

**AFPP – 11^e CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES RAVAGEURS ET AUXILIAIRES EN AGRICULTURE
MONTPELLIER – 25 ET 26 OCTOBRE 2017**

INTERACTION TROPHIQUE ENTRE LE COLZA ET SON RAVAGEUR, LA LIMACE GRISE *DEROCERAS RETICULATUM* : FACTEURS STIMULANT LA NUTRITION ET REPONSES METABOLIQUES INTER-SPECIFIQUES

M. CHARRIER^{1*}, M. TAMINE^{1*} ET C. JONARD²

1-Université Bretagne-Loire, Université de Rennes 1, UMR CNRS 6553, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042 RENNES Cedex

2-Institut National de la Recherche Agronomique, Plateforme P2M2, 35653, Le Rheu, France

* : co-premiers auteurs de l'article

RESUME

Bon nombre d'espèces parmi les escargots et les limaces sont des ravageurs de cultures, notamment des vignes et des vergers, malgré l'utilisation d'agents chimiques protégeant les plantes contre les phytophages. La limace grise *Deroceras reticulatum* est le principal ravageur des cultures de colza. Des travaux antérieurs ont montré que les plants de jeunes stades (cotylédon, 2-4 feuilles) sont les plus attaqués et que les glucosinolates aliphatiques sont répulsifs. Cette étude a abordé en premier lieu l'influence de la physiologie de la limace (masse fraîche, état nutritionnel) sur la consommation des plants de *Brassica napus*, en relation avec leur génotype et leur stade de croissance. En second lieu, les profils métaboliques des cotylédons ont été analysés dans le but de (i) différencier les génotypes de colza, identifier des substances phagostimulantes ou phagorépulsives et (ii) décrire les caractéristiques biochimiques du mucus de la limace grise.

Nous avons démontré que les petites limaces (158 ± 71 mg) étaient plus voraces que les grosses limaces (372 ± 157 mg), leur voracité étant accrue après cinq jours de jeûne. Le génotype Liho a été préféré au génotype Express et les jeunes plants ont souffert davantage que les cotylédons des attaques de limaces. Les profils biochimiques des cotylédons se sont révélés différents selon le génotype. Un appauvrissement des cotylédons en acides aminés a été observé après consommation par les limaces. Le génotype Express se distingue par la présence de progoïtrine (glucosinolate aliphatique), alors que le génotype Liho est enrichi en glucobrassicine (glucosinolate indole). Le mucus de *D. reticulatum* se discrimine par les molécules de 4OH-glucobrassicine et de glucoraphanine. Nos résultats confirment la répulsivité des glucosinolates aliphatiques. Nous faisons l'hypothèse que les acides aminés combinés aux glucosinolates pourraient améliorer la protection de la plante contre l'attaque des limaces. En perspective, nous souhaitons (i) rechercher les phytohormones dans le mucus et dans l'appareil digestif de la limace et (ii) analyser sur gels d'amidon la consommation de métabolites isolés (glucosinolate) et mixtes (glucosinolate + acide aminé).

Mots-clés : ravageurs de cultures, limaces, phytophagie, mucus, métabolites des plantes.

ABSTRACT

TROPHIC INTERACTIONS BETWEEN OILSEED RAPE AND THE PEST SLUG *DEROCERAS RETICULATUM*: STIMULATING FACTORS OF FOOD CONSUMPTION AND INTERSPECIFIC METABOLIC RESPONSES

Many species of terrestrial snails and slugs are key pests in crops, vineyard and orchard, despite chemical protective agents developed by plants against phytophages. The grey slug *Deroceras reticulatum* is the major pest in European rapeseed crops. Previous works showed that attacks occur mainly at the first stage of growth (cotyledon, 2-4 true leaves) and that aliphatic glucosinolates were

deterrent. This study focused first on the influence of slug physiology (fresh mass, nutritional status) on plant consumption, in relation with the genotype and growth stage of the oilseed rape *Brassica napus*. Second, metabolic profiles of rape cotyledons, attacked or not, and slug mucus after consumption were analyzed, in order to (i) discriminate the genotypes and find phagostimulant or phagodeterrent compounds, (ii) describe the biochemical specificities of the slug mucus.

We demonstrated that small slugs (158 ± 71 mg) were more voracious than big slugs (372 ± 157 mg), a more pronounced voracity being found after 5 days of starvation. Liho genotype was preferred to Express genotype and the seedlings suffered more than the cotyledons from slug attacks. The biochemical profiles of rapeseed cotyledons differed according to the genotype. Amino acids depletion was observed in the cotyledons after slug consumption. Express was characterized by the occurrence of progoitrine (aliphatic glucosinolate), whereas Liho was enriched in glucobrassicin (indol glucosinolate). The mucus of *D. reticulatum* was discriminated by 4OH-glucobrassicin and glucoraphanin. Our results were consistent with the deterrent effect of aliphatic glucosinolates. We also hypothesized that amino acids combined with glucosinolates might enhance plant protection against slug attack. In future, we will search for plant hormones in the slug mucus and gut and we will analyse slug consumption on isolated and mixed metabolites poured on starch gels.

Keywords: crop pests, slugs, herbivory, mucus, plant metabolites.

INTRODUCTION

Les plantes, confrontées à l'attaque de phytophages, doivent allouer des moyens de défense directe (tolérance) et indirecte (résistance) (Schwachtje et Baldwin, 2008). La tolérance mesure la capacité de la plante à compenser, par son métabolisme primaire, les effets des dommages sur sa fitness. La résistance cible l'utilisation d'outils physiques ou chimiques qui réduisent quantitativement les dégâts dus aux phytophages. Parmi ces outils, les métabolites secondaires sont issus des stocks d'énergie et de ressources du métabolisme primaire. Les métabolites secondaires alloués par la plante à des fonctions de défense face aux risques environnementaux sont donc étroitement liés aux métabolites primaires nécessaires à sa croissance et à sa reproduction.

Les mollusques gastéropodes phytophages généralistes sont capables d'exploiter des ressources diversifiées, mais ils montrent des préférences alimentaires liées à la composition chimique minérale des végétaux (Chevalier *et al.*, 2003) et à leur teneur en métabolites secondaires, parmi lesquels les glucosinolates (Glen *et al.*, 1990), les alcaloïdes (Chevalier *et al.*, 2000) et les terpénoïdes (Donnell *et al.*, 2016). Parmi les limaces, les plus importants ravageurs polyphages en grandes cultures et en cultures légumières sont les limaces grises (*Deroceras reticulatum* et *Deroceras agreste*, famille Agriolimacidae) et noires (*Arion hortensis*, *Arion vulgaris* et *Arion distinctus*, famille Arionidae) (Falk *et al.*, 2014).

