

**AFPP – ÉCOLOGIE CHIMIQUE :
NOUVELLES CONTRIBUTIONS À LA PROTECTION DES CULTURES CONTRE LES RAVAGEURS
MONTPELLIER – 24 OCTOBRE 2017**

**ROLE DE LA PERCEPTION CHIMIOSENSORIELLE DANS LE CHOIX DE PONTE CHEZ LE RAVAGEUR
DROSOPHILA SUZUKII MATSUMURA**

S. LEBRETON ^{(1)*} ET B. PRUD'HOMME ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Aix-Marseille Univ, CNRS, IBDM, Institut de Biologie du Développement de Marseille, Campus de Luminy case 907, 13288 Marseille Cedex 9, France
*sebastien.lebreton@univ-amu.fr

RÉSUMÉ

Contrairement à la plupart des espèces de Drosophiles qui pondent sur les fruits en décomposition, *Drosophila suzukii* Matsumura s'attaque préférentiellement aux fruits mûrs. Cette modification comportementale s'est accompagnée d'une modification de sa perception chimiosensorielle. Nous avons testé ici comment les signaux olfactifs et gustatifs affectent le comportement de ponte de *D. suzukii* en comparaison avec *Drosophila melanogaster* Meigen. Des odeurs de fraises et le saccharose semblent avoir un effet additif sur le comportement de *D. suzukii* alors qu'ils agissent en synergie chez *D. melanogaster*. Aussi, ces deux composantes combinées expliquent la majorité de l'effet stimulant de la fraise sur la ponte de *D. suzukii*, alors que ce n'est pas le cas chez *D. melanogaster*. Nos résultats suggèrent donc que ces deux espèces utilisent et intègrent ces deux signaux sensoriels différemment.

Mots-clés : Olfaction, gustation, ponte, *Drosophila suzukii*, comportement.

ABSTRACT

ROLE OF CHEMOSENSORY PERCEPTION IN EGG-LAYING CHOICE IN THE PEST SPECIES *DROSOPHILA SUZUKII*

Unlike most of the other *Drosophila* species which lay eggs on decaying fruit, *Drosophila suzukii* preferentially attacks ripe fruit. This behavioral modification is accompanied with a modification of its chemosensory perception. We tested here how olfactory and gustatory signals affect the egg-laying behavior of *D. suzukii*, in comparison with *D. melanogaster*. Fresh strawberry odors and sugars (sucrose) seem to have an additive effect on *D. suzukii* behavior whereas they act synergistically in *D. melanogaster*. In addition, these two components together explain most of the stimulatory effect of strawberries on *D. suzukii* egg-laying behavior, which is not the case for *D. melanogaster*. Therefore, our results suggest that these two species differentially use and integrate these two sensory signals.

Keywords: Olfaction, gustation, egg-laying, *Drosophila suzukii*, behavior.

INTRODUCTION

La drosophile à ailes tachetées, *Drosophila suzukii* Matsumura, est une espèce invasive qui s'est implantée en Europe et en Amérique du Nord en provenance d'Asie en 2008, et s'est depuis répandue sur l'ensemble de ces continents (Framout et al., 2017). Contrairement aux autres espèces de drosophiles qui pondent sur des fruits abimés, *D. suzukii* s'attaque préférentiellement aux fruits mûrs. Cette caractéristique comportementale est en partie due à une modification de la structure de son ovipositeur (appendice à l'aide duquel les femelles pondent leurs œufs) lui permettant de percer la peau des fruits intacts (Atallah et al., 2014). De plus, *D. suzukii* est une espèce généraliste qui s'attaque à une large gamme de petits fruits, tels que la fraise, la framboise, la cerise, la myrtille ou bien encore le raisin (Walsh et al., 2011). Toutes ces caractéristiques font de cette espèce l'un des ravageurs principaux sur les cultures de fruits de nombreux pays (Bolda et al., 2010; Lee et al., 2011).

