectes et mise en culture sous différentes conditions, une identification morphologique et moléculaire a été réalisée et 37 espèces fongiques ont pu être identifiées. La majorité des espèces identifiées sont considérées comme des saprophytes et étaient ici isolées vraisemblablement comme saproxylophages, tandis que neuf espèces fongiques étaient connues pour leur association avec les scolytes. Des champignons au caractère xylophage largement démontré comme *Ophiostoma ips*, *Ceratocystiopsis minuta* et *Geosmithia lavendula*, capables d'attaquer des arbres vivants, ont également été isolés.

Les capacités de croissance sur milieu contenant de la lignine ou de l'écorce de pin, ainsi que les activités enzymatiques peroxydase et oxydase, ont été évaluées. L'ensemble des espèces fongiques s'est révélé capable de croître en présence de ces substrats lignocellulosiques comme seule source de carbone, avec parfois un développement plus important que sur milieu additionné de glucose. Ces résultats suggèrent l'implication des champignons dans la dégradation de la lignine, principal composant de l'écorce des arbres, qui peuvent donc représenter un facteur de stress important pour le pin d'Alep.

Cette étude apporte de nouvelles connaissances sur la flore fongique des pinèdes algériennes et met en évidence le rôle potentiellement aggravant des champignons associés aux scolytes dans le dépérissement des forêts, via l'affaiblissement des défenses des arbres qu'ils engendrent.

## **Fungal associates of bark beetles in Aleppo pine forests of semi-arid regions of Algeria**

Moumeni L<sup>a,b</sup>, Gastebois A<sup>a</sup>, Bounechada M<sup>b</sup>, Benia F<sup>b</sup>, Poirier W<sup>a</sup>, Giraud S<sup>a</sup>, Gillmann L<sup>a</sup>, Bouchara JP<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Amélioration et de Développement de la Production Végétale et Animale (LADPVA), Ferhat Abbas University Setif 1, Setif, Algeria.

<sup>b</sup>Université d'Angers, Université de Bretagne Occidentale, UR Infections Respiratoires Fongiques (IRF), SFR ICAT, Angers, France.

## ABSTRACT

The Aleppo pine forests in semi-arid regions of Algeria have been experiencing a decline in their surface area in recent years. This has been attributed to the increasing number of wildfires and to the weakening of trees due to successive droughts resulting from global warming. The proliferation of xylophagous insects has been proposed as one of the causes of the forest decline. In a previous study, we identified seven species of xylophagous insects, including six bark beetle species, in three Aleppo pine forests in eastern Algeria. In this study, we aimed to identify the fungal associates of these insects. We isolated and identified 37 fungal species, and evaluated their growth on media supplemented with lignin or bark powder substrates. We also assessed the influence of these carbon substrates on the oxidase and peroxidase activities, which are essential for the extracellular degradation of lignin, the main component of the bark. The identified fungi were categorized into three groups, including entomopathogenic species, xylophagous fungi, such as *Ophiostoma ips*, *Ceratocystiopsis minuta*, and *Geosmithia lavendula*, which have the ability to attack living trees, and saproxylophagous fungi, which are capable of degrading lignin in dead trees. Our findings suggest that the fungal associates play an important role in the decline of Aleppo pine forests and should be considered in forest management strategies.

### Key words:

Bark beetles; Phytopathogenic fungi; Aleppo pine; Ophiostomatoid fungi; Lignin degradation.

## INTRODUCTION

Forests which cover a large surface on earth, represent a complex ecosystem that hosts 80 per cent of the terrestrial species of plants and animals on the globe. They play an important role in the biogeochemical cycles in maintaining ecological balance. In recent decades, forests have been the subject of several health problems, which may have various causes like global warming, drought and irruption of pests or pathogens, leading to forest dieback (Dobbertin *et al.*, 2007; Allen *et al.*, 2010; Anderegg *et al.*, 2015). Tree mortality can have single cause, but most often, they are multiple, acting in concomitance or in synergy (Kurz *et al.*, 2008).

In eastern Algeria, the Aleppo pine forests have been experiencing a decline in their surface in recent years (Guit *et al.*, 2016) because of fires caused by longer periods of drought and of the weakening of trees by water stress which has favoured outbreaks of xylophagous insects that are becoming increasingly regular (Vicente-Serrano *et al.*, 2010; Jakoby *et al.*, 2019; Davi *et al.*, 2020). The bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) are among the main pests of Aleppo pine; even if most species of bark beetles only colonize dead trees, some species can attack living or weakened trees (Davi *et al.*, 2020). These insects are known for their association with fungi (Lieutier *et al.*, 1991). The relationship between the two is not entirely clear, but it is undeniable that a number of fungi are capable of causing the death of trees while others can help the insects in the process of tree colonization (Viiri and Lieutier, 2004; Allison and Redak, 2017; Cale *et al.*, 2019). Adult insects host fungi in their digestive tract or in the integument by structures called mycangia; these structures are usually lined with glands which help to acquire fungi. The insects transport the fungi and introduce them into the trees by burrowing under the bark into the phloem (Six and Wingfield, 2011).

Not all fungi associated with bark beetles are similar. Some fungal and insect species have an obligate mutualistic relationship where the insects depend on the fungus for nutrition to complete their cycle, and others have a facultative mutualistic relationship (Allison and Redak, 2017). In both cases, the fungi are suspected to kill the trees either directly by blocking the conductive system of the trees or by depleting the defense system of the trees, thus allowing the insects to colonize the tree. Some fungi develop in the phloem and others in the sapwood of trees (Vega and Hofstetter, 2015).

The most common fungal associates of bark beetles are Ascomycetes fungi belonging to the Ophiostomatales or Microascales order (Massoumi Alamouti *et al.*, 2009). Climate changes had led to a range expansion of bark beetle species in the world. Invasive species not known to cause mortality in their native range can become more aggressive in their new environment. They can establish new associations with native



xylophagous fungi, but they may also introduce new pathogens (Cudmore *et al.*, 2010). The fungi associated with emergent insects can also adapt to new environments and colonise new hosts, and some species can become pathogenic to humans (Chabasse *et al.*, 2009).

In Algeria, the association between Aleppo pine bark beetles and fungi has never been studied, and little is known about the diversity of bark beetle-associated fungi. In a previous work, we investigated the diversity of bark beetle species in Aleppo pine forests in the North East semi-arid regions of Algeria. Six species belonging to the Scolytinae subfamily were identified. *Tomicus destruens* and *Orthotomicus erosus* were detected in the three studied forests, where they were found to colonize living trees while other species also detected in all sampled forests (*Crypturgus numidicus* and *Crypturgus mediterraneus*) or only in some of them (*Hylurgus ligniperda* and *Hylurgus micklitzii*) were colonizing only dead trees. Here we attempted to define the fungal species associated with these bark beetles, which may therefore be one of the causes for Aleppo pine decline in the semi-arid regions of Algeria.

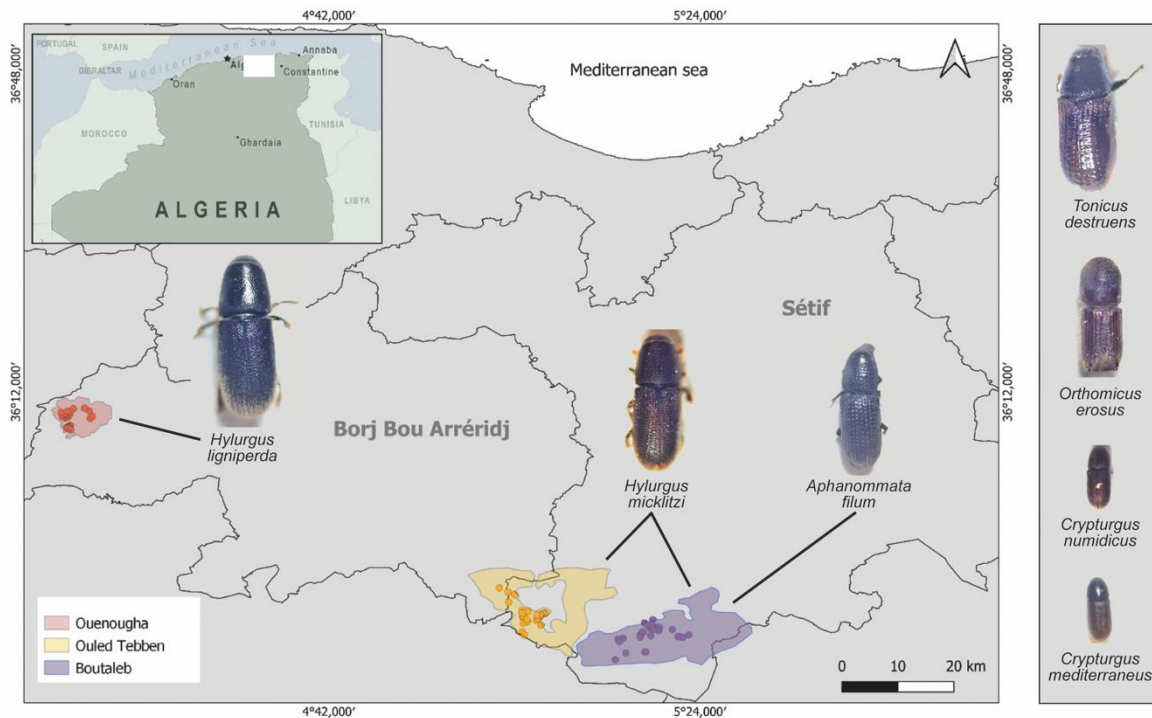
## MATERIALS AND METHODS

### Insects collection

Bark beetles were collected from May to September 2017 (sampling every 15 days) from *Pinus halepensis* trees in different sites in the Boutaleb, Ouled Tebben and Ouenougha forests which are located in the Hodna and the Bibans Mountains, in North-Eastern Algeria (Table 1 and Figure 1). Twenty-three, 25 and 30 sites were investigated, respectively, in these forests. A total number of 1629 specimens were collected from 76 different trees, and seven different species were identified, belonging for 6 of them to the Scolytinae subfamily. For each sampling day and for each insect species, three individuals were selected for the isolation of fungi when possible.

**Table 1.** Study areas investigated for collecting bark beetles.

Location	Forest	Altitude
Sétif	Boutaleb	950-1886 m
Sétif	Ouled Tebbene	700-1500 m
Bordj Bou Arréridj	Ouenougha	900-1280 m



**Figure 1.** Location of bark beetles sampling sites.

Bark beetles were collected from *Pinus Helepeensis* trees in three forests in the semi-arid region of North Eastern Algeria: Boutaleb, Ouled Tebbene and Ouenougha. A total number of 1629 insects were collected which were placed individually in sterile Eppendorf test tubes and then stored at 4°C. The four insect species presented at the right of the map were detected from the three forests sampled, whereas *Hylurgus* and *Aphanommata* species were recovered from only one or two of these forests.

### Isolation of fungi

For the isolation of fungi, insects were washed in a solution containing a surfactant in order to suspend the spores present in the different structures that house them in the insect. Insects were placed in sterile microtubes containing 800 µL of a 0.01% polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate solution (Tween® 20; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). To dislodge the fungal spores that are located in the mycangium of the insects and to disperse them in the surfactant, the tubes were subjected to shaking using an horizontal shaker that performs radial oscillations (2 min at 30 Hz). Then 100 µL-aliquotes of the obtained spore suspensions were plated onto agar-based culture media.

To optimize the detection of all fungal species that may be associated with the bark beetles, three different culture media were used: Yeast extract-Peptone-Dextrose-Agar (YPDA, containing in g per liter: yeast extract, 5; peptone, 10; dextrose, 20; and agar,

20), Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC agar) and Malt Extract Agar (MEA). A thermostable broad-spectrum antibiotic (chloramphenicol) was added to each culture medium to inhibit the growth of bacteria (0.5 g/L). For each medium, two plates were inoculated which were incubated at 25°C and 37°C in order to detect both mesophilic and thermophilic fungi. After 4 days of incubation, plates were checked for fungal growth and then examined every 48 h until day 14. Colonies differing in their size, color and texture were counted, and then examined microscopically. Slide preparation for microscopic characterisation was carried out using the adhesive tape technique (Koneman and Roberts, 1986). Macroscopic features of the colonies, as well as the microscopic morphology (presence of conidiophores and their color, septation, length and width; shape, size, color and arrangement of the conidia) were used for preliminary identification of the isolates at the genus level and to group the isolates. Fungal isolates that do not produce conidia were subcultured on fresh YPDA or MEA plates to stimulate sporulation. For each group of fungal isolates, precise species identification was achieved by molecular analysis.

All the isolates were cryopreserved in 20% glycerol at - 80°C.

### **Molecular identification**

DNA was extracted from fungal hyphae grown on YPDA. Briefly, hyphae were scraped from actively growing cultures using a sterile scalpel, then crushed with mortar and pestle in liquid nitrogen, and the obtained powder was resuspended in extraction buffer (Tris HCl 1 M pH 8, containing 2% Triton X100, 20% sodium dodecyl sulfate, 5 M NaCl, and 0.5 M EDTA; about 5 mL of buffer per 0.5 g of powder). Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) was added to the mix, which was then centrifuged at 4600 rpm for 1 h. Afterward, the supernatant was transferred to a new tube and DNA was precipitated with 2 vol of 100% ethanol and 1/10 vol of sodium acetate 3 M at - 80°C for 15 min. RNA was eliminated by incubation with 1/100 vol of RNase A (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) for 30 min at 37°C. Finally, DNA was precipitated by the addition of 100% isopropanol and the pellet was resuspended in 100 µL TE buffer (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, 1 mM EDTA). DNA extracts were stored at 4°C until use.

The internal transcribed spacer (ITS) 1 and 2 regions of the ribosomal DNA (rDNA) operon, together with the 5.8S gene, were amplified by PCR using primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3').

In some cases, part of the beta-tubulin gene was amplified as described by Glass and Donaldson (1995) using primers Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') and Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC-3'), and the calmodulin locus was

amplified using primers Cmd5 (5'-CCGAGTACAAGGARGCCTTC-3') and Cmd6 (5'-CCGATRGAGGTCATRACGTGG-3') from IDT (Coralville, IA, USA). 2 µL of the DNA extracts were added to the reaction mixture (50 µL) which contained 2 U of Taq DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTPs and 200 µM of each primer. PCR reaction was carried out in a Gene Pro TC-E-48D thermocycler (BIOER) with the following amplification program: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 52°C and 1 min at 72°C, with a final elongation step of 5 min at 72°C. For some isolates, touch-up gradient PCR was carried out with a 0.5°C increase in temperature of the hybridization step (from 48°C to 68°C) during the successive cycles.

PCR products were analyzed by agarose-gel electrophoresis, and if needed, purified from the agarose gels using the PCR Clean-up kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) before to be sent to Eurofins Genomics MWG Operon (Ebersberg, Germany) for sequencing in both directions. Sequence assembly and alignments were performed using the Geneious software (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand).

### **Growth studies**

Kinetics of growth were investigated on agar plates inoculated with conidia obtained from cultures on YPDA or MEA plates depending of the fungus. After 7 days, spores were collected by scrapping the colonies from the agar plates, followed by filtration on Miracloth® mesh filter (22-µm pore size) to remove hyphae. Cultures were carried out in triplicate on a Scedo-Select III-derived synthetic culture medium (containing in g per liter: ammonium sulphate, 5; potassium dihydrogenophosphate, 1.25; magnesium sulphate, 0.625; agar, 20; and chloramphenicol, 0.5) supplemented with 0.9 g/L Aleppo pine Bark powder (obtained by grinding the bark using an electric grinder) or lignin (Sigma-Aldrich) as described by Poirier *et al.* (X).

YPDA plates were used as control. Each plate was inoculated by single spotting in its center, with 3 µL of a 10<sup>6</sup> CFU/mL suspension. Colony diameter was measured at two dimensions every day during ten days.

### **Enzyme essays**

Prior to enzyme essays, 2.10<sup>7</sup> spores were inoculated in 50 mL of YPD broth. Germ tubes were collected after incubation at 30°C with agitation at 150 rpm for 24 or 48 h depending on growth kinetics. Germ tubes were then inoculated in 50 mL of a liquid synthetic medium (the abovementioned culture medium without agar) containing Aleppo pine bark powder, lignin or glucose as the unique carbon source. After incubation for 24 h at 30°C with agitation (150 rpm), cultures were centrifuged (15 min,

3000 rpm). The supernatants were collected, concentrated by lyophilisation and the obtained lyophilizates resuspended in 1 mL of saline (0.15 M NaCl).

*Peroxidase activity.* Detection of peroxidase activity was performed using the O-PhenyleneDiamine (OPD; Sigma-Aldrich) oxidation test. Two controls were used, *i.e.* a control lyophilizate obtained from a fungus-free culture medium submitted to the same duration and temperature of incubation, and a control lyophilizate supplemented with horseradish peroxidase.

The reaction mixture contained 0.75 mg/mL OPD, 5  $\mu$ L of 30% hydrogen peroxide and 12.5  $\mu$ L of the lyophilizate in a final volume of 250  $\mu$ L of a 0.1 M citric acid - sodium phosphate buffer pH 5. The mix was incubated at room temperature for 5 min, and the reaction was stopped with 62.5  $\mu$ L of a 0.2 M sulfuric acid solution. OPD oxidation yielded a soluble end product which is yellow-orange in color. The absorbance was determined at 490 nm. The extinction coefficient used was 1.578 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, as described previously (Romano *et al.*, 2000).

*Oxidase activity.* The ability of the isolates to produce extracellular oxidases was quantified by the 2-2'-Azinobis (3-ethylBenzoThiazoline-6-Sulphonic acid) (ABTS, Sigma-Aldrich) test. ABTS working solution consisted in 0.1 mM ABTS and 0.0075% hydrogen peroxide in 0.1 M citric acid - sodium phosphate buffer pH 5. Stock solutions of ABTS were freshly prepared and stored in the dark for limited periods (1-2 h).

The reaction solution was composed by equal volumes (*i.e.* 150  $\mu$ L) of ABTS working solution and sample. Controls, negative (obtained from a fungus-free culture medium) and positive (the same supplemented with a suitable amount of *Aspergillus* laccase from Sigma-Aldrich) were included in each series of tests. All reactions were incubated at 37°C for 20 min. The oxidation of ABTS was followed by measurement of the absorption at 420 nm. The extinction coefficient used was 36,000 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Kenzom *et al.*, 2014).

## RESULTS

### Fungal species identified

Fungal spores suspensions obtained by washing the insects with shaking for 2 min were inoculated on different culture media, and after incubation, all different types of colonies were enumerated and subcultured on YPDA prior to morphological identification followed by ITS and, if needed, Bt2 and/or calmodulin sequencing. In some cases, the use of growth-limiting media like DRBC was necessary to prevent the growth of overwhelming species like *Aspergillus niger* or the Mucorales. 37 fungal

species were repeatedly isolated from 425 different specimens of adult bark beetles collected from the three forests investigated. Species were identified through maximum Parsimony method, by comparing sequenced amplicons with the corresponding nucleotide sequences of type strains (ATCC, CBS or NRRL) (Supplemental Table).

The most represented genus was *Penicillium* with 8 species, followed by *Talaromyces* and *Aspergillus* with 5 species each. Saprophytic species accounted for the larger number of species with 18 species, followed by species known to be associated with bark beetles with 9 species. Only 4 entomopathogenic species were isolated. The fungal species were unevenly distributed among the forests, likely because there were differences in the distribution of bark beetles. The fungal diversity was the greatest in the Boutaleb forest with 28 different species identified, followed by the Ouenougha and Ouled Tebben forests with 20 and 19 species identified, respectively (Table 2).

*Orthomicus erosus* and *Crypturgus numidicus* were the bark beetles which hosted the highest diversity of fungal species, with a total of 17 fungal species identified each. Ten fungal species were identified from *Crypturgus mediterraneus* individuals, and eight distinct species from *Hilurgus micklitzii* and *Aphanommata filum*. *Tomicus destruens* and *Hilurgus ligniperda* were the insect species which hosted the lowest diversity of fungal species with only 6 and 5 species, respectively.

Table 2. Frequency of fungal species isolated from bark beetles collected from Aleppo pine in the three forests.

Fungal species	Boutaleb forest						Ouled Tebbane forest						Ouennougha forest						Total			
	Af	Cm	Cn	HI	Hm	Oe	Td	Af	Cm	Cn	HI	Hm	Oe	Td	Af	Cm	Cn	HI		Hm	Oe	Td
Total number of individuals collected	235	56	211	/	16	117	31	/	46	212	/	27	118	13	/	24	275	13	/	190	45	1629
Number of individuals analyzed	18	12	18		12	16	9		12	18		12	16	10		9	18	9		17	15	221
<i>Aspergillus alliaceus</i>	3																					3
<i>Aspergillus bridgeri</i>										4			2									6
<i>Aspergillus citrinoterreus</i>										6			2									8
<i>Aspergillus flavus</i>				2																		2
<i>Aspergillus spelunceus</i>						5																5
<i>Aspergillus subramanianii</i>	3												4									7
<i>Beauveria bassiana</i>				8	6	6		4	4	6				3		2				5	1	35
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	6					5																11
<i>Ceratocystopsis minuta</i>		4	6			4								1								28
<i>Cyberlindnera mississippiensis</i>						9											7			5		21
<i>Eucasphaeria capensis</i>																		3				3
<i>Exophiala phaeomuriformis</i>			5						4	3												12
<i>Geosmithia lavendula</i>			7				1	3					5			2						18
<i>Graphium pseudormiticum</i>					4	4	2						2							5		13
<i>Leptographium manifestum</i>																	8					13
<i>Ogataea zsolitii</i>			3	4	6	6	2							4								19
<i>Ophiostoma ips</i>			6		7								6			3						22

Af: *Aphanommata filum*; Cm: *Crypturgus mediterraneus*; Cn: *Crypturgus numidicus*; HI: *Hylurgus ligniperda*; Hm: *Hylurgus micklitzii*; Oe: *Orthotomicus erosus*; Td: *Tomicus destruens*.

**Table 2 (continued).** Frequency of fungal species isolated from bark beetles collected from Aleppo pine in the three forests.

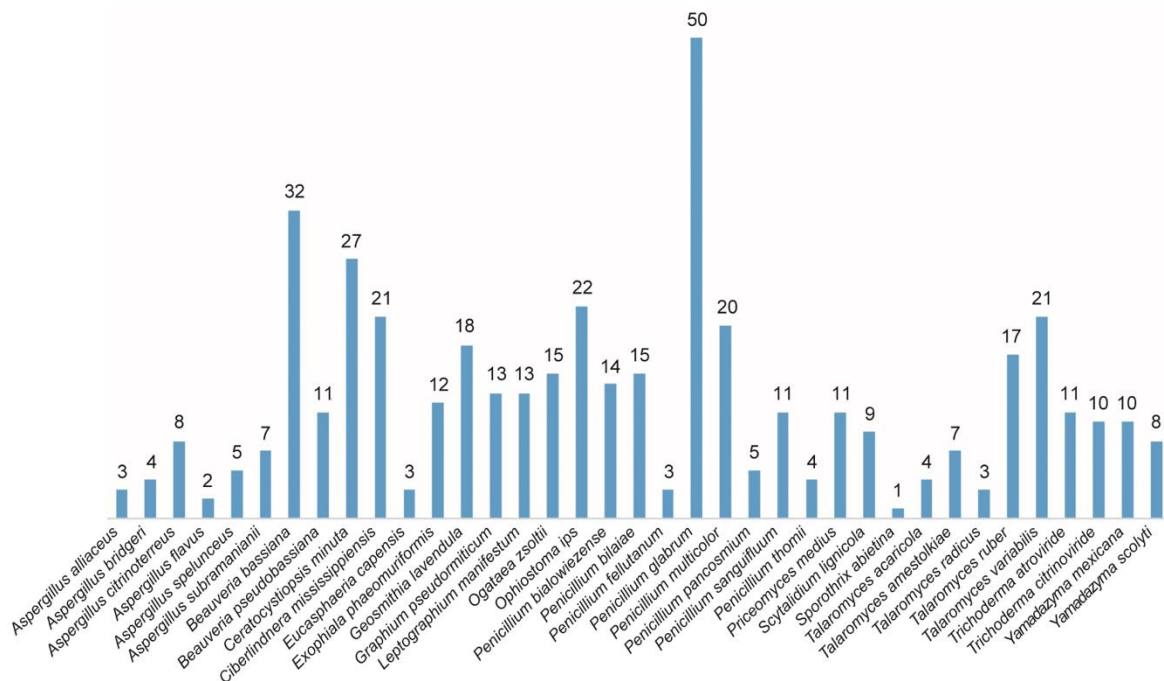
Fungal species	Boutaleb forest						Ouled Tebbane forest						Ouennougha forest						Total				
	Af	Cm	Cn	HI	Hm	Oe	Td	Af	Cm	Cn	HI	Hm	Oe	Td	Af	Cm	Cn	HI		Hm	Oe	Td	
<i>Penicillium bialowiezense</i>	9												5										14
<i>Penicillium bitatae</i>								8									4	3					15
<i>Penicillium fellutanum</i>																						3	3
<i>Penicillium glabrum</i>	4	10	4		6	5				6							7	1		5	2		50
<i>Penicillium multicolor</i>		7	5			5						5		1						1			21
<i>Penicillium pancosmium</i>																							5
<i>Penicillium sanguifluum</i>										6							5						11
<i>Penicillium thomii</i>	4																						4
<i>Priceomyces medius</i>	5							1	2				3	1									12
<i>Scytalidium lignicola</i>					2		4															3	9
<i>Sporothrix abietina</i>																						1	1
<i>Talaromyces acaricola</i>																						4	4
<i>Talaromyces amestolkiae</i>																	5			2			7
<i>Talaromyces radicus</i>	3																						3
<i>Talaromyces ruber</i>			8			3				5													17
<i>Talaromyces variabilis</i>		4	5					1	3								6			2			21
<i>Trichoderma atroviride</i>					1	2						3	1							2	2		11
<i>Trichoderma citrinoviride</i>								3	5			2											10
<i>Yamadazyma mexicana</i>			6									4											10
<i>Yamadazyma scolyti</i>			5			3																	8

Af: *Aphanommata filum*; Cm: *Crypturgus mediterraneus*; Cn: *Crypturgus numidicus*; HI: *Hylurgus ligniperda*; Hm: *Hylurgus micklitzii*; Oe: *Orthotomicus erosus*; Td: *Tomicus destruens*.



Cultures and molecular identification of fungal isolates recovered from bark beetles showed the presence of *Penicillium glabrum* in all the insects studied. It was the most frequent fungal species (Figure 2). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* was the second most common species; this fungus was present in 5 species of bark beetles followed by *Ceratocystiopsis minuta*, *Ophiostoma ips*, *Cyberlindnera mississippiensis*, *Talaromyces variabilis*, *Penicillium multicolor* and *Geosmithia lavendula* (Table 2). 7 yeast species were isolated from 6 insect species, and all of them are known to be associated with tree-boring insects which suggests that this is the natural habitat of these yeasts. Likewise, among the filamentous fungi identified, 8 species are considered as associated to xylophagous insects.

Finally, there were no significant differences in the occurrences of species among the sampling dates in the three forests.



**Figure 2.** Frequency of fungal species isolated from bark beetles.

Values indicated for the different fungal species correspond to the number of culture-positive samples among the total number of insects studied (425 adult bark beetles).

## Growth studies

We tested the ability of fungi associated to bark beetles to utilize lignin as a carbon source. All the tested species were able to grow on modified Scedo-Select III culture medium with Aleppo pine Bark powder or purified lignin as the sole carbon source, demonstrating that they were all capable to degrade lignin for energy production. In almost all cases, there was a correlation between the percentage of growth in lignin- and Bark-containing medium. *Eucasphaeria capensis* and *Talaromyces variabilis* species showed more profuse growth on lignin and bark-containing agar plates compared to YPDA control plates (Figure 3).