Malgré l'utilisation de produits insecticides et molluscicides, la recrudescence des ravageurs dans les grandes cultures et leur pullulation récente dans les jeunes vignes et vergers induisent des pertes de production non soutenables pour les professionnels. Afin de soutenir la durabilité de l'agriculture, des moyens alternatifs sont à l'étude depuis de nombreuses années, sans qu'il ait été possible de passer efficacement de la phase expérimentale en laboratoire à la phase commerciale dans les territoires agricoles. Parmi les agents de bio-contrôle, les médiateurs chimiques, phéromones et substances allélochimiques, peuvent représenter une voie d'avenir à moyen terme.

Notre projet a pour cadre les limaces nuisibles aux grandes cultures et cherche à mettre en évidence les signaux chimiques mis en place par les plantes comme moyen de défense contre ces ravageurs ainsi que les réponses chimiques des limaces susceptibles de contrer les défenses de la plante. Il s'agira ici de cibler les substances naturelles d'origine végétale synthétisées par la plante.

A ce jour, l'importance des glucosinolates aliphatiques dans la défense des surfaces foliaires contre les limaces est connue sur des espèces cultivées ou sauvages (Glen *et al.*, 1990 ; Falk *et al.*, 2014), mais une récente étude a montré la présence d'acide salicylique spécifiquement dans le mucus de la limace grise *Deroceras reticulatum* nourrie sur *Arabidopsis thaliana* (Kästner *et al.*, 2014). Cette phytohormone inhibe le cycle de l'acide jasmonique chez la plante, qui est l'une des voies métaboliques utilisées dans les défenses contre les phytophages. L'origine de l'acide salicylique dans le mucus de la limace grise est inconnue. Certains ions et métabolites primaires n'ont pas encore été étudiés dans les interactions entre plante et limace. Présents à de très faibles concentrations à la surface des feuilles, ils constituent le phylloplan (Derridj, 1996). La composition du phylloplan, notamment en acides aminés libres, varie selon l'âge de la plante et la face de la feuille, selon un pattern propre à chaque espèce (Soldaat *et al.*, 1996). Il peut exercer un rôle important dans l'acceptabilité de la plante par le phytophage (Fiala *et al.*, 1990).

Dans cette étude, nous avons pour objectif de mieux appréhender les interactions trophiques entre la limace et le colza. Pour ce faire, nous cherchons à savoir si *Deroceras reticulatum* est capable de discriminer des variétés de colza et si les profils en métabolites primaires et spécialisés du colza permettent d'expliquer ses choix alimentaires. Etant donné l'attractivité reconnue de métabolites du phylloplan (Derridj, 1996), nous faisons l'hypothèse que la limace consomme les variétés de colza selon leur qualité/quantité en acides aminés libres ou en sucres et ce quelle que soit leur richesse en glucosinolates, grâce à une capacité d'excrétion active ou de dégradation par hydrolyse des substances toxiques, capacité décrite chez le gastéropode lichénophage du subantarctique *Notodiscus hookeri* (Gadea *et al.* 2017). De plus, nous émettons l'hypothèse que la limace est capable de discriminer les métabolites purs et d'ajuster sa consommation lors de la gustation selon l'appétence ou l'inappétence du métabolite proposé.

MATERIEL ET METHODES

Semis de colza en culture

L'étude porte sur deux génotypes de l'espèce *Brassica napus* L. (1753), issus de lignées pures, provenant du Centre de Ressources Génétiques BraCySol de l'INRA (Le Rheu, France) et disponibles à l'état de graines (collaboration avec Anne-Marie Cortesero, UMR IGEPP). Les deux génotypes de colza utilisés sont un génotype de printemps, Liho, et un génotype d'hiver, Express choisi *a priori* d'après la présence (Liho) ou l'absence

(Express) de glucosinolates dans les graines (Hervé *et al.*, 2014). Les graines sont semées sur un substrat classique (terreau horticole avec engrais Substrat 4 produit par Verolia, Rennes) comprenant un mélange de tourbe blonde et de sphaignes, de fumier composté, d'algues marines, de dolomie et d'un mélange d'engrais NP et NPK). Chaque graine est déposée dans un godet en plastique (5 cm de diamètre) percé au fond et les godets sont disposés sur un plateau. Deux fois par semaine, la terre est arrosée indirectement d'une solution nutritive de liquoplant FD207 (dilution à 3mL/L d'eau) versée sur le plateau. La germination s'effectue en serre à une température de 15-20°C, en photopériode naturelle 12h jour/12h nuit. Deux stades sont étudiés, le stade cotylédon, appelé « Cotylédon » et le stade deux feuilles, appelé « Feuille », obtenus respectivement dix jours et vingt jours après le semis.

Récolte des limaces et maintenance de l'élevage

L'espèce étudiée est la limace grise *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774), Gastéropode Stylommatophore de la famille des Agriolimacidae, ravageur important en Europe centrale sur de nombreuses cultures, notamment les colzas d'hiver et les tournesols de printemps, quelles que soient les techniques de labour (Keller *et al.*, 1999). Selon Rowson *et al.* (2014), les critères morphologiques d'identification de l'espèce sont les suivants : à l'âge adulte, les individus mesurent de 35 à 50 mm de long. Le manteau de couleur crème ou rosée est recouvert de stries fines concentriques et de taches brunes ou gris foncé entre les tubercules. Le mucus devient blanc et laiteux quand l'animal est stressé. Les limaces utilisées sont récoltées à l'aide de pièges spécifiques carrés de 50 cm de côté (® De Sangosse, France) et proviennent de deux lieux distincts. Il s'agit de parcelles expérimentales non-traitées situées à Anthé (Lot-et-Garonne) (44°23'13.7"N ; 0°56'21.2"E) (Figure 2.A) et appartenant à la société De Sangosse. Les arrivages sont de mars et mai 2016 et d'avril 2017. Le champ était non semé au moment des récoltes, avec un précédent de blé et des abords de phacélie, de féverole et de radis. Les pratiques culturales sont du semis direct sans travail du sol. Le second lieu de récolte est Menetou-Salon (Cher) (47°16'12.80"N ; 2°22'22.70"E). L'unique arrivage a eu lieu en mai 2016. Il s'agit d'une parcelle implantée en blé après labour, avec un précédent de colza.