Si l'adaptation morphologique de son ovipositeur explique pourquoi *D. suzukii* est capable de pondre sur des fruits intacts, la préférence pour ces derniers s'explique par une modification de sa perception sensorielle (Karageorgi et al., 2017). Par exemple, *D. suzukii* est beaucoup moins sensible à la dureté du substrat sur lequel elle pond, en comparaison avec des espèces proches comme *Drosophila biarmipes* Malloch ou bien *Drosophila melanogaster* Meigen; espèces s'attaquant aux fruits abimés et choisissant toujours les substrats les plus mous (Karageorgi et al., 2017). Autre modalité sensorielle affectée : l'olfaction. Nous avons ainsi pu mettre en évidence récemment que l'odeur de fraises mûres est suffisante à elle seule pour stimuler la ponte de *D. suzukii*, ce qui n'est pas le cas de *D. melanogaster* (Karageorgi et al., 2017). Les drosophiles, tout comme les autres insectes, détectent les composés chimiques volatils par le moyen de deux types de récepteurs : Les récepteurs olfactifs de type OR (*Olfactory Receptors*) et les récepteurs ionotropiques (IR = *Ionotropic Receptors*) (Benton et al., 2009; Larsson et al., 2004). Pour aller plus loin dans l'étude de la perception olfactive chez *D. suzukii*, nous avons généré des lignées mutantes et transgéniques afin de manipuler le système olfactif de cette espèce. Ceci nous a permis de montrer que les récepteurs olfactifs de type OR sont responsables de la perception des composés volatils émis par les fraises mûres qui stimulent la ponte de cette mouche (Karageorgi et al., 2017). Cependant, les mouches anosmiques pour les composés détectés par les récepteurs de type OR se comportent normalement lorsqu'elles ont la possibilité d'être en contact direct avec les fruits mûrs (Karageorgi et al., 2017). Ce résultat suggère que des signaux perçus par contact, et par conséquent probablement des signaux gustatifs, sont également capables de stimuler la ponte chez *D. suzukii* et peuvent compenser la perte partielle de l'odorat.

Nous nous sommes par conséquent intéressés dans cette étude à la part que prend chacun de ces deux types de signaux (olfactif et gustatif) dans la stimulation de la ponte, ainsi que la manière dont ils interagissent pour moduler le comportement de *D. suzukii* et *D. melanogaster*.

MATERIEL ET MÉTHODE

INSECTES

Les lignées sauvages « Oregon R » (*D. melanogaster*) et « Alpes Maritimes, AM » (*D. suzukii*) ont été utilisées pour réaliser cette étude. Les deux stocks étaient maintenus dans des tubes standards communément utilisés pour l'élevage des drosophiles contenant de la nourriture NutriFly (http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/media-recipes/germanfood.htm). Dans le cas de *D. suzukii*, une bande de papier Whatmann était ajoutée dans chaque tube afin de permettre la pupaison.

Dans les deux jours suivant l'émergence, les mouches ont été transférées dans un nouveau tube pendant sept à dix jours avant le début de l'expérience.

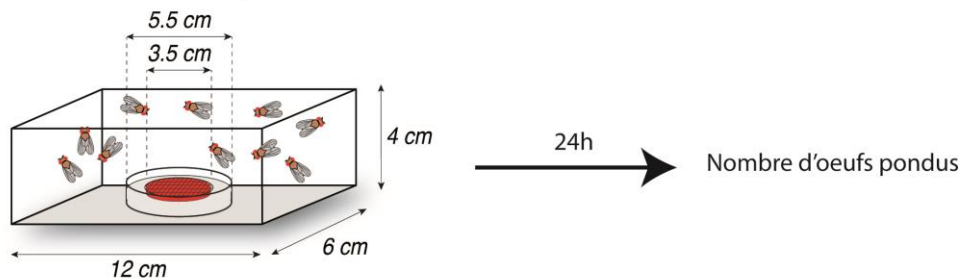
DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Environ 6h avant le début de l'expérience, les mouches étaient anesthésiées à l'aide de CO₂, puis les femelles de l'une ou l'autre des deux espèces étaient placées dans un nouveau tube, par groupe de 10. Chaque groupe de femelles était ensuite transféré dans une boîte en Plexiglas (12 x 6 x 4cm) dans laquelle se trouvait une boîte de Petri sur laquelle les mouches avaient la possibilité de pondre (Figure 1). Le dispositif de ponte était constitué d'une petite boîte de Petri (Ø 35 mm) située au centre d'une boîte plus grande (Ø 55 mm). La boîte située au centre était recouverte d'une grille métallique permettant aux mouches de sentir les odeurs émanant de cette boîte tout en les empêchant d'avoir un contact direct avec le contenant. Les mouches pouvaient en revanche pondre autour de la petite boîte, sur le substrat présent dans la plus grande boîte (Figure 1).

