

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

**SUCCEs DE LA LUTTE BIOLOGIQUE EN VIGNE :
QUAND LA BIOLOGIE MOLECULAIRE S'EN MELE**

J. SÉGURET, L. APROSIO et M. GIRAUD

BIOLINE, 1306 ROUTE DE BIOT, 06560 VALBONNE, FRANCE

E-mail: mgiraud@biolineagrosiences.fr

RÉSUMÉ

La désormais classique comparaison de modalités sur des microparcelles distinctes n'est pas applicable aux macroorganismes car ces derniers se dispersent facilement. Les parcelles doivent donc être plus grandes et dans ce cas l'homogénéité des conditions n'est plus garantie. Pour comparer les performances de macroorganismes dans des conditions strictement identiques, Bioline a mis au point et combiné plusieurs techniques innovantes. Des trichogrammes de souches et d'espèces différentes sont lâchés en mélange dans des vignobles pour lutter contre les tordeuses de la grappe : des grappes sentinelles permettent de les recapturer puis de les identifier par des techniques de biologie moléculaire. Cette nouvelle méthode de 'screening', alliant expérimentation de terrain et technicité de laboratoire, s'avère être la plus intéressante pour sélectionner rapidement et efficacement les meilleurs trichogrammes.

Mots-clés : biocontrôle, trichogrammes, biologie moléculaire, screening, sélection.

ABSTRACT

SUCCESS OF BIOLOGICAL CONTROL IN VINEYARD - WHEN MOLECULAR BIOLOGY MIXES IN

The now classical comparison of modalities on distinct microplots is not applicable to macroorganisms because they easily disperse. The plots must therefore be larger and in this case the homogeneity of the conditions is no longer guaranteed. To compare the performances of macroorganisms under strictly identical conditions, Bioline has developed and combined several innovative techniques. Trichograms of various strains and species were released mixed together in vineyard plots to control the Grapewine Moths. These Trichograms are recaptured using sentinel bunches of grapes and then identified using molecular biology techniques. This new method of screening, combining both field experimentation and laboratory technology, has become the most interesting way to quickly and efficiently select the best Trichograms.

Keywords: biocontrol, Trichograms, molecular biology, screening, selection.

INTRODUCTION

De façon classique, pour comparer des modalités de traitements phytosanitaires ou de variétés, par exemple de céréales, on opère sur des microparcelles très proches les unes des autres. Dans le cas des trichogrammes, qui volent et donc se déplacent potentiellement sur de grandes distances (jusqu'à plusieurs centaines de mètres dans certaines conditions), il est difficile de procéder de la même façon. D'ailleurs, la bonne dispersion des trichogrammes est un facteur important de leur efficacité. On est donc obligé de travailler dans des parcelles de plus grandes dimensions. Traditionnellement, pour comparer des souches de trichogramme, les essais étaient réalisés dans des grandes parcelles éloignées les unes des autres, chaque grande parcelle recevant un ou plusieurs lâchers d'une unique souche de trichogramme. Ceci amenait des variabilités fortes entre les modalités (les parcelles), compliquait les comparaisons et obligeait à augmenter le nombre de répétitions. Bioline utilise aujourd'hui un protocole innovant, développé par sa propre Recherche & Développement (R&D). Il permet de comparer un grand nombre de souches de trichogramme entre elles dans une seule grande parcelle, donc dans une situation strictement identique pour chaque souche.

MATERIEL ET MÉTHODE

PRODUCTION DES GRAPPES SENTINELLES

Un élevage des deux principales tordeuses de la grappe, l'eudémis *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller 1775) et la cochylis *Eupoecilia ambiguella* (Hübner 1796) est maintenu au laboratoire de R&D à Valbonne (Alpes-Maritimes). Ces souches d'élevage sont originaires de l'Inra de Bordeaux et ont été mises en élevage sur un milieu artificiel décrit par Denis Thiéry et Jérôme Moreau (Thiéry D. et Moreau J., 2005). Des grappes de raisin sont récoltées chaque semaine dans les parcelles d'essai, dans notre cas dans deux domaines viticoles du Var et un troisième dans les Alpes-Maritimes. Ces grappes de raisin sont ramenées au laboratoire et suspendues dans une cage contenant des papillons d'eudémis ou de cochylis. Pendant la nuit, les papillons viennent pondre leurs œufs sur les baies de raisin. Le lendemain, les papillons sont chassés des grappes et ces grappes, qui portent des œufs, sont retirées des cages. Nous les appelons « grappes sentinelles ».