Les limaces, mises en élevage dans des boîtes en plastique (13 x 21 x 12 cm), sont placées dans une enceinte climatique à une température variable de 10-13°C, en photopériode naturelle. Les limaces sont nourries avec du concombre frais et des croquettes pour chat (composition : maïs, viandes de volaille déshydratées, farine de gluten de maïs, graisses animales, substances minérales, huile de poisson, hydrolysate de protéines, riz ; additifs nutritionnels : vitamines A et D3, fer, iode, cuivre, manganèse, zinc, sélénium) durant trois semaines avant expérimentation afin qu'elles soient « naïves » lors des expériences sur colza. Desbuquois *et al.* (1998) ont en effet montré que la capacité de mémorisation d'un aliment par les escargots est de l'ordre de trois semaines. Les limaces sont manipulées assez souvent (les cages sont nettoyées tous les 2 à 4 jours) durant ces trois semaines, pour les habituer au contact humain. Le phénomène d'habituation chez les mollusques est rapide (Smith, 2002) et permet une perte minimale de mucus au moment de la pesée.

Expériences de non-choix alimentaire

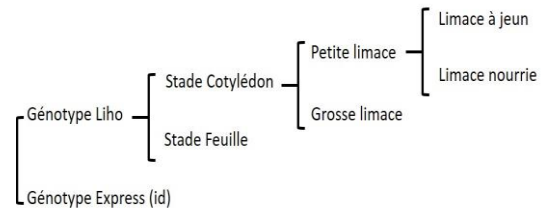
Les limaces sont confrontées à une monoculture, un seul cultivar de colza étant généralement semé par parcelle (Glen *et al.*, 1990). De ce fait, l'expérience de non-choix qui consiste à mettre en contact le sujet d'étude (limace) avec un aliment unique (Susan *et al.*, 1986) simule la situation naturelle au champ. Dans cette étude, nous aurons des expériences de non-choix, d'une part sur plant entier et, d'autre part sur métabolites purs commercialisés par Phytoplan (glucosinolates) ou par Sigma-Aldrich (acides aminés). Seules les expériences sur plants entiers sont décrites dans cet article.

Un bloc expérimental est constitué de 40 boîtes transparentes (15 cm x 8 cm x 10 cm) placées dans l'enceinte climatique (10-13°C, photopériode journalière naturelle J/N = 12h/12h au printemps) dont chacune contient trois plants de colza de même génotype. Deux stades de croissance du colza sont étudiés, le stade cotylédon (Cot) et le stade 2 feuilles vraies (Feu). Deux facteurs sont pris en compte chez les limaces, leur âge estimé d'après leur masse pondérale et leur état nutritionnel consistant en limaces nourries ou maintenues à jeun 5 jours avant d'avoir du colza. Cinq plants témoins sont placés dans l'enceinte, sans limaces.

Consommation alimentaire

Nous étudions six modalités par génotype de colza et chaque modalité est répétée 20 fois, ce qui donne un total de 20 blocs expérimentaux (Figure 1). Les limaces sont retirées des boîtes expérimentales après 24h. Le nombre de cotylédons et de feuilles attaqués est relevé afin de calculer le pourcentage consommé par rapport au nombre disponible dans la boîte. Le nombre disponible est n=9 au stade cotylédon car il y a une jeune feuille centrale et ce nombre est n=15 au stade 2 feuilles car les cotylédons sont encore présents auxquels s'ajoutent les deux feuilles bien formées, mais aussi une jeune feuille centrale.

Figure 1 : Schéma partiel du dispositif expérimental utilisé pour quantifier les dégâts sur les plants de colza *B. napus* par la limace *D. reticulatum*. (id) signifie que le schéma est identique pour l'autre état de la variable.



Les cotylédons et feuilles consommés sont photographiés au stéréomicroscope Stemi 2000C muni d'une caméra AxioCam (Zeiss, France). La surface consommée est calculée grâce au logiciel Zen 2.3 Lite (Zeiss). Quand la feuille ou le cotylédon est partiellement consommé, la surface réelle est calculée. Par contre, quand il ne reste que la tige du cotylédon ou de la feuille, nous estimons la surface consommée d'après la surface moyenne obtenue sur les plants témoins

Prélèvements des cotylédons de colza et du mucus de limace :

Des limaces sont nourries en continu sur des plants de stade cotylédon et de génotype Express ou Liho pendant cinq jours. Quatre boîtes (25x15x12 cm) contenant six plants et huit limaces chacune sont préparées pour chaque génotype et placées dans une enceinte climatique (10-13°C, photopériode journalière J/N =12h/12h). Des plants témoins sont également placés dans l'enceinte climatique, sans limaces. Chaque jour, les plants mangés sont remplacés par de nouveaux. Les cotylédons des plants témoins et les cotylédons partiellement consommés sont prélevés, environ deux heures après le début de l'activité nutritionnelle des limaces. C'est, selon Falk *et al.*, (2014), le temps optimal qui permet à la plante de réagir à la morsure de la limace en accumulant de l'acide jasmonique (JA) et son conjugué Isoleucine-JA. Une vingtaine de cotylédons sont collectés par prélèvement.

Le mucus des limaces est récolté une fois par jour sur les cinq jours en plaçant celles-ci dans des boîtes de Petri tapissées de Velcro pré-nettoyé à l'éthanol sur lequel elles déposent du mucus en rampant (Kästner *et al.*, 2014).

Les trois types de prélèvements (feuilles témoins, feuilles consommées, mucus) sont poolés par boîte sur les cinq jours d'expérience, lyophilisés durant 30 h (lyophilisateur Alpha 1-2, Christ, France), puis pesés et broyés pendant 20 secondes (QIAGEN, modèle Tissue Lyser II). Pour chaque type de prélèvement, l'échantillon est, après broyage, divisé en deux aliquots qui permettent de réaliser deux types d'analyses : (1) les acides aminés, sucres, polyols et acides organiques, (2) les glucosinolates.

Profilages métaboliques

Métabolites primaires (acides aminés, sucres, polyols et acides organiques) : Les métabolites primaires sont extraits à partir d'un mélange méthanol-chloroforme-eau (excepté pour le mucus, extrait sans chloroforme) et des standards internes BABA et adonitol, et dosés selon une adaptation de la méthode de Gravot *et al.* (2010), ceci afin de prendre en compte la nature des échantillons. Un volume de 400µL d'un mélange concentré de BABA 10 mM (quantification des acides aminés) et d'adonitol 20 mM (quantification des sucres et polyols) est dilué dans 20 mL de méthanol, afin de préparer la solution méthanolique.