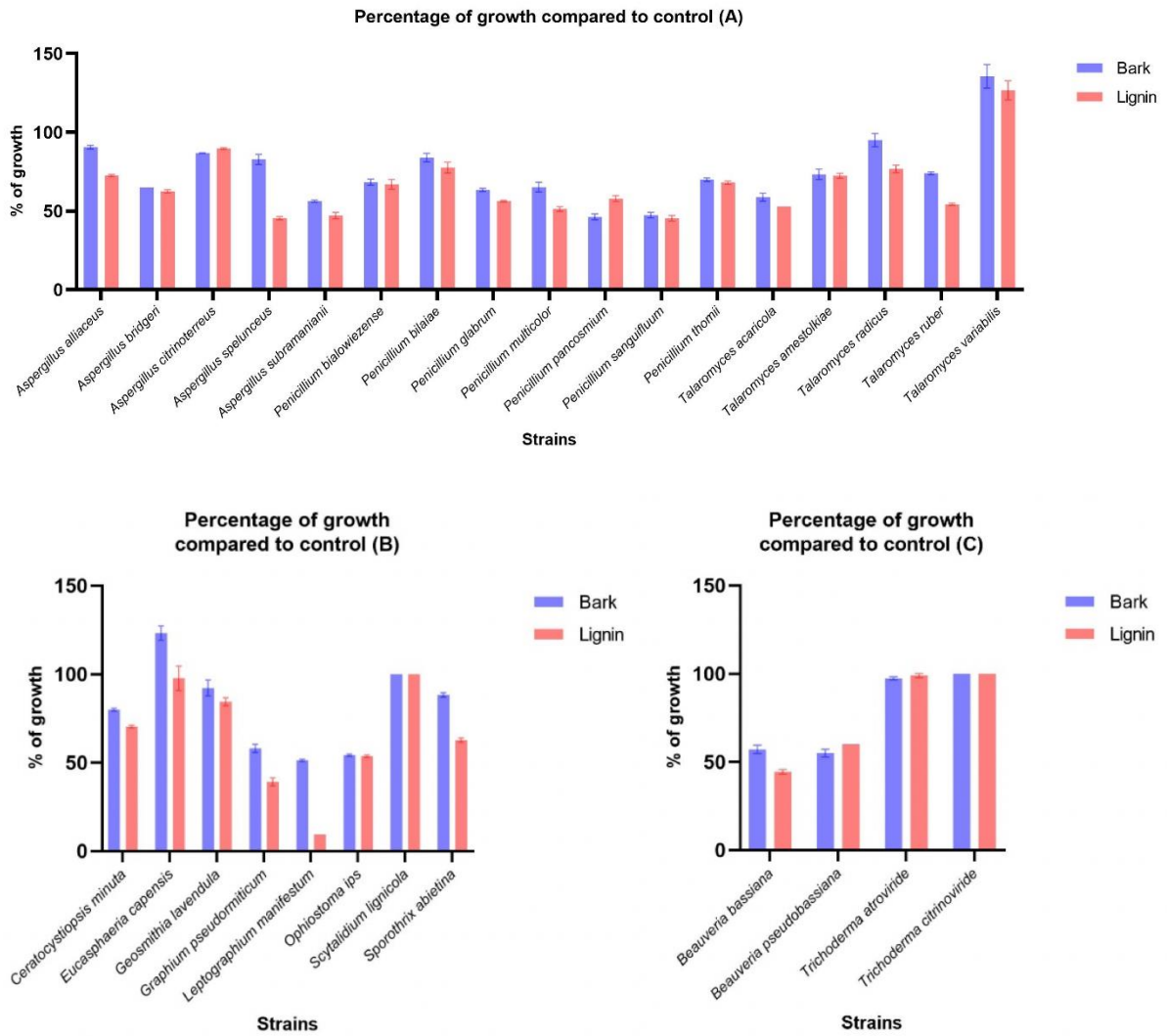
Although some xylophagous species showed similar or even greater growth rates compared to the control, two species showed poor growth (with growth rates of about 50% compared to YPDA) and *Leptographium manifestum* was the species with the lowest ability to grow on lignin-containing agar among all the isolated species. There were no significant differences in growth rates between xylophagous species and the other filamentous fungal species identified. Finally, all the yeast species were able to grow on lignin-containing liquid medium with growth rates comparable to those observed on YPD, but with great variations in triplicate experiments which led us to exclude them from the enzymatic study.

## Enzymatic activity

Laccases and peroxidases are known as lignin-modifying enzymes. In order to verify their production and to quantify their activity, enzyme assays were performed using OPD and ABTS as substrates for peroxidase and laccase activities, respectively. The results showed an increase in peroxidase and oxidase activities when the fungal species tested were grown in lignin- or bark powder-containing media compared to the control (Figure 4).

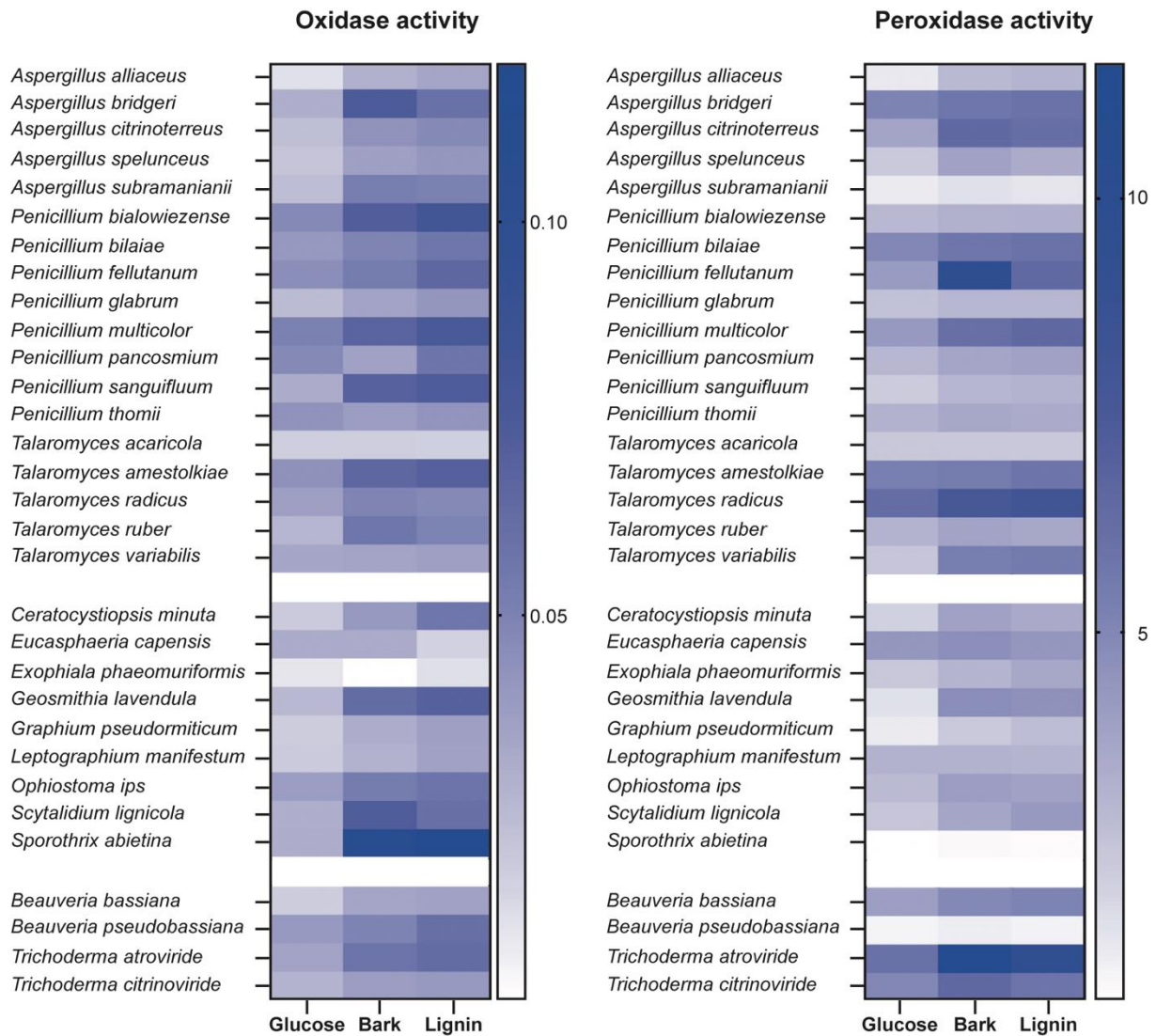
## Discussion

In order to understand the causes of decline in Aleppo pine forests in Algeria, bark beetles were collected every 15 days during a five-month period in three different forests in the North-Eastern region of the country (Moumeni *et al.*, 2021), and here we identified the fungal species associated with these insects. 37 fungal species were thus recovered from scolytids.



**Figure 3.** Percentage of growth in the bark and lignin-containing culture media compared to YPDA control.

A: saprophytic strains; B: xylophagous strains; C: entomopathogenic strains.



**Figure 4:** Oxidase and peroxidase activities.

Isolates considered as strictly saprophytic species, as xylophagous species or as entomopathogenic species were grown for 24 h in a synthetic culture medium containing glucose, bark or lignin as the sole carbon and energy source. Results are expressed in arbitrary units per mg dry weight.

The relationship between bark beetles and fungi was first reported decades ago (Hartig, 1878). Many fungal associates are known as forest pathogens or as causing discoloration of wood (Kirisits, 2007). Even though the relation between fungi and bark beetles is well known, some aspects of these associations are still unclear. Two primary groups of bark beetles may be distinguished, Ambrosia beetles and phloeophagous bark beetles, which differ in their living environment and the food their larvae are consuming (Hulcr and Stelinski, 2017). Ambrosia beetles use specific fungi to feed their larvae completely or partially (Batra, 1963) as opposed to phloeophagous bark beetles that feed on phloem tissues, located just under the bark. Nevertheless, there is also an intermediate group called phloeomycetophagous beetles that feed both on phloem and fungi (Francke-Grosmann 1952, 1966, 1967). Although the insect species studied here are close to some Ambrosia bark beetles, they are not considered as Ambrosia beetles in literature (Batra, 1963; Hulcr and Stelinski, 2017; Hulcr *et al.*, 2020).

The symbiotic relationship between fungi and bark beetles depend on their level of interdependence. Some fungi are entirely dependent on their host insects for spreading; this is the case for a particular group of fungi called ambrosia which cannot colonize new trees without the help of ambrosia beetles. Conversely, the association between fungi and bark beetles that invade the phloem of trees has been the subject of considerable debate. There are both supportive and opposing arguments regarding whether or not the insects and the fungi they carry are in a mutualistic relationship (Batra, 1963; Six, 2012; Biedermann and Vega, 2020; Hulcr *et al.*, 2020).

Fungi are also known to play an important role in the interactions between bark beetles and trees helping the insects to find weakened trees, as well as for protection of the insects against predators and competitors. Ambrosia bark beetles species cultivate fungi in specialized structures within the galleries they dig under the bark, using them as a food source and as a means of suppressing other fungi that may be harmful to their larvae. Other species carry fungi on their bodies or in specialized organs, using them to inoculate the trees and to feed from the degradation products of lignin or cellulose that are generated by the fungus.

One of the most important groups of fungi associated with phloeophagous bark beetles is the blue-staining fungi, which are known to cause discoloration of the sapwood (the central part of tree trunk) and to produce toxic compounds that can reduce the tree's ability to defend itself against beetle attacks. These fungi are also known to provide nutritional benefits to the beetles, as they can break down complex carbohydrates and other compounds in the sapwood of the trees, making them more accessible to the beetles.

Our results showed that *Ophiostoma*, *Ceratocystiopsis*, *Leptographium* and *Geosmithia* species are regular associates of phloem-feeding scolytids in Aleppo pine forests in Algeria. This relationship has been reported with different bark beetles in several European countries (Lieutier *et al.*, 1991; Paine *et al.*, 1997; Strzałka *et al.*, 2021; Jankowiak *et al.*, 2022). Likewise, *Ceratocystiopsis minuta*, *Geosmithia lavendula* and *Ophiostoma ips* are well known associates of scolytids in the mediterranean area; they have been isolated from several scolytid species and their abundance suggest that this association is widespread in Algeria (Kolařík *et al.*, 2007; Strzałka *et al.*, 2021). However, they have never been isolated from the bark beetles studied here. Regarding *G. lavendula*, Kolařík *et al.* (2007) reported this fungus from ambrosia beetle and found that it is a common associate of bark beetles, which is consistent with the ecology of the entire genus *Geosmithia*. The genus includes species that are exclusive associates of bark beetles, as well as species that have been found on other substrates, although less frequently.

*Ophiostoma ips* is an important fungal associate of bark beetles, playing a role in both the nutrition and defense of the beetles against competitors and pathogens. It was first isolated from *Ips calligraphus* (Rumbold, 1931) on several species of pine in the USA and has since been found in association with many other bark beetles in the Northern Hemisphere, including Europe and Asia. In the Southern Hemisphere, it has been reported in Australia from galleries of *Ips grandicollis* on *Pinus taeda* and in New Zealand from galleries of *P. elliotii* and *P. radiata*. The fungus has also been reported from South Africa, in association with *Orthotomicus erosus*, *Hylastes angustatus*, and *Hylurgops ligniperda* on several species of pine, and from Chile in association with *H. ligniperda* on *P. radiata* (De Beer *et al.*, 2004). In our study, *O. ips* was isolated from *O. erosus* as described in South Africa (De Beer *et al.*, 2004), and from *C. numidicus*. This suggests that *O. ips* has a broad geographic range and can be associated with a large variety of bark beetle species and pine species.

*Ceratocystis minuta* was first described by Siemaszko in 1939 from *Picea abies* infested by *Ips typographus* in Poland. Since this date, *C. minuta* has been found associated with a wide variety of conifer-infesting bark beetles in many parts of the world, including Europe, Asia, and North America and Chile (Kirisits, 2007). In South Africa, *C. minuta* has been found in association with *Hylastes angustatus* and *Hylurgus ligniperda* (De Beer *et al.*, 2004). Here we demonstrate that this xylophagous fungus may be associated with a wide variety of bark beetles species since we found this fungus on *O. erosus*, *C. numidicus*, *C. mediterraneus* and *T. destruens*.

*Leptographium manifestum* has been reported only in China from *Ips subelongatus* and *Polygraphus verricifrons* on *P. yunnanensis* and *Larix olgensis* (Paciura *et al.*,

2010; Liu *et al.*, 2017). The present study is the first report of the association of this fungus with *Crypturgus numidicus* and of its occurrence in Aleppo pine forests in the Mediterranean region.

*Graphium pseudormiticum* was first reported from *O. erosus* in south Africa (Mouton *et al.*, 1994). It was also isolated in China from *Tsuga dumos* tree infested by *Pissodes* sp. (Paciura *et al.*, 2010b), and in Europe from *Crypturgus*, *Dryocoetes*, *Hylurgops*, *Polygraphus*, *Trypodendron*, *Pityogenes* and *Ips* species on spruce, and from *Ips* and *Orthotomicus* species on pine trees in Germany (Kirschner, 1998). In this study *G. pseudormiticum* was isolated for the first time in Algeria, associated with *Orthotomicus erosus* or *Tomicus destruens*. Finally, most of the species here identified were isolated in association with more than one bark beetle species, suggesting that these fungi are not specifically adapted to a particular bark beetle species, but have a broad range of insect hosts.

The bark is primarily composed of lignin and the sapwood of cellulose and hemicellulose, while the phloem contains equal amounts of both types of components. All identified fungi were capable to grow on either bark or lignin and therefore capable to use them as a source of carbon for energy production. Considering the complex structure of lignin, a large macromolecule resulting from the polymerization of phenolic derivatives called monolignols (coniferylic acid, paracoumarylic acid and sinapylic acid), the involvement of several secreted enzymes such as laccases which are multicopper oxidases, and peroxidases is required for the initial steps of its extracellular degradation. As expected, culture of our fungal isolates on bark- or lignin-containing culture media resulted in an increase in the peroxidase and oxidase activities of the culture supernatant compared to those observed on YPD broth. Recently, similar results were reported for three *Scedosporium* species with a marked increase in oxidase and peroxidase activities when the fungal isolates were grown in the presence of lignin (Poirier *et al.*, 2022). Together these results suggest that, apart from some entomophagous fungi and some well known xylophagous species like *Ophiostoma*, *Ceratocystiopsis*, *Leptographium* and *Geosmithia* species which may allow the insects to attack living trees, the other fungal species here identified may be considered as saproxylophagous fungi, capable to degrade lignin, and therefore to allow the bark beetles to attack dead trees.

## References

- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, Hogg EH (Ted.), Gonzalez P, Fensham R, Zhang Z, Castro J, Demidova N, Lim JH, Allard G, Running SW, Semerci A, Cobb N, 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* 259, 660–684. DOI:10.1016/j.foreco.2009.09.001
- Allison JD, Redak RA, 2017. The impact of trap type and design features on survey and detection of bark and woodboring beetles and their associates: A review and meta-analysis. *Annual Review of Entomology* 62, 127–146. DOI:10.1146/annurev-ento-010715-023516
- Anderegg WRL, Hicke JA, Fisher RA, Allen CD, Aukema J, Bentz B, Hood S, Lichstein JW, Macalady AK, Mcdowell N, Pan Y, Raffa K, Sala A, Shaw JD, Stephenson NL, Tague C, Zeppel M, 2015. Tree mortality from drought, insects, and their interactions in a changing climate. *New Phytologist* 208, 674–683. DOI:10.1111/NPH.13477
- Batra LR, 1963. Ecology of Ambrosia fungi and their dissemination by beetles. *Transactions of the Kansas Academy of Science (1903-)* 66, 213–236. DOI:10.2307/3626562
- Biedermann PHW, Vega FE, 2020. Ecology and evolution of insect-fungus mutualisms. *Annual Review of Entomology* 65, 431–455. DOI:10.1146/annurev-ento-011019-024910
- Cale JA, Klutsch JG, Dykstra CB, Peters B, Erbilgin N, 2019. Pathophysiological responses of pine defensive metabolites largely lack differences between pine species but vary with eliciting ophiostomatoid fungal species. *Tree Physiology* 39(7), 1121–1135. DOI:10.1093/treephys/tpz012
- Chabasse D, Pihet M, Bouchara JP, 2009. Émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine : revue générale. *Revue Francophone des Laboratoires* 2009, 71–86. DOI:10.1016/S1773-035X(09)70253-9
- Cudmore TJ, Björklund N, Carroll AL, Staffan Lindgren B, 2010. Climate change and range expansion of an aggressive bark beetle: evidence of higher beetle reproduction in naïve host tree populations. *Journal of Applied Ecology* 47, 1036–1043. DOI:10.1111/j.1365-2664.2010.01848.x
- Davi H, Durand-Gillmann M, Damesin C, Delzon S, Petit C, Rozenberg P, Sabatier SA, Chadœuf J, Boutte B, Boivin T, 2020. Distribution of endemic bark beetle attacks and their physiological consequences on *Pinus halepensis*. *Forest Ecology and Management* 469, 118187. DOI:10.1016/j.foreco.2020.118187
- De Beer ZW, Wingfield B, Zhou X, 2004. Fungal Diversity *Ophiostoma* and *Ceratocystiopsis* spp. associated with two pine-infesting bark beetles in Chile. *Fungal Diversity* 15, 261–274. DOI:https://doi.org/10.1017/S0953756204009918
- Dobbertin M, Wermelinger B, Bigler C, Bürgi M, Carron M, Forster B, Gimmi U, Rigling A, 2007. Linking increasing drought stress to scots pine mortality and bark beetle infestations. *TheScientificWorldJournal* 7(suppl 1), 231–239. DOI:10.1100/tsw.2007.58



- Glass NL, Donaldson GC, 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1323–1330. DOI:10.1128/AEM.61.4.1323-1330.1995
- Guit B, Nedjimi B, Chakali G, Guibal F, 2016. État sanitaire des peuplements de pin d'Alep (*Pinus halepensis* MILL.) Dans le massif forestier de Senalba (Djelfa, Algérie). *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 71, 156–167.
- Hartig R, 1878. *Die Zersetzungserscheinungen des Holzes, der Nadelb.* ed. Berlin.
- Hulcr J, Barnes I, De Beer ZW, Duong TA, Gazis R, Johnson AJ, Jusino MA, Kasson MT, Li Y, Lynch S, Mayers C, Musvuugwa T, Roets F, Seltmann KC, Six D, Vanderpool D, Villari C, 2020. Bark beetle mycobiome: collaboratively defined research priorities on a widespread insect-fungus symbiosis. *Symbiosis* 81, 101–113. DOI:10.1007/s13199-020-00686-9
- Hulcr J, Stelinski LL, 2017. The Ambrosia symbiosis: From evolutionary ecology to practical management. *Annual Review of Entomology* 62, 285–303. DOI:10.1146/annurev-ento-031616-035105
- Jakoby O, Lischke H, Wermelinger B, 2019. Climate change alters elevational phenology patterns of the European spruce bark beetle (*Ips typographus*). *Global Change Biology* 25, 4048–4063. DOI:10.1111/GCB.14766
- Jankowiak R, Solheim H, Bilański P, Mukhopadhyay J, Hausner G, 2022. *Ceratocystiopsis* spp. associated with pine- and spruce-infesting bark beetles in Norway. *Mycological Progress* 21, 61. DOI:10.1007/s11557-022-01808-x
- Kirisits T, 2007. Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi, in: Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire JC, Evans HF (Eds), *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Springer Dordrecht, The Netherlands, pp. 181–236. DOI:10.1007/978-1-4020-2241-8\_10
- Kolařík M, Kostovčík M, Pažoutová S, 2007. Host range and diversity of the genus *Geosmithia* (Ascomycota: Hypocreales) living in association with bark beetles in the Mediterranean area. *Mycological Research* 111, 1298–1310. DOI:10.1016/j.mycres.2007.06.010
- Koneman WE, Roberts GD, 1986. *Practical Laboratory Mycology, Third Edition.*, The Williams & Wilkins Co., John Wiley & Sons, Ltd, Baltimore. DOI:10.1002/JOBM.3620260509
- Kurz WA, Dymond CC, Stinson G, Rampley GJ, Neilson ET, Carroll AL, Ebata T, Safranyik L, 2008. Mountain pine beetle and forest carbon feedback to climate change. *Nature* 452, 987–990. DOI:10.1038/nature06777
- Lieutier François, Garcia J, Yart Annie, Vouland Gerard, Pettinetti Maurice, Morelet M, Lieutier F, Yart A, Vouland G, Pettinetti M, 1991. Ophiostomales (Ascomycètes) associées à *Ips acuminatus* Gyll (Coleoptera : Scolytidae) sur le pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) dans le sud-est de la France et comparaison avec *Ips sexdentatus* Boern. *Agronomie* 11, 807–817.
- Liu XW, Wang HM, Lu Q, Decock C, Li YX, Zhang XY, 2017. Taxonomy and pathogenicity of *Leptographium* species associated with *Ips subelongatus* infestations of *Larix* spp. in northern China, including two new species. *Mycological Progress* 16, 1–13. DOI:10.1007/s11557-016-1245-1

- Massoumi Alamouti S, Tsui CKM, Breuil C, 2009. Multigene phylogeny of filamentous ambrosia fungi associated with ambrosia and bark beetles. *Mycological Research* 113, 822–835. DOI:10.1016/J.MYCRES.2009.03.003
- Paciura D, de Beer Z, Jacobs K, Zhou XD, Ye H, Wingfield MJ, 2010a. Eight new *Leptographium* species associated with tree-infesting bark beetles in china. *Persoonia* 25, 94–108. DOI:10.3767/003158510X551097
- Paciura D, Zhou XD, De Beer ZW, Jacobs K, Ye H, Wingfield MJ, 2010b. Characterisation of synnematosus bark beetle-associated fungi from China, including *Graphium carbonarium* sp. nov. *Fungal Diversity* 40, 75–88. DOI:10.1007/s13225-009-0004-x
- Paine TD, Raffa KF, Harrington TC, 1997. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Review of Entomology* 42, 179–206. DOI:10.1146/annurev.ento.42.1.179
- Six DL, 2012. Ecological and evolutionary determinants of bark beetle —fungus symbioses. *Insects* 3, 339–366. DOI:10.3390/insects3010339
- Six DL, Wingfield MJ, 2011. The role of phytopathogenicity in bark beetle-fungus symbioses: A challenge to the classic paradigm. *Annual Review of Entomology* 56, 255–272. DOI:10.1146/annurev-ento-120709-144839
- Strzałka B, Kolařík M, Jankowiak R, 2021. *Geosmithia* associated with hardwood-infesting bark and ambrosia beetles, with the description of three new species from Poland. *Antonie van Leeuwenhoek* 114, 169–194. DOI:10.1007/s10482-020-01510-6
- Vega FE, Hofstetter RW, 2015. *Bark beetles biology and ecology of native and invasive species*. Academic Press, 620 pp.
- Vicente-Serrano SM, Lasanta T, Gracia C, 2010. Aridification determines changes in forest growth in *Pinus halepensis* forests under semiarid Mediterranean climate conditions. *Agricultural and Forest Meteorology* 150, 614–628. DOI:10.1016/J.AGRFORMET.2010.02.002
- Viiri H, Lieutier F, 2004. Ophiostomatoid fungi associated with the spruce bark beetle, *Ips typographus*, in three areas in France. *Annals of Forest Science* 61, 215–219. DOI:10.1051/forest:2004013i

**Supplemental Table : Species identification of fungal isolates recovered from the insects studied.**

Isolate type	Species identification	Similarity with isolate number	Host insect species	Sampling coordinates	Location	Sampling date (dd/mm/yyyy)	Reference strain	ITS sequencing Query coverage (%)	ITS sequencing Identity (%)	BT2 sequencing Query coverage (%)	BT2 sequencing Identity (%)	CAL sequencing Query coverage (%)	CAL sequencing Identity (%)
1	<i>Talaromyces ruber</i>	3	<i>Crypturgus numidicus</i>	35°46'13.5N 5°04'10.9E	Boutaleb	06/07/2017	<i>Talaromyces ruber</i> CBS 196.88	97.98	100	100	100	/	/
2	<i>Trichoderma atroviride</i>	21	<i>Orthomicus erosus</i>	35°46'45.1N 5°05'59.4E	Ouled Tebben	28/05/2017	<i>Trichoderma atroviride</i> isolate NTOUJ 4219	100	100	/	/	/	/
3	<i>Talaromyces ruber</i>	1	<i>Crypturgus numidicus</i>	35°44'17.5N 5°21'45.4E	Ouled Tebben	05/08/2017	<i>Talaromyces ruber</i> CBS 196.88	97.98	100	100	100	/	/
			<i>Crypturgus mediterraneus</i>	35°46'09.0N 5°05'30.0E	Ouled Tebben	28/05/2017							
4	<i>Penicillium bielowiezense</i>	30	<i>Aphanommata filum</i>	35°44'19.3N 5°21'51.5E	Boutaleb	05/08/2017	<i>Penicillium bielowiezense</i> CBS Z27.28	99.93	100	/	/	/	/
5	<i>Penicillium glabrum</i>	8, 11, 13, 34, 35, 41, 51	<i>Orthomicus erosus</i>	35°48'34"N 5°05'53"E	Boutaleb	04/09/2017	<i>Penicillium glabrum</i> CBS 105.11	98	99.8	/	/	/	/
			<i>Crypturgus mediterraneus</i>	35°44'07.2N 5°15'19.0E	Boutaleb	19/07/2017							
6	<i>Penicillium bilaiae</i>	33	<i>Crypturgus numidicus</i>	35°48'21.0"N 5°05'36.0"E	Ouenougha	13/08/2017	<i>Penicillium bilaiae</i> CBS 330.95	92.82	99.8	/	/	/	/
			<i>Hylurgus ligniperda</i>	36°10'06.0"N 4°13'06.0"E	Ouenougha	23/08/2017							
7	<i>Penicillium sanguiiflum</i>	18	<i>Crypturgus numidicus</i>	36°08'10.5N 4°12'45.2E	Ouenougha	09/07/2017	<i>Penicillium sanguiiflum</i> CBS 127029	95.79	99.5	94.08	99.80	/	/
8	<i>Penicillium glabrum</i>	5, 11, 13, 34, 35, 41, 51	<i>Hylurgus micklitz</i>	35°44'17.5N 5°21'45.4E	Boutaleb	05/08/2017	<i>Penicillium glabrum</i> NRRL 66390	/	/	100	98.20	/	/
			<i>Aphanommata filum</i>	35°44'21.8N 5°21'31.3E	Boutaleb	05/08/2017	<i>Penicillium glabrum</i> CBS 229.28	100	100	94.41	98.1	/	/
9	<i>Aspergillus subramanii</i>	68	<i>Aphanommata filum</i>	35°45'39.8N 5°17'58.0E	Boutaleb	08/06/2017	<i>Aspergillus subramanii</i> NRRL 6161	91.21	99.8	94.77	99.6	/	/
10	<i>Trichoderma citrinoviride</i>		<i>Crypturgus numidicus</i>	35°46'13.5N 5°04'10.9E	Ouled Tebben	06/07/2017	<i>Trichoderma citrinoviride</i> CBS 130683	96.78	99.5	/	/	/	/
			<i>Crypturgus mediterraneus</i>	35°46'11.1N 5°04'07.5E	Ouled Tebben	06/07/2017							
			<i>Hylurgus micklitz</i>	35°45'49.0"N 5°03'59.0"E	Ouled Tebben	06/07/2017							
11	<i>Penicillium glabrum</i>	5, 8, 13, 34, 35, 41, 51	<i>Orthomicus erosus</i>	36°09'48.2"N 4°12'25.4"E	Ouenougha	23/08/2017	<i>Penicillium glabrum</i> CBS 229.28	100	100	/	/	/	/
			<i>Hylurgus ligniperda</i>	36°08'46.0"N 4°12'45.0"E	Ouenougha	23/08/2017							
13	<i>Penicillium glabrum</i>	5, 8, 11, 34, 35, 41, 51	<i>Crypturgus numidicus</i>	36°09'33.3"N 4°12'07.0"E	Ouenougha	10/08/2017	<i>Penicillium glabrum</i> CBS 229.28	100	100	/	/	/	/
			<i>Hylurgus ligniperda</i>	36°10'06.0"N 4°13'06.0"E	Ouenougha	23/08/2017							
14	<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Hylurgus micklitz</i>	35°44'17.5N 5°21'45.4E	Boutaleb	05/08/2017	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957	92.54	100	99.82	99.4	/	/
			<i>Crypturgus mediterraneus</i>	35°44'17.5N 5°21'45.4E	Boutaleb	05/08/2017	<i>Aspergillus flavus</i> CBS 126857	97.75	100	/	/	/	/
15	<i>Penicillium multicolor</i>	23, 39, 43	<i>Crypturgus mediterraneus</i>	35°44'17.5N 5°21'45.4E	Boutaleb	05/08/2017	<i>Penicillium multicolor</i> CBS 501.73	90.73	99.8	99.79	100	/	/
16	<i>Ceratocystopsis minuta</i>	40	<i>Orthomicus erosus</i>	35°46'11.1N 5°04'07.5E	Ouled Tebben	06/07/2017	<i>Ceratocystopsis minuta</i> CBS 116963	99.84	98	/	/	/	/
			<i>Crypturgus numidicus</i>	35°44'34.0N 5°17'18.4E	Boutaleb	05/07/2017							
			<i>Crypturgus mediterraneus</i>	35°44'46.5N 5°17'33.9E	Boutaleb	05/07/2017							