Figure 1 : Grappes sentinelles suspendues dans une cage contenant des papillons de tordeuses, photo par Alexandra Ménard
(*Sentinel bunches of grapes hanging in a cage containing Grapewine Moths, photo by Alexandra Ménard*).



POSITIONNEMENT DES GRAPPES SENTINELLES AU VIGNOBLE

Les grappes sentinelles sont ensuite le jour-même transportées vers les parcelles d'essai d'où elles sont originaires et sont accrochées dans la vigne durant 48 à 60 heures (2 jours à 2,5 jours) avec une petite réserve en eau pour conserver au mieux leur fraîcheur. Dans ce laps de temps, les œufs, qui n'ont pas eu le temps d'éclore (en juillet-août, époque des essais, les œufs éclosent en 5 jours environ), peuvent être visités par des trichogrammes. Puis, les grappes sentinelles sont rapportées au laboratoire, pour incubation le temps que des trichogrammes émergent des œufs. Ces trichogrammes sont ensuite isolés un par un pour être analysés.

Figure 2 : Une grappe sentinelle, portant des œufs de tordeuse, est repositionnée dans son vignoble d'origine, photo par Alexandra Ménard
(A sentinel bunch of grapes, with Grapemoth eggs, is replaced in its original vineyard, photo by Alexandra Ménard).



LACHERS DE TRICHOGRAMMES AU VIGNOBLE

De manière concomitante, en été 2015, des trichogrammes appartenant à 9 souches au début de l'expérience, puis davantage par la suite (jusqu'à 19 souches au total) sont conditionnés dans des diffuseurs et lâchés dans les parcelles d'essai. Ces 19 souches sont originaires de France métropolitaine continentale et représentent en tout 11 espèces différentes de trichogramme. Les souches sont en compétition dans des conditions égales (mêmes dates, mêmes parcelles, mêmes points de lâcher, mêmes œufs à parasiter sur les grappes sentinelles). Seule la dose de lâcher (difficile à maîtriser) a pu varier (de 300 à 700 trichogrammes /souche /diffuseur) selon les semaines : des comptages en diffuseurs ont permis *a posteriori* de calculer la dose effectivement lâchée pour chaque souche.