A partir du surnageant récupéré, 50 µL de chaque tube (100 µL pour les échantillons de mucus) sont aliquotés dans des tubes eppendorfs pour l'UPLC (acides aminés) et 50 µL (100 µL pour les échantillons de mucus) dans des vials pour la GC (sucres et polyols). Les aliquots sont ensuite placés sous évaporation à sec au Speedvac pendant 1h30 à 2h à 35°C. Les aliquots utilisés pour doser les acides aminés sont repris avec 100 µL d'eau UP (50 µL pour les échantillons de mucus) et une dérivation AccQTag est réalisée (Gravot *et al.*, 2010). Les acides aminés libres sont alors dosés par chromatographie à phase liquide ultra-performante avec détection UV (UPLC-DAD) (Hervé *et al.*, 2014). Les aliquots utilisés pour le dosage des sucres, polyols et acides organiques sont directement analysés après l'évaporation et sont dosés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) (Hervé *et al.*, 2014)

Glucosinolates : Un aliquot de 10 mg de poudre sèche pour chaque type de prélèvement est utilisé afin d'analyser les glucosinolates selon la méthode décrite par Hervé *et al.* (2014). Leur dosage se fait par chromatographie à phase liquide ultra-performante triple quadripôle avec détection UV et spectrométrie de masse (Acquity-TQD-UPLC-PDA-MS).

Analyses statistiques

Nous avons conduit deux séries expérimentales, l'une avec des petites limaces et l'autre avec des grosses limaces. Pour chaque série, l'homogénéité des lots (20 limaces par lot x 2 états nutritionnels x 2 génotypes de colza) est vérifiée d'après la masse pondérale des limaces avant expérience. Leur distribution ne suivant pas une loi normale, nous appliquons un test de Wilcoxon pour données indépendantes.

Quantification des dégâts sur le colza par les limaces Nous avons cherché à comparer, de manière quantitative, les dégâts causés par les limaces sur le colza selon les modalités étudiées (génotype et stade de développement du colza, taille et état nutritionnel de la limace). L'objectif est d'évaluer les dégâts sur la base d'une biomasse équivalente malgré un nombre différent d'individus. Les nombres de cotylédons et de feuilles consommés par boîte sont comparés entre les modalités grâce à un GLM basé sur une loi binomiale et sur lequel est appliqué un test du rapport des vraisemblances. Deux analyses sont réalisées séparément selon le nombre de limaces par boîte, car deux limaces ont deux fois plus de chances d'attaquer les feuilles comparativement aux boîtes où il n'y a qu'une limace. Nous considérons ici le génotype et le stade du colza, ainsi que l'état nutritionnel de la limace comme étant des facteurs fixes (contrôlés par l'expérimentateur). Une analyse ANOVA de type II est donc réalisée sur le modèle retenu d'après le critère AIC (Akaike, 1974). La détermination précise des surfaces consommées des feuilles attaquées et des surfaces des feuilles témoins permet d'une part de comparer les feuilles des deux génotypes et d'autre part, de comparer le taux de consommation des limaces (= surface consommée par mg de masse fraîche (MF) de limace) selon les différentes modalités. Les surfaces des feuilles intactes ne suivant pas une distribution normale, des tests de Wilcoxon ont été appliqués sur chaque type de feuille entre les deux génotypes étudiés. De plus, nous souhaitons savoir si l'estimation à vue des dégâts donne une bonne évaluation des dégâts réels. Pour cela, nous recherchons si les deux variables quantitatives, proportions observées et surfaces consommées mesurées, sont corrélées, à l'aide d'un test de corrélation de Spearman car les données ne suivent pas de loi normale.

Analyses métaboliques des cotylédons de colza, du mucus des limaces : Les échantillons étudiés sont les suivants : cotylédons témoins (T) et consommés (C) des génotypes Express (Exp) et Liho, le mucus (M) des limaces ayant consommé, soit Exp, soit Liho. L'objectif étant de savoir quels sont les métabolites qui discriminent les six types d'échantillons (ExpT, ExpC, ExpM, ExpF, LihoT, LihoC), nous avons utilisé l'analyse discriminante des moindres carrés partiels (PLS-DA) et plus exactement la version optimisée de Liland et Indahl (2008). Pour cette analyse, les teneurs des échantillons en métabolites sont transformées par leur racine quadratique, étant donné que certaines teneurs sont nulles (Wold *et al.*, 2001). Quatre métabolites corrélés à plus de 95% avec la lysine, la phénylalanine, l'acide aspartique et l'acide glutamique ont été arbitrairement ôtés du jeu de données. Il s'agit de NH₄ issu du catabolisme des acides aminés, d'un acide aminé non protéique, le S-Methyl L-cystéine sulfoxide (SMCSO) qui est dans le groupe des arômes de plantes selon Thomas et Parkin (1994), l'asparagine et la glutamine, acides aminés apparentés à l'aspartate et au glutamate respectivement. Les valeurs des 46 métabolites restants ont été centrées-réduites avant traitement statistique (Jansen *et al.*, 2010). Afin d'évaluer le pourcentage de variance contrainte (expliquée) par rapport à la variance résiduelle, nous avons, après double validation croisée de la PLS-DA selon Westerhuis *et al.* (2008), appliqué une analyse de redondance (RDA) mise au point par van den Wollenberg (1977). Cette analyse, qui distingue le génotype de colza d'une part et la nature des tissus analysés (issus du colza ou de la limace), permet de calculer les parts de variance contrainte et non-contrainte.

Toutes les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel R (Version 3.1.3 R Core Team, 2016) et les packages Vegan (v 2.4-0), pls (v 2.5-0) et RVAidemémoire (v 0.9-56 ; Hervé 2014). Les scripts des analyses multivariées (PLS-DA, RDA et ACP) ont été élaborés par Hervé (2016) dans le cadre de l'école thématique d'écologie chimique (Roscoff, 20-24 juin 2016).