17	<i>Sporothrix abietina</i> ( <i>Ophiostoma abietinum</i> )	67			36°08'02.6N 4°12'36.8E	Ouenougha	09/07/2017	<i>Sporothrix abietina</i> CBS 125.89	99.44	99.1	80.59	98.2	/	/
18	<i>Penicillium sanguifluum</i>	7			35°46'59.9N 5°03'52.0E	Ouled Tebben	22/07/2017	<i>Penicillium sanguifluum</i> CBS 110.64	99.83	99.5	/	/	/	/
19	<i>Aspergillus citrinoterreus</i>	49			35°46'45.0"N 5°05'30.0"E	Ouled Tebben	13/08/2017	<i>Aspergillus citrinoterreus</i> DTO 434-D2	/	/	/	/	100	99.4
20	<i>Penicillium fellutanum</i>				35°45'11.9N 5°18'40.0E	Boutaleb	08/06/2017	<i>Penicillium fellutanum</i> CBS 152.45	100	99.8	/	/	/	/
21	<i>Trichoderma afroviride</i>	2			36°08'02.6N 4°12'36.8E	Ouenougha	09/07/2017	<i>Trichoderma afroviride</i> NTOU 4219	100	100	/	/	/	/
22	<i>Geosmithia lavendula</i>				35°47'11.0"N 5°04'34.0"E	Ouled Tebben	22/07/2017	<i>Geosmithia lavendula</i> NRRL 2146	92.9	99.8	/	/	/	/
					35°44'58.0"N 5°19'19.0"E	Boutaleb	24/05/2017							
					35°45'21.6N 5°19'23.9E	Boutaleb	24/05/2017							
23	<i>Penicillium multicolor</i>	15, 39, 43			35°45'49.0"N 5°03'59.0"E	Ouled Tebben	06/07/2017	<i>Penicillium multicolor</i> CBS 501.73	92.45	99.8	/	/	/	/
25	<i>Talaromyces variabilis</i>	29			35°44'34.0N 5°17'18.4E	Boutaleb	05/07/2017	<i>Talaromyces variabilis</i> AS3.15840	/	/	93.1	97.3	/	/
								<i>Talaromyces variabilis</i> NRRL 2125	92.98	99.8	/	/	/	/
26	<i>Beauveria pseudobassiana</i>				35°45'22.0N 5°18'37.1E	Boutaleb	24/05/2017	<i>Beauveria pseudobassiana</i> NREP103	74.73	100	/	/	/	/
					35°47'00.1N 5°06'27.5E	Ouled Tebben	28/05/2017							
27	<i>Aspergillus bridgeri</i>				35°47'00.1N 5°06'27.5E	Ouled Tebben	28/05/2017	<i>Aspergillus bridgeri</i> CBS 128324	96.05	99.7	/	/	/	/
28	<i>Aspergillus alliaceus</i>				35°45'39.8N 5°17'58.0E	Boutaleb	08/06/2017	<i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL 4181	/	/	92.87	99.6	/	/
								<i>Aspergillus alliaceus</i> CBS 132.161	96.78	100	/	/	/	/
29	<i>Talaromyces variabilis</i>	25			35°45'51.7N 5°17'43.5E	Boutaleb	08/06/2017	<i>Talaromyces variabilis</i> NRRL 2125	92.98	99.8	/	/	/	/
30	<i>Penicillium bialowiezense</i>	4			35°46'16.3N 5°04'25.5E	Ouled Tebben	25/06/2017	<i>Penicillium bialowiezense</i> CBS 227.28	99.84	99.8	/	/	/	/
31	<i>Penicillium pancosmium</i>				35°44'51.7N 5°17'30.4E	Boutaleb	05/07/2017	<i>Penicillium pancosmium</i> CBS 118018	/	/	89	100	/	/
								<i>Penicillium pancosmium</i> CBS 276.75	99.82	99.8	/	/	/	/
32	<i>Scytalidium lignicola</i>				35°45'11.9N 5°18'40.0E	Boutaleb	08/06/2017	<i>Scytalidium lignicola</i> CBS 125602	97.76	94	/	/	/	/
					35°44'17.5N 5°21'45.4E	Boutaleb	05/08/2017							
33	<i>Penicillium bilaiae</i>	6			35°46'59.5N 5°04'08.4E	Ouled Tebben	22/07/2017	<i>Penicillium bilaiae</i> CBS 330.95	95.08	99.8	/	/	/	/
34	<i>Penicillium glabrum</i>	5, 8, 11, 13, 35, 41, 51			36°09'11.0N 4°12'31.0E	Ouenougha	13/06/2017	<i>Penicillium glabrum</i> CBS 229.28	99.83	99.8	/	/	/	/
35	<i>Penicillium glabrum</i>	5, 8, 11, 13, 34, 41, 51			35°44'17.5N 5°21'45.4E	Boutaleb	05/08/2017	<i>Penicillium glabrum</i> CBS 127705	100	100	/	/	/	/
36	<i>Ophiostoma ips</i>	48			35°44'46.5N 5°17'33.9E	Boutaleb	05/07/2017	<i>Ophiostoma ips</i> strain CXY1639	98.29	99.7	/	/	/	/

37	<i>Talaromyces amestolkiae</i>					Orthomicus erosus <i>Crypturgus numidicus</i>	36°07'48.0"N 4°12'32.0"E	5°14'40.23N 5°14'44.5E	Boutaleb Ouenougha	19/07/2017 09/07/2017	<i>Talaromyces amestolkiae</i> CBS 365.48	98.03	98.3	/	/	/	/
38	<i>Talaromyces radicus</i>					<i>Aphanonmata filum</i>	35°45'22.0N 5°18'37.1E	35°45'22.0N 5°18'37.1E	Boutaleb	24/05/2017	<i>Talaromyces radicus</i> NRRL 29340	/	/	100	99.8	/	/
39	<i>Penicillium multicolor</i>	15, 23, 43				<i>Crypturgus numidicus</i>	35°44'34.0N 5°17'18.4E	35°44'34.0N 5°17'18.4E	Boutaleb	05/07/2017	<i>Penicillium multicolor</i> CBS 501.73	96.23	96.6	/	/	/	/
40	<i>Ceratocystopsis minuta</i>	16				<i>Orthomicus erosus</i> <i>Tomicus destruens</i>	36°09'27.7N 4°12'25.1E	36°09'27.7N 4°12'25.1E	Ouenougha Ouenougha	23/07/2017 26/06/2017	<i>Ceratocystopsis minuta</i> CBS 116963	100	98.4	/	/	/	/
41	<i>Penicillium glabrum</i>	5, 8, 11, 13, 34, 35,51				<i>Crypturgus mediterraneus</i>	35°46'59.5N 5°04'08.4E	35°46'59.5N 5°04'08.4E	Ouled Tebben	22/07/2017	<i>Penicillium glabrum</i> CBS 127705	100	100	/	/	/	/
43	<i>Penicillium multicolor</i>	15, 23, 39				<i>Orthomicus erosus</i>	35°44'51.7N 5°17'30.4E	35°44'51.7N 5°17'30.4E	Boutaleb	05/07/2017	<i>Penicillium multicolor</i> CBS 501.73	94.95	99.6	/	/	/	/
44	<i>Beauveria bassiana</i>					<i>Aphanonmata filum</i> <i>Hylurgus micklizi</i>	35°44'33.6N 5°17'15.7E	35°44'33.6N 5°17'15.7E	Boutaleb Boutaleb	05/07/2017 05/08/2017	<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 20872	100	100	/	/	/	/
46	<i>Talaromyces ruber</i>					<i>Orthomicus erosus</i>	35°44'46.5N 5°17'33.9E	35°44'46.5N 5°17'33.9E	Boutaleb	05/07/2017	<i>Talaromyces ruber</i> ATCC 10520	/	/	100	100	/	/
47	<i>Talaromyces acaricola</i>					<i>Tomicus destruens</i>	36°08'10.5N 4°12'45.2E	36°08'10.5N 4°12'45.2E	Ouenougha	09/07/2017	<i>Talaromyces acaricola</i> NRRL 35250	/	/	91.16	99.8	/	/
48	<i>Ophiostoma ips</i>	36				<i>Crypturgus numidicus</i> <i>Orthomicus erosus</i>	36°09'07.0N 4°12'08.0E	36°09'07.0N 4°12'08.0E	Ouenougha Boutaleb	13/06/2017 19/08/2017	<i>Ophiostoma ips</i> CCMA333	100	99.8	/	/	/	/
49	<i>Aspergillus citrinoterreus</i>	19				<i>Orthomicus erosus</i>	35°46'53.8N 5°06'29.9E	35°46'53.8N 5°06'29.9E	Ouled Tebben	28/05/2017	<i>Aspergillus citrinoterreus</i> QCC-M015/17	99.02	99.7	/	/	/	/
50	<i>Aspergillus spelunceus</i>	54				<i>Orthomicus erosus</i>	35°45'37.1N 5°18'32.8E	35°45'37.1N 5°18'32.8E	Boutaleb	19/08/2017	<i>Aspergillus spelunceus</i> NRRL 4989	95.57	99.6	/	/	/	/
51	<i>Penicillium glabrum</i>	5, 8, 11, 13, 34, 35, 41				<i>Crypturgus numidicus</i>	36°07'58.0"N 4°12'28.0"E	36°07'58.0"N 4°12'28.0"E	Ouenougha	05/06/2017	<i>Penicillium glabrum</i> CBS 229.28	100	100	/	/	/	/
52	<i>Eucasphaeria capensis</i>					<i>Hylurgus ligniperda</i>	36°10'06.0"N 4°13'06.0"E	36°10'06.0"N 4°13'06.0"E	Ouenougha	23/08/2017	<i>Eucasphaeria capensis</i> OUCMBI101085	97.61	100	/	/	/	/
53	<i>Leptographium manifestum</i>					<i>Crypturgus numidicus</i>	36°07'43.8N 4°12'46.7E	36°07'43.8N 4°12'46.7E	Ouenougha	26/06/2017	<i>Leptographium manifestum</i> CBS 123604	100	99.5	/	/	/	/
54	<i>Aspergillus spelunceus</i>	50				<i>Orthomicus erosus</i>	35°45'37.1N 5°18'32.8E	35°45'37.1N 5°18'32.8E	Boutaleb	19/08/2017	<i>Aspergillus spelunceus</i> NRRL 4989	95.61	99.8	/	/	/	/
55	<i>Penicillium thomii</i>					<i>Aphanonmata filum</i>	35°45'27.4N 5°18'33.8E	35°45'27.4N 5°18'33.8E	Boutaleb	22/06/2017	<i>Penicillium thomii</i> CBS 140.72	99.83	99.2	/	/	/	/
56	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	57				<i>Crypturgus numidicus</i>	35°46'21.0"N 5°05'36.0"E	35°46'21.0"N 5°05'36.0"E	Ouenougha	13/08/2017	<i>Talaromyces amestolkiae</i> NRRL 62294	/	/	100	96.7	/	/
57	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	56				<i>Crypturgus numidicus</i>	36°07'58.0"N 4°12'28.0"E	36°07'58.0"N 4°12'28.0"E	Ouenougha	05/06/2017	<i>Talaromyces amestolkiae</i> CBS 365.48	100	99.5	/	/	/	/

58	<i>Exophiala praeorniturformis</i>		<i>Crypturgus numidicus</i>	36°08'02.6N 4°12'36.8E	Ouenougha	09/07/2017	<i>Exophiala praeorniturformis</i> EXF-9028	61.64	94	/	/	/	/
59	<i>Cyberlindnera mississippiensis</i>		<i>Orthomicus erosus</i>	35°44'46.5N 5°17'33.9E	Boutaleb	05/07/2017	<i>Cyberlindnera mississippiensis</i> CBS 5837	99.68	99.4	/	/	/	/
60	<i>Yamadazyma mexicana</i>		<i>Crypturgus numidicus</i>	35°44'17.5N 5°21'31.3E	Boutaleb	05/08/2017	<i>Yamadazyma mexicana</i> CBS 6023	100	99.7	/	/	/	/
61	<i>Cyberlindnera mississippiensis</i>		<i>Hylurgus ligniperda</i>	36°09'46.0N 4°12'45.0E	Ouenougha	23/08/2017							
			<i>Orthomicus erosus</i>	36°08'02.6N 4°12'36.8E	Ouenougha	09/07/2017	<i>Cyberlindnera mississippiensis</i> CBS 7023	99.84	98.9	/	/	/	/
			<i>Crypturgus numidicus</i>	36°07'57.4N 4°12'42.8E	Ouenougha	09/07/2017							
62	<i>Ogataea zsoitii</i>		<i>Orthomicus erosus</i>	35°44'17.5N 5°21'45.4E	Boutaleb	05/08/2017	<i>Ogataea zsoitii</i> NBRC 101079	92.1	98.2	/	/	/	/
			<i>Hylurgus micklitz</i>	35°45'37.1N 5°18'32.8E	Boutaleb	19/08/2017							
			<i>Tomiscus destruens</i>	35°44'58.0N 5°19'19.0E	Boutaleb	24/05/2017							
63	<i>Priceomyces medius</i> (type 1)		<i>Aphanominata filum</i>	35°45'39.8N 5°17'58.0E	Boutaleb	08/06/2017	<i>Priceomyces medius</i> CBS :5520	96.5	99.8	/	/	/	/
			<i>Orthomicus erosus</i>	35°47'11.0N 5°04'34.0E	Ouled Tebben	22/07/2017	<i>Priceomyces medius</i> CBS:5520	96.07	99.4	/	/	/	/
64	<i>Priceomyces medius</i> (type 2)		<i>Crypturgus numidicus</i>	35°47'11.0N 5°04'34.0E	Ouled Tebben	22/07/2017							
			<i>Crypturgus mediterraneus</i>	35°47'11.0N 5°04'34.0E	Ouled Tebben	22/07/2017							
65	<i>Yamadazyma scolyti</i>		<i>Orthomicus erosus</i>	35°44'02.3N 5°14'44.5E	Boutaleb	19/07/2017	<i>Yamadazyma scolyti</i> CBS 5731	96.17	98.9	/	/	/	/
			<i>Crypturgus numidicus</i>	35°44'17.5N 5°21'31.3E	Boutaleb	05/08/2017							
66	<i>Ogataea zsoitii</i>		<i>Hylurgus micklitz</i>	35°45'37.1N 5°18'32.8E	Boutaleb	19/08/2017	<i>Ogataea zsoitii</i> NBRC 101079	95.88	99.4	/	/	/	/
			<i>Crypturgus numidicus</i>	35°45'37.1N 5°18'32.8E	Boutaleb	19/08/2017							
67	<i>Sporothrix abietina</i> ( <i>Ophiostoma abietinum</i> )	17	<i>Orthomicus erosus</i>	36°09'07.0N 4°12'08.0E	Ouenougha	13/06/2017	<i>Sporothrix cf. abietina</i> 764RJ	100	100	/	/	/	/
68	<i>Aspergillus subramanianii</i>	9	<i>Orthomicus erosus</i>	35°47'11.0N 5°04'34.0E	Ouled Tebben	22/07/2017	<i>Aspergillus subramanianii</i> NRRL 6161	90.94	100	/	/	/	/
69	<i>Graphium pseudomiticum</i>		<i>Orthomicus erosus</i>	35°46'34"N 5°05'53"E	Boutaleb	04/09/2017	<i>Graphium pseudomiticum</i> CMW 503	100	100	/	/	/	/
			<i>Tomiscus destruens</i>	35°46'09.0N 5°05'30.0E	Boutaleb	28/05/2017							

### Étude 3: Caractérisation de la réponse transcriptionnelle de *Ceratocystiopsis minuta* et *Aspergillus citrinoterreus* en culture sur écorce de pin ou lignine

*Ceratocystiopsis minuta* est un champignon reconnu pour sa capacité pathogène sur les pins d'Alep. Il est souvent associé aux scolytes, des insectes qui creusent des galeries dans l'écorce des arbres. Ce champignon appartient à la famille des Ophiostomataceae, un groupe de champignons couramment désignés sous le nom d'agents de bleuissement. Ces champignons sont transportés par les scolytes et se développent dans les tissus du bois, ce qui peut entraîner la mort ou l'affaiblissement des arbres.

Ce groupe de champignons est réputé pour son ensemble d'enzymes capables de neutraliser les mécanismes de défense des pins. Bien que *Ceratocystiopsis minuta* soit relativement peu étudié, il est indiscutable qu'il possède des enzymes qui lui confèrent la capacité de coloniser les arbres. Cette étude vise à comparer l'arsenal enzymatique de *Ceratocystiopsis minuta* à celui d'*Aspergillus citrinoterreus*, un champignon saprophyte, dont l'isolement dans notre étude précédente pourrait traduire un caractère saproxylophage. Les deux espèces sont capables de dégrader la lignine, un composant structural majeur du bois. Cependant, elles utilisent des ensembles de gènes différents pour le faire.

L'analyse du transcriptome a été réalisée par séquençage des ARN totaux pour identifier les gènes qui sont exprimés de manière différentielle par les deux espèces lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux contenant de la poudre d'écorce de b33ois ou de la lignine comme seule source de carbone.

En culture sur écorce de pin, nous avons constaté que *A. citrinoterreus* exprime un plus grand nombre de gènes impliqués dans la dégradation de la cellulose que *C. minuta*. En outre, les deux champignons surexpriment des gènes impliqués dans les voies inférieures de la dégradation de la lignine.

Cette étude fournit de nouvelles informations sur l'arsenal enzymatique de *C. minuta* et *A. citrinoterreus*, et ainsi sur les mécanismes de pathogénicité de *C. minuta*. Ils suggèrent que cette espèce est capable de dégrader la lignine, ce qui lui permet de pénétrer et de se propager dans le bois. Ces connaissances pourraient donc être utilisées pour développer de nouvelles stratégies de lutte contre ce champignon pathogène. Néanmoins, la production d'enzymes de détoxification ou d'autres

composés qui permettent de contourner les défenses de l'hôte pourrait également jouer un rôle dans sa pathogénicité.

## Introduction

Aleppo pine (*Pinus halepensis*) is a prominent and ecologically important tree species in the Mediterranean ecosystems (Ne'eman and Trabaud, 2000 ; Le Houérou, 2005). It is known for its adaptability to various environmental conditions, making it a key component of these ecosystems (Lloret *et al.*, 2012). In Algeria, Aleppo pine forests have been negatively affected by climate change, particularly by heatwaves and prolonged drought periods (Veuillen *et al.*, 2023). These extreme climatic events increase tree stress and vulnerability to pests and diseases (Allen *et al.*, 2010). In recent years, one of the major concerns was the infestation by xylophagous insects, which can further exacerbate tree stress and ultimately lead to tree mortality (Raffa *et al.*, 2008 ; Colombari *et al.*, 2013). Bark beetles belonging to the Curculionidae family and the Scolytinae subfamily are a widespread type of insects that colonize Aleppo pine trees. These insects live in close association with diverse microorganisms, including some yeasts and filamentous fungi (Six and Wingfield, 2011). To weaken and colonize trees, some bark beetles rely on fungi, which are carried by the beetles in specialized structures called mycangia and introduced into the tree when the insects burrow into the bark to lay their eggs. These fungal phytopathogens, called Ophiostomoid fungi, can exacerbate the damage caused by the beetles and thus contribute to forest decline (Jankowiak, 2005 ; Klepzig *et al.*, 2009).

Ophiostomatoid fungi are a group of Ascomycetes that include many tree pathogens like *Ophiostoma*, *Leptographium*, and *Ceratocystiopsis* species. Several species in this group are responsible for serious diseases of pine trees worldwide. One of the most notorious is *Grosmannia clavigera*, which causes blue staining disease (Plattner *et al.*, 2008). After the inoculation by bark beetles into the bark, these fungi spread through the sapwood, disrupting water transport and leading to the death of the tree. Other ophiostomatoid fungi that affect pines include *Ophiostoma ips*, which causes pine wilt disease (Vicente *et al.*, 2022), as well as *Ceratocystiopsis* species, and *Ophiostoma novo-ulmi*, which causes Dutch elm disease but can also infect pine trees (Brasier, 1991). These fungi have evolved close symbiotic relationships with their bark beetle vectors, relying on them to spread spores between trees; they produce sticky spores which adhere to the insect cuticle, and by this way their spores are transmitted from an infected pine tree to a new tree. This mechanism allows an efficient dispersal of these fungi, enabling them to spread rapidly and to devastate pine forests. In a recent study, we aimed to characterize the fungal associates of six important bark beetle species in the semi-arid regions of Eastern Algeria: *Tomicus detruens*, *Orthotomicus erosus*, *Crypturgus numidicus*, *Crypturgus mediterraneus*, *Hylurgus ligniperda* and



*Hylurgus micklitzi* (Moumeni *et al.*, 2021). Using a combination of morphological and molecular identification of fungal isolates, we identified a total of 37 fungal species associated with these insects, with *Ophiostoma ips* and *Ceratocystiopsis minuta* as the most frequent Ophiostomatoid species (Moumeni *et al.*, to be submitted).

*Ceratocystiopsis minuta*, which has been observed colonizing living Aleppo pines, can contribute to the decline of the pine forests (Jankowiak *et al.*, 2022). *Ceratocystiopsis* species are known to possess a wide enzymatic arsenal, which enables them to circumvent the trees defences and to alter the host tree's tissues (Paine *et al.*, 1997 ; Six and Paine, 1998). Understanding the enzymatic arsenal of these fungi species can provide valuable insights into the mechanisms behind tree decline (Ayres *et al.*, 2000; Six and Elser, 2020).

In this aim, we selected two fungal isolates recovered from our insect sampling (Moumeni *et al.*, to be submitted) for further characterization of their enzymatic equipment. On the basis of the economic importance of *Ceratocystiopsis* species as pathogens of Aleppo pine trees (Chang *et al.*, 2021), and of the genomic resources available for the genus *Ceratocystiopsis* (Wingfield *et al.*, 2016), we selected *Ceratocystiopsis minuta*, a causative agent of blue staining disease known for its association with bark beetles, and compared it with *Aspergillus citrinoterreus*. Little is known about this fungus which is thought to be a non-pathogenic saproxylophagous fungus, and which is commonly misidentified as the well known endophytic fungus *A. terreus* (Waqas *et al.*, 2015 ; Guinea *et al.*, 2015 ; Mahendran *et al.*, 2021). Incorporating *A. citrinoterreus* into our research was driven by the recurrent identification of this fungus in our previous study, and the accessibility of genomic data for the closely related species, *A. terreus*. Comparative analyses of the lignin degrading enzymatic arsenal of these two species with different lifestyles provides an opportunity to identify genomic adaptations associated with pathogenesis. Owing to these genomic resources, we analyzed by RNA-seq the transcriptomes of both fungi to gain new insights into fungal virulence factors, considering that the enzymatic profile of *C. minuta* will differ from that of the saproxylophagous fungus *A. citrinoterreus*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Microorganisms and culture conditions**

This study was conducted on two of the fungal isolates that were recovered by culture from bark beetles colonizing the Aleppo pine trees in the semi-arid regions of Eastern Algeria. These fungal isolates were selected on the basis of the availability of the whole

genome sequence of reference strains and were representative of the two groups of fungal species associated with scolytids: a well-known insect-associated xylophagous fungus *Ceratocystiopsis minuta* (recovered by culture from *Crypturgus mediterraneus*, *Crypturgus numidicus*, *Orthotomicus erosus* and *Tomicus destruens*) and a saprophytic fungus that was capable to grow on lignin- or bark-containing agar-based culture media and therefore considered as saproxylophagous, *Aspergillus citrinoterreus* (recovered from *Crypturgus numidicus* et *Orthotomicus erosus*). *Ceratocystiopsis minuta* isolate 16 was recovered from a *Crypturgus numidicus* specimen collected in the Boutaleb forest (35°44'34.0N 5°17'18.4E) on July 5, 2017, and *Aspergillus citrinoterreus* isolate 19 from an *Orthotomicus erosus* specimen collected in the Ouled Tebbane forest (35°46'45.0"N 5°05'30.0"E) on August 13, 2017. Species identification of the isolates was confirmed by comparing the nucleotide sequence of the internal transcribed spacer (ITS) 1 and 2 regions of ribosomal DNA genes, and of the beta-tubulin (locus BT2) and/or calmodulin encoding genes with corresponding nucleotide sequences of type strains (*Aspergillus citrinoterreus* DTO 434-D2 and *Ceratocystiopsis minuta* strain CBS 116963) present in the GenBank database.

All strains were conserved frozen at - 80°C. Fungi were routinely maintained by weekly passages at 30°C on Yeast extract-peptone-dextrose-agar (YPDA) medium (containing in g per liter: yeast extract, 5; peptone, 10; dextrose, 20; and agar, 20).

### **RNA extraction**

For RNA extraction, spores were obtained from 7-day-old cultures at 30°C on YPDA plates by scraping the surface of the colonies with sterile distilled water, followed by filtration through Miracloth membranes and enumeration of the conidia by hemacytometer counts. To initiate spore germination,  $10^7$  spores were then inoculated in 50 mL of YPD medium which were incubated at 30°C with agitation (130 rpm) for 24 h for *A. citrinoterreus*, and 48 h for *C. minuta*. The cells were subsequently collected on nylon filters with 11- $\mu$ m pore size and transferred to a liquid culture medium derived from the synthetic Scedo-Select III culture medium (containing in g per liter: ammonium sulphate, 5; potassium dihydrogenophosphate, 1.25; magnesium sulphate, 0.625; agar, 20; and chloramphenicol, 0.5) supplemented with 0.9 g/L lignin or bark powder as the sole carbon and energy source. Control condition consisted in growth in the same culture medium containing 0.9 g/L glucose. After incubation, mycelium was recovered by filtration and ground with a mortar and pestle under liquid nitrogen.

Total RNA was extracted using the Norgen total RNA purification kit (Norgen Biotek Corporation, Thorold, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Concentration of the RNA extracts was determined using NanoDrop and Qubit. The integrity of RNA was checked using the Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

### **RNA sequencing**

For sequencing from total RNA, Illumina Stranded Total RNA Prep ligation kit (Illumina, San Diego, CA, USA) was used to prepare sequencing libraries and rRNA were depleted using Ribo-Zero Plus rRNA depletion Kit (Illumina). The sequencing was performed on an Illumina MiSeq at 2 x 75 bp reads. Three samples for each species and each condition were set up, resulting in a total number of 18 samples to be analyzed.

### **Quality control**

The quality of the data generated by RNA sequencing was verified using the FastQC/MultiQC software (Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK) to check the quality of raw sequence data. The Sequence Analysis Viewer v3.0 (Illumina) was used to check quality metrics generated by Real-Time Analysis (RTA) software on the Illumina sequencing platform as the sequencing run progresses. Finally, the mapped sequence analysis tool SeqMonk software (Babraham Bioinformatics) was used for visualization and analysis of mapped sequence data, and therefore to verify the duplication rates in the data sets.