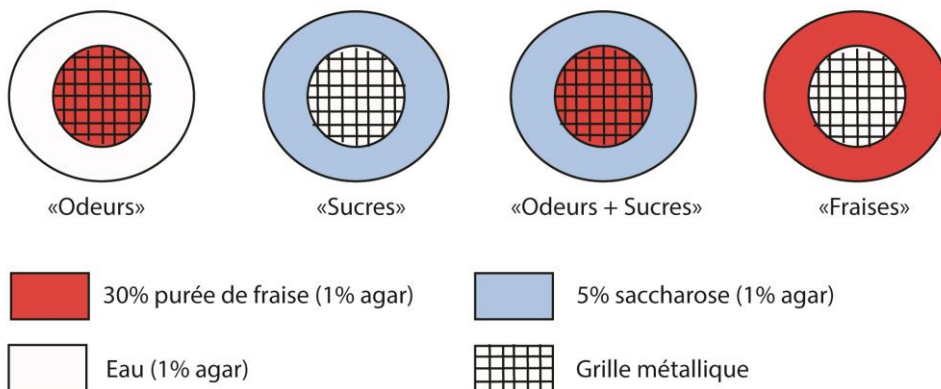
Figure 1 : Dispositif expérimental (Experimental set-up)

(A) Protocole expérimental

10 femelles *D. melanogaster* ou *D. sukuii*



(B) Conditions testées



Les mouches étaient confrontées à l'un des quatre substrats de ponte suivant (n = 23 par condition et par espèce) :

- Odeurs de fraises fraîches seules (30%)
- Saccharose seul (6%)
- Odeurs de fraises fraîches (30%) + sucres (6%)
- Fraises fraîches (30%).

La composition de ces substrats de ponte est décrite dans le tableau I et illustrée dans la figure 1. De la purée de fraise Sicoly® a été utilisée dans cette expérience (<http://www.sicoly.fr/fruit/produits-fruits-surgeles/purees/puree-fruits/fraise-puree.html>). La purée contenant 20% de sucre, une dilution de 30%

de cette purée correspond à une concentration de sucre de 6% dans le substrat de ponte final (le taux de sucres présents dans une fraise est de l'ordre de 5-6%).

Tableau I : Composition des quatre substrats de ponte testés (composition of the four oviposition substrates tested)

Test	petite boîte	grande boîte
« odeurs seules »	30% de purée de fraise Sicoly® diluée dans de l'eau + 1% d'agar	Eau + 1% d'agar
« sucre seuls »	Eau + 1% d'agar	6% de saccharose dilué dans de l'eau + 1% d'agar
« odeurs + sucre »	30% de purée de fraise Sicoly® diluée dans de l'eau + 1% d'agar	6% de saccharose dilué dans de l'eau + 1% d'agar
« fraises »	Eau + 1% d'agar	30% de purée de fraise Sicoly® diluée dans de l'eau + 1% d'agar

Au bout de 24h les boîtes de Petri étaient prélevées et le nombre d'œufs comptés.