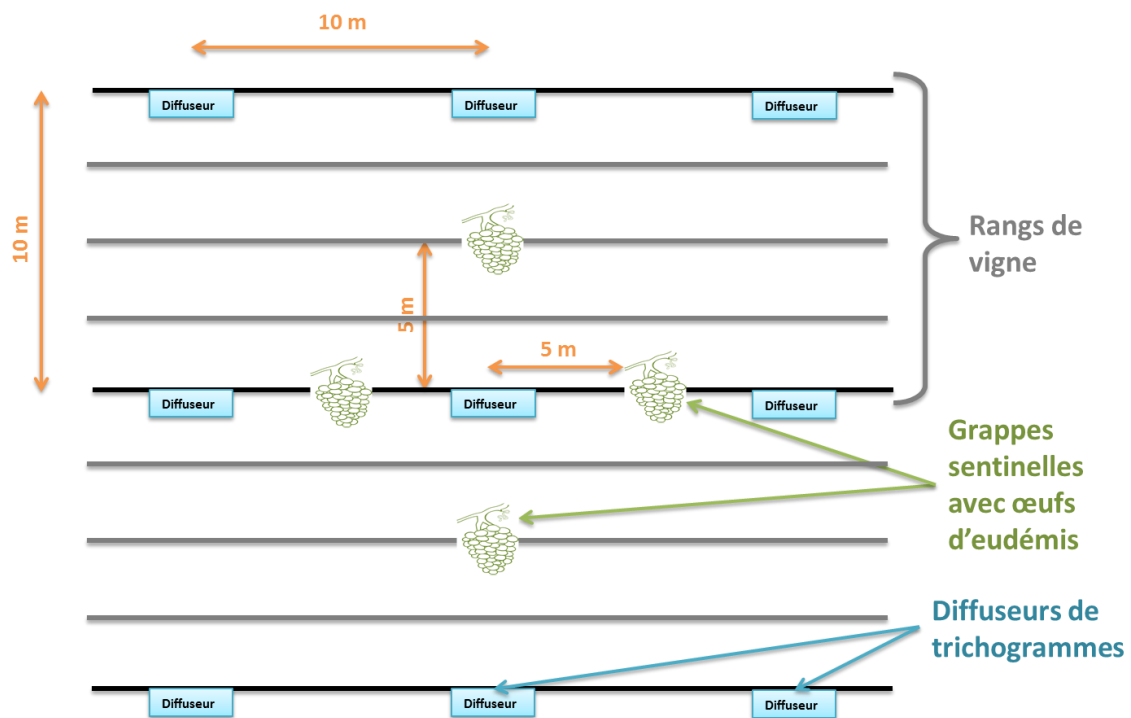
Figure 3 : Pose d'un diffuseur contenant des trichogrammes dans les vignes, photo Bioline
(Laying a dispenser containing Trichograms in the vineyard, photo Bioline).



ORGANISATION DES ESSAIS AU VIGNOBLE

De façon pratique, les trichogrammes émergent des diffuseurs à partir du deuxième jour après le lâcher et se dispersent dans les vignes. Pendant ce temps, les grappes sentinelles sont placées dans ces mêmes vignes, mais à distance des points de lâcher de trichogrammes, de façon à favoriser les trichogrammes qui se dispersent le mieux. Les lâchers ont lieu une fois par semaine et la pose des grappes sentinelles également.

Figure 4 : Dispositif expérimental au vignoble
(*Experimental layout in the vineyard*)



ANALYSES AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Les baies portant des œufs parasités par les trichogrammes (c'est-à-dire les œufs devenus noirs) sont isolées et surveillées quotidiennement. À l'émergence, chaque trichogramme est prélevé individuellement et traité en microtube de 1,5 ml pour en extraire l'ADN.

Extraction d'ADN

Ensuite, 100 µL de Chelex Molecular Biology Grade Resin à 5% (Biorad Laboratories, Inc) sont ajoutés sur chaque trichogramme traité. Ce mélange est incubé 30 minutes à 56°C au bain marie, vortexé quelques secondes puis incubé à nouveau 15 minutes à 99°C.

Amplification du gène COI

Les trichogrammes sont identifiés grâce au séquençage du gène mitochondrial codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase (COI). Ce gène est largement utilisé pour identifier différentes espèces d'êtres vivants, car il présente l'intérêt d'être bien discriminant au niveau interspécifique. Comme la séquence du gène COI est relativement conservée au sein des arthropodes, le couple d'amorces universelles LCO1490 et HCO2198 peut être utilisé dans le cas des trichogrammes (Former et al, 1994). Une réaction de polymérase en chaîne (PCR) est appliquée sur les échantillons d'ADN précédemment obtenus. Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur Techne TC-3000 avec le programme

suivant : dénaturation initiale de 3 minutes à 95°C, 35 cycles de 30 secondes à 95°C, 35 secondes à 55°C et 45 secondes à 72°C, élongation finale de 10 minutes à 72°C.

La qualité de l'amplification est visualisée grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, dans lequel est déposé un mélange de bleu de charge et de 4 µL de produit PCR. Les échantillons positifs sont conditionnés puis envoyés pour séquençage.