### **Data analysis**

The STAR (Spliced Transcripts Alignment to a Reference) tool was used to align the reads to the reference genomes (Dobin *et al.*, 2013). For *A. citrinoterreus*, reads were aligned to the reference genome of the sister species *Aspergillus terreus* (strain NIH2624 – genome assembly ASM14961v1) for which the annotation file in gff format was obtained from the NCBI website ([www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_000149615.1/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000149615.1/)). For *C. minuta*, only one genome was available, from strain CBS 138717 (assembly ASM167686v1), and it was currently in draft version, consisting of 904 scaffolds ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/LZPB01?display=contigs](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/LZPB01?display=contigs)). Since the annotation file was not available, the BRAKER tool was used to automatically generate a gtf annotation file from this reference genome (Hoff *et al.*, 2016 ; Brûna *et al.*, 2021) and the ORSON tool (workflow for prOteome and tRanScriptome functiOnal Annotation)

was used for functional annotation of these genes. The coverage of each sample was calculated with respect to its reference genome using bedtools genomecov ([bedtools.readthedocs.io/en/latest/content/tools/genomecov.html](http://bedtools.readthedocs.io/en/latest/content/tools/genomecov.html)).

The quantification of reads was performed using the featureCounts program of the Subread package ([github.com/ShiLab-Bioinformatics/subread](https://github.com/ShiLab-Bioinformatics/subread)). The count matrices were then analysed using the R package DESeq2 which enables differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution ([rdrr.io/bioc/DESeq2/](http://rdrr.io/bioc/DESeq2/)). Then, a functional enrichment analysis was performed for *A. citrinoterreus* on the g:Profiler website ([biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost](http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost)). Since *C. minuta* did not have functional annotation, only the DEGs could be identified. Additionally, Blast fungi and Interproscan were used to help with functional annotation and classification of the differentially expressed genes.

## RESULTS

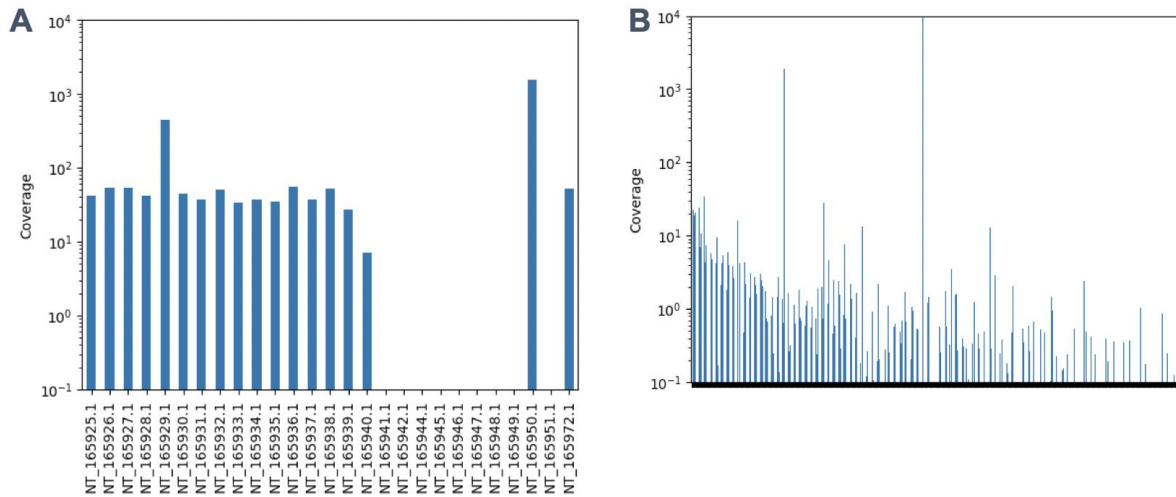
### Quality of the results

Raw data analysis revealed that out of the initially anticipated 20 million reads per sample, only 5 millions were recovered by the end of the sequencing process. Furthermore, according to the quality report, in addition to the low read count, over 80% duplication was identified in each sample.

To identify the cause of these abnormal results and following Illumina's recommendation, two additional analyses were conducted. The first analysis revealed chip subclustering, indicating that only a few RNA fragments were successfully sequenced, raising suspicions of library loss. A second analysis was carried out to determine whether the samples could be utilized or if the obtained reads were the result of PCR duplication.

### Alignment

The coverage calculation revealed that, for *A. citrinoterreus*, certain scaffolds did not contain any reads (Figure 1A). Upon checking the annotation file, no genes were annotated in these specific regions.



**Figure 1.** Graphs depicting the sequencing coverage for *A. citrinoterreus* (A) and *C. minuta* (B).

### Differentially expressed genes in *Aspergillus citrinoterreus*

We used RNA-seq data to identify genes that were differentially expressed in *Aspergillus citrinoterreus* and *Ceratocystiopsis minuta* grown on media containing bark powder or lignin as the sole carbon source. For each species, cultures grown in a glucose-containing medium were used as control.

For *Aspergillus citrinoterreus*, 409 genes were identified as upregulated and 433 as downregulated when the bark powder and control growth conditions were compared. Differentially expressed genes were markedly less numerous in the comparison between the lignin and control growth conditions, since only 95 genes were upregulated and 99 downregulated.<sup>1</sup>

#### *Bark powder vs. control growth conditions*

Using g:Profiler, putative functions were assigned to the differentially expressed genes. As shown in Table 1, analysis of the results in bark powder vs. control growth conditions revealed enriched gene categories that were involved in carbohydrate metabolic processes, transport, development and cellulose degradation processes. Among genes potentially involved in cellulose degradation, we found an overexpression of genes orthologous to *ATEG\_07420*, *ATEG\_03755* and *ATEG\_00448*, encoding in *A. terreus* an endoglucanase I precursor, a protein similar to endoglucanase, and an endoglucanase IV precursor, respectively.

<sup>1</sup> Compte tenu du grand nombre de gènes sur ou sous-exprimés, la liste complète des gènes différentiellement exprimés pour *Aspergillus citrinoterreus* n'est pas produite dans ce document ; elle sera présentée lors de la soumission de ce travail pour publication sous forme de *Supplemental tables*.

As expected, most of the upregulated genes were involved in binding to polysaccharides (cellulose binding, carbohydrate binding, starch binding) or in their degradation (hydrolase activity acting on glycosyl bonds or hydrolyzing O-glycosyl compounds, polygalacturonase activity, cellulase activity). Likewise, most of them were involved in carbohydrate/polysaccharide/pectin metabolic or catabolic processes, or in subsequent elongation of the hyphae and fungal growth (cell wall organization or biogenesis). Strikingly, most of the downregulated genes were involved in secondary metabolite biosynthesis, or in polyketide biosynthesis. Finally, regarding the subcellular localization of proteins encoded by the upregulated genes, they were mostly extracellular.

#### *Lignin vs. control growth conditions*

Compared to the glucose growth condition, growth of the fungus in the presence of lignin as the sole carbon source resulted in a notable enrichment of diverse functional categories, including ATPase-coupled transmembrane transporter activity, oxidoreductase activity, primary active transmembrane transporter activity, dioxygenase activity, and several catabolic processes related to aromatic amino acids such as L-phenylalanine and tyrosine (Table 2). These findings suggest a coordinated response to environmental changes.

As shown in Figure 2, there was an absence of prominent lignin-degrading genes associated with the funneling pathways, such as laccases and peroxidases. However, some dioxygenases involved in the cleavage of the aromatic ring in the lower lignin degradation pathways, were found to be overexpressed; for instance, indoleamine 2,3-dioxygenase, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and an intradiol ring cleavage dioxygenase were found to be overexpressed in the presence of bark powder or lignin, and homogentisate 1,2-dioxygenase in the presence of lignin only. Interestingly, some of the upregulated genes were involved in active transmembrane transporter activity (including two members of the major facilitator superfamily and one ATP-binding cassette protein), and as observed with bark powder, many of the downregulated genes were involved in polyketide or secondary metabolite biosynthetic process. Molecular function of proteins encoded by the downregulated genes included polyketide synthase activity (like 5-methylorsellinic acid synthase, lovastatin nonaketide synthase and lovastatin diketide synthase), in decoration of polyketides (cytochrome P-450 monooxygenases, dimethylallyl tryptophane synthase, and versicolorin reductase, as well as some methyltransferases, dehydrogenases or epimerases) or in phosphopantetheine binding which is necessary for the synthesis of polyketides.

**Table 1.** Identified genes functions of the differentially expressed genes in *A. citrinoterreus* grown in bark powder-containing medium vs. control and subcellular localization of the corresponding proteins.

	<b>Upregulated genes (functional enrichment)</b>	<b>Downregulated genes</b>
<b>Molecular function</b>	Hydrolase activity, acting on glycosyl bonds Hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds Polysaccharide binding Hydrolase activity Cellulose binding Carbohydrate binding polygalacturonase activity starch binding Galacturan 1,4-alpha-Galacturonidase activity Cellulase activity	Oxidoreductase activity
<b>Biological process</b>	Carbohydrate metabolic process Polysaccharide catabolic process Polysaccharide metabolic process Carbohydrate catabolic process Organic substance catabolic process Catabolic process Macromolecule catabolic process Galacturonan metabolic process Pectin metabolic process Pectin catabolic process External encapsulating structure organization Cell wall organization Cell wall organization or biogenesis	Polyketide biosynthetic process Polyketide metabolic process Obsolete oxidation-reduction process Pyruvate metabolic process secondary metabolite Biosynthetic process Secondary metabolic process
<b>Cellular component</b>	Extracellular region	Intrinsic component of membrane Plasma membrane Integral component of membrane Cell periphery

**Table 2.** Identified genes functions of the differentially expressed genes in *A. citrinoterreus* grown in lignin-containing medium vs. control and subcellular localization of the corresponding proteins.

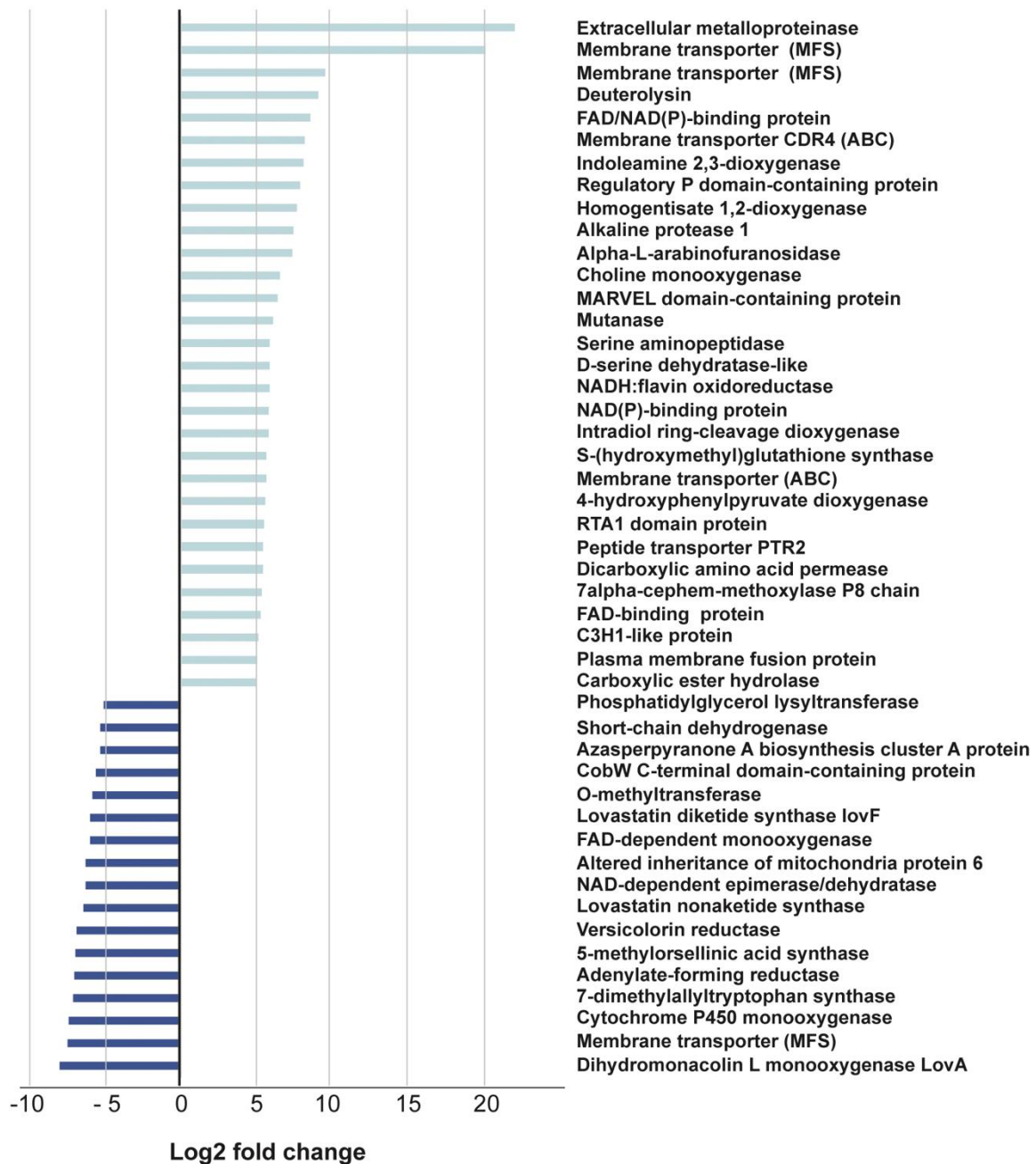
	<b>Upregulated genes (functional enrichment)</b>	<b>Downregulated genes</b>
<b>Molecular function</b>	ATPase-coupled transmembrane transporter activity Oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, primary active transmembrane transporter activity Dioxygenase activity Oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen Active transmembrane transporter activity	Phosphopantetheine binding Modified amino acid binding Lovastatin nonaketide synthase activity Amide binding
<b>Biological process</b>	Aromatic amino acid family catabolic process L-phenylalanine catabolic process Tyrosine metabolic process Erythrose 4-phosphate/phosphoenolpyruvate family amino acid catabolic process L-phenylalanine metabolic process Erythrose 4-phosphate/phosphoenolpyruvate family amino acid metabolic process	Polyketide biosynthetic process Polyketide metabolic process Secondary metabolite Biosynthetic process Secondary metabolic process NADPH oxidation
<b>Cellular component</b>	Plasma membrane Extracellular region Cell periphery	Plasma membrane Cell periphery Intrinsic component of membrane Integral component of membrane Membrane





**Figure 2A.** RNA-seq fold change of differentially expressed genes in *A. citrinoterreus* grown in bark powder-containing medium vs. control.

Only genes with known function and at least a five-fold overexpression or downregulation are shown.



**Figure 2B.** RNA-seq fold change of differentially expressed genes in *A. citrinoterreus* grown in lignin-containing medium vs. control.

Only genes with known function and at least a five-fold overexpression or downregulation are shown.

### **Differentially expressed genes in *Ceratocystiopsis minuta***

RNA-seq analysis revealed for *C. minuta* a lower number of differentially expressed genes in both culture conditions. In the comparative analysis between the bark powder-containing medium and the growth control condition, 47 genes were shown to be upregulated, and 6 genes demonstrated downregulation. Likewise, in the comparison between the lignin-containing culture medium and the growth control condition, 37 genes displayed upregulation, while 7 genes were shown to be downregulated. The full list of differentially expressed genes is presented in Supplemental Table S1 and S2.

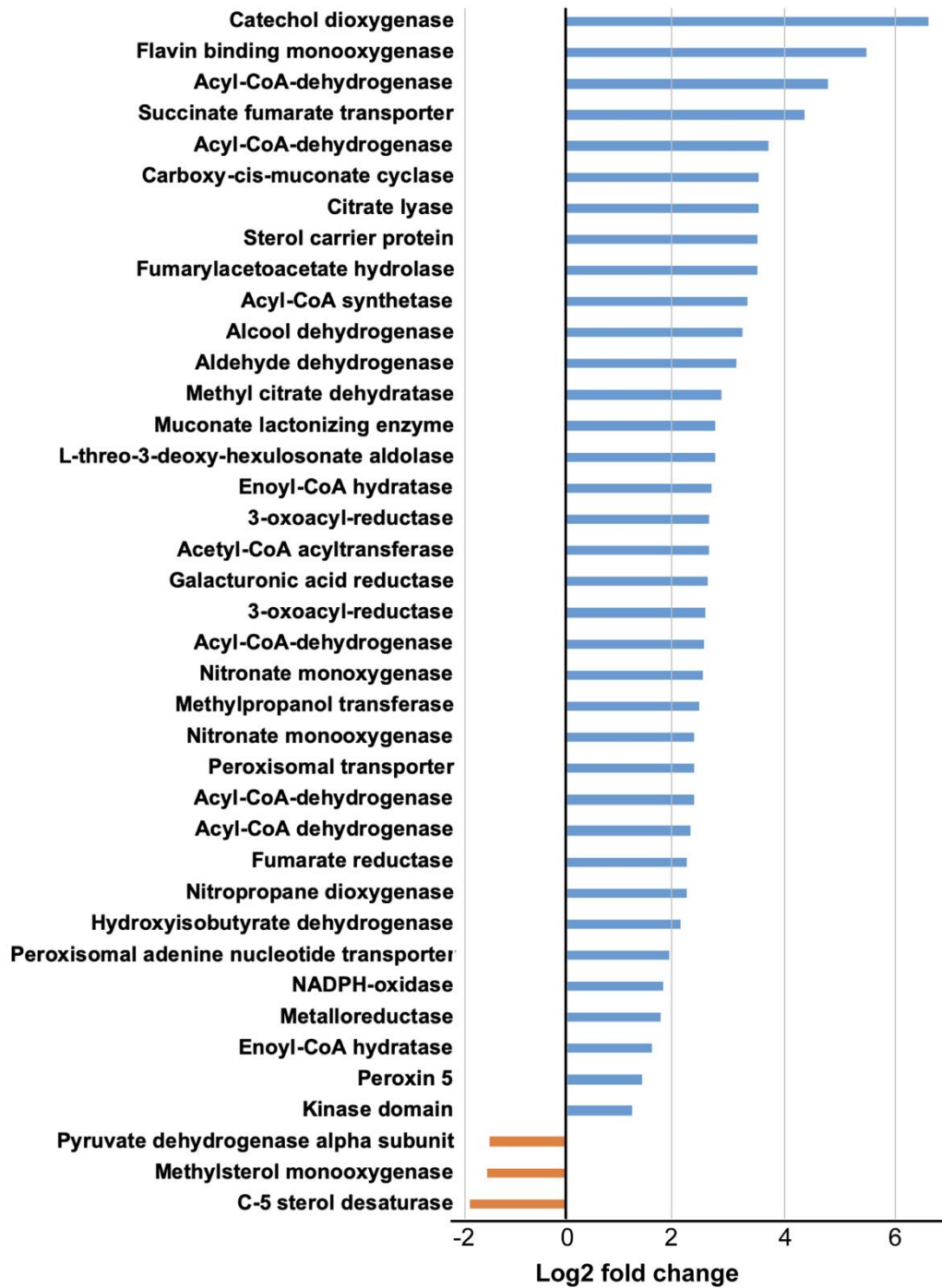
The set of the identified differentially expressed genes was covering diverse functions related to sterol metabolism, carbohydrate metabolism, amino acid and protein metabolism, lipid metabolism (Tables 3 and 4). In addition, some differentially expressed genes encoded enzymatic proteins with oxidase, reductase, or dehydratase or activity, with some of them being involved in lignin degradation like the catechol dioxygenase which seemed to play for this fungus an important role in the opening of the aromatic ring, and the muconate lactonizing enzyme which is responsible for the following step in lignin degradation. Interestingly, two genes encoding nitronate monooxygenases (formerly called nitropropane dioxygenases) were found to be overexpressed in the presence of bark powder, and in the presence of lignin as well. Likewise, as observed for *A. citrinoterreus* (Figure 2), most of the genes that were overexpressed (or downregulated) in the presence of purified lignin, were also found to be overexpressed (or downregulated) in bark powder-culture condition.

**Table 3.** Identified genes functions of the differentially expressed genes in *C. minuta* grown in bark powder-containing medium vs. control growth condition.

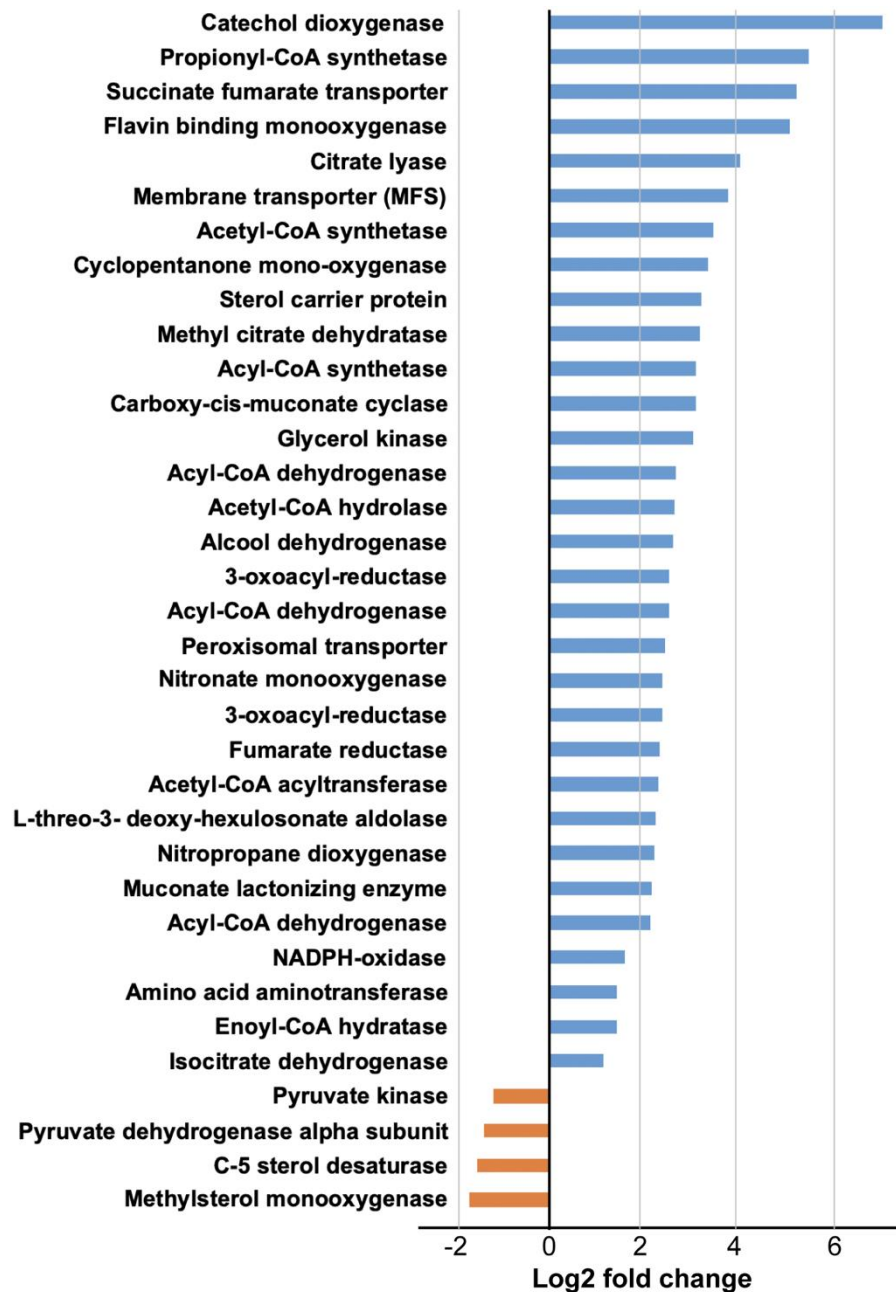
<b>Biological process</b>	<b>Function of the differentially expressed genes</b>
<b>Sterol metabolism</b>	C-5 sterol desaturase Methylsterol monooxygenase Sterol carrier protein
<b>Carbohydrate metabolism</b>	Subunit alpha pyruvate dehydrogenase Peroxisomal adenine nucleotide transporter Peroxisomal transporter 3-oxoacyl-reductase Oxidoreductase, galacturonic acid reductase Citrate lyase Carboxy-cis-muconate cyclase
<b>Amino acid and protein metabolism</b>	Dihydrolipolysine residue (methylpropanol transferase) Inosine monophosphate dehydrogenase / nitronate monooxygenase Aldéhyde dehydrogenase Alcool dehydrogenase Fumarylacetoacetate hydrolase
<b>Lipid metabolism</b>	Enoyl-CoA hydratase Acyl-CoA dehydrogenase Acetyl-CoA acyltransferase (ketoacyl-CoA thiolase) Succinate fumarate transporter Flavin binding monooxygenase
<b>Oxygenases and reductases</b>	Nitropropane dioxygenase Fumarate reductase Dioxygenase, catechol dioxygenase NADPH-oxidase Metalloreductase
<b>Dehydratases and other enzymes</b>	Hydroxyisobutyrate dehydrogenase Mandelate racemase (muconate lactonizing enzyme) Methyl citrate dehydratase Acyl-CoA synthetase

**Table 4.** Identified genes functions of the differentially expressed genes in *C. minuta* grown in lignin-containing medium vs. control growth condition.

<b>Biological process</b>	<b>Function of the differentially expressed genes</b>
<b>Steroid metabolism</b>	C-5 sterol desaturase Methylsterol monooxygenase Sterol carrier protein
<b>Carbohydrate metabolism</b>	pyruvate dehydrogenase alpha Subunit Peroxisomal adenine nucleotide transporter Peroxisomal transporter 3-oxoacyl-reductase Oxidoreductase, galacturonic acid reductase Citrate lyase Carboxy-cis-muconate cyclase
<b>Amino acid and protein metabolism</b>	Dihydrolipolysine residue (methylpropanol transferase) Inosine monophosphate dehydrogenase / nitronate monooxygenase Aldehyde dehydrogenase Alcool dehydrogenase Fumarylacetoacetate hydrolase
<b>Lipid metabolism</b>	Enoyl-CoA hydratase Acyl-CoA dehydrogenase Acetyl-CoA acyltransferase (ketoacyl-CoA thiolase) Succinate fumarate transporter Flavin binding monooxygenase
<b>Oxygenases and reductases</b>	Nitropropane dioxygenase Fumarate reductase Dioxygenase, catechol dioxygenase NADPH-oxidase Metalloreductase
<b>Dehydratases and other enzymes</b>	Hydroxyisobutyrate dehydrogenase Mandelate racemase muconate lactonizing enzyme Methyl citrate dehydratase Acyl-CoA synthetase



**Figure 3A.** RNA-seq fold change of differentially expressed genes in *C. minuta* grown in bark powder-containing medium vs. control. Only genes with known function are shown.



**Figure 3B.** RNA-seq fold change of differentially expressed genes in *C. minuta* grown in lignin-containing medium vs. control. Only genes with known function are shown.

## DISCUSSION

Consistent with previous research, we found that Ophiostomatoid species are prominently associated with Aleppo pine bark beetles inhabiting the semi-arid regions of Algeria (Paine *et al.*, 1997 ; Zhou *et al.*, 2004 ; Moumeni *et al.*, 2021). These fungi establish colonization within the phloem of living pine trees, circumventing efficiently the natural defenses of the tree (Wang *et al.*, 2020 ; Zaman *et al.*, 2023). This contrasts with saprophytic species, which are unable to colonize living trees and only thrive within wood tissues following the tree's dieback.

Within the context of the interactions between pine pathogenic fungi and their host plants, it is essential to investigate the colonization strategies developed by these fungi, especially the degradation of plant tissues which is a critical step in the colonization process. Several studies have emphasized the pivotal role of some secondary metabolites, specifically phenylpropanoid derivatives and terpenoids, in defense responses against fungi infesting conifers (Wainhouse *et al.*, 1990 ; Klepzig *et al.*, 2009). However, the lignification of plant cell walls, in particular, emerges as a cornerstone in the arsenal of disease resistance mechanisms in plants (Vance *et al.*, 1980).

The colonization of living pine trees by pathogenic species, such as *Ceratocystiopsis minuta*, represents a complex ecological interaction that involves overcoming tree defences in the beginning and the degradation of plant tissues (Lieutier *et al.*, 1991). This requires the use by these fungi of specific enzymes enabling them to overcome the host's intricate defense systems and to cleave the macromolecular complexes of the plant cell wall, especially lignin which is the major compound of the bark (Wang *et al.*, 2014). It is worth noting that our study employed solubilized lignin in testing, and it is acknowledged that this might not entirely represent the cell wall-bound lignin, since interactions between lignin and the other components of the plant cell wall could introduce a further complexity in the interaction between pathogenic fungi and their host plants. Nevertheless, compared to the control growth condition, most of the genes that were differentially expressed in the presence of bark powder, were also found as differentially expressed in the presence of lignin.