ANALYSE STATISTIQUE

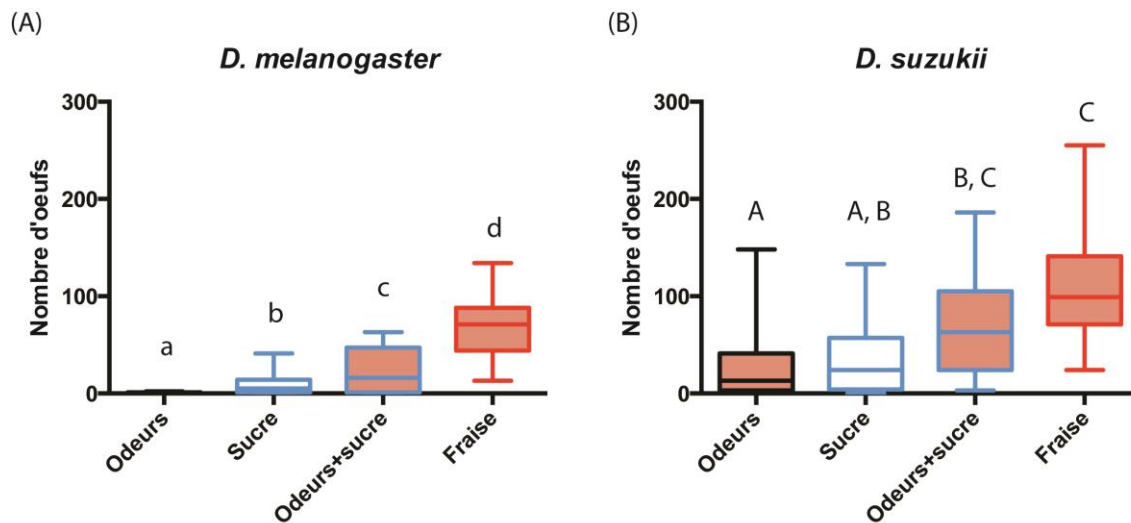
Pour chaque espèce, le nombre d'œufs pondus a été comparé entre les différents traitements grâce à un modèle linéaire généralisé (GLM) avec l'hypothèse d'une structure d'erreur binomiale négative, suivi d'un test de comparaisons multiples avec une méthode de correction *post hoc* de type FDR (False Discovery Rate).

RESULTATS

D. melanogaster ne pond presque pas en présence d'odeurs de fraises uniquement ($0,48 \pm 0,73$ œufs pondus ; Figure 2A). En revanche, elle pond plus lorsque les odeurs sont combinées avec le sucre ($22,87 \pm 22,16$) en comparaison avec le sucre seul ($9,65 \pm 12,06$). Ce taux de ponte est toutefois inférieur au taux de ponte sur la purée de fraises ($70,39 \pm 29,81$).

En ce qui concerne *D. sukii*, sa ponte est stimulée à la fois par les odeurs de fraises ($28,39 \pm 37,13$ œufs pondus) et par le sucre ($38,48 \pm 40,25$; Figure 2B). Lorsque les deux stimuli sont combinés, on observe un taux de ponte intermédiaire ($67,82 \pm 55,76$) entre chacun des stimuli seuls et la purée de fraises ($108,00 \pm 51,57$), tout en n'étant pas significativement différent de cette dernière.

Figure 2 : Nombres d'œufs pondus par *D. melanogaster* (A) et *D. suzukii* (B) sur les différents substrats de ponte (Number of eggs laid by *D. melanogaster* and *D. suzukii* on the different egg-laying substrates). Différentes lettres au dessus des histogrammes montrent des différences statistiques entre les différentes conditions au sein de chaque espèce.



DISCUSSION

Les comportements de ponte de *D. melanogaster* et *D. suzukii* sont radicalement différents. Alors que *D. melanogaster* pond quasi-exclusivement sur des fruits abîmés ou en cours de décomposition, *D. suzukii* préfère nettement pondre sur des fruits frais ou en cours de maturation. Dans leur environnement naturel, ces deux espèces sont donc confrontées à des substrats de ponte dont la composition chimique (volatile et non-volatile) diffère grandement. Lors de la maturation, les fruits accumulent du sucre (essentiellement du fructose, ainsi que du glucose et du saccharose dans une moindre mesure) (Woodward, 1972). Lorsqu'il est abîmé, le fruit va ensuite être colonisé par des micro-organismes (notamment des levures), qui au cours du processus de fermentation vont dégrader les sucres (Berthels et al., 2004) et produire de l'éthanol, puis de l'acide acétique, ainsi que de nombreux autres composés chimiques volatils (Mansourian and Stensmyr, 2015). Il n'est donc pas surprenant que ces deux espèces aient subi, au cours de l'évolution, des modifications de leurs systèmes sensoriels ayant conduit à des divergences comportementales en réponse à certains signaux chimiques (Karageorgi et al., 2017; Keesey et al., 2015; Pham and Ray, 2015; Ramasamy et al., 2016; Revadi et al., 2015).