Analyses bio-informatiques

La purification du produit PCR et le séquençage selon la méthode Sanger sont confiés à la société Genoscreen (Lille, France). Les séquences sont renvoyées et chacune est traitée individuellement :

- Elles sont d'abord vérifiées et éventuellement corrigées manuellement ;
- Un alignement est réalisé avec les séquences de la banque de données interne de Bioline pour mettre en évidence les identités avec les séquences des souches lâchées dans les vignes au cours de l'expérimentation.

Un traitement global des résultats permet de relier chaque référence de trichogramme récupérée sur le terrain avec une des références lâchées et d'établir quelles souches ont été les plus aptes à parasiter les œufs portés par les grappes sentinelles.

RESULTATS

Occurrences de recaptures

Neuf à dix-neuf souches ont été déposées sur le terrain, en compétition et en proportions variables selon les semaines de lâchers. La figure 5 ci-dessous indique ces proportions durant la durée de l'expérimentation. Les résultats en semaines 29 et 34 sont manquants car les échantillons récoltés étaient inexploitable.

Le nombre de recaptures est relativement faible (moins d'une quarantaine de trichogrammes) au cours de l'expérimentation à part en semaine 35, où près de 300 individus ont pu être récupérés à l'émergence (figure 5A). En effet, la semaine 35 signe la fin de la période de rémanence du soufre, souvent utilisé dans les vignobles, et qui est malheureusement difficilement compatible avec les insectes auxiliaires (Thomson et al, 2000).

Identification des trichogrammes recapturés

La souche A1 est retrouvée à chaque prélèvement, quelle que soit sa proportion dans le cocktail de souches lâchées. En fin de campagne, les souches B1 et B2 sont recapturées en plus grand nombre (figure 5A). La souche B1 a été identifiée en semaine 32, alors qu'elle n'a pas été lâchée cette semaine-là. On peut supposer que les individus lâchés en semaine 31 ont survécu, parasitant ainsi les nouveaux œufs sentinelles déposés en semaine 32.

Le bilan global des identifications des trichogrammes sur la campagne d'expérimentation font apparaître trois souches majoritaires sur les dix-neuf lâchées (figure 6). Sur 383 Trichogrammes analysés, près de 90% sont issus des souches A1, B1 et B2, appartenant à 2 espèces différentes.

Figure 5 : Proportions des souches de trichogrammes recapturées (A) par rapport aux proportions de souches lâchées (B)
(Proportion of the recollected strains of Trichogramma (A) in comparison with the proportion of the released strains (B)).