The plant cell wall components, cellulose and lignin, are normally resistant to degradation. Their enzymatic degradation provides the pathogen with essential nutrients and allows it to expand its colonization within the host. As the infection progresses, the tree's tissues are compromised, potentially causing disease symptoms and leading to a decline of the tree (Rice *et al.*, 2007). The lignin degradation pathways have been extensively studied in fungi. These pathways consist of both upper and lower sections.



The upper pathways involve the depolymerization of the lignin complex and encompass two main groups of enzymes: lignin-modifying enzymes (LME) and lignin-degrading auxiliary (LDA) enzymes (Janusz *et al.*, 2017 ; Chauhan, 2020). These enzymes play a crucial role in the initial breakdown of lignin, making it more amenable to further degradation. On the other hand, the lower pathways can be classified into three distinct groups: the 3-oxoadipate ( $\beta$ -keto adipate) pathway, which includes branches for protocatechuate, catechol, and hydroxyquinol, allowing the breakdown of these aromatic compounds derived from lignin; the gentisate pathway, dealing with the degradation of gentisate, another important aromatic compound resulting from the cleavage of lignin; and the homogentisate pathway, which is involved in the degradation of homogentisate, yet another key aromatic breakdown product of lignin (Brink *et al.*, 2019 ; Weng *et al.*, 2021 ; Poirier *et al.*, 2021). This two-tiered approach allows tree pathogenic fungi to efficiently metabolize and degrade lignin since the lower pathways further break down the aromatic intermediates generated during the upper pathways into simpler compounds, which can be used by the fungus to produce energy through the tricarboxylic acid cycle. The final breakdown of these compounds involves a large variety of enzymes, including for example isocitrate dehydrogenase, citrate synthase, fumarate reductase, and fumarylacetoacetate hydrolase, as well as enzymes involved in the biosynthesis of acetyl-CoA like acyl-CoA dehydrogenases, acyl-CoA synthetase, acyltransferases, or enoyl-CoA hydratases, all enzymes encoded by genes that we found to be overexpressed in *C. minuta*.

Along with other species within the *Aspergillus* genus, *A. terreus* has demonstrated lignin-degrading potential. Several studies have investigated the ability of *Aspergillus* species, including *A. terreus*, to metabolize lignin aromatic compounds. Notably, this fungal species has been shown to produce laccases and peroxidases (Kanayama *et al.*, 2002 ; Alharbi *et al.*, 2022). These enzymes play a pivotal role in the funnelling pathways of lignin degradation. In addition, studies on *Aspergillus* species, including *A. terreus*, have revealed their proficiency in decarboxylating and demethoxylating the aromatic breakdown products of lignin such as coumaric, ferulic, vanillic, veratric, and anisic acids, and in cleaving the aromatic ring (Milstein *et al.*, 1984).

Surprisingly, in our study, enzymes associated with the funneling pathways of lignin degradation were conspicuously absent in the transcriptome when both fungi were cultivated in a medium containing lignin or pine bark powder as the sole carbon and energy source. Only oxygenases involved in the lower pathways were highly expressed such as homogentisate 1,2-dioxygenase, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, phenol monooxygenase and intradiol ring-cleavage dioxygenases.

Phenol monooxygenase has demonstrated its ability to degrade catechol via the meta and ortho pathways, and protocatechuate through the ortho pathway (Heinaru *et al.*, 2001). Homogentisate 1,2-dioxygenase and 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase can also contribute to the degradation of lignin by-products. Nevertheless, in *A. fumigatus*, these enzymes are primarily associated with the catabolism of aromatic amino acids like phenylalanine and tyrosine, as well as phenolic compounds related to the degradation of these two molecules (Jones *et al.*, 1995 ; Schmalzer-Ripcke *et al.*, 2009).

The transcriptome analysis performed for *A. citrinoterreus* also revealed a pronounced expression of genes encoding proteinases, notably an extracellular metalloproteinase (MEP), in both conditions. The secretion of proteases, including MEP, during germination and early growth of *A. fumigatus* has been extensively explored in response to diverse complex protein sources, such as homogenates of pig lungs, mucin, or casein (Farnell *et al.*, 2012). Although these enzymes are not essential for the invasion process, multiple studies have proposed a correlation between virulence of *Aspergillus* species and the production of secreted proteases, with extracellular metalloproteinases playing a pivotal role in this context (Rementeria *et al.*, 2005 ; Fernández *et al.*, 2013). However, the reasons for the overexpression of the corresponding genes in the presence of bark powder or lignin remain obscure.

In contrast to other fungal phytopathogens, *Ceratocystiopsis minuta* remains relatively understudied when it comes to plant tissues degradation. The capacity of *C. minuta* to successfully colonize the wood tissues of living pine trees may be intrinsically linked to its ability to utilize plant defense metabolites as an energy source such as limonene and monoterpenes. Studies conducted on related species such as *Grosmannia clavigera* showed that they developed mechanisms to harness these metabolites for their energy needs using Baeyer-Villiger monooxygenases (BVMOs), an epoxide hydrolase and an enoyl coenzyme A (enoyl-CoA) hydratase (Wang *et al.*, 2014). Also *Ophiostoma piceae* and *Grosmannia clavigera* have an ABC-G transporter, which is believed to play an important role in minimizing the intracellular accumulation of toxic compounds, particularly monoterpenes (Haridas *et al.*, 2013). This ABC-G transporter is thought to function as an efflux pump, actively transporting monoterpenes and other toxic compounds out of the fungal cells (Del Sorbo *et al.*, 2000).

Interestingly, two genes encoding nitronate reductases were found to be upregulated in *C. minuta* grown in the presence of bark powder or lignin as the sole carbon source. Nitronate monooxygenases (EC 1.13.12.16), formerly known as nitropropane dioxygenases, are enzymes catalyzing the denitrification of nitroalkanes. The link with lignin degradation is still unclear. Nevertheless, it is well established that lignin

degradation involves many oxidative reactions and leads to the production of oxygen radicals, thus resulting in an oxidative stress. Different fungi, including entomopathogens and phytopathogens, contain three to eight putative nitronate monooxygenase genes (Cervantes-Quintero *et al.*, 2020). These enzymes are essential for detoxification of nitroalkanes like 3-nitropropionate and its conjugate base propionate-3-nitronate (Francis *et al.*, 2012), but also to reduce the consequences of lipid nitration during nitrooxidative stress (Marroquin-Guzman *et al.*, 2017). For *Magnaporthe grisea*, the causative agent of rice blast, these enzymes are also thought to play a crucial role in suppressing the host's defenses and establishing biotrophic growth in rice (Marroquin-Guzman *et al.*, 2017). Interestingly, a proteomic study conducted on lignin degradation by the bacterium *Pandoraea* sp. demonstrated the upregulation of homogentisate 1,2-dioxygenase, quercetin 2,3-dioxygenase, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, on kraft lignin, together with the upregulation of a nitropropane dioxygenase (Kumar *et al.*, 2018).

Another interesting information derived from this study is that most of the genes that were downregulated in cultures of *A. citrinoterreus* grown in the presence of bark powder or lignin, encoded enzymes involved in the secondary metabolism, especially in biosynthesis of polyketides. Although the link between lignin degradation and downregulation of polyketide biosynthesis remains to be elucidated, one may speculate a negative regulation of the transcription factors controlling the corresponding biosynthetic gene clusters by some breakdown products of lignin. Nevertheless, the regulation of polyketide biosynthesis could also result from an energy-saving strategy, as lignin is a macromolecule that is difficult to degrade, the fungus therefore driving all the energy produced towards the primary metabolism and the hyphal elongation.

In this study, RNA-seq analysis of *C. minuta* grown in the presence of bark powder or lignin revealed the overexpression of genes encoding enzymes associated with cleavage of the aromatic rings, such as the catechol 2,3-dioxygenase and the muconate lactonizing enzyme which are both involved in the catechol branch of the 3-oxoadipate pathway (Halak *et al.*, 2006 ; Poirier *et al.*, 2021), and the 3-carboxy-cis,cis-muconate cyclase which is involved in the protocatechuate branch of the 3-oxoadipate pathway. Despite the lack of detection of genes encoded enzymes of the funneling pathways, our results collectively suggest the capability of *C. minuta* for lignin degradation, and the major role of the 3-oxoadipate pathway.

## CONCLUSION

In conclusion, this study provides experimental evidence supporting the role of *C. minuta* as an Ophiostomatoid fungus and of *A. citrinoterreus* as a saproxylophagous fungus. Culture of the latter in the presence of bark powder resulted in the overexpression of genes involved principally in polysaccharide/carbohydrate metabolism or catabolism (cellulose degradation), and in hyphal elongation, together with downregulation of polyketide biosynthesis. By contrast, *C. minuta* exhibited a different behaviour since most of the genes overexpressed in the presence of bark powder or lignin were related to the cleavage of the aromatic ring of the lignin breakdown products or in the production of energy through the tricarboxylic acid cycle, and the defense against the nitrooxidative stress generated during lignin degradation.

We did not obtain a clear demonstration of lignin degradation ability in *A. terreus* and *C. minuta*, particularly regarding the lack of detection of the enzymes related to the funneling pathways, and this may be due to the limited number of sequencing reads resulting from our experimental conditions, focused on the identification of the most abundant mRNA. Further investigations are needed to gain a more comprehensive understanding of how bark beetle-associated fungi colonize pine trees and to elucidate the precise molecular mechanisms underpinning this ecological interaction.

## REFERENCES

- Alharbi NK, Alzaban MI, Albarakaty FM, *et al.* (2022) Transcriptome profiling reveals differential gene expression of laccase genes in *Aspergillus terreus* KC462061 during biodegradation of crude oil. *Biology* 11:564. doi.org/10.3390/BIOLOGY11040564/S1
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, *et al.* (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* 259:660–684. doi.org/10.1016/j.foreco.2009.09.001
- Ayres MP, Wilkens RT, Ruel JJ, *et al.* (2000) Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. *Ecology* 81:2198–2210.
- Brasier CM (1991) *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia* 115:151–161. doi.org/10.1007/BF00462219
- Brink DP, Ravi K, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF (2019) Mapping the diversity of microbial lignin catabolism: experiences from the eLignin database. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:3979–4002. doi.org/10.1007/S00253-019-09692-4
- Brúna T, Hoff KJ, Lomsadze A, *et al.* (2021) BRAKER2: automatic eukaryotic genome annotation with GeneMark-EP+ and AUGUSTUS supported by a protein database. *NAR genomics and bioinformatics* 3:1–11. doi.org/10.1093/NARGAB/LQAA108
- Cervantes-Quintero KY, Padilla Guerrero IE, Torres Guzman JC, Villa Martinez BG, Valencia Felix A, Gonzalez Hernandez GA (2020) Members of the nitronate

monooxygenase gene family from *Metarhizium brunneum* are induced during the process of infection to *Plutella xylostella*. *Appl Microbiol Biotechnol* 104(7):2987–2997. doi.org/10.1007/s00253-020-10450-0

Chang R, Zhang X, Si H, *et al.* (2021) Ophiostomatoid species associated with pine trees (*Pinus* spp.) infested by Cryphaluspiceae from eastern China, including five new species. *MycoKeys* 83:181. doi.org/10.3897/MYCOKEYS.83.70925

Chauhan PS (2020) Role of various bacterial enzymes in complete depolymerization of lignin: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 23:101498. doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101498

Colombari F, Schroeder ML, Battisti A, Faccoli M (2013) Spatio-temporal dynamics of an *Ips acuminatus* outbreak and implications for management. *Agricultural and Forest Entomology* 15:34–42. doi.org/10.1111/J.1461-9563.2012.00589.X

Del Sorbo G, Schoonbeek HJ, De Waard MA (2000) Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology* 30:1–15. doi.org/10.1006/fgbi.2000.1206

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, *et al.* (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* (Oxford, England) 29:15–21. doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635

Farnell E, Rousseau K, Thornton DJ, Bowyer P, Herrick SE (2012) Expression and secretion of *Aspergillus fumigatus* proteases are regulated in response to different protein substrates. *Fungal Biology* 116(9):1003–1012. doi: 10.1016/j.funbio.2012.07.004.

Fernández D, Russi S, Vendrell J, *et al.* (2013) A functional and structural study of the major metalloprotease secreted by the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Acta Crystallographica Section D, Biological crystallography* 69:1946–1957. doi.org/10.1107/S0907444913017642

Francis K, Nishino SF, Spain JC, Gadda G (2012) A novel activity for fungal nitronate monooxygenase: detoxification of the metabolic inhibitor propionate-3-nitronate. *Arch Biochem Biophys* 521(12):84–89. doi.org/10.1016/j.abb.2012.03.015

Guinea J, Sandoval-Denis M, Escribano P, *et al.* (2015) *Aspergillus citrinoterreus*, a new species of section *Terrei* isolated from samples of patients with nonhematological predisposing conditions. *Journal of Clinical Microbiology* 53:611. doi.org/10.1128/JCM.03088-14

Halak S, Lehtiö L, Basta T, *et al.* (2006) Structure and function of the 3-carboxy-cis,cis-muconate lactonizing enzyme from the protocatechuate degradative pathway of *Agrobacterium radiobacter* S2. *The FEBS journal* 273:5169–5182. doi.org/10.1111/J.1742-4658.2006.05512.X

Haridas S, Wang Y, Lim L, *et al.* (2013) The genome and transcriptome of the pine saprophyte *Ophiostoma piceae*, and a comparison with the bark beetle-associated pine pathogen *Grosmannia clavigera*. *BMC Genomics* 14:373. doi.org/10.1186/1471-2164-14-373

Heinaru E, Viggor S, Vedler E, *et al.* (2001) Reversible accumulation of p-hydroxybenzoate and catechol determines the sequential decomposition of phenolic compounds in mixed substrate cultivations in pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology* 37:79–89. doi.org/10.1111/J.1574-6941.2001.TB00855.X

- Hoff KJ, Lange S, Lomsadze A, *et al.* (2016) BRAKER1: Unsupervised RNA-seq-based genome annotation with GeneMark-ET and AUGUSTUS. *Bioinformatics* 32:767–769. doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTV661
- Jankowiak R (2005) Fungi associated with *Ips typographus* on *Picea abies* in southern Poland and their succession into the phloem and sapwood of beetle-infested trees and logs. *Forest Pathology* 35:37–55. doi.org/10.1111/j.1439-0329.2004.00395.x
- Jankowiak R, Solheim H, Bilański P, *et al.* (2022) *Ceratocystiopsis* spp. associated with pine- and spruce-infesting bark beetles in Norway. *Mycological Progress* 21:61. doi.org/10.1007/s11557-022-01808-x
- Janusz G, Pawlik A, Sulej J, *et al.* (2017) Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 41:941–962.
- Jones KH, Trudgill PW, Hopper DJ (1995) Evidence of two pathways for the metabolism of phenol by *Aspergillus fumigatus*. *Archives of Microbiology* 163:176–181. doi.org/10.1007/BF00305350
- Kanayama N, Tohru S, Keiichi K (2002) Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93:405–410. doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80075-5
- Klepzig KD, Adams AS, Handelsman J, Raffa KF (2009) Symbioses: A key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on Humans. *Environmental Entomology* 38:67–77. doi.org/10.1603/022.038.0109
- Kumar M, Verma S, Gazara RK, *et al.* (2018) Genomic and proteomic analysis of lignin degrading and polyhydroxyalkanoate accumulating  $\beta$ -proteobacterium *Pandoraea* sp. ISTKB. *Biotechnol Biofuels* 11:154. doi: 10.1186/s13068-018-1148-2.
- Le Houérou H-N (2005) Atlas de la répartition de 250 espèces-clés dans le bassin méditerranéen. Le Houérou ed, Montpellier.
- Lieutier F, Garcia J, Yart A, *et al.* (1991) Ophiostomales (Ascomycètes) associées à *Ips acuminatus* Gyll (Coleoptera : Scolytidae) sur le pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) dans le sud-est de la France et comparaison avec *Ips sexdentatus* Boern. *Agronomie* 11:807–817.
- Lloret F, Escudero A, Iriondo JM, *et al.* (2012) Extreme climatic events and vegetation: the role of stabilizing processes. *Global Change Biology* 18:797–805. doi.org/10.1111/J.1365-2486.2011.02624.X
- Mahendran TR, Thottathil GP, Surendran A, *et al.* (2021) Biocontrol potential of *Aspergillus terreus*, endophytic fungus against *Rigidoporus microporus* and *Corynespora cassiicola*, pathogens of rubber tree. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 54:1014–1032. doi.org/10.1080/03235408.2021.1884952
- Marroquin-Guzman M, Hartline D, Wright JD, Elowsky C, Bourret TJ, Wilson RA (2017) The *Magnaporthe oryzae* nitrooxidative stress response suppresses rice innate immunity during blast disease. *Nature Microbiology* 2:17054. doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.54
- Milstein OA, Haars A, Sharma A, *et al.* (1984) Lignin degrading ability of selected *Aspergillus* spp. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 9:393–394. doi.org/10.1007/BF02798992/METRICS

- Moumeni L, Gastebois A, Gillmann L, *et al.* (2021) Investigating the prevalence of bark beetles of *Pinus halepensis* in the north east semi-arid region of Algeria. *Biodiversitas* 22: 2755–2762. doi.org/10.13057/biodiv/d220724
- Ne'eman G, and Trabaud L (2000) Ecology, biogeography and management of *Pinus halepensis* and *P. brutta* forest ecosystems in the Mediterranean Basin. Backhuys Publishers, Leiden. 407 pp.
- Paine TD, Raffa KF, Harrington TC (1997) Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Review of Entomology* 42:179–206. doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.179
- Plattner A, Kim JJ, DiGuistini S, Breuil C (2008) Variation in pathogenicity of a mountain pine beetle-associated blue-stain fungus, *Grosmannia clavigera*, on young lodgepole pine in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30:457–466. doi.org/10.1080/07060660809507543
- Poirier W, Ravenel K, Bouchara JP, Giraud S (2021) Lower funneling pathways in *Scedosporium* species. *Frontiers in Microbiology* 12:630753. doi.org/10.3389/FMICB.2021.630753/BIBTEX
- Raffa KF, Aukema BH, Bentz BJ, *et al.* (2008) Cross-scale drivers of natural disturbances prone to anthropogenic amplification: The dynamics of bark beetle eruptions. *BioScience* 58:501–517. doi.org/10.1641/B580607
- Rementería A, López-Molina N, Ludwig A, *et al.* (2005) Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Revista iberoamericana de micología* 22:1–23. doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70001-2
- Rice A V., Thormann MN, Langor DW (2007) Mountain pine beetle associated blue-stain fungi cause lesions on jack pine, lodgepole pine, and lodgepole x jack pine hybrids in Alberta. doi.org/10.1139/B07-014 85:307–315. doi.org/10.1139/B07-014
- Schmaler-Ripcke J, Sugareva V, Gebhardt P, *et al.* (2009) Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology* 75:493–503. doi.org/10.1128/AEM.02077-08
- Six DL, and Elser JJ (2020) Mutualism is not restricted to tree-killing bark beetles and fungi: the ecological stoichiometry of secondary bark beetles, fungi, and a scavenger. *Ecological Entomology* 45:1134–1145. doi.org/10.1111/een.12897
- Six DL, and Paine TD (1998) Effects of mycangial fungi and host tree species on progeny survival and emergence of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *Environmental Entomology* 27:1393–1401. doi.org/10.1093/EE/27.6.1393
- Six DL, and Wingfield MJ (2011) The role of phytopathogenicity in bark beetle-fungus symbioses: a challenge to the classic paradigm. *Annual Review of Entomology* 56:255–272. doi: 10.1146/annurev-ento-120709-144839.
- Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 18:259–288. doi.org/10.1146/ANNUREV.PY.18.090180.001355
- Veullen L, Prévosto B, Alfaro-Sánchez R, *et al.* (2023) Pre- and post-drought conditions drive resilience of *Pinus halepensis* across its distribution range. *Agricultural and Forest Meteorology* 339:109577. doi.org/10.1016/J.AGRFORMET.2023.109577

- Vicente CSL, Soares M, Faria JMS, *et al.* (2022) Fungal communities of the pine wilt disease complex: Studying the interaction of Ophiostomatales with *Bursaphelenchus xylophilus*. *Frontiers in Plant Science* 13:908308. doi.org/10.3389/FPLS.2022.908308/BIBTEX
- Wainhouse D, Cross DJ, Howell RS (1990) The role of lignin as a defence against the spruce bark beetle *Dendroctonus micans*: effect on larvae and adults. *Oecologia* 85:257–265. doi.org/10.1007/BF00319411/METRICS
- Wang F, Cale JA, Erbilgin N (2020) Induced defenses of a novel host tree affect the growth and interactions of bark beetle-vectored fungi. *Microbial Ecology* 80:181–190. doi.org/10.1007/S00248-020-01490-0/METRICS
- Wang Y, Lim L, Madilao L, *et al.* (2014) Gene discovery for enzymes involved in limonene modification or utilization by the mountain pine beetle-associated pathogen *Grosmannia clavigera*. *Applied and environmental microbiology* 80:4566–4576. doi.org/10.1128/AEM.00670-14
- Waqas M, Khana AL, Hamayuna M, *et al.* (2015) Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: an example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*. *Journal of Plant Interactions* 10:280–287. doi.org/10.1080/17429145.2015.1079743
- Weng C, Peng X, Han Y (2021) Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. *Biotechnology for Biofuels* 2021 14:1 14:1–22. doi.org/10.1186/S13068-021-01934-W
- Wingfield BD, Ambler JM, Coetzee MPA, *et al.* (2016) Draft genome sequences of *Armillaria fuscipes*, *Ceratocystiopsis minuta*, *Ceratocystis adiposa*, *Endoconidiophora laricicola*, *E. polonica* and *Penicillium freii* DAOMC 242723. *IMA Fungus* 7:217–227. doi.org/10.5598/IMAFUNGUS.2016.07.01.11
- Zaman R, May C, Ullah A, Erbilgin N (2023) Bark beetles utilize ophiostomatoid fungi to circumvent host tree defenses. *Metabolites* 13:239. doi.org/10.3390/METABO13020239/S1
- Zhou XD, de Beer ZW, Ahumada R, *et al.* (2004) *Ophiostoma* and *Ceratocystiopsis* spp. associated with two pine-infesting bark beetles in Chile. *Fungal Diversity* 15:261–274



Supplemental Table S1: List of differentially expressed genes in *Ceratocystopsis minuta* grown in the presence of bark powder vs. control growth condition.

Gene	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Position start	Position stop	Scaffold	Blast	e value / % identity
file_1_g6101	16.84456858	-3.881675308	0.845727186	-4.589748763	4.44E-06	0.000513398	8382	9064	sca 104	Uncharacterized protein	6 <sup>e</sup> -54 / 88%
file 1_a6459	170.7613259	-1.741981197	0.347480863	-5.013171612	5.35E-07	0.000123878	87085	88206	sca 42	C-5 sterol desaturase	0 / 83%
file 1_g900	25.78782297	-1.699112972	0.464769127	-3.655821514	0.00025636	0.014379448	91794	97678	sca26	No similarity	
file 1_a4616	869.9599242	-1.664993814	0.397939029	-4.184042513	2.86E-05	0.002454829	4495	5571	sca 357	No similarity	
file 1_a6510	215.308191	-1.431892003	0.404056465	-3.543791841	0.000394417	0.019212236	40597	41644	sca 107	Methylsterol monooxygenase	0 / 85%
file_1_g2474	72.90773826	-1.380572071	0.302469837	-4.564329741	5.01E-06	0.000545601	20443	21815	sca 71	Pyruvate dehydrogenase alpha subunit	0 / 88%
file 1_a2849	129.7002963	1.223951667	0.333572235	3.669225248	0.000243287	0.014072612	97937	104743	sca 16	No similarity	
file_1_g2153	68.71231049	1.226585643	0.327089603	3.74999888	0.000176635	0.010910742	87557	89412	sca 6	Uncharacterized protein	3 <sup>e</sup> -150 / 82%
file 1_a4178	179.9461247	1.383227673	0.422584317	3.273258416	0.001063152	0.044111214	23086	25608	sca169	No similarity	
file 1_g995	27.40366611	1.404819871	0.432295317	3.249676361	0.001155364	0.044526364	132110	134209	sca 4	Peroxin 5	0 / 86%
file 1_a1443	192.8441695	1.510793278	0.450651433	3.352465271	0.000800953	0.036160093	9371	12619	sca 128	No similarity	
file 1_g1295	129.1476599	1.58065998	0.339317438	4.65835175	3.19E-06	0.000421435	12038	12976	sca 191	Enoyl-CoA hydratase	0 / 87%
file 1_g1563	159.7127333	1.661868208	0.307316084	5.407683806	6.38E-08	2.95E-05	87735	88777	sca 1	No similarity	
file 1_a1396	93.3828589	1.723103465	0.532113803	3.238223583	0.001202765	0.044526364	34528	37419	sca 103	Metalloreductase	0 / 82%
file 1_g3154	91.69941953	1.769845286	0.418964511	4.224332228	2.40E-05	0.002217964	18147	19974	sca 146	NADPH-oxidase	0, 82%
file 1_g2388	48.92910961	1.812361118	0.497688659	3.64155599	0.000270995	0.014753296	10181	12003	sca 20	No similarity	
file_1_g5327	23.37344604	1.890927152	0.520541873	3.632612954	0.000280566	0.014837917	46423	47548	sca 76	Peroxisomal adenine nucleotide transporter	e-172 / 82%
file 1_a4799	64.88803737	2.101237024	0.402255511	5.22363763	1.75E-07	5.41E-05	112925	113431	sca 23	No similarity	
file_1_g818	13.432835	2.107399301	0.653618191	3.2242054	0.001263228	0.044966043	43143	45720	sca 123	Hydroxyisobutyrate dehydrogenase	e-155 / 82%
file 1_g233	8.909495531	2.18207381	0.673788694	3.238513542	0.001201543	0.044526364	19620	22120	sca 157	No similarity	
file 1_g3793	195.5143621	2.201346645	0.448250866	4.910970203	9.06E-07	0.00016775	4836	6099	sca 91	Nitropropane dioxygenase	0 / 83%
file 1_a4828	443.0198579	2.213965973	0.600610994	3.686189558	0.000227637	0.013592121	12942	15039	sca 102	Fumarate reductase	0 / 82%
file 1_g974	10.23969727	2.244598873	0.692832267	3.239743557	0.001196372	0.044526364	54470	55491	sca 4	No similarity	

Gene	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Position start	Position stop	Scaffold	Blast	e value / % identity
file 1 g6288	38.27775874	2.280011749	0.535372062	4.258742494	2.06E-05	0.002114049	76720	78418	sca37	Acyl-CoA dehydrogenase	0 / 82%
file 1 a4336	305.8364652	2.337815843	0.70214231	3.329547029	0.000869874	0.038336578	5175	6986	sca 469	Acyl-CoA-dehydrogenase	0 / 85%
file_1_g4758	29.69936847	2.350706644	0.49066842	4.790825225	1.66E-06	0.000279496	3057	4260	sca 350	Peroxisomal transporter	e-117 / 83%
file_2_470_g	33.36656169	2.354665626	0.627087738	3.754922128	0.000173395	0.010910742	133641	134692	sca6	Nitronate monooxygenase	e-173 / 81%
file 1 g4244	33.12610743	2.444915001	0.599433097	4.078712059	4.53E-05	0.003335369	35122	36771	sca 43	Acyltransferase	e-54 / 77%
file_1_g732	36.50482771	2.498471822	0.763869228	3.270810934	0.001072396	0.044111214	6241	7816	sca 148	Uncharacterized protein	5e-78 / 76%
file_1_g2854	20.98169187	2.505855764	0.782446425	3.202590852	0.001361973	0.047566276	116378	117460	sca16	Nitronate monooxygenase (oxvdoeductase)	e-46 / 75%
file 1 g6165	152.5989519	2.525152644	0.508498848	4.965896494	6.84E-07	0.000140644	9027	10332	sca 78	Acyl-CoA-dehydrogenase	0 / 85%
file_1_g3357	101.9724916	2.558095058	0.731803751	3.495602549	0.000472993	0.022448959	67890	68840	sca 60	3-oxoacyl-reductase	e-175 / 89%
file_1_g1165	28.14069462	2.591121728	0.788027152	3.288112243	0.001008616	0.043417408	48140	49531	sca 109	Oxidoreductase, galacturonic acid reductase	0 / 82%
file_1_g2163	99.86021089	2.60417246	0.626357359	4.157646463	3.22E-05	0.002587723	123428	124747	sca6	Acetyl-CoA acyltransferase (ketoacyl-CoA thiolase)	0 / 87%
file 1 a5799	57.58712497	2.629495436	0.550920996	4.772908372	1.82E-06	0.000280094	41120	42628	sca 24	3-oxoacyl-reductase	e-72 / 85%
file_1_g5142	37.05830436	2.65188821	0.561851691	4.719907658	2.36E-06	0.000335959	742	1623	sca 312	Enoyl-CoA hydratase	e-156 / 82%
file_1_g1164	14.6276	2.736077392	0.785800509	3.481898218	0.000497873	0.023039068	45776	46765	sca 109	L-threo-3-deoxy-hexulosonate aldolase	0 / 81%
file 1 g5298	65.54369297	2.740175116	0.694789534	3.943892332	8.02E-05	0.005299787	5587	6783	sca 234	Muconate lactonizing enzyme	0 / 87%
file_1_g2146	12.49571494	2.816045309	0.777276804	3.622963267	0.000291247	0.01497496	64409	67589	sca6	Uncharacterized protein (possibly a transcription factor)	2e-120 / 74%
file 2 1544	62.00971358	2.841734854	0.558358673	5.089443383	3.59E-07	9.50E-05	85804	87536	sca 29	Methyl citrate dehydratase	0 / 90%
file 1 a3182	24.54982816	3.122658635	0.966074079	3.232318	0.001227903	0.044565666	25917	27496	sca 214	Aldehyde dehydrogenase	0 / 84%
file_1_g3157	19.89486576	3.222734818	0.762140335	4.22853203	2.35E-05	0.002217964	27031	28231	sca 146	Alcohol dehydrogenase	2e-104 / 80%
file 1 a5394	122.0123212	3.323084385	0.630036724	5.274429661	1.33E-07	4.93E-05	6100	8317	sca194	Acyl-CoA synthetase	0 / 77%
file_1_g450	11.72562619	3.484975215	1.073400572	3.246667932	0.001167645	0.044526364	26570	28506	sca2	Fumarylacetoacetate hydrolase	3e-47 / 77%
file 1 a1890	110.2486337	3.503033106	0.553906342	6.324233614	2.54E-10	1.57E-07	59475	60866	sca 77	Sterol carrier protein	0 / 87%

Gene	baselMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Position start	Position stop	Scaffold	Blast	e value / % identity
file 1 g3462	542.1808863	3.515516202	0.75887538	4.632534268	3.61E-06	0.000445741	66031	67625	sca 64	Citrate synthase	0 / 86%
file_1_g4314	22.08399673	3.522490458	0.865304746	4.070809127	4.69E-05	0.003335369	30663	29358	sca 89	Carboxy-muconate cyclase	2 <sup>e</sup> -130 / 76%
file 1 g501	21.83227938	3.625245757	0.889563278	4.075309587	4.60E-05	0.003335369	223663	226437	sca 2	No similarity	
file_1_g4222	8.514902818	3.695825724	0.935259702	3.951657187	7.76E-05	0.005299787	47194	49194	sca82	Acyl-CoA-dehydrogenase domain	2 <sup>e</sup> -18 / 75%
file 1 g4418	79.75752448	4.362503448	1.04371149	4.179798239	2.92E-05	0.002454829	53488	54524	sca73	Succinate fumarate transporter	0 / 86%
file 1 g4541	12.35450574	4.784989086	1.325132849	3.610950472	0.000305077	0.015262091	3155	4519	sca444	Acyl-CoA-dehydrogenase	0 / 85%
file_1_g2627	156.5251342	5.487106499	0.820525366	6.687308799	2.27E-11	2.10E-08	10049	12040	sca49	Flavin binding monooxygenase	e-105 / 72%
file_1_g4315	316.1042987	6.598667927	0.984424034	6.703074789	2.04E-11	2.10E-08	31467	32429	sca89	Catechol 1,2-dioxygenase	6 <sup>e</sup> -130 / 83%

Supplemental Table S2: List of differentially expressed genes in *Ceratocystiopsis minuta* grown in the presence of lignin vs. control growth condition.