Nos résultats confirment que le comportement de ponte de *D. melanogaster* n'est pas stimulé par la présence seule d'odeurs de fraïses fraîches. En revanche, ces mêmes odeurs la stimulent lorsqu'elle a la possibilité de pondre sur un substrat sucré. L'effet de ces odeurs sur la ponte de ces mouches dépend donc du contexte dans lequel elles les détectent. La purée de fraïses fraîches utilisée dans cette étude pourrait s'apparenter à des fruits tout juste abîmés, avant qu'ils ne soient colonisés par les levures. Or, les larves se nourrissent de ces micro-organismes qui ont besoin de sucres pour se développer. Ainsi, un substrat sucré pourrait indiquer un terrain propice au développement des levures et par conséquent des larves de drosophiles. Ceci expliquerait pourquoi *D. melanogaster* ne répond aux odeurs de fruits qu'en présence de sucre, d'autant plus que ces mouches ont la capacité d'ensemencer elles-mêmes le milieu de levures au moment de la ponte (Becher et al., 2012). *D. suzukii* quant à elle est stimulée à la fois par les odeurs de fraïses mûres (Karageorgi et al., 2017) et par le sucre, ce qui est en adéquation avec ses préférences de ponte en milieu naturel, à savoir les fruits mûrs ou en cours de maturation.

Nos résultats suggèrent également que, chez *D. melanogaster*, le sucre et les odeurs de fruits ont un effet synergique sur la ponte (le nombre d'œufs pondus en présence simultanée des deux stimuli (22,87) est deux fois supérieur à la somme des œufs pondus en présence de chacun des deux stimuli seuls ($0,48 + 9,65 = 10,13$)). Ce n'est pas le cas de *D. sukukii* chez qui on observe plutôt un effet additif (l'effet conjoint des deux stimuli (67,82 œufs pondus en moyenne) est égal à la somme des effets de chacun des stimuli ($28,39 + 38,48 = 66,87$ œufs)). Les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de l'intégration des signaux gustatifs et olfactifs au niveau du système nerveux central pourraient donc être différents chez ces deux espèces.

Finalement, chez *D. melanogaster*, le nombre d'œufs pondus sur la purée de fraises est bien supérieur au nombre d'œufs pondus en réponse à la présence simultanée d'odeurs de fraises et de sucre (qui ne représente que 32% de la réponse sur la purée de fraises). Des signaux gustatifs autres que le saccharose jouent donc un rôle majeur sur la stimulation de la ponte chez cette espèce. Chez *D. sukukii* en revanche, le nombre d'œufs pondus sur la purée de fraises n'était pas significativement plus élevé qu'en réponse à la présence conjointe des deux stimuli (ponte sur [odeurs + sucre] représente 63% de la ponte sur [fraises]). Contrairement à *D. melanogaster*, il semblerait donc que *D. sukukii* se base largement sur la présence d'odeurs et la quantité de sucres pour pondre sur un fruit mûr.

CONCLUSION

Contrairement aux autres espèces de drosophiles comme *D. melanogaster*, *D. sukukii* s'attaque préférentiellement aux fruits peu mûrs, ce qui en fait un ravageur majeur des cultures de fruits (Bolda et al., 2010; Lee et al., 2011). Par conséquent, les signaux chimiques (olfactifs et gustatifs) utilisés lors de la ponte, l'importance relative de ces signaux ainsi que l'intégration de ces signaux au niveau du système nerveux a changé chez *D. sukukii*. Il s'agira maintenant de déterminer quels sont les signaux spécifiques impliqués dans la stimulation de la ponte chez cette espèce, ainsi que les récepteurs olfactifs et gustatifs responsables de leur perception afin de mettre au point des outils efficaces pour lutter contre cette espèce.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une aide du gouvernement français au titre du Programme Investissements d'Avenir, Initiative d'Excellence d'Aix-Marseille Université - A*MIDEX