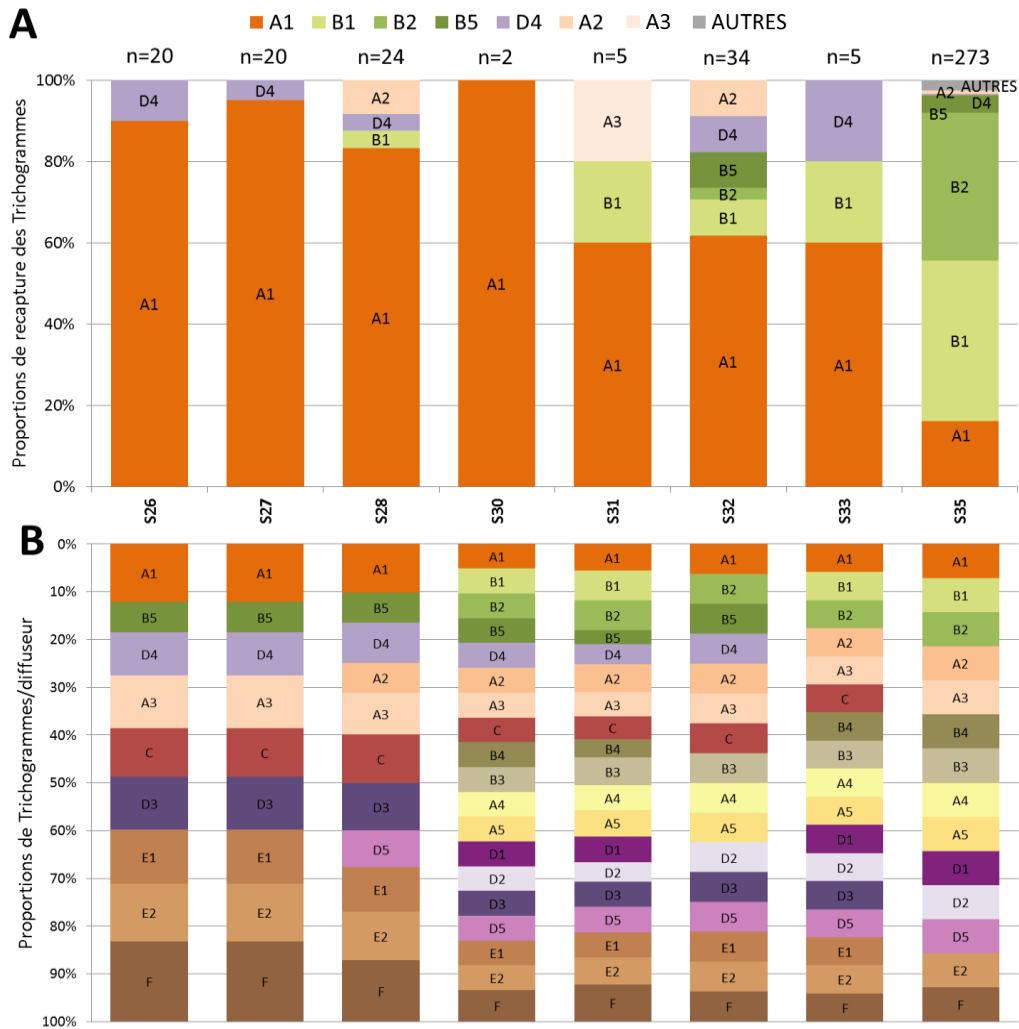
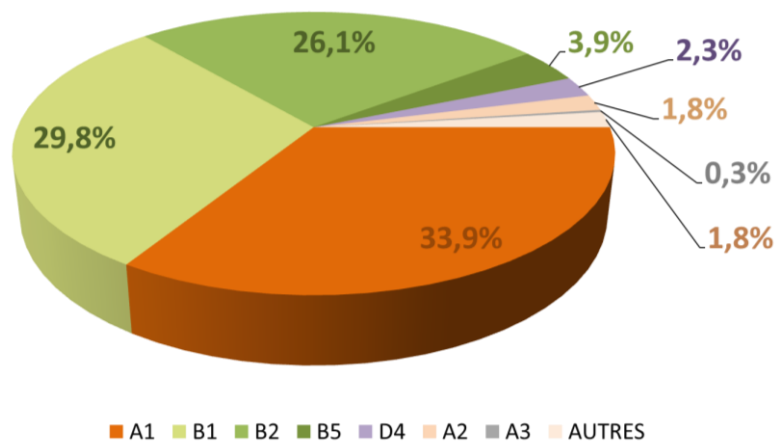


Figure 6 : Bilan global des souches de trichogrammes recapturées sur le terrain
(Synthesis of all the trichogramms strains captured in the vineyard).



DISCUSSION

La biologie moléculaire est aujourd'hui devenue un outil indispensable pour la R&D de la société Bioline. Son application sur un processus de lâcher-recapture a déjà été testée par le passé sur plusieurs cultures : sur le maïs dans le cadre de la lutte contre la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*), sur le géranium pour lutter contre le brun des pélagoniums (*Cacyreus marshalli*) et sur la châtaigne contre le carpocapse des châtaignes (*Cydia splendana*). Elle fait partie intégrante des expérimentations à venir, sur la vigne mais aussi sur le soja.