Gene	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Position start	Position stop	Scaffold	Blast	e value / % identity
file_1_g6101	16.84456858	- 3.32	0.825399392	- 4.018441118	5.86E-05	0.004353914	8382	9064	sca 104	Uncharacterized protein	6e-54 / 88%
file_1_g5037	22.52791623	- 2.02	0.551039884	- 3.660244959	0.000251974	0.012690339	71316	72023	sca 44	No similarity	
file_1_g6510	215.308191	- 1.72	0.406955547	- 4.214961256	2.50E-05	0.002306681	40597	41644	sca 107	Methylsterol monooxygenase	0 / 85%
file_1_g6459	170.7613259	- 1.54	0.348270108	- 4.415894512	1.01E-05	0.001114572	87085	88206	sca42	C-5 sterol desaturase	0 / 85%
file_1_g4616	869.9599242	- 1.48	0.398086821	- 3.711519497	0.000206019	0.011045266	4495	5571	sca 357	No similarity	
file_1_g2474	72.90773826	- 1.4	0.308422248	- 4.544261258	5.51E-06	0.000654451	20443	21815	sca 71	Pyruvate dehydrogenase alpha subunit	0 / 88%
file_1_g1365	76.89618238	- 1.21	0.331131847	- 3.639820948	0.000272828	0.013336459	18250	19892	sca 57	Pyruvate kinase	0 / 87%
file_1_g2458	299.7268485	1.15	0.333004311	3.459486433	0.000541207	0.022487132	19702	21181	sca 120	Isocitrate dehydrogenase	0 / 87%
file_1_g1295	129.1476599	1.43	0.341433718	4.184897044	2.85E-05	0.002370805	12038	12976	sca 191	Enoyl-CoA hydratase	0 / 87%
file_1_g2519	55.47139641	1.43	0.395729221	3.602588424	0.000315064	0.014545463	36759	37982	sca 101	Amino acid aminotransferase	0 / 80%
file_1_g4178	179.9461247	1.58	0.422883705	3.734120877	0.000188372	0.01043581	23086	25608	sca 169	No similarity	
file_1_g3154	91.69941953	1.61	0.421376623	3.820030669	0.000133435	0.007920325	18147	19974	sca 146	NADPH-oxidase	0 / 82%
file_1_g4799	64.88803737	1.63	0.408131788	3.999706551	6.34E-05	0.004353914	112925	113431	sca 23	No similarity	
file_1_g1563	159.7127333	1.65	0.308629047	5.330986493	9.77E-08	2.32E-05	87735	88777	sca 1	No similarity	
file_1_g6288	38.27775874	2.16	0.53933997	4.00629519	6.17E-05	0.004353914	76720	78418	sca 37	Acyl-CoA dehydrogenase	0 / 82%
file_1_g3571	52.6288014	2.18	0.576353442	3.787506733	0.000152167	0.008720718	52305	53736	sca 86	Muconate lactonizing enzyme	0 / 84%
file_1_g3793	195.5143621	2.23	0.448851639	4.970918238	6.66E-07	0.000100682	4836	6099	sca 91	Nitropropane dioxygenase	0 / 83%
file_1_g5142	37.05830436	2.27	0.568151782	3.992095129	6.55E-05	0.004353914	742	1623	sca 312	Enoyl coA hydratase	e-156 / 82%
file_1_g2163	99.86021089	2.31	0.628175282	3.673167371	0.000239562	0.012442275	123428	124747	Sca 6	Acetyl-CoA acyltransferase	0 / 87%

Gene	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Position start	Position stop	Scaffold	Blast	e value / % identity
file 1 g2388	48.92910961	2.31	0.496238191	4.648193306	3.35E-06	0.000459841	10181	12003	Sca 20	No similarity	
file 1 a4828	443.0198579	2.36	0.600725162	3.929105437	8.53E-05	0.005450238	12942	15039	Sca 102	Fumarate reductase	0 / 82%
file_1_g3357	101.9724916	2.41	0.732944282	3.288330021	0.001007836	0.038286927	67890	68840	sca 60	3-oxoacyl-reductase	e-175 / 89%
file_2_470_g	33.36656169	2.42	0.62929932	3.841486259	0.000122292	0.007527726	13641	134692	sca 6	Nitronate monooxygenase	e-173 / 81%
file_1_g4758	29.69936847	2.47	0.49313693	5.012564889	5.37E-07	9.92E-05	3057	4260	Sca 350	Peroxisomal transporter	e-117 / 83%
file_1_g4336	305.8364652	2.55	0.702228618	3.626022923	0.00028782	0.01366733	5175	6986	sca 469	Acyl-CoA dehydrogenase	0 / 85%
file 1 a5799	57.58712497	2.56	0.553115538	4.633414541	3.60E-06	0.000459841	41120	42628	sca 24	3-oxoacyl-reductase	e-72 / 85%
file_1_g3157	19.89486576	2.65	0.773024723	3.424145851	0.000616735	0.025000336	27031	28231	sca 146	Alcohol dehydrogenase	2e104 / 80%
file 1 a759	306.7780586	2.68	0.609384343	4.391441062	1.13E-05	0.001169652	21705	23285	sca 68	Acetyl-CoA hvdrolase	0 / 89%
file 1 g6165	152.5989519	2.71	0.508783626	5.334412079	9.59E-08	2.32E-05	9027	10332	sca 78	Acyl-CoA dehydrogenase	0 / 85%
file_1_g501	21.83227938	2.95	0.898941521	3.286720735	0.001013613	0.038286927	223663	226437	Sca 2	No similarity	
file 1 g3580	141.6423566	3.06	0.747046302	4.101650773	4.10E-05	0.003246543	25673	27312	sca 110	Glycerol kinase	0 / 83%
file_1_g4314	22.08399673	3.12	0.872068938	3.577113537	0.000347409	0.01560525	30663	29358	Sca 89	Carboxy-cis-muconate cyclase	2e-130 / 76%
file 1 g5394	122.0123212	3.14	0.631185183	4.978449261	6.41E-07	0.000100682	6100	8317	Sca 194	Acyl-CoA synthetase	0 / 77%
file_1_g2626	9.20339804	3.17	0.889314583	3.566186228	0.000362214	0.015842098	8680	9402	sca49	No similarity	
file 2 1544	62.00971358	3.2	0.558098479	5.73588588	9.70E-09	4.03E-06	85804	87536	sca 29	Methyl citrate dehydratase	0 / 90%
file 1 a1890	110.2486337	3.25	0.555559407	5.853091974	4.83E-09	2.67E-06	59475	60866	sca 77	Sterol carrier protein	0 / 87%
file_1_g5530	113.8503304	3.38	1.024597712	3.294305355	0.000986653	0.038286927	4518	6165	sca 449	Cyclopentanone mono-oxygenase	0 / 78%
file 1 a2084	353.4300794	3.49	0.831167553	4.193087513	2.75E-05	0.002370805	160229	162714	sca 3	Acetyl-CoA synthetase	0 / 84%
file 1 g1062	19.68397183	3.82	0.885936579	4.312825894	1.61E-05	0.001575782	7526	9440	sca 351	MFS transporter	0 / 80%
file 1 g3462	542.1808863	4.08	0.758762409	5.379111261	7.49E-08	2.32E-05	66031	67625	Sca 64	Citrate lyase	0 / 86%
file_1_g2627	156.5251342	5.14	0.821422015	6.25413575	4.00E-10	3.32E-07	10049	12040	sca 49	Flavin binding monooxygenase	e-105 / 72%
file 1 g4418	79.75752448	5.28	1.042363959	5.66824197	4.05E-07	8.40E-05	53488	54524	sca 73	Succinate fumarate transporter	0 / 86%

Gene	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	Position start	Position stop	Scaffold	Blast	e value / % identity
file_1_g1765	154.9833728	5.53	1.592486109	3.471744865	0.000517088	0.022035883	3260	5434	sca 308	Propionyl-CoA synthetase	3e-121 / 74%
file_1_g4315	316.1042987	7.12	0.984306383	7.23034638	4.82E-13	8.01E-10	31467	32429	sca 89	Catechol dioxygenase	6e-130 / 83%

## **Discussion**

Les scolytes, qui appartiennent à la famille des Curculionidae et à la sous-famille des Scolytinae, sont connus comme étant parmi les ravageurs les plus importants des forêts de conifères à l'échelle mondiale (FAO 2009). Leur impact sur les écosystèmes forestiers est un sujet de préoccupation continue, car ils peuvent causer des dommages dévastateurs aux arbres, entraînant des épidémies généralisées et, dans certains cas, le dépérissement de vastes zones boisées (Cudmore *et al.*, 2010 ; Tittiger et Blomquist, 2016 ; Lieutier *et al.*, 2016). Plusieurs régions à travers le monde ont été témoins du potentiel destructeur de ces insectes, avec des millions d'hectares de forêts disparaissant à la suite de leur infestation. L'hémisphère nord, en particulier le Canada, les USA et la Suède, compte les forêts les plus gravement touchées (Tittiger et Blomquist, 2016).

Il est important de noter que toutes les espèces de scolytes n'ont pas le même potentiel dévastateur. Certaines espèces ont évolué pour coexister avec les arbres sans causer de dommages significatifs, tandis que d'autres sont aujourd'hui bien connues pour leur capacité à décimer les forêts (Rudinsky, 1962). Comprendre les facteurs qui contribuent à la différence d'impact de ces espèces est un sujet de recherche d'actualité. Un aspect important impactant la prévalence et l'intensité des infestations de scolytes est le réchauffement climatique global. Ce dernier entraîne des températures de plus en plus élevées, ce qui affecte le cycle de vie et le comportement de ces insectes (Logan *et al.*, 2003 ; Logan *et al.*, 2004 ; Jönsson *et al.*, 2011). Diverses études ont montré une corrélation entre l'augmentation des températures et la fréquence et la gravité des infestations de scolytes (Dobbertin *et al.*, 2007). De plus, les stress résultant de dommages mécaniques, de la sécheresse, de la perturbation de la nutrition ou de la pollution de l'air sont susceptibles d'augmenter la sensibilité des arbres aux scolytes, et par conséquent, le développement d'épidémies à grande échelle (Hlásny et Turčáni, 2013).

Dans une étude menée au Canada, Maness *et al.* (2012) ont observé un changement de température concomitamment à une infestation de scolytes en Colombie-Britannique, mettant ainsi en évidence l'influence profonde du changement climatique sur les écosystèmes forestiers. Cet événement, au cours duquel environ 170 000 kilomètres carrés de forêt ont été attaqués par des scolytes, fournit un exemple de l'interaction complexe entre le climat, la santé des forêts et les dynamiques mondiales du carbone. Le changement climatique est devenu un facteur clé de la prévalence et de l'intensité des épidémies de scolytes, et l'étude canadienne en Colombie-Britannique illustre ce lien. Les températures plus élevées ont étendu le potentiel reproductif des scolytes, leur permettant d'infester de plus vastes zones de forêts.



Les épidémies à grande échelle causées par ces insectes ne sont pas seulement favorisées par le changement climatique ; elles contribuent également au réchauffement climatique en augmentant la mortalité des forêts. Les conséquences de ces infestations sont étendues. À mesure que les infestations de scolytes progressent, elles entraînent par la mortalité des arbres, une réduction significative de la transpiration de la couverture végétale. Avec la perte d'arbres sains, le rayonnement solaire entrant, qui était précédemment utilisé pour évaporer l'eau par transpiration, chauffe désormais le sol forestier, entraînant une augmentation des températures locales. Les effets de ces épidémies à l'échelle continentale vont donc au-delà des écosystèmes locaux. On s'attend à ce qu'elles aient des conséquences substantielles sur le bilan carbone mondial. Comme ces infestations conduisent à une augmentation de la mortalité des forêts et à une diminution de la séquestration du carbone, il est à craindre que la capacité de ces forêts à agir comme puits de carbone soit compromise (Anderegg *et al.*, 2015).

Des études basées sur des modèles de population fournissent des prédictions alarmantes. Les forêts boréales du centre du Canada, qui ne sont pas menacées actuellement, risquent de devenir des régions à forte probabilité d'épidémies d'ici la fin du siècle. Ces modèles suggèrent que la pertinence de la température pour les infestations de scolytes se déplace vers des latitudes et des altitudes plus élevées, identifiant des régions actuellement préservées comme présentant un potentiel élevé pour de futures épidémies (Bentz *et al.*, 2010). Dans l'Ouest des États-Unis, on estime que 53 700 kilomètres carrés de forêts ont disparu entre 1997 et 2010, principalement en raison de l'activité du scolyte du pin ponderosa (*Dendroctonus ponderosae*), le scolyte du sapin (*Dendroctonus rufipennis*) et l'ips du pin (*Ips confusus*) (Meddens *et al.*, 2012). Par la suite, ces chiffres ont été revus à la hausse, puisqu'en 2016, la même équipe estimait à partir d'images satellite, que durant les trois dernières décennies, les scolytes avaient entraîné la mort de 6,6 Mha de forêts dans l'Ouest des États-Unis, davantage que les feux de forêts (2,7 à 5,9 Mha) (Hicke *et al.*, 2016). Quant à l'Europe, un déclin des épicéas a également été signalé en Allemagne, en Autriche, en Pologne, en République Tchèque et en Slovaquie (Jankowiak, 2005 ; Hlásny et Turčáni, 2013 ; Huo *et al.*, 2021).

Compte tenu de ses implications significatives sur les écosystèmes forestiers et l'environnement, la prolifération des scolytes dans les régions méditerranéennes est devenue également une préoccupation majeure au cours des dernières années, y compris en Algérie. A titre d'exemple, un incident alarmant dans l'Ouest de l'Algérie, en particulier dans la région d'Oran, met en lumière la gravité de cette question. Dans cette région, une forêt de pins d'Alep a attiré l'attention en raison d'une infestation dévastatrice par des scolytes. Comme l'a rapporté l'agence de presse Algérienne en

2022, cette forêt a été touchée à 60% par ces ravageurs. Cet incident rappelle de manière frappante l'impact profond que les épidémies de scolytes peuvent avoir sur les forêts. Les conséquences vont au-delà de la perte immédiate d'arbres, englobant la perturbation écologique, les défis économiques et les menaces potentielles pour la biodiversité. Il est donc urgent de traiter les facteurs sous-jacents contribuant à ces infestations, tels que le changement climatique et le stress hydrique qui en résulte pour les arbres hôtes, et de comprendre les dynamiques complexes entre les scolytes et leur environnement. Bien que l'Algérie n'ait pas été épargnée par ces épidémies, les études sur les scolytes dans notre pays sont restées relativement rares.

L'enquête menée dans le cadre de ce projet revêt une importance particulière, car elle constitue la première étude sur les insectes xylophages dans les monts du Hodna et le massif des Bibans, une région d'une grande importance écologique qui sépare le Sahara aride des plaines semi-arides. Cette étude a permis d'obtenir une première évaluation des populations actuelles de scolytes dans cette zone restée largement inexplorée à cet égard. Les monts du Hodna, situés dans le centre-est de l'Algérie, qui relie l'Atlas tellien et l'Atlas saharien, représentent une niche écologique unique.

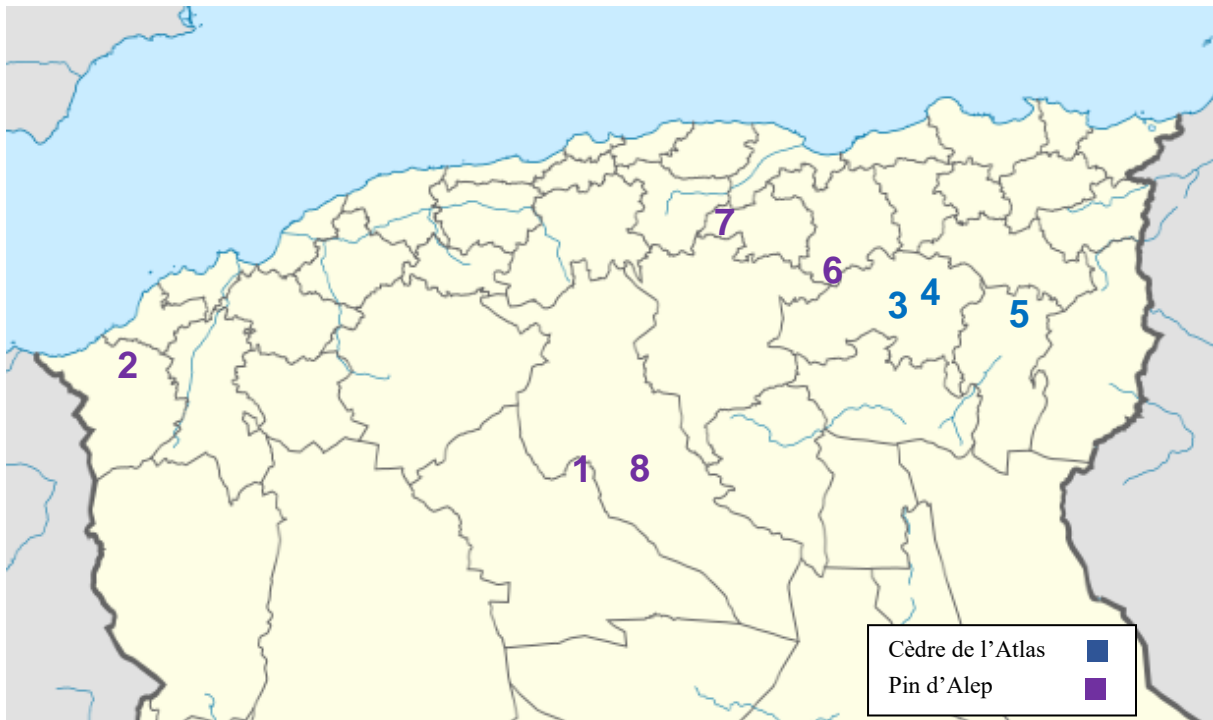
Sur les 21 espèces de scolytes recensées en Algérie (Tableau 2), 11 ont la capacité de coloniser le pin d'Alep. Déterminer qu'elles sont les espèces de scolytes menaçant les forêts de pins d'Alep est essentiel pour mettre en place des stratégies de gestion efficaces et préserver la santé de ces écosystèmes forestiers. Par conséquent, notre enquête ne contribue pas seulement à la connaissance des scolytes installés dans les montagnes du Hodna et des Bibans, mais fournit également de nouvelles informations sur les espèces spécifiques qui impactent les pins d'Alep en Algérie, ce qui devrait renforcer notre capacité à protéger cette ressource.

Plusieurs études menées au cours des dernières années dans diverses régions d'Algérie ont permis d'identifier plusieurs espèces de scolytes infestant les conifères locaux (Figure 23). Les essences forestières les plus gravement touchées par cette infestation sont le pin d'Alep et le cèdre de l'Atlas. Dans la région de Sétif et de Bordj Bou Arréridj, notre étude a mis en évidence la présence de six espèces de scolytes sur le pin d'Alep, parmi lesquelles les plus fréquentes sont *Orthotomicus erosus* et *Crypturgus numidicus*.

**Tableau 3** : Scolytes identifiés dans les forêts de conifères en Algérie, leurs espèces hôtes et leur distribution.

Espèce	Region	Arbre hôte	Forêt	Référence
<i>Cisdygma corioli</i>	Batna	<i>C. atlantica</i>	Boumerzoug	Boukerker et Si Bachir, 2015
<i>Cryphalus numidicus</i>	Batna	<i>C. atlantica</i>	Chelia, Ouled Yagoub Thouggar, Boumerzoug	Beghami <i>et al.</i> , 2020 Talbi et Bouhraoua, 2015
<i>Crypturgus cedri</i>	Batna	<i>C. atlantica</i>	Chelia, Ouled Yagoub Thouggar, Boumerzoug	Beghami <i>et al.</i> , 2020 Talbi et Bouhraoua, 2015
<i>Crypturgus mediterraneus</i>	Setif	<i>P. halepensis</i>	Boutaleb, Ouled Tebbene	Moumeni <i>et al.</i> , 2021
	Bordj Bou Arréridj Tlemcen	<i>P. halepensis</i> <i>P. halepensis</i>	Ouenougha Monts Trara	Moumeni <i>et al.</i> , 2021 Nichane <i>et al.</i> , 2014
<i>Crypturgus numidicus</i>	Setif	<i>P. halepensis</i>	Boutaleb, Ouled Tebbene	Moumeni <i>et al.</i> , 2021
	Bordj Bou Arréridj Djelfa	<i>P. halepensis</i> <i>P. halepensis</i>	Ouenougha Senalba Chergui	Moumeni <i>et al.</i> , 2021 Houda <i>et al.</i> , 2023
<i>Hylastes ater</i>	Batna	<i>C. atlantica</i>	Thouggar, Boumerzoug	Talbi et Bouhraoua, 2015
<i>Hylastes batnensis</i>	Batna	<i>C. atlantica</i>	Chelia, Ouled Yagoub	Beghami <i>et al.</i> , 2020
<i>Hylastes cunicularius</i>	Djelfa	<i>P. halepensis</i>	Senalba Chergui	Houda <i>et al.</i> , 2023
<i>Hylurgops bonvouloiri</i>	Batna	<i>C. atlantica</i>	Chelia, Ouled Yagoub	Beghami <i>et al.</i> , 2020
<i>Hylurgus ligniperda</i>	Bordj Bou Arréridj Djelfa	<i>P. halepensis</i> <i>P. halepensis</i>	Ouenougha Senalba Chergui	Moumeni <i>et al.</i> , 2021 Houda <i>et al.</i> , 2023
	Tlemcen	<i>P. halepensis</i>	Monts Trara	Nichane <i>et al.</i> , 2014
<i>Hylurgus micklitzii</i>	Sétif	<i>P. halepensis</i>	Boutaleb, Ouled Tebbene	Moumeni <i>et al.</i> , 2021
<i>Orthotomicus erosus</i>	Setif	<i>P. halepensis</i>	Boutaleb, Ouled Tebbene	Moumeni <i>et al.</i> , 2021
	Bordj Bou Arréridj Djelfa	<i>P. halepensis</i> <i>P. halepensis</i>	Ouenougha Senalba Chergui	Moumeni <i>et al.</i> , 2021 Houda <i>et al.</i> , 2023
	Batna	<i>C. atlantica</i>	Chelia, Ouled Yagoub Thouggar	Beghami <i>et al.</i> , 2020 Talbi et Bouhraoua, 2015
	Tlemcen	<i>P. halepensis</i>	Monts Trara	Nichane <i>et al.</i> , 2014
<i>Orthotomicus laricis</i>	Tlemcen	<i>P. halepensis</i>	Monts Trara	Nichane <i>et al.</i> , 2014
<i>Phloeosinus cedri</i>	Batna	<i>C. atlantica</i>	Chelia, Ouled Yagoub Boumerzoug	Beghami <i>et al.</i> , 2020 Boukerker et Si Bachir, 2015
<i>Phloeosinus thujae</i>	Batna	<i>C. atlantica</i>	Boumerzoug	Talbi et Bouhraoua, 2015
<i>Pityogenes bidentatus</i>	Tlemcen	<i>P. halepensis</i>	Monts Trara	Nichane <i>et al.</i> , 2014
<i>Pityogenes calcaratus</i>	Tlemcen	<i>P. halepensis</i>	Monts Trara	Nichane <i>et al.</i> , 2014
<i>Scolytus amygdali</i>	Batna	<i>C. atlantica</i>	Boumerzoug Thouggar, Boumerzoug	Boukerker et Si Bachir, 2015 Talbi et Bouhraoua, 2015
	Batna	<i>C. atlantica</i>	Chelia, Ouled Yagoub Boumerzoug	Beghami <i>et al.</i> , 2020 Boukerker et Si Bachir, 2015
<i>Tomicus destruens</i>	Djelfa	<i>P. halepensis</i>	Senalba Chergui	Houda <i>et al.</i> , 2023
	Setif	<i>P. halepensis</i>	Boutaleb, Ouled Tebbene	Moumeni <i>et al.</i> , 2021
	Bordj Bou Arréridj Djelfa	<i>P. halepensis</i> <i>P. halepensis</i>	Ouenougha Senalba Chergui	Moumeni <i>et al.</i> , 2021 Chakali, 2005
<i>Xyleborus dryographus</i>	Batna	<i>C. atlantica</i>	Chelia, Ouled Yagoub Thouggar	Beghami <i>et al.</i> , 2020 Talbi et Bouhraoua, 2015

*C. atlantica* (*Cedrus atlantica*) : cèdre de l'atlantique ; *P. halepensis* (*Pinus halepensis*) : pin d'Alep.



**Figure 23 : Localisation des différentes études réalisées sur les insectes xylophages des conifères en Algérie.**

1 : Djelfa, Chakali (2005) ; 2 : Tlemcen, Nichane *et al.* (2014) ; 3 : Batna, Talbi et Bouhraoua (2015) ; 4 : Batna, Boukerker et Si Bachir (2015) ; 5 : Batna, Beghami *et al.* (2020) ; 6 : Sétif, Moumeni *et al.* (2021) ; 7 : Bordj Bou Arréridj, Moumeni *et al.* (2021) ; 8 : Djelfa, Houda *et al.* (2023).