BIBLIOGRAPHIE

- Atallah, J., Teixeira, L., Salazar, R., Zaragoza, G., and Kopp, A. (2014). The making of a pest: the evolution of a fruit-penetrating ovipositor in *Drosophila sukukii* and related species. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20132840.
- Becher, P., Flick, G., Rozpedowska, E., Schmidt, A., Hagman, A., Lebreton, S., et al. (2012). Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Funct. Ecol.* 26, 822–828.
- Benton, R., Vannice, K. S., Gomez-diaz, C., and Vosshall, L. B. (2009). Variant Ionotropic Glutamate Receptors as Chemosensory Receptors in *Drosophila*. *Cell* 136, 149–162. doi:10.1016/j.cell.2008.12.001.
- Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Thevelein, J. M., and Pretorius, I. S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast

- strains. *FEMS Yeast Res.* 4, 683–689. doi:10.1016/j.femsyr.2004.02.005.
- Bolda, M. P., Goodhue, R. E., and Zalom, F. G. (2010). Spotted wing drosophila: potential economic impact of a newly established pest. *Agric. Resour. Econ. Updat.* 13, 5–8.
- Fraimout, A., Debat, V., Fellous, S., Hufbauer, R. A., Foucaud, J., Pudlo, P., et al. (2017). Deciphering the routes of invasion of *Drosophila suzukii* by means of ABC random forest. *Mol. Biol. Evol.* 34, 980–996. doi:10.1093/molbev/msx050.
- Karageorgi, M., Bräcker, L. B., Lebreton, S., Minervino, C., Cavey, M., Siju, K. P., et al. (2017). Evolution of multiple sensory systems drives novel egg-laying behavior in the fruit pest *Drosophila suzukii*. *Curr. Biol.* 27, 847–853.
- Keesey, I. W., Knaden, M., and Hansson, B. S. (2015). Olfactory specialization in *Drosophila suzukii* supports an ecological shift in host preference from rotten to fresh fruit. *J. Chem. Ecol.* 41, 121–128. doi:10.1007/s10886-015-0544-3.
- Larsson, M. C., Domingos, A. I., Jones, W. D., Chiappe, M. E., Amrein, H., and Vosshall, L. B. (2004). Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 43, 703–714. doi:10.1016/j.neuron.2004.08.019.
- Lee, J. C., Bruck, D. J., Dreves, A. J., Ioriatti, C., Vogt, H., and Baufeld, P. (2011). In Focus : Spotted wing drosophila , *Drosophila suzukii* , across perspectives. *Pest Manag. Sci.* 67, 1349–1351. doi:10.1002/ps.2271.
- Mansourian, S., and Stensmyr, M. C. (2015). The chemical ecology of the fly. *Curr. Opin. Neurobiol.* 34, 95–102. doi:10.1016/j.conb.2015.02.006.
- Pham, C. K., and Ray, A. (2015). Conservation of olfactory avoidance in *Drosophila* species and identification of repellents for *Drosophila suzukii*. *Sci. Rep.* 5, 11527. doi:10.1038/srep11527.
- Ramasamy, S., Ometto, L., Crava, C. M., Revadi, S., Kaur, R., Pisani, D., et al. (2016). The evolution of olfactory gene families in *Drosophila* and the genomic basis of chemical-ecological adaptation in *Drosophila suzukii*. *Genome Biol. Evol.* 8, 2297–2311. doi:10.1093/gbe/evw160.
- Revadi, S., Vitagliano, S., Rossi Stacconi, M. V., Ramasamy, S., Mansourian, S., Carlin, S., et al. (2015). Olfactory responses of *Drosophila suzukii* females to host plant volatiles. *Physiol. Entomol.* 40, 54–64. doi:10.1111/phen.12088.
- Walsh, D. B., Bolda, M. P., Goodhue, R. E., Dreves, A. J., Lee, J., Bruck, D. J., et al. (2011). *Drosophila suzukii* (Diptera : Drosophilidae) : Invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. *J. Integr. Pest Manag.* 2, 3–9. doi:10.1603/IPM10010.
- Woodward, J. R. (1972). Physical and chemical changes in developing strawberry fruits. *J. Sci. Fd Agric.* 465–473.