RÉSULTATS

Influence de la biologie et de la physiologie des limaces sur les dégâts au colza

Les variables relevées lors de ces expériences sont la masse des limaces utilisées, le nombre de feuilles endommagés par boîte qui donnent des estimations des dommages causés par les limaces, le pourcentage observé de surface de feuille consommée et la surface calculée de feuilles consommées qui évaluent plus précisément les dégâts. Les petites et les grosses limaces utilisées ont des masses moyennes (\pm Sd) respectivement de 158 ± 71 mg et de 372 ± 157 mg.

L'état nutritionnel des limaces a un effet significatif sur le nombre de feuilles qu'elles attaquent, quelle que soit leur taille (Tableau 1).

Tableau 1 : Résultat des tests χ^2 sur le nombre de feuilles consommées par boîte selon la taille des limaces, leur état nutritionnel, le génotype et le stade de colza. Les variables explicatives retenues dans les GLM, selon le critère AIC, sont données pour chaque classe de taille des limaces. Le nombre de degrés de liberté (ddl) est indiqué entre parenthèses et la probabilité est évaluée par p.

Nombre de feuilles attaquées					
Petites limaces			Grosses limaces		
	χ^2 (ddl)	Valeur de p		η^2 (ddl)	Valeur de p
Etat	15,171 (1)	< 0,001	Etat	5,991 (1)	= 0,014
Génotype	7,927 (1)	= 0,030	Stade	8,220 (1)	= 0,004
			Etat : Stade	4,657 (1)	= 0,030
			Etat : Génotype	6,509 (1)	= 0,011

Les petites limaces à jeun attaquent 1,4 fois plus de feuilles que les petites limaces nourries. Il en est de même pour les grosses limaces à jeun et les grosses limaces nourries. Les petites limaces sont influencées par le génotype de colza qu'elles mangent (21% de feuilles de génotype Liho attaquées contre 16% de feuilles de génotype Express), alors que les grosses limaces sont influencées par le stade de colza (14% de feuilles de plants de stade Cotylédon attaquées contre 10% de feuilles de plants de stade Feuille). L'état nutritionnel des grosses limaces interagit avec le stade d'une part et avec le génotype de colza d'autre part.

Des dommages ont été constatés dans 75% des boîtes (68% des boîtes de limaces nourries et 83% des boîtes de limaces à jeun). Si toutes les limaces avaient consommé du colza, environ 1720 cm² de colza auraient été consommés en une nuit sur les 920 plants totaux, qui correspondent à environ 26m² de parcelle de colza (De Sangosse, communication personnelle). La grande variabilité des surfaces des cotylédons et des feuilles, surtout les grandes, selon les plants, génotypes confondus, a conduit à des approximations des surfaces consommées lorsqu'il n'y avait pas de résidu foliaire après nutrition par les limaces (Tableau 2). Les cotylédons poursuivent leur croissance au stade feuille et leurs surfaces diffèrent d'un stade à l'autre (Wilcoxon, W= 16582, p< 0,001). Les cotylédons et les feuilles ont des surfaces comparables entre génotypes Express et Liho.

Tableau 2 : Surfaces moyennes (\pm Sd) des feuilles de colza intactes selon le stade étudié et le type de feuille. Les génotypes sont confondus. (Stade Cotylédon : cotylédon n= 40, petite feuille n= 20. Stade feuille : cotylédon n= 40, grande feuille n=40, petite feuille n= 20).

Stade cotylédon		Stade feuille	
Cotylédon	2,84 \pm 0,84 cm ²	Cotylédon	3,71 \pm 0,35 cm ²
Petite feuille	1,32 \pm 0,57 cm ²	Grande feuille	21,95 \pm 2,27 cm ²
		Petite feuille	3,23 \pm 0,34 cm ²

Les petites limaces ont un taux de consommation supérieur (x1,4, Figure 2.A) à celui des grosses limaces et mangent davantage lorsqu'elles ont jeûné (Figure 2.B). Le taux de consommation est élevé sur le génotype Liho (Figure 2. C). Le stade Feuille est 7,7 fois plus consommée que le stade Cotylédon (Figure 2. D).

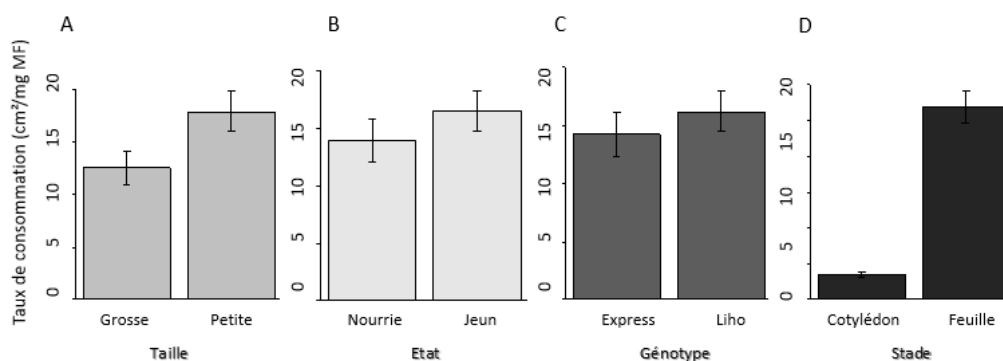


Figure 2 : Taux de consommation moyen des limaces pour une nuit selon la taille (A), l'état nutritionnel (B), le génotype (C) et le stade de colza (D). Les barres d'erreurs sont les erreurs standards.

Profilages métaboliques des cotylédons de colza et du mucus de limace

Parmi les 37 métabolites extraits des cotylédons (19 acides aminés, 8 sucres et acides organiques, 10 glucosinolates), deux n'ont pas pu être identifiés et dosés parmi les acides aminés et ont été retirés des analyses. Nous n'avons pas identifié de polyols dans les cotylédons ni dans le mucus de limas.

Les profils qualitatifs en acides aminés sont comparables dans les deux génotypes témoins et trois acides aminés majoritaires sont identiques, acide glutamique, glutamine, acide aspartique, alors que l'arginine singularise le génotype Express. Dans le génotype Liho, tous les autres acides aminés ont des teneurs en deçà de 8 nmol.mg^{-1} alors que dans le génotype Express, la richesse en arginine, asparagine, sérine et ornithine est remarquable avec des teneurs moyennes supérieures à 15 nmol.mg^{-1} . Les teneurs en arginine, ornithine et histidine sont 20 à 30 fois supérieures à celles mesurées dans le génotype Liho.