Houda et ses collègues (2023) ont identifié 5 espèces de scolytes dans la forêt de pins d'Alep de la région semi-aride de Djelfa en Algérie dont *Hylastes cunicularius*, une espèce unique à cette région et à cet arbre. Leurs résultats sont très similaires aux nôtres, à l'exception de l'espèce *O. erosus* qui était moins abondante dans les forêts de Djelfa que dans notre étude. Cette différence de fréquence peut s'expliquer par les caractéristiques des deux sites étudiés et par des différences climatiques.

Sur le littoral du Nord-Ouest, dans l'Atlas tellien, Nichane et ses collègues (2014) avaient précédemment rapporté six espèces, dont *O. erosus*, ainsi que trois espèces qui infestent le pin d'Alep et qui sont présentes uniquement dans cette région, à savoir *Pityogenes bidentatus*, *Pityogenes calcaratus* et *Orthotomicus laricis*. Enfin, concernant le cèdre de l'Atlas, des études menées dans l'est du pays ont montré la prédominance de scolytes appartenant au genre *Phloeosinus* et *Scolytus*, comme l'ont souligné Talbi et Bouhraoua (2015), ainsi que Beghami et ses collègues (2020). Parmi ces espèces, *Scolytus amygdali* et *S. numidicus* semblent particulièrement abondants dans cette région.

Bien que la diversité des espèces rapportées varie d'une zone géographique à l'autre, probablement en lien avec la composition forestière locale, certaines espèces telles que *O. erosus* et *C. numidicus* semblent être largement distribuées dans le nord de l'Algérie. Leur caractère polyphage pourrait expliquer leur grande capacité de dispersion et cette large répartition. *Orthotomicus erosus* est la seule espèce en Algérie qui colonise à la fois le pin d'Alep et le cèdre de l'Atlas.

L'ensemble de ces travaux apporte une meilleure compréhension de la scolytofaune en Algérie et de ses hôtes. Ils mettent en évidence la nécessité de poursuivre les prospections, en particulier dans l'ouest du pays, où les données sont encore limitées. Une caractérisation plus approfondie des interactions entre les scolytes, les champignons associés et les arbres permettrait de mieux évaluer les risques sanitaires qui pèsent sur les forêts algériennes.

*Tomicus destruens* est considéré comme l'espèce primaire la plus dévastatrice en Algérie, et elle peut attaquer des arbres vivants soumis à un stress (Chakali, 2004 ; Chakali, 2005 ; Chakali, 2007). Elle a également été identifiée dans d'autres forêts de pins de la région méditerranéenne et le long des côtes atlantiques du Portugal, de l'Espagne et de la France (Vasconcelos *et al.*, 2006 ; Sabbatini Peverieri *et al.*, 2008 ; Sarikaya et Avci, 2010 ; Davi *et al.*, 2020). Avec *Orthotomicus erosus*, *T. destruens* est la seule espèce capable de s'attaquer aux arbres vivants, en particulier les pins très communs dans le bassin méditerranéen, y compris dans les régions semi-arides de l'Algérie (Faccoli *et al.*, 2008 ; Lieutier *et al.*, 2016). Ces espèces ont en effet adopté la stratégie d'épuisement de l'hôte, une approche couramment employée par les scolytes méditerranéens colonisant les arbres vivants. Comme *Hylastes ligniperda*, *O. erosus* produit des phéromones d'agrégation pour attirer d'autres individus de son espèce et ainsi orchestrer des attaques massives sur les arbres vivants (Mendel, 1988; Schowalter, 2012). *Tomicus destruens*, en revanche, est attiré par les terpènes émis à partir de blessures d'arbres, résultant de l'activité des scolytes pionniers (Faccoli *et al.*, 2008 ; Lieutier *et al.*, 2016).

Il est important de noter que *T. destruens* a été documenté sur des pins d'Alep dans diverses régions d'Algérie. Les facteurs de stress liés au changement climatique ont amplifié sa multiplication, entraînant le dépérissement des forêts de pins d'Alep dans les régions semi-arides (Chakali, 2007 ; Houda *et al.*, 2023). De manière intéressante, c'est *T. destruens* qui initie la colonisation des pins d'Alep, en tant qu'espèce primaire agressive, suivie par *O. erosus*, considéré comme espèce secondaire. Le succès de ces attaques dépend de la présence d'arbres soumis à des stress et d'un certain niveau de population de ravageurs (Lieutier *et al.*, 2016).

Dans certaines régions, telles que Saragosse en Espagne, les galeries creusées par *O. erosus* occupent des régions plus importantes dans les arbres attaqués comparé à *T. destruens*, soulignant ainsi la capacité de l'espèce à contrer les défenses de l'hôte et à provoquer la mort des arbres (Sangüesa-Barreda *et al.*, 2015). Bien que *O. erosus* soit souvent considéré comme un ravageur secondaire, nos résultats rejoignent ceux d'autres études qui ont constaté sa capacité à attaquer des arbres vivants en situation de stress (Pernek *et al.*, 2019 ; Faccoli *et al.*, 2020). Il pourrait donc lui-aussi représenter une menace significative dans les régions semi-arides.

Les espèces du genre *Crypturgus*, un groupe de scolytes secondaires, colonisent généralement des biotopes précédemment habités par d'autres espèces et n'affectent pas les arbres en bonne santé. Cette étude a confirmé que *Crypturgus numidicus* niche dans l'écorce des pins à un stade de dépérissement avancé et pré-colonisée par d'autres scolytes. Il utilise en effet les galeries creusées par d'autres espèces d'insectes xylophages pour pénétrer sous l'écorce, et pondre ses œufs. Peu d'études se sont intéressées à cet insecte qui passe souvent inaperçu et qui, en dehors des trois massifs forestiers que nous avons étudiés dans la région de Sétif ou de Bordj Bou Arréridj, n'a été rapporté en Algérie que dans l'étude de Houda *et al.* (2023) réalisée dans la forêt de Senalba Chergui dans la région de Djelfa, là aussi à partir de pins d'Alep.

Quant aux espèces du genre *Hylurgus* que nous avons identifiées (*H. ligniperda* et *H. micklitzii*), il s'agit également de scolytes secondaires. Ces insectes ont été retrouvés dans des arbres en décomposition, indiquant leur préférence pour les arbres faibles ou morts, comme dans d'autres études menées en Algérie (Nichane *et al.*, 2014 ; Houda *et al.*, 2023). Enfin, nous avons également observé la présence d'*Aphanommata filum*, une espèce déjà connue en Algérie (Folwaczny, 1973 ; Alonso-Zarazaga, 1988), résidant dans les troncs de conifères avec des galeries creusées dans l'aubier des arbres morts.

Cette étude a donc élargi nos connaissances sur la diversité des scolytes dans les régions semi-arides du Nord-Est de l'Algérie. La présence de *T. destruens* et d'*O. erosus* dans les arbres vivants met en lumière la capacité de ces espèces à attaquer des arbres soumis à un stress, soulignant la menace potentielle qu'elles représentent. L'une des principales raisons à l'origine de l'impact dévastateur des scolytes est leur reproduction rapide et leur tendance à cibler des arbres affaiblis ou stressés. Ceci les rend plus susceptibles aux infestations et réduit leur capacité de défense. Par conséquent, une fois qu'une infestation commence dans une zone, elle peut se propager rapidement. Les invasions de scolytes passent souvent inaperçues jusqu'à ce qu'il soit trop tard. Ces ravageurs ciblent généralement des arbres âgés ou en

mauvaise santé, qui peuvent ne pas présenter immédiatement de signes de détresse. De plus, les scolytes émettent des substances volatiles qui attirent d'autres scolytes, facilitant la formation d'épidémies massives.

Les efforts de surveillance et de gestion des populations de scolytes doivent être renforcés. La situation dans l'ouest de l'Algérie souligne l'importance de mesures proactives, de la recherche scientifique et de la collaboration internationale pour atténuer l'impact de ces ravageurs forestiers et garantir la santé et la durabilité de nos précieux écosystèmes forestiers. De plus, la détection précoce d'une infestation et l'intervention sont essentielles pour prévenir la dévastation généralisée des forêts que pourraient causer ces insectes xylophages.

L'étroite association que ces insectes établissent avec des champignons xylophages est essentielle dans la colonisation de l'arbre hôte. L'identification des symbiontes fongiques des scolytes pourrait constituer une nouvelle méthode de lutte contre ces ravageurs. En assurant la dégradation des composés lignocellulosiques du bois, ces champignons fournissent les nutriments permettant la multiplication de l'insecte ; ils représentent donc par eux-mêmes une menace pour les forêts de conifères des régions fragiles. Les champignons les plus couramment associés aux scolytes sont les champignons ophiostomatoïdes (Kirisits, 2004 ; Hofstetter *et al.*, 2015). Il s'agit d'un groupe polyphylétique de champignons comprenant plusieurs genres appartenant à l'ordre des Microascales, et principalement à la famille des Ceratocystidaceae (Réblová *et al.*, 2011 ; De Beer *et al.*, 2013), ou à l'ordre des Ophiostomatales et la famille des Ophiostomataceae (De Beer et Wingfield, 2013). Ce groupe de champignons inclut les champignons dits "agents de bleuissement" qui causent une décoloration du bois de cœur de l'arbre et produisent des composés toxiques pouvant réduire la capacité de l'arbre à se défendre contre les attaques de scolytes.

Ces champignons qui dépendent étroitement des scolytes pour leur dissémination, produisent des spores recouvertes de mucilage qui facilite leur attachement à la cuticule des insectes et ainsi leur dispersion par les scolytes. Dans cette thèse, nous nous sommes donc focalisés sur les champignons présents en surface des insectes collectés ou dans le mycangium, sans tenir compte des champignons présents dans le système digestif. Bien que les scolytes colonisent souvent les mêmes arbres simultanément ou successivement, de nombreux champignons n'ont été isolés que chez certaines espèces, tels que *Leptographium manifestum*, qui n'a été retrouvé que chez *Crypturgus numidicus*. Ceci pourrait refléter pour ces champignons une spécificité d'hôte.

Inversement, d'autres champignons ont été isolés à partir de différents scolytes. Ainsi, *Ceratocystiopsis minuta* a été isolé à partir de *Crypturgus mediterraneus*, *Crypturgus*

*numidicus*, *Orthotomicus erosus* et *Tomicus destruens*, indiquant une compatibilité plus large avec les vecteurs. De même, *Ophiostoma ips* a été retrouvé chez *Crypturgus numidicus* et *Orthotomicus erosus*. *Ceratocystiopsis minuta*, *Geosmithia lavendula* et *Graphium pseudormiticum* sont les seuls champignons xylophages retrouvés chez *T. destruens*, espèce primaire qui peut s'attaquer à des arbres vivants suggérant que ces champignons possèdent un arsenal enzymatique leur permettant de contourner les défenses de l'arbre. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature qui soulignent, par rapport au Ophiostomataceae, une dépendance moins étroite des espèces du genre *Ceratocystis* vis-à-vis des insectes vecteurs pour leur dispersion, une capacité d'infestation de plantes hôtes très diverses, et une large variété d'insectes vecteurs (Wingfield *et al.*, 2017).

Parmi les champignons isolés à partir des insectes que nous avons collectés dans les forêts de pins d'Alep, de nombreuses espèces sont considérées comme de simples saprophytes, et pourraient être ici des saproxylophages. Concernant ces micromycètes, une certaine spécificité d'hôte est observée pour les *Aspergillus*, contrairement aux *Penicillium* et aux *Talaromyces* qui ont été retrouvés chez plusieurs espèces de scolytes.

Peu d'études se sont intéressées à l'association de ces micromycètes considérés saprophytes aux scolytes. A l'inverse, les champignons xylophages détectés au cours de cette étude ont déjà été observés lors d'épisodes de pullulation de scolytes au cours de plusieurs études réalisées dans la région méditerranéenne (Lieutier *et al.*, 2016). *Ophiostoma ips* en particulier joue un rôle crucial dans la nutrition et la défense des insectes contre les compétiteurs et les agents pathogènes. Sa présence dans diverses régions du monde, notamment en Amérique du Nord, en Europe, en Asie, en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Afrique du Sud et au Chili, souligne l'ampleur de son adaptabilité. Ce champignon est fréquemment associé à différentes espèces de scolytes du genre *Ips* et *Orthotomicus* (Rumbold, 1931 ; Upadhyay, 1981 ; Lieutier *et al.*, 1989 ; Stone et Simpson, 1990), notamment *O. erosus* qui est originaire d'Europe centrale et des pays du pourtour méditerranéen (Mendel et Halperin, 1982) et se serait ensuite dispersé, ou encore du genre *Hylurgus* comme *H. ligniperda*, association rapportée notamment au Chili (Zhou *et al.*, 2004). De même, *C. minuta*, qui a été initialement décrit en Pologne en 1939, a été retrouvé en association avec de nombreux scolytes infestant des conifères dans le monde entier, ce qui confirme sa capacité à s'adapter à un large éventail d'espèces de scolytes.

La présence de *Leptographium manifestum* en Algérie, notamment en association avec *Crypturgus numidicus*, est une découverte importante qui élargit notre compréhension de la répartition de ce champignon. Enfin, *Graphium pseudormiticum*,



précédemment observé en Afrique du Sud, en Chine et en Europe, a été isolé pour la première fois en Algérie, montrant sa capacité à s'associer avec différentes espèces de scolytes dans des régions variées.

Les relations entre les champignons et les scolytes sont complexes et variées. Bien que cette étude ne permette pas de déterminer le degré de mutualisme qui unit ces organismes, les résultats obtenus montrent que les champignons associés aux insectes xylophages diffèrent d'un insecte à l'autre et que la plupart des champignons identifiés peuvent être associés à plus d'une espèce de scolytes, suggérant que ces champignons ne sont pas associés spécifiquement à un scolyte particulier, mais qu'ils ont au contraire une large gamme d'insectes vecteurs.

Les arguments en faveur ou contre l'existence d'une relation mutuellement bénéfique entre les scolytes et les champignons ont été largement investigués. Les champignons jouent un rôle essentiel dans la relation entre les scolytes et les arbres. Ils aident les insectes à localiser les arbres affaiblis et leur offrent une protection contre les prédateurs et les concurrents. Les scolytes à ambrosia, par exemple, cultivent des champignons dans des structures spécialisées sous l'écorce, les utilisant comme source de nourriture et pour supprimer d'autres champignons qui pourraient être nuisibles pour leurs larves. D'autres espèces de scolytes portent des champignons sur leur corps ou dans le mycangium, et les utilisent pour inoculer les arbres et se nourrir des produits de dégradation de la lignine ou de la cellulose générés par les champignons.

Ceci nous a conduit à étudier les capacités de dégradation des composants de l'écorce par les champignons que nous avons isolés. La plupart de ces micromycètes se sont révélés capables de croître en présence d'écorce ou de lignine comme seule source de carbone, avec parfois une croissance radiale plus importante en présence de ces substrats comparativement à ce observé en présence d'une quantité équivalente de glucose, qu'il s'agisse de champignons connus comme xylophages ou de micromycètes classiquement considérés comme saprophytes. La lignine est un composant majeur de l'écorce des arbres, et la capacité des champignons à l'utiliser comme source de carbone et d'énergie est donc un reflet de leur caractère xylophage. La dégradation de ce composé polyaromatique nécessite, dans un premier temps, l'action de diverses enzymes, notamment des laccases et des peroxydases, et les expériences que nous avons réalisées, ont montré une augmentation des activités enzymatiques correspondantes lorsque ces champignons sont cultivés sur des milieux riches en lignine. Cette constatation suggère que, outre quelques champignons entomophages et des champignons bien connus comme xylophages, les espèces fongiques ici identifiées qui sont habituellement considérées comme de simples

saprophytes, sont bien capables de dégrader la lignine, et sont donc des saproxylophages.

Deux isolats, représentatifs de ces deux groupes de champignons, et pour lesquels la séquence du génome était disponible, ont donc été sélectionnés pour réaliser une analyse de la réponse transcriptionnelle à la présence d'écorce de pin ou de lignine comme seule source de carbone. Bien que ces expériences doivent être reproduites pour avoir une couverture plus large du transcriptome de ces deux isolats dans les différentes conditions de culture étudiées, les résultats obtenus montrent clairement des différences de comportement entre les deux champignons. Pour *C. minuta* choisi comme représentant des champignons connus comme xylophages, les gènes surexprimés en présence d'écorce ou de lignine codent des enzymes impliquées dans les étapes tardives de la dégradation de la lignine (voies inférieures), notamment dans la voie du gentisate et celle du protocatéchuate, ou dans la production d'ATP via le cycle des acides tricarboxyliques. A l'inverse, *A. citrinoterreus* surexprime en premier lieu des gènes codant des enzymes impliquées dans le catabolisme des polysaccharides, en l'occurrence la cellulose qui bien que minoritaire dans l'écorce, n'en est pas moins présente, et des résultats identiques sont observés en présence de lignine, ce qui soulève la question du degré de pureté du réactif utilisé. Compte tenu du grand nombre de gènes surexprimés chez *A. citrinoterreus*, nous nous sommes focalisés pour cette thèse sur les gènes les plus surexprimés ou sous-exprimés, et l'analyse des gènes différentiellement exprimés devra être poursuivie.

Par ailleurs, parmi les gènes surexprimés chez *C. minuta* figurent également des gènes codant des enzymes impliquées dans la protection du champignon vis-à-vis du stress oxydatif. La dépolymérisation de la lignine fait appel à diverses enzymes, notamment des peroxydases, et l'ouverture des noyaux aromatiques nécessite l'intervention de diverses dioxygénases. Ces réactions génèrent une quantité importante de radicaux oxygénés, et sont donc à l'origine d'un stress oxydant vis-à-vis duquel le champignon doit se protéger *via* la production de superoxyde dismutases, de catalases et peroxydases, et des composants du système de la thiorédoxine (thiorédoxine et thiorédoxine réductases) ou du système du glutathion (glutathion peroxydases notamment) (Staerck *et al.*, 2017). Les gènes correspondants n'ont pas été retrouvés comme surexprimés, peut être en relation avec le trop faible nombre de reads obtenus. Néanmoins, parmi les gènes les plus surexprimés figurent déjà deux gènes codant des nitronate monoxygénases, enzymes largement étudiées chez *Neurospora crassa*, *Hansenula mrakii* ou *Fusarium oysporum* chez lesquels elles catalysent par des réactions d'oxydation à partir de l'oxygène moléculaire ou des anions superoxydes, la détoxification des nitroalkanes, et participent ainsi à la protection vis-à-vis du stress oxydant (Gadda et Francis, 2010).

Enfin, cette étude a révélé de manière intéressante une répression du métabolisme secondaire dans les conditions de culture étudiées. La plupart, sinon la totalité, des gènes les plus sous-exprimés chez *A. citrinoterreus* cultivé en présence d'écorce ou de lignine sont en effet impliqués dans le métabolisme secondaire. Par opposition à la biosynthèse des protéines, des glucides des lipides et des acides nucléiques, le métabolisme secondaire n'est pas indispensable à la vie. Néanmoins, les produits du métabolisme secondaire jouent un rôle physiologique important dans certaines conditions de culture, par exemple en protégeant le champignon vis-à-vis des rayonnements ionisants (pigments de type mélanine) ou en permettant l'acquisition du fer extracellulaire dans un milieu carencé en fer (sidérophores).

Ces métabolites secondaires appartiennent à différentes classes, les principales étant les dérivés terpéniques qui résultent de l'assemblage d'unités diméthylallyl ou isopentényl (paclitaxel par exemple), les peptides non ribosomiques qui résultent de l'assemblage d'acides aminés sous l'effet d'enzymes appelées peptides synthétases non ribosomiques (NRPS ; gliotoxine par exemple) et les polycétides qui résultent de l'assemblage d'unités de malonyl-CoA sous l'effet d'enzymes appelées *polyketide synthases* (PKS). Ces polycétides possèdent diverses propriétés mises à profit en thérapeutique humaine puisqu'on décrit, par exemple, parmi les polycétides d'origine fongique, des molécules à activité hypolipémiante (lovastatine), immunosuppressive (acide mycophénolique), ou encore antifongique (fumagilline).

Les PKS sont des enzymes comprenant plusieurs domaines, avec systématiquement un domaine acyltransférase (domaine AT) qui va reconnaître les unités de malonyl-CoA et les présenter au domaine ACP (pour *acyl carrier protein*). Ce domaine comporte un résidu sérine sur lequel est greffé un groupement phosphopantétheine (PP). L'unité de malonyl CoA va se greffer sur le groupement PP, puis après décarbonylation, le groupement acyl sera transféré au dernier domaine obligatoire, le domaine de condensation sur lequel s'effectuera l'élongation de la chaîne carbonée. D'autres domaines dits facultatifs, peuvent être présents, notamment un domaine céto-réductase qui permettra la réduction de tout ou partie des fonctions cétone, un domaine déshydratase qui permettra l'élimination de tout ou partie des groupements hydroxyles générés sous l'effet du domaine précédant, et un domaine énoyl réductase qui permettra la réduction de tout ou partie des double liaisons générées par le domaine déshydratase. Par ailleurs, les gènes codant les PKS sont organisés en clusters, dans lesquels ils sont entourés de gènes codant des enzymes dites de décoration (par exemple des méthyl transférases), mais aussi des gènes codant des protéines d'efflux qui assureront l'excrétion du métabolite final, et d'un gène codant un facteur de transcription.

L'étude des gènes les plus sous-exprimés chez *A. citrinoterreus* cultivé en présence d'écorce ou de lignine montre qu'ils sont pour la plupart impliqués dans cette synthèse, qu'il s'agisse de gènes codant des PKS, des protéines fixant le phosphopantéthéine, des enzymes de décoration ou encore des protéines d'efflux. Différentes hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer la régulation négative de ce métabolisme secondaire en présence d'écorce ou de lignine, comme la production d'une molécule inhibitrice lors de la dégradation des composants du bois, ou une stratégie d'économie de l'énergie produite. De plus amples investigations sont nécessaires pour comprendre ces mécanismes de régulation, ce qui pourrait accroître les connaissances sur ces voies métaboliques très prometteuses sur le plan thérapeutique.

## **Conclusion et perspectives**

Les recherches que nous avons menées dans la région de Sétif et de Bordj Bou Arreridj ont fourni des informations importantes sur la répartition et l'impact des scolytes, en mettant en évidence la présence de 7 espèces de scolytes capables d'attaquer le pin d'Alep, et surtout des arbres vivants. Nos résultats confirment la présence bien établie d'*Orthotomicus erosus* et de *Tomicus destruens* en tant que ravageurs majeurs dans la région méditerranéenne, où ils menacent particulièrement les conifères, en particulier le pin d'Alep. Le climat méditerranéen, caractérisé par des températures élevées et des périodes de sécheresse répétées, offre un environnement idéal pour la prolifération de ces insectes. Il est important de noter que notre recherche a également mis en lumière la coexistence d'*O. erosus* avec d'autres espèces de scolytes, notamment *Crypturgus numidicus*, ce qui suggère des interactions interspécifiques qu'il conviendrait d'explorer.

D'une manière plus large, il faut souligner la nécessité de poursuivre ce type d'étude pour comprendre de manière exhaustive le comportement, la répartition et l'impact écologique des scolytes dans les régions semi-arides de l'Algérie.

Il est évident que la présence d'*Orthotomicus erosus* représente une menace considérable pour la santé et la durabilité des forêts de conifères dans le bassin méditerranéen, exigeant une vigilance continue et des efforts de recherche pour protéger ces écosystèmes essentiels. Notre étude constitue une contribution à cet effort collectif visant à préserver les paysages forestiers de la région et à approfondir les connaissances sur ces insectes ravageurs.

Les recherches futures devront inclure l'identification moléculaire des échantillons d'insectes, mais aussi un génotypage des insectes, ce qui contribuera à la compréhension de la dissémination des différentes populations. Ces études devront se baser sur des systèmes de piégeage normalisés utilisant des leurres (multi-espèces). Ceux-ci sont essentiels pour surveiller les espèces et établir des comparaisons avec d'autres pays. Des stratégies de gestion efficaces ne peuvent être élaborées qu'à travers une compréhension approfondie de ces ravageurs et de leurs interactions avec les écosystèmes forestiers environnants.

Nos travaux d'identification des champignons associés aux scolytes ont révélé que la majorité des espèces identifiées appartiennent au groupe des champignons saprophytes, qui ici se comportent en saproxylophages en participant à la dégradation du bois mort. Néanmoins de véritables xylophages ont également été identifiés. Ces champignons vivent en symbiose avec les scolytes, profitant de l'insecte pour leur dissémination, et à l'inverse fournissant à l'insecte les nutriments pour assurer sa multiplication. Parmi les espèces associées aux scolytes, *C. minuta* et *O. ips* se sont révélées les plus répandues. Il serait cependant intéressant dans les études futures

d'envisager le recours aux techniques de métagénomique, afin d'avoir un recensement plus exhaustif des espèces fongiques associées aux scolytes, les cultures étant parfois mises en défaut lors de la présence simultanée de différentes espèces fongiques. Les champignons réellement xylophages présentent souvent une croissance relativement lente, et leur présence est facilement masquée en culture par des champignons saprophytes de croissance souvent plus rapide comme les *Aspergillus* ou des Mucorales. Par ailleurs, ces études devraient intégrer l'analyse de la mycoflore du système digestif des scolytes pour permettre des comparaisons avec les micromycètes de la cuticule de l'insecte, et ainsi préciser les interactions symbiotiques. Enfin, l'isolement des champignons à partir des galeries creusées par les insectes devrait également être envisagée pour une meilleure compréhension de ces interactions. Une telle approche diversifiée permettrait d'explorer en profondeur les liens complexes entre les scolytes et les champignons qui les accompagnent, et ainsi d'enrichir notre connaissance des écosystèmes forestiers et de leurs acteurs clés.

Si la plupart des espèces fongiques identifiées dans cette étude se sont révélées capables de croître sur un milieu additionné d'écorce de pin ou de lignine comme seule source de carbone, et parfois davantage que sur milieu contenant une concentration équivalente de glucose, l'analyse transcriptomique que nous avons réalisée sur deux espèces fongiques représentatives des deux groupes majeurs de champignons identifiés a clairement montré des différences de comportement. Des différences profondes de comportement en présence d'écorce ou de lignine ont été observées dans le transcriptome de ces deux espèces, choisies pour la disponibilité de la séquence de leur génome, vraisemblablement en lien avec leur caractère saproxylophage ou xylophage. Pour *Aspergillus citrinoterreus*, les gènes les plus surexprimés concernaient principalement le catabolisme des polysaccharides, suggérant une utilisation préférentielle de la cellulose. Inversement, pour *C. minuta*, le substrat préférentiel semble être la lignine, les gènes les plus surexprimés étant impliqués dans l'ouverture des noyaux aromatiques, principalement par la voie du gentisate et du protocatéchuate, et l'utilisation des produits de dégradation dans le cycle de Krebs. Par ailleurs, ces analyses ont montré une surexpression de gènes impliqués dans la protection vis-à-vis du stress oxydant, et à l'inverse une régulation négative du métabolisme secondaire assurée par les polykétides synthases. Sur un plan fondamental, les liens entre ces différentes observations mériteraient d'être précisés, compte tenu des applications industrielles que représentent la dégradation des dérivés lignocellulosiques et le métabolisme secondaire.

## Références



- Alonso-Zarazaga MA. 1988. The genus *Aphanommata* Wollaston, 1873 in the old world (Coleoptera: Curculionidae, Cossoninae). *Insect Systematics and Evolution* 19:325–331. DOI: 10.1163/187631289X00195.
- Anderegg WRL, Hicke JA, Fisher RA, Allen CD, Aukema JE, Bentz B, Hood S, Lichstein JW, Macalady AK, Nate G, McDowell NG, Pan Y, Raffa K, Sala A, Shaw JD, Stephenson NL, Tague CL, Zeppel M. 2015. Tree mortality from drought, insects, and their interactions in a changing climate. *New Phytologist* 208:674–683. doi.org/10.1111/NPH.13477
- Ayres MP, Wilkens RT, Ruel JJ, Lombardero MJ, Vallery E. 2000. Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. *Ecology* 81:2198–2210.
- Beghami R, Bertella N, Laamari M, Bensaci OA. 2020. Bark beetle and woodborer insects' outbreak as a potent driver of Atlas cedar (*Cedrus atlantica* (Endl.) Carriere) forests dieback in Aures -East Algeria-. *Forest Science and Technology* 16:75–85. doi.org/10.1080/21580103.2020.1756929
- Bellakhdar J. 2017. La pharmacopée marocaine traditionnelle, 2<sup>ème</sup> édition augmentée. Le Fennec, Casablanca (Maroc). 1370 pp.
- Benderradji MEH, Alatou D, Arfa AMT, Benachour K. 2006. Problèmes de dégradation de l'environnement par la désertification et la déforestation : Impact du phénomène en Algérie. *New Medit* 5:15–22.
- Bentouati A, Bariteau M. 2005. Une sylviculture pour le pin d'Alep des Aurès (Algérie). *Forêt méditerranéenne* XXVI(4):315–321.
- Boukerker H, Si Bachir A. 2015. Biodiversity of xylophagous insects and their role in the *Cedrus atlantica* forests decline in the national park of Belezma – Batna- (Algeria). *Courrier du Savoir* 20:79–90.
- Boulâacheb N. 2010. La résine de *Pinus halepensis* Mill. Usage traditionnel par la population de la Petite Kabylie (Algérie, Nord Afrique). *Acta Horticulturae* 435–438. doi.org/10.17660/actahortic.2010.853.53
- Bouzahar C. 2022. Phytosociologie paysagère et gestion conservatoire de la biodiversité dans le Dahra oriental. Université de Bretagne Occidentale.
- Brink DP, Ravi K, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. 2019. Mapping the diversity of microbial lignin catabolism: experiences from the eLignin database. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(10):3979–4002. doi.org/10.1007/S00253-019-09692-4
- Bruneton J, Poupon E. 2016. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 5<sup>ème</sup> édition. ÉLavoisier Tec & doc, Paris. 1487 pp.
- Chakali G. 2004. Statut spécifique de l'hylésine *Tomicus* (Coleoptera-Scolytidae) de la région semi-aride de Djelfa (Algérie). *Annales de l'Institut National Agronomique* 25:31–41.