Le séquençage, bien que très informatif, demande un délai d'obtention des résultats relativement long et son coût global est plus élevé qu'une simple PCR. Il a fallu réfléchir à une méthode plus rapide et moins onéreuse, développée au départ en collaboration avec le Centre INRA PACA, Institut Sophia Agrobiotech (ISA), équipe de Recherche et Développement en Lutte Biologique (RDLB). La société Bioline et l'équipe RDLB ont donc mis au point une méthode d'analyse simple, permettant d'amplifier spécifiquement 7 espèces différentes de trichogramme. Après deux PCR multiplex indépendantes, les résultats sont lisibles sur un gel d'agarose grâce à un polymorphisme de taille des produits d'amplification obtenus. En comparaison avec la stratégie de screening utilisée sur la vigne, cette technique est moins coûteuse mais moins précise qu'un séquençage. Ceci dit, elle permet de détecter rapidement la présence des 7 espèces principalement recherchées.

Récemment, et toujours en collaboration avec l'équipe RDLB de l'INRA dans le cadre du projet européen COLBICS, des travaux ont démarré sur l'utilisation de marqueurs microsatellites pour discriminer les trichogrammes à l'échelle individuelle (comprenez 1 individu génétique = 1 lignée clonale ou fortement consanguine). Les microsatellites sont des séquences ADN formées par une répétition continue de motifs composés de 1 à 4 nucléotides généralement. Le nombre de répétitions de ces motifs varie entre les individus. En combinant les études d'une quinzaine de microsatellites par insecte, il est possible d'attribuer à chaque individu d'une même espèce, un profil microsatellite qui lui est propre. En comparaison avec la stratégie de screening utilisée sur la vigne, cette technique est plus précise qu'un séquençage et s'avère moins coûteuse en réactifs, mais elle nécessite le développement d'une base de microsatellites et une analyse bioinformatique qui peuvent devenir plus coûteuses en logiciel et en temps.

CONCLUSION

Les méthodes de biologie moléculaire ont permis la mise au point d'un protocole innovant pour comparer un grand nombre de souches de trichogrammes sur une seule parcelle et dans des conditions strictement identiques pour toutes.

Les résultats obtenus grâce à cela sur la vigne sont très prometteurs et les essais se poursuivent afin de perfectionner la stratégie de lâcher tout en optimisant l'efficacité des trichogrammes. Avec l'aide de la biologie moléculaire, un temps précieux a été gagné et les coûts d'expérimentation ont pu être diminués. Ces techniques de pointe, aujourd'hui facilement disponibles aux laboratoires publics et privés, permettent de poursuivre le développement des produits de biocontrôle par le moyen classique des lâchers de macroorganismes.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent particulièrement à remercier les viticulteurs qui ont aimablement accueillis les essais sur leurs parcelles :

- Le Domaine de Val d'Iris à Seillans dans le Var.
- Le Vignoble Rasse à Saint-Jeannet dans les Alpes-Maritimes.
- Le Domaine du Clos de Saint Vincent à Bellet dans les Alpes-Maritimes.

Ils remercient également :

- Tous ceux qui ont contribué au développement des techniques de biologie moléculaire citées ci-dessus, en particulier à l'INRA : Thibaut Malausa, Nicolas Ris, Sylvie Warot, Géraldine Bout, Paloma Martinez Rodriguez et Antoine Lauvernay.

- Tous ceux qui ont contribué à l'obtention des résultats ici présentés, en particulier Alexandra Ménard, Marion Giraud, Benoît Frank, Lucie Beauvié, Tony Ben Soussan, Lisa Brancaccio, Maxime Ferrero, Thomas Lepilleur, Cécilia Multeau, Martin Pons, Pierre-Baptiste Bourne-Watrin et toute l'équipe R&D de Bioline.

BIBLIOGRAPHIE

Thiéry D., Moreau J., 2005 - Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia*, 143, 4, 548-557.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R., 1994 - DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299

Thomson L. J., Glenn D. C., Hoffmann A. A., 2000 - Effects of sulfur on *Trichogramma* egg parasitoids in vineyards: measuring toxic effects and establishing release windows. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 40(8), 1165-1171