Les teneurs en glucosinolates diffèrent, Express est pourvu de progoïtrine ($0,3 \pm 0,1 \text{ nmol.mg}^{-1}$), mais pas Liho, alors que Liho est riche en glucobrassicine ($1,1 \pm 0,5 \text{ nmol.mg}^{-1}$). Après consommation par les limaces, les cotylédons s'appauvrissent en acides aminés libres majoritaires, et le génotype Liho semble s'appauvrir en citrate et en glycérate. Le mucus de limaces ayant consommé des cotylédons de génotype Liho est dominé par l'hydroxyglucobrassicine ($0,2 \pm 0,1 \text{ nmol.mg}^{-1}$), et la glucoraphanine ($0,1 \pm 0,1 \text{ nmol.mg}^{-1}$), alors que le mucus des limaces ayant consommé des cotylédons de génotype Express est plus pauvre en métabolites, mais se caractérise par la présence d'un sucre, le glucose, avec une teneur moyenne de $5,7 \text{ nmol.mg}^{-1}$ proche de celle du cotylédon consommé ($7,9 \text{ nmol.mg}^{-1}$).

DISCUSSION

Influence de la biologie et de la physiologie des limaces sur les dégâts au colza

Les petites limaces attaquent plus le colza que les grosses limaces, quel que soit le génotype. Les individus étudiés sont en phase de croissance (petites) et en phase de maturité sexuelle (grosses) car certaines ont pondu durant le maintien en élevage et, en captivité, les limaces grises meurent après la ponte. Les individus les plus jeunes sont en pleine croissance et allouent les bénéfices nutritionnels à la synthèse de leurs tissus corporels alors que les individus matures utilisent les gains d'énergie à leur reproduction. La plus faible attaque des plants de colza par les grosses limaces pourrait aussi venir d'un effet plus répulsif des glucosinolates car Aguir et Wink (2005) ont observé chez *Arion lusitanicus* une tolérance pour les alcaloïdes plus élevée chez les individus jeunes que chez les adultes. Cette diminution de la tolérance aux composés toxiques avec l'âge de la limace pourrait être liée à une baisse de l'activité du cytochrome P450 et/ou d'autres composants du complexe d'oxydases à fonctions mixtes, qui est situé dans la glande digestive et qui serait responsable de la détoxification des alcaloïdes chez *Arion lusitanicus*. Cette baisse d'activité enzymatique, durant la saison de reproduction, a déjà été observée chez d'autres mollusques, notamment chez la moule commune, *Mytilus edulis* (Livingstone 1985 in Aguiar et Wink, 2005).

Les limaces à jeun sont plus voraces que les limaces nourries sur concombre et croquettes pour chat. Cook et al. (2000) ont mis en évidence que les préférences alimentaires de *Deroceras reticulatum* sont directement influencées par son état nutritionnel. Une exposition prolongée à un régime strict ou un jeûne peut entraîner un déséquilibre nutritionnel. Ainsi, les limaces préfèrent généralement de la nourriture qu'elles n'ont pas rencontrée récemment, ce qui augmenterait les chances d'acquiescer les nutriments dont elles ont manqué durant cette période de privation. De plus, un jeûne d'une à deux semaines entraîne une augmentation significative de l'activité locomotrice de *Deroceras reticulatum*, et ce, dès les premiers jours de jeûne (Airey, 1987). Les individus sont plus actifs et la faim est l'une des conséquences de cette augmentation d'activité.

Chez les espèces généralistes, comme *D. reticulatum*, plus les feuilles sont âgées, plus elles sont attaquées car les jeunes feuilles investissent leurs ressources en azote pour stocker davantage de glucosinolates et se défendre contre les ravageurs (Lambdon et al., 2003). Nos résultats concordent puisque le taux de consommation des limaces est plus important sur le stade Feuille que sur les cotylédons. Nous n'avons pas étudié la composition métabolique du stade Feuille mais nous pouvons émettre l'hypothèse que les teneurs en glucosinolates sont plus faibles dans les feuilles que dans les cotylédons. Toutefois, il faudrait tenir compte du fait que la baisse en glucosinolates varie, en rapidité et en importance, selon le type structural, indolique, aromatique ou aliphatique de ces composés (Lambdon et al. 2003).

Les métabolites primaires et spécialisés définissent le génotype du colza et expliquent l'importance des attaques par la limace

Les résultats de l'étude de non-choix sur plants entiers montrent une différence de consommation entre les deux génotypes de colza étudiés. Les végétaux mettent en place des stratégies de défense contre les phytophages, même si la production et le stockage des métabolites secondaires dans leurs tissus sont des

processus énergivores (Levin, 1976). Le génotype Liho, particulièrement riche en glucosinolates de la famille des indoles (glucobrassicine et dérivés), est plus attaqué que le génotype Express qui est plus riche en progoïtrine, un glucosinolate aliphatique. Les glucosinolates jouent un rôle important dans la détermination de l'appétence du colza pour les limaces. Glen et al. (1990) ont montré que les dommages causés (nombre de plants attaqués) au colza par la limace grise sont positivement corrélés à la concentration en glucobrassicine et négativement corrélés à la concentration en progoïtrine dans les plants. Falk *et al.* (2014) ont, quant à eux, démontré l'effet répulsif des glucosinolates aliphatiques d'*Arabidopsis thaliana* sur le broutage par *Arion lusitanicus* (i.e. *A. vulgaris*).

La teneur en progoïtrine dans les cotylédons étant particulièrement faible avec un maximum de 0,8 nmol.mg⁻¹ de matière sèche dans le génotype Express, nous ne pouvons pas exclure le fait que d'autres métabolites aient un effet répulsif sur *D. reticulatum*. Parmi eux, sont les acides aminés majoritaires (Asp, Asn, Glu et Gln) ainsi que la lysine, l'histidine et la méthionine. L'excès de certains acides aminés peut réduire la prise de nourriture, surtout dans les régimes faibles en protéines (Harper et Benevenga, 1970). Delaney et Gelperin (1986) ont démontré une aversion de *Limax maximus* envers un aliment dépourvu de méthionine, acide aminé essentiel. Or, le cotylédon du génotype Express a une teneur moyenne 5 fois plus élevée en méthionine que celui du génotype Liho. Nous pouvons émettre l'hypothèse que *D. reticulatum* présente une aversion plus importante pour les glucosinolates aliphatiques présents dans le génotype Express que par le manque de méthionine, pourtant déterminante dans la croissance des animaux (Harper et Benevenga, 1970 ; Delaney et Gelperin, 1986).