- Chakali G. 2005. L'hylésine des pins, *Tomicus destruens* Wollaston 1865 (Coleoptera-Scolytidae) en Zone Semi-Aride (Algérie). *Silva Lusitana* 13(1):113–124.
- Chakali G. 2007. Stratégie d'attaque de l'hylésine *Tomicus destruens* (Wollaston 1865) (Coleoptera : Scolytidae) sur le pin d'Alep en zone semi-aride (Algérie, Djelfa). *Annales de la Société Entomologique de France* 43:129–137. doi.org/10.1080/00379271.2007.10697502
- Christiansen E, Bakke A. 1988. The spruce bark beetle of Eurasia. In: Berryman AA (Ed.), *Dynamics of Forest Insect Populations*. 479–503. doi.org/10.1007/978-1-4899-0789-9\_23
- Cudmore TJ, Björklund N, Carroll AL, Staffan Lindgren B. 2010. Climate change and range expansion of an aggressive bark beetle: evidence of higher beetle reproduction in naïve host tree populations. *Journal of Applied Ecology* 47:1036–1043. doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01848.x
- Davi H, Durand-Gillmann M, Damesin C, Delzon S , Petit C , Rozenberg P , Sabatier SA , Chadœuf J , Boutte B , Boivin T. 2020. Distribution of endemic bark beetle attacks and their physiological consequences on *Pinus halepensis*. *Forest Ecology and Management* 469:118187. doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118187
- De Beer ZW, Seifert KA, Wingfield MJ (2013) The ophiostomatoid fungi: their dual position in the Sordariomycetes. In: Seifert KA, de Beer ZW, Wingfield MJ (Eds.), *The ophiostomatoid fungi: expanding frontiers*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, pp 245–322.
- De Beer ZW, Wingfield MJ. 2013. Emerging lineages in the Ophiostomatales. In: Seifert KA, De Beer ZW, Wingfield MJ (Eds.), *The ophiostomatoid fungi: expanding frontiers*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, pp 21–46.
- de Luis M, Čufar K, Di Filippo A, Novak K, Papadopoulos A, Piovesan G, Rathgeber CBK, Raventós J, Saz MA, Smith KT. 2013. Plasticity in dendroclimatic response across the distribution range of aleppo pine (*Pinus halepensis*). *PLoS ONE* 8:e83550. doi.org/10.1371/journal.pone.0083550
- de Pagter T, Lucas-Borja ME, Navidi M, Carra BG, Baartman J, Zema DA. 2023. Effects of wildfire and post-fire salvage logging on rainsplash erosion in a semi-arid pine forest of Central Eastern Spain. *Journal of Environmental Management* 329:117059. doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2022.117059
- Diaz G, Carrillo C, Honrubia M. 2010. Mycorrhization, growth and nutrition of *Pinus halepensis* seedlings fertilized with different doses and sources of nitrogen. *Annals of Forest Science* 67(4):405–405. doi.org/10.1051/FOREST/2009125
- Dob T, Berramdane T, Chelgoum C. 2005. Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *Comptes Rendus Chimie* 8:1939–1945. doi.org/10.1016/J.CRCI.2005.05.007

- Dobbertin M, Wermelinger B, Bigler C, Bigler C, Bürgi M, Carron M, Forster B, Gimmi U, Rigling A. 2007. Linking increasing drought stress to scots pine mortality and bark beetle infestations. *ScientificWorldJournal* 7(Suppl 1):231–239
- Elvira NJ, Lloret F, Jaime L, Margalef-Marrase J, Pérez Navarro MÁ, Batllori E. 2021. Species climatic niche explains post-fire regeneration of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) under compounded effects of fire and drought in east Spain. *Science of The Total Environment* 798:149308. doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149308
- Fabre JP, Mouna M, Du Merle, P, Benhalima S. 1999. Le point sur certains ravageurs du cèdre de l'Atlas en Afrique du Nord, en France et en Europe. *Forêt méditerranéenne* 20:203–218.
- Faccoli M, Anfora G, Tasin M. 2008. Responses of the mediterranean pine shoot beetle *Tomicus destruens* (Wollaston) to pine shoot and bark volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 34:1162–1169. doi.org/10.1007/S10886-008-9503-6/METRICS
- Faccoli M, Gallego D, Branco M, Brockerhoff EG, Corley J, Coyle DR, Hurley BP, Jactel H, Lakatos F, Lantschner V, Lawson S, Martinez G, Demian F, Gomez DF, Avtzis D. 2020. A first worldwide multispecies survey of invasive Mediterranean pine bark beetles (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Biological Invasions* 22:1785–1799. doi.org/10.1007/s10530-020-02219-3
- FAO (2009) Global review of forest pests and diseases. FAO Forestry paper, Rome.
- Farjon, A., 2010. A Handbook of the World's Conifers, second revision. Brill Academic Publishers, 1150 pp. doi.org/10.1163/9789047430629
- Folwaczny B. 1973. Identification table of the Palaearctic Cossoninae (Coleoptera, Curculionidae) without the genera occurring only in China and Japan, together with information on distribution. *Entomologische Blätter für Biologie und Systematik der Käfer* 65:180.h
- Freer-Smith PH, Broadmeadow MSJ, Lynch JM. 2007. Forestry and climate change. CAB International, 253 pp.
- Gadda G, Francis K. 2010. Nitronate monooxygenase, a model for anionic flavin semiquinone intermediates in oxidative catalysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 493(1):53–61.
- Goussanem M. 2000. L'étude prospective du secteur forestier en Afrique (FOSA) : Algérie. FAO, Rome. 60 pp.
- Guit B, Nedjimi B, Chakali G, Guibal F. 2016. État sanitaire des peuplements de pin d'Alep (*Pinus halepensis* MILL.) dans le massif forestier de Senalba (Djelfa, Algérie). *Revue d'Ecologie (La Terre et La Vie)* 71:156–167.

- Guit B, Nedjimi B, Guibal F, Chakali G. 2015. Dendroécologie du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en fonction des paramètres stationnels dans le massif forestier de Senalba (Djelfa - Algérie). *Revue d'Écologie (La Terre et La Vie)* 70:32–43. doi.org/10.3406/revec.2015.1767
- Hadj-Sadok DN, Belkahla H, Aimouche Z El. 2011. Variations temporelles et structure trophique des communautés de nématodes associées à la culture de chou (*Brassica oleracea*) en Algérie. *Nematologia Mediterranea* 39(1):29–34.
- Hedgren PO, Schroeder LM. 2004. Reproductive success of the spruce bark beetle *Ips typographus* (L.) and occurrence of associated species: a comparison between standing beetle-killed trees and cut trees. *Forest Ecology and Management* 203:241–250. doi.org/10.1016/J.FORECO.2004.07.055
- Helluy M, Prévosto B, Cailleret M, Fernandez C, Balandier P. 2020. Competition and water stress indices as predictors of *Pinus halepensis* Mill. radial growth under drought. *Forest Ecology and Management* 460:117877. doi.org/10.1016/j.foreco.2020.117877
- Hicke JA, Meddens AJH, Kolden CA. 2016. Recent tree mortality in the Western United States from bark beetles and forest fires. *Forest Science* 62(2):141–153.
- Hlásny T, Turčáni M. 2013. Persisting bark beetle outbreak indicates the unsustainability of secondary Norway spruce forests: Case study from Central Europe. *Annals of Forest Science* 70:481–491. doi.org/10.1007/s13595-013-0279-7
- Hoceini F, Nebih Hadj-Saddouk D, Bounaceur F, Hamdani M, Berrabah DE, Aiche M, Saidi S. 2020. Structure trophique des nématodes du sol dans les agro-écosystèmes oléicoles algérien. *Revue des Régions Arides* 46(1):519–525.
- Hofstetter RW, Dinkins-Bookwalter J, Davis TS, Klepzig KD. 2015. Symbiotic associations of bark beetles. In: Vega FE, Hofstetter RW (Eds.), *Bark beetles: biology and ecology of native and invasive species*. Academic Press, New York, pp 209–246.
- Houda D, Nasser D, Amador V, Ali EK. 2023. Diversity of bark beetles (Curculionidae: Scolytinae) and their attack strategy in a natural forest of semi-arid region (Djelfa-Algeria). *Polish Journal of Entomology* 92:7–20. doi.org/10.5604/XXX01.3001.0053.6806
- Huo L, Persson HJ, Lindberg E. 2021. Early detection of forest stress from European spruce bark beetle attack, and a new vegetation index: Normalized distance red & SWIR (NDRS). *Remote Sensing of Environment* 255:112240. doi.org/10.1016/J.RSE.2020.112240
- Jactel H, Koricheva J, Castagnèyrol B. 2019. Responses of forest insect pests to climate change: not so simple. *Current Opinion in Insect Science* 35:103–108. doi.org/10.1016/j.cois.2019.07.010
- Jankowiak R. 2005. Fungi associated with *Ips typographus* on *Picea abies* in southern Poland and their succession into the phloem and sapwood of beetle-infested trees and logs. *Forest Pathology* 35:37–55. doi.org/10.1111/j.1439-0329.2004.00395.x

- Janusz G, Pawlik A, Sulej J, Świdorska-Burek U, Jarosz-Wilkolazka A, Paszczyński A. 2017. Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 41(6):941–962. doi.org/10.1093/femsre/fux049
- Jönsson AM, Harding S, Krokene P, Lange H, Lindelöw Å, Økland B, Ravn HP, Schroeder LM. 2011. Modelling the potential impact of global warming on *Ips typographus* voltinism and reproductive diapause. *Climatic Change* 109:695–718. doi.org/10.1007/S10584-011-0038-4/METRICS
- Kadik B. 1986. Contribution à l'étude du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Algérie. Écologie, dendrométrie et morphologie. O.P.U, Alger.
- Kirisits T. 2004. Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi. In: Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire J, Evans HF (Eds.), *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. Springer, Amsterdam, pp 181–236.
- Lapie G, Maige LA. 1914. Flore forestière illustrée comprenant les espèces ligneuses de l'Algérie, et les espèces ligneuses les plus répandues en Tunisie, au Maroc et dans le midi de la France; pour la détermination facile, sans l'emploi de mots techniques, de toutes les espèces décrites. E. Orlach, Paris.
- Latifa B. 2013. Les champignons associés au *Platypus cylindrus* Fab. (Coleoptera, Curculionidae, Platypodinae) dans un jeune peuplement de chêne-liège de la forêt de M'Sila (Oran, nord-ouest d'Algérie) : Étude particulière de la biologie et l'épidémiologie de l'insecte. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen.
- Le Houérou HN. 2005. Atlas de la répartition de 250 espèces-clés dans le bassin méditerranéen. Le Houérou ed, Montpellier.
- Leatham GF, Crawford RL, Kirk TK. 1983. Degradation of phenolic compounds and ring cleavage of catechol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 46:191–197. doi.org/10.1128/AEM.46.1.191-197.1983
- Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire JC, Evans HF. 2004. *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Springer Netherlands.
- Lieutier F, Mendel, Z, Faccoli M. 2016. Bark beetles of mediterranean conifers. In: Paine TD, Lieutier F (Eds.), *Insects and Diseases of Mediterranean Forest Systems*. Springer International Publishing, pp. 105–197. doi.org/10.1007/978-3-319-24744-1\_6
- Lieutier F, Yart A, Garcia J, Ham MC, Morelet M, Levieux J. 1989. Champignons phytopathogènes associés à deux coléoptères Scolytidae du pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) et étude préliminaire de leur agressivité envers l'hôte. *Annales des Sciences Forestières*, 46:201–216.
- Littell JS, Oneil EE, McKenzie D, Hicke JA, Lutz JA, Norheim RA, Elsner MM. 2010. Forest ecosystems, disturbance, and climatic change in Washington State, USA. *Climatic Change* 102:129–158. doi.org/10.1007/S10584-010-9858-X/METRICS

- Logan JA, Régnière J, Powell JA. 2003. Assessing the impacts of global warming on forest pest dynamics. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1:130–137. doi.org/10.1890/1540-9295(2003)001[0130:ATIOGW]2.0.CO;2
- Mauri A, Di Leo M, de Rigo D, Caudullo G. 2016. *Pinus halepensis* and *Pinus brutia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz J, de Rigo D, Caudullo, G, Durant TH, Mauri A (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species*. 122–123.
- Meddens AJH, Hicke JA, Ferguson CA. 2012. Spatiotemporal patterns of observed bark beetle-caused tree mortality in British Columbia and the western United States. *Ecological Applications*. 22(7):1876-1891.
- Meigs GW, Zald HSJ, Campbell JL, Keeton WS, Kennedy RE. 2016. Do insect outbreaks reduce the severity of subsequent forest fires? *Environmental Research Letters* 11:045008. doi.org/10.1088/1748-9326/11/4/045008
- Mendel Z. 1988. Attraction of *Orthotomicus erosus* and *Pityogenes calcaratus* to a synthetic aggregation pheromone of *Ips typographus*. *Phytoparasitica* 16:109–117. doi.org/10.1007/BF02980465/METRICS
- Mendel Z, Halperin J. 1982. The biology and behaviour of *Orthotomicus erosus* in Israel. *Phytoparasitica* 10:169 –181.
- Moumeni L, Gastebois A, Gillmann L, Papon N, Benia F, Bouchara JP, Bounechada M. 2021. Investigating the prevalence of bark beetles of *Pinus halepensis* in the north east semi-arid region of Algeria. *Biodiversitas* 22(7):2755–2762. doi.org/10.13057/biodiv/d220724
- Nahal I. 1962. Le pin d'Alep (*Fines halepensis* Mill.). Étude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. *Annales de l'Ecole Nationale des Eaux et Forêts et de la Station de Recherches et Expériences Forestières* 19:477–688.
- Navarro-Cerrillo RM, Sarmoum M, Gazol A, Abdoun F, Camarero JJ. 2019. The decline of Algerian *Cedrus atlantica* forests is driven by a climate shift towards drier conditions. *Dendrochronologia* 55:60–70. doi.org/10.1016/j.dendro.2019.04.003
- Ne'eman G, Osem Y. 2021. *Pines and Their mixed forest ecosystems in the Mediterranean basin, managing forest ecosystems*. Springer International Publishing, Cham. doi.org/10.1007/978-3-030-63625-8
- Nichane M, Bouchikhi-tani Z, Anouar M. 2014. Les insectes xylophages et leur rôle dans le dépérissement du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) dans les monts des Traras (Tlemcen – Algérie). *Lebanese Science Journal* 15:19–26.
- Ouanouki F, Ighili H. 1988. Inventaire des nématodes phytophages sur cultures maraichères et sur palmier dattier dans la region de Ouargla. *Algerian Annals of Agronomy* 12:184–201.

- Patel TR, Hameed N, Armstrong S. 1992. Metabolism of gallate in *Penicillium simplicissimum*. *Journal of Basic Microbiology* 32:233–240. doi.org/10.1002/JOBM.3620320405
- Pausas JG, Ribeiro E, Vallejo R. 2004. Post-fire regeneration variability of *Pinus halepensis* in the eastern Iberian peninsula. *Forest Ecology and Management* 203:251–259. doi.org/10.1016/j.foreco.2004.07.061
- Pernek M, Lacković N, Lukić I, Zorić N, Matošević D. 2019. Outbreak of *Orthotomicus erosus* (Coleoptera, Curculionidae) on Aleppo pine in the Mediterranean region in Croatia. *South-east European forestry* 10:19–27. doi.org/10.15177/seeфор.19-05
- Peyerimhoff P. 1919. Notes sur la biologie de quelques Coléoptères phytophages du Nord africain (3<sup>ème</sup> série). *Annales de la Société Entomologique de France* 88:169–258.
- Réblová M, Gams W, Seifert KA. 2011. Monilochaetes and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. *Studies in Mycology* 68:163–191.
- Richardson DM. 1998. Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. 527 pp. doi.org/10.1016/s0378-1127(00)00598-3
- Rougeron A, Giraud S, Alastruey-Izquierdo A, Cano-Lira J, Rainer J, Mouhajir A, Le Gal S, Nevez G, Meyer W, Bouchara JP. 2018. Ecology of *Scedosporium* species: Present knowledge and future research. *Mycopathologia* 183:185–200. doi.org/10.1007/S11046-017-0200-2
- Rudinsky JA. 1962. Ecology of Scolytidae. *Annual Review of Entomology* 7:327–348. doi.org/10.1146/annurev.en.07.010162.001551
- Rumbold CT. 1931. Two blue-staining fungi associated with bark-beetle infestation of pines. *Journal of Agricultural Research*, 43:847–873.
- Sabbatini Peverieri G, Faggi M, Marziali L, Tiberi R. 2008. Life cycle of *Tomicus destruens* in a pine forest of central Italy. *Bulletin of Insectology* 61:337–342.
- Sadou N, Seridi R, Djahoudi A, Hedef Y. 2015. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. *Revue des Sciences et Technologie, Synthèse* 30:33–39.
- Sangüesa-Barreda G, Linares JC, Camarero JJ. 2015. Reduced growth sensitivity to climate in bark-beetle infested Aleppo pines: Connecting climatic and biotic drivers of forest dieback. *Forest Ecology and Management* 357:126–137. doi.org/10.1016/j.foreco.2015.08.017
- Sarikaya O, Avci M. 2010. Distribution and biology of the Mediterranean pine shoot beetle *Tomicus destruens* (Wollaston, 1865) in the Western Mediterranean region of Turkey. *Turkish Journal of Entomology* 34:289–298.

- Schowalter TD. 2012. Ecology and management of bark beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in southern pine forests. *Journal of Integrated Pest Management* 3(2):A1–A7. doi.org/10.1603/ipm11025
- Sebastiana M, Corrêa A, Castro P, Ramos M. 2020. *Pisolithus*, in: Amaresan N, Senthil Kumar M, Annapurna K, Kumar K, Sankanarayanan A (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*. Academic Press, pp. 707–726. doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00036-8
- Seigue A. 1985. *La forêt circumméditerranéenne et ses problèmes*. G.P. Maisonneuve et Larose, Paris. 502 pp.
- Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, Calenda A, Larcher G, Gillmann L, Papon N, Bouchara JP, Fleury MJJ. 2017. Microbial antioxidant defense enzymes. *Microb Pathog* 110:56-65. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.015.
- Stone C, Simpson JA. 1990. Species associations in *Ips grandicollis* galleries in *Pinus taeda*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 20:75–96.
- Talbi Y, Bouhraoua RT. 2015. Complexe xylophage associé au dépérissement du cèdre de l'Atlas au Bélezma (Algérie). *Lebanese Science Journal* 16:97.
- Tatar H. 2012. Production forestière, exploitation et valorisation en Algérie. *Forêt Méditerranéenne* XXXIII(4):361–368.
- Tittiger C, Blomquist GJ. 2016. *Pine Bark Beetles*. Academic Press. pp. 293.
- Touchan R, Anchukaitis KJ, Meko DM, Attalah S, Baisan C, Aloui A. 2008. Long term context for recent drought in northwestern Africa. *Geophysical Research Letters* 35:L13705. doi.org/10.1029/2008GL034264
- Upadhyay HP. 1981. *A monograph of Ceratocystis and Ceratocystiopsis*. University of Georgia Press, Athens.
- Vasconcelos T, Horn A, Lieutier F, Branco M, Kerdelhué C. 2006. Distribution and population genetic structure of the Mediterranean pine shoot beetle *Tomicus destruens* in the Iberian peninsula and Southern France. *Agricultural and Forest Entomology* 8(2):103–111. doi.org/10.1111/j.1461-9563.2006.00292.x
- Vennetier M. 2007. *Un nouveau modèle bioclimatique pour la forêt méditerranéenne. Application à l'étude de l'impact du changement climatique sur la végétation et à l'évaluation de la productivité forestière*. Université Paul Cézanne Aix-Marseille III.
- Vennetier M, Ripert C, Brochiéro F, Rathgeber CBK, Chandiooux O, Estève R. 2010. Évaluation de la productivité du pin d'Alep en région Méditerranéenne française. *Revue Forestière Française* LXII:503–524. doi.org/10.4267/2042/39863
- Vennetier M, Ripert C, Rathgeber C. 2018. Autecology and growth of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.): A comprehensive study in France. *Forest Ecology and Management* 413:32–47. doi.org/10.1016/j.foreco.2018.01.028



Veuillen L, Prévosto B, Zeoli L, Pichot C, Cailleret M. 2023. *Pinus halepensis* and *P. brutia* provenances present similar resilience to drought despite contrasting survival, growth, cold tolerance and stem quality: Insights from a 45 year-old common garden experiment. *Forest Ecology and Management* 544:121146. doi.org/10.1016/J.FORECO.2023.121146

Wingfield MJ, Barnes I, de Beer ZW, Roux J, Wingfield BD, Taerum SJ. 2017. Novel associations between ophiostomatoid fungi, insects and tree hosts: current status—future prospects. *Biology Invasions* 19:3215–3228. doi.org/10.1007/s10530-017-1468-3

Zakzeski J, Bruijninx PCA, Jongerius AL, Weckhuysen BM. 2010. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical Reviews* 110:3552–3599. doi.org/10.1021/cr900354u

Zhou XD, De Beer ZW, Ahumada R, Wingfield BD, Wingfield MJ. 2004. *Ophiostoma* and *Ceratocystiopsis* spp. associated with twopine-infesting bark beetles in Chile. *Fungal Diversity* 15:253–266.

**ملخص :** تعاني غابات الصنوبر الحلبي (*Pinus halepensis* Mill.) في الجزائر من انخفاض يرجع إلى الاحتباس الحراري وتكاثر بعض الحشرات النباتية مثل خنافس القلف. في هذا السياق، قمنا بدراسة أنواع الحشرات التي تعيش في أشجار الصنوبر الحلبي في ثلاث غابات بجبال الأطلس التلي (بوطالب، أولاد تيان، ونوغا) في شمال شرق الجزائر. تم تحديد سبعة أنواع، وكانت ستة منها تنتمي إلى أسرة السكوليتينيات (Scolytinae). الأنواع الأكثر وفرة هي *Crypturgus numidicus*، و *Orthotomicus erosus*، و *Tomicus destruens* فقط نوعان قادران على مهاجمة الأشجار الحية. تقدم هذه الدراسة توصيفاً أولياً لهذه الحشرات الضارة في المناطق شبه الجافة في شمال شرق الجزائر. تعيش هذه الحشرات بالتعايش مع فطريات محبة للخشب. تم عزل 37 نوعاً فطرياً من هذه الحشرات، وهي في الغالب فطريات رمية ومنها أيضاً بعض الفطريات المسببة للأمراض مثل *Ophiostoma ips* و *Ceratocystiopsis minuta*. أظهرت جميع الفطريات المعزولة قدرات على النمو في وسط يحتوي على الخشب، وقد تلعب بالتالي دوراً في إضعاف الأشجار. أظهر تحليل RNAseq للترانسكربتوم لـ *C. minuta* و *A. citrinoterreus* المزروعين على مسحوق القلف أو الليجنين أن *C. minuta*، يستخدم الليجنين بصورة تفضيلية، كما يظهره التعبير المفرط للجينات التي تُشفّر الإنزيمات المشاركة في المراحل المتأخرة من تحلل الليجنين أو في استخدام المنتجات المحصلة لإنتاج الطاقة من خلال دورة الحمض الثلاثي الكربوكسيلي. بالمقابل، يبدو أن السليلوز هو الجزيء المفضل لدى *A. citrinoterreus*. تعزز هذه النتائج فهماً للعوامل الحيوية المشاركة في انخفاض مساحة غابات الصنوبر الجزائرية وتفتح آفاقاً جديدة لتطوير وسائل مستدامة لمحاربة الحشرات الضارة من خلال استهداف أعضائهم أو شركائهم الفطريين.

**كلمات البحث :** مناخ شبه جاف، الصنوبر الحلبي، فطريات الأشجار، ليجنين، خنافس القلف

**Résumé :** Les forêts de pins d'Alep en Algérie connaissent un déclin en lien avec le réchauffement climatique global et la prolifération d'insectes xylophages. Dans ce contexte, nous avons entrepris d'identifier les insectes colonisant le pin d'Alep dans 3 forêts de l'Atlas Tellien (Boutaleb, Ouled Tebbane et Ouennougha) au centre Est de l'Algérie. Sept espèces ont été identifiées dont six appartiennent à la famille des Scolytinae. Les espèces les plus abondantes étaient *Crypturgus numidicus*, *Orthotomicus erosus* et *Tomicus destruens*. Seules les deux dernières attaquent les arbres vivants. Cette étude fournit une première caractérisation de ces ravageurs dans les régions semi-arides du Nord-Est de l'Algérie. Ces insectes vivent en association avec des champignons xylophages. 37 espèces fongiques ont été isolées des insectes collectés, majoritairement des saprophytes mais aussi des pathogènes connus du pin comme *Ophiostoma ips* et *Ceratocystiopsis minuta*. Toutes les espèces fongiques isolées ont montré des capacités de croissance sur milieu lignocellulosique. Ces champignons pourraient donc jouer un rôle dans l'affaiblissement des arbres. L'analyse par RNAseq du transcriptome du pathogène *C. minuta* et du saprophyte *Aspergillus citrinoterreus* cultivés sur poudre d'écorce ou sur lignine démontre pour *C. minuta* l'utilisation préférentielle de la lignine, avec la mise en évidence de la surexpression de gènes impliqués dans les étapes tardives de la dégradation de la lignine ou de l'utilisation des produits obtenus pour la production d'énergie via le cycle de Krebs. A l'inverse, *A. citrinoterreus* semble utiliser préférentiellement la cellulose et serait donc seulement un saproxylophage. Ces données renforcent notre compréhension des facteurs biotiques impliqués dans le déclin des forêts de pins algériennes et ouvrent des perspectives pour le développement de moyens durables de lutte contre ces bioagresseurs en ciblant leur métabolisme ou leur symbiotes fongiques.

**Mots clés :** Dépérissement, Scolytes, pin d'Alep, Ophiostomataceae, champignons, lignine

**Abstract :** The Aleppo pine forests in Algeria are experiencing a decline attributed to global warming and to the proliferation of xylophagous insects such as scolytes. In this context, we investigated the insect species colonizing Aleppo pine in three forests of the Tell Atlas (Boutaleb, Ouled Tebbane, and Ouennougha) in the North-East of Algeria. Seven species were identified, with six of them belonging to the Scolytinae family. The most abundant species were *Crypturgus numidicus*, *Orthotomicus erosus*, and *Tomicus destruens*. Only the last two species are capable to attack living trees. This study provides an initial characterization of these pests in semi-arid regions of North-Eastern Algeria. These insects live in association with xylophagous fungi. 37 fungal species were isolated from these insects, mostly saprophytes but also some well known pine pathogens such as *Ophiostoma ips* and *Ceratocystiopsis minuta*. All the isolated fungi exhibited growth capabilities on lignocellulosic medium and may, therefore, play a role in weakening the trees. RNAseq analysis of the transcriptome of the pathogen *C. minuta* and the saprophyte *Aspergillus citrinoterreus* cultivated on bark powder or lignin demonstrated for *C. minuta*, the preferential use of lignin, as evidenced by the overexpression of genes encoding enzymes involved in the late stages of lignin degradation or in the use of the obtained products for energy production through the tricarboxylic acid cycle. In contrast, cellulose seems to be the preferential substrate for *A. citrinoterreus*, which is only a saproxylophagous fungus. These findings enhance our understanding of the biotic factors involved in the decline of Algerian pine forests and open up new possibilities for developing sustainable means of combating these bioaggressors by targeting their metabolism or their fungal symbionts.

**Keywords :** Decline, Scolytes, Aleppo pine, Ophiostomataceae, fungi, lignin