Les préférences alimentaires des phytophages dépendent de l'attractivité (sélection d'une proie potentielle) mais aussi de la digestibilité (taux de digestion) de la plante (Nicotri, 1980). Les métabolites primaires et spécialisés de celle-ci peuvent en partie définir ces deux paramètres, rendant un végétal plus ou moins attractif pour un phytophage (Hervé *et al.* 2014). Ces auteurs mettent en évidence la préférence du méligèthe du colza (*Meligethes aeneus*) pour les bourgeons de génotype Express plutôt que ceux du génotype Liho, en raison d'un profil riche en saccharose, proline et sérine, acides aminés qui ont montré leur rôle attractif chez d'autres espèces (Hervé *et al.*, 2014). Nous n'avons pas détecté de saccharose dans les cotylédons de colza mais il y a bien des concentrations en proline et en sérine plus importantes chez le colza de génotype Express, même si le ratio de concentration est deux fois plus élevé dans les bourgeons (Hervé *et al.*, 2014). Cependant, si ces acides aminés stimulent la phytophagie chez les insectes, ils ne semblent pas avoir d'effet sur *Deroceras reticulatum* qui consomme plus de colza de génotype Liho., alors que l'effet de l'absence de certains acides aminés a été montré sur *Limax maximus* (Delaney et Geperin, 1986). De nouvelles approches sur les changements métabolomiques chez les végétaux attaqués par des herbivores montrent que les métabolismes primaires et secondaires sont liés et qu'ils ne peuvent être seulement associés à la croissance et aux variations environnementales, respectivement (Schwachje et Baldwin, 2008).

CONCLUSION

Cette étude expérimentale nous a permis de mieux caractériser les dégâts faits au colza par *D. reticulatum* et de mettre en relation ses préférences alimentaires avec la physiologie des individus, d'une part, et les profils métaboliques du colza d'autre part.

Parmi les glucosinolates, nous avons pu mettre en évidence que la poigoïtrine et de la glucobrassicine distinguent principalement les deux génotypes de colza. Une expérience de non-choix sur des gels imbibés de l'un ou l'autre des glucosinolates, en concentrations comparables à celles trouvées dans le colza, permet de mieux appréhender leur action de défense contre l'attaque par *D. reticulatum*. Notre étude a révélé que la consommation du tissu foliaire induit des changements de la teneur en certains acides aminés. Seraient-ils des signaux de défense de la plante, en interaction avec les glucosinolates aliphatiques ? Pour y répondre, nous proposons des cocktails de métabolites primaires associés à la progoïtrine ou à la glucobrassicine, sur gels, afin de tester leur appétence.

La limace grise est capable de se nourrir même si les défenses naturelles de la plante sont mises en place, et serait même capable de les contrer grâce à des subterfuges chimiques. Il est nécessaire de poursuivre ces recherches, pour comprendre ces mécanismes de défenses, notamment l'origine tissulaire de la production d'acide salicylique par la limace.

FINANCEMENTS

Cette étude a été partiellement financée par le projet RESOLIM (coordinateur, André Chabert ACTA) et par un contrat avec l'entreprise De Sangosse (coordinatrice Marion Puysservert).

REFERENCES

- Acevedo F. E., L.J. Rivera-Vega, S.H. Chung, S. Ray, S. et G.W. Felton, 2015. Cues from chewing insects - the intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, **26** : 80–86.
- Agreste, 2013. Enquête pratiques culturales 2011. Les traitements phytosanitaires sur les grandes cultures. *Agreste Les Dossiers*, n°17.
- Aguiar, R. M. et Wink, 2005. How do slugs cope with toxic alkaloids? *Chemoecology*, **15** : 167–177.
- Airey W. J., 1987. The influence of food deprivation on the locomotor activity of slugs. *Journal Molluscan Studies*, **53** : 37–45 (1987).
- Akaike H, 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, **19** (6) : 716–723.
- Byrne J. et P. Jones, 1996. Responses to glucosinolate content in oilseed rape varieties by crop pest (*Deroceras reticulatum*) and non-pest slug species (*Limax pseudoflavus*). *Annals of Applied Biology*, **128** : 78–79.
- Chevalier L., C. Desbuquois, J. Papineau et M. Charrier, 2000. Influence of the quinolizidine alkaloid content of *Lupinus albus* (Fabaceae) on the feeding choice of *Helix aspersa* (Gastropoda: Pulmonata). *Journal Molluscan Studies*. **66** : 61–68.
- Cook R. T., S.E.R. Bailey, C.R. Mccrohan, B. Nash et R.M. Woodhouse, 2000. The influence of nutritional status on the feeding behaviour of the field slug, *Deroceras reticulatum* (Müller). *Animal Behaviour*, **59** : 167–176.
- de Vos M., K.L. Kriksunov et G. Jander, 2008. Indole-3-acetonitrile production from indole glucosinolates deters oviposition by *Pieris rapae*. *Plant Physiology*, **146** : 916–926.
- Delaney K. et Gelperin A. (1986) Post-ingestive food-aversion learning to amino acid deficient diets by the terrestrial slug *Limax maximus*. *Journal of Comparative Physiology A*, **159** : 281-295
- Derridj S. 1996. Nutrients on the leaf surface. In *Aerial plant surface microbiology*, Morris et al. (Eds), Plenum Press, New York
- Erb M., S. Meldau et G.A. Howe, 2012. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science*, **17** : 250–259.
- Falk K.L. et J. Gershenzon 2007. The desert locust, *Schistocerca gregaria*, detoxifies the glucosinolates of *Schouwia purpurea* by desulfation. *Journal of Chemical Ecology*, **33** : 1542-1555.
- Falk K.L., J. Kästner, N. Bodenhausen, K. Shramm, C. Paetz, D.G. Vassao, M. Reichelt, D. von Knorre, J. Bergelson, M. Erb, J. Gershenzon et S. Meldau, 2014. The role of glucosinolates and the jasmonic acid pathway in resistance of *Arabidopsis thaliana* against molluscan herbivores. *Molecular ecology*, **23** (5) : 1188–203. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mec.12610/full> [Accessed March 1, 2016].
- Fiala V., Boutin J.P., Barry P. et S. Derridj 1993. Les métabolites de surface foliaire (phylloplan) : présence et rôle dans les relations plante-insecte. *Acta Botanica Gallica*, **140** : 207-2016.
- Glen D.M., H. Jones et J.K. Fieldsend, 1990. Damage to oilseed rape seedlings by the field slug *Deroceras reticulatum* in relation to glucosinolate concentration. *Annals of Applied Biology*, **117** : 197–207.
- Gadea A., Le Pogam P., Biver G., et al (2017) Which specialized metabolites does the native subantarctic Gastropod *Notodiscus hookeri* extract from the consumption of the lichens *Usnea taylorii* and *Pseudocyphellaria crocata*? *Molecules* **22**:425 ; doi: 10.3390/molecules22030425
- Gravot A., S.M. Dittami, S. Rousvoal, R. Lugan, A. Eggert, J. Collén, J., ... et T. Tonon, 2010. Diurnal oscillations of metabolite abundances and gene analysis provide new insights into central metabolic processes of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *New Phytologist*, **188** : 98-110.
- Hanley M. E., M.T. Bulling et M. Fenner, 2003. Quantifying individual feeding variability: Implications for mollusc feeding experiments. *Functional Ecology*, **17** : 673–679.
- Harper A.E. et N.J. Benevenga, 2013. Effect of disproportionate amounts of amino acids. *RA Lawrie, ea., Proteins as Human Food* (Avi Publishing Co., Westport, Conn., USA) : 417-447.
- Hervé M.R., R. Delourne, A. Gravot, N. Marnet, S. Berardocco et A-M. Cortesero, 2014. Manipulating feeding stimulation to protect crops against insect pests ? *Journal of Chemical Ecology*, **40** : 1220-1231.
- Honek A., P. Saska, Z. Martinkova et S. Koprdoва, 2013. A method to study slug predation on seedlings in the field. *Annals of Applied Biology*, **162** : 89–99.
- Hotelling H., 1933. Analysis of a 995 complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, **24** : 417-441
- Howlett S.A., 2005. The biology, behaviour and control of the field slug, *Deroceras reticulatum* (Müller). Thèse de doctorat, Université de Newcastle.
- Howlett S., 2012. Terrestrial slug problems: classical biological control and beyond. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, **7** : 10p.
- Jansen C., P. Parchi, S. Capellari, A.J. Vermeij, P. Corrado, F. Baas, F., ... et A.J. Rozemuller, 2010. Prion protein amyloidosis with divergent phenotype associated with two novel nonsense mutations in PRNP. *Acta neuropathologica*, **119** : 189-197.
- Kästner J., D. von Knorre, H. Himanshu, M. Erb, I.T. Baldwin et S. Meldau., 2014. Salicylic acid, a plant defense hormone, is specifically secreted by a molluscan herbivore. *PLoS One*, **9** : 1–5.
- Keller M., J. Kollmann et P.J Edwards, 1999. Palatability of weeds from different European origins to the slugs *Deroceras reticulatum* Müller and *Arion lusitanicus* Mabilie. *Acta Oecologica*, **20** : 109–118.
- Lambdon P. W., M. Hassall, R.R. Boar et R. Mithen, 2013. Asynchrony in the nitrogen and glucosinolate leaf-age profiles of Brassica: Is this a defensive strategy against generalist herbivores? *Agriculture, Ecosystem and Environment*, **97** : 205–214.
- Levin D.A., 1976. The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Annual review of Ecology and Systematics*,

7 : 121-159.

- Liland K.H. et U.G. Indahl, 2008. Powered partial least squares discriminant analysis. *Journal of Chemometrics*, **23** : 7-18.
- Lipsa F.D., R. Snowdon et W. Friedt, 2007. Improving rapeseed meal quality by reduction of condensed tannins. *Quality, Nutrition and Processing : Processing Technology*, **5** : 135-137.
- Linhart Y.B. et J.D. Thompson, 1995. Terpene-based selective herbivory by *Helix aspersa* (Mollusca) on *Thymus vulgaris* (Labiatae). *Oecologia*, **102** : 126-132.
- Livingstone D. R., 1985. Responses of the detoxication/toxication enzyme systems of molluscs to organic pollutants and xenobiotics. *Marine Pollution Bulletin*, **16** : 158-164.
- Maltas, E. et S. Yildiz, 2010. Distribution of secondary metabolites in *Brassica napus* genotypes. *Journal of Food Biochemistry*, **35** : 1071-1082.
- Ratzka A., Vogel H., Kliebenstein D.J., Mitchell-Olds T. et J. Kroymann, 2002. Disarming the mustard oil bomb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **99** : 11223-11228.
- Rowson, B. R. Anderson, J.A. Turner et W.O.C. Symondson, 2014. The Slugs of Britain and Ireland: Undetected and Undescribed Species Increase a Well-Studied, Economically Important Fauna by More Than 20%. *PLoS One*, **9** : e91907.
- RV Aide-Mémoire : <http://cran.r-project.org/doc/contrib/Herve-Aide-emoire-statistique>
- Schwachtje J. et T. Baldwin 2008 Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? *Plant Physiology*, **146** : 845-851.
- Singh A, S. Singh, K.I. Singh, 2016. Recent insights into the molecular mechanism of jasmonate signaling during insect-plant interaction. *Australian Plant Pathology*, **45** : p123-133.
- Smith A.M. et M.C. Morin, 2002. Biochemical differences between trail mucus and adhesive mucus from marsh periwinkle snails. *The Biological Bulletin*, **203** : 338-346.
- Soldaat L.L., Boutin J.P. et S. Derridj 1996. Species specific composition of free amino acids on the leaf surface of four *Senecio* species. *Journal of Chemical Ecology*, **22** : 1-2.
- Thomas D. J. et K.L. Parkin, 1994. Quantification of alkenyl-L-cysteine sulfoxides and related amino acids in Alliums by high-performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, **42** : 1632-1638.
- Vermorel M., R.K. Heaney et G.R. Fenwick., 1986. Nutritive value of rapeseed meal: effects of individual glucosinolates. *Journal of the science of food and agriculture*, **37** : 1197-1202.
- van den Wollenberg A., 1977. Redundancy analysis an alternative for canonical correlation analysis. *Psychometrika*, **42** : 207-219.
- Westerhuis J.A., H.C. Hoefsloot, S. Smit, D.J. Vis, A.K. Smilde, E.J. van Velzen, ... et F.A. van Dorsten, 2008. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*, **4** : 81-89.
- Wold S., J. Trygg, A. Berglund et H. Antti, 2001. Some recent developments in PLS modeling. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, **58** : 131-150.
- Zotin A.A., 2007. Patterns of individual growth of gray garden slug *Deroceras reticulatum*. *Biology Bulletin*, **34** : 457-462.