

**LA BIOLOGIE MOLECULAIRE A L'AIDE DE L'EVALUATION DU NIVEAU DE REGULATION NATURELLE
DES POPULATIONS DE RAVAGEURS**

J. CARPEZAT, A. LAUVERNAY et C. ROBERT

Terres Inovia, Avenue Lucien Brétignières, 78850 Thiverval Grignon, France
Mél : j.carpezat@terresinovia.fr

RÉSUMÉ

L'étude de la régulation naturelle des ravageurs du colza répond à une problématique forte pour Terres Inovia et ses partenaires. L'analyse des ennemis naturels de ces ravageurs nécessite généralement des compétences très poussées en entomologie, et repose traditionnellement sur l'observation de critères morphologiques et sur l'élevage de spécimens au stade larvaire afin de déterminer des taux de parasitismes. Les avancées en biologie moléculaire offrent aujourd'hui de nouveaux outils permettant de simplifier ce type d'approche. Le Laboratoire Génétique et Protection des Cultures (GPC) de Terres Inovia et ses partenaires, l'INRA-CBGP et le CIRAD, à travers le projet CASDAR COLEOTOOL, ont élaboré une base de données regroupant des informations génétiques des charançons ravageurs du colza et de leurs principaux parasitoïdes. Le laboratoire GPC a poursuivi ces travaux à travers le projet Plant2Pro MEMOCOL pour notamment enrichir la base de données avec des références sur la grosse altise et ses parasitoïdes. Ces projets lui ont ensuite permis de développer un test ADN rapide et économique permettant de déterminer le taux de parasitisme chez des populations de grosses altises et de charançons du bourgeon terminal.

Mots-clés : colza, ravageur, parasitoïde, biologie moléculaire, HRM

ABSTRACT

USE OF MOLECULAR BIOLOGY TO HELP EVALUATION OF NATURAL REGULATION LEVEL OF PEST POPULATIONS

Study of the natural regulation of rapeseed pests is a major issue for Terres Inovia and its partners. The analysis of the natural enemies of these pests generally requires very advanced skills in entomology, and is traditionally based on the observation of morphological criteria and the rearing of specimens at the larval stage in order to determine parasitism rates. Advances in molecular biology now offer new tools to simplify this type of approach. Terres Inovia's Genetics and Crop Protection Laboratory (GPC) and its partners, INRA-CBGP and CIRAD, through the CASDAR COLEOTOOL project, have developed a database containing genetics information on rapewinter stem weevil and their main parasitoids. Terres Inovia's GPC laboratory then continued this work through the Plant2Pro MEMOCOL project to enrich the database with references on the large flea beetles and its parasitoids. These projects allowed to develop a rapid and economical DNA test to determine the parasitism rate in populations of large flea beetles and rapewinter stem weevils.

Keywords: oilseed rape, pest, parasitoid, molecular biology, HRM

INTRODUCTION

Afin de réduire la dépendance aux intrants, la lutte intégrée constitue une stratégie durable pour la gestion des ravageurs du colza. Terres Inovia est mobilisé sur cette thématique, en particulier avec le projet DEPHY EXPE R2D2 qui vise notamment à identifier des leviers de restauration de la régulation naturelle en favorisant le développement des insectes auxiliaires.

La grosse altise *Psylliodes chrysocephala* (Linnaeus, 1758) et le charançon du bourgeon terminal *Ceutorhynchus picipitarsis* (Gyllenhal, 1837), sont les insectes ravageurs les plus fréquents et les plus nuisibles chez le colza. Le parasitisme par des hyménoptères entomophages représente le principal mécanisme de régulation naturelle de ces espèces. Le suivi de l'évolution du taux de parasitisme chez ces ravageurs constitue donc un bon indicateur du niveau de restauration des populations d'insectes auxiliaires. Ce suivi repose traditionnellement sur l'élevage de populations de ravageurs au stade larvaire. En plus de s'étendre sur plusieurs mois, cette approche nécessite des infrastructures spécifiques et des compétences poussées en entomologie pour identifier les parasitoïdes qui émergent.

La biologie moléculaire offre aujourd'hui des outils permettant de diminuer l'expertise nécessaire et de réduire les temps d'analyses. Depuis une dizaine d'années, le laboratoire Génétique et Protection des Cultures (GPC) de Terres Inovia développe des tests ADN pour optimiser les diagnostics en pathologie végétale. L'institut s'est donc naturellement tourné vers ce type de techniques pour répondre à ces enjeux. Ces outils reposent sur l'analyse de fragments ADN des individus à analyser grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires. Ces marqueurs sont développés grâce à des séquences d'ADN de référence. Il existe plusieurs bases de données ADN internationales, mais celles-ci présentent parfois des erreurs de référencement, et ne contiennent pas toujours les informations génétiques souhaitées. C'est pourquoi dans le cadre du projet COLEOTOOL, Terres Inovia et ses partenaires, l'INRA-CBGP et le CIRAD-BIOS, ont élaboré une base de données génétiques regroupant les principaux charançons ravageurs du colza et leurs auxiliaires parasitoïdes (Robert C. *et al.*, 2019). Dans ce cadre, un nombre important de spécimens avaient été capturés, identifiés morphologiquement par des experts, puis séquencés. La cible génétique qui avait été choisie est un gène mitochondrial codant pour l'une des trois sous unités de la cytochrome c oxydase (COI). Cette cible avait été sélectionnée en raison de ses caractéristiques en termes de variabilité inter-espèce et de conservation intra-espèce permettant d'identifier un spécimen grâce à sa séquence COI. Ce travail a été poursuivi dans le projet MEMOCOL, pour notamment acquérir des références sur les parasitoïdes de la grosse altise et enrichir la base de données COI. Cette dernière est aujourd'hui utilisée par le laboratoire GPC de Terres Inovia pour identifier des parasitoïdes adultes par séquençage SANGER.

Les parasitoïdes majoritairement liés à la régulation naturelle de la grosse altise et du charançon du bourgeon terminal sont du genre *Tersilochus*. Le Laboratoire GPC de Terres Inovia a utilisé les livrables des projets COLEOTOOL et MEMOCOL (base de données COI et échantillons d'ADN de référence) pour développer une PCR spécifique à ce genre afin d'identifier les larves de grosses altises et de charançons du bourgeon terminal parasitées par cet auxiliaire. Ce protocole (non publié) a été utilisé en 2019 pour déterminer le niveau de parasitismes de ces deux espèces dans la zone témoin suivie dans le projet R2D2. En parallèle, des élevages ont montré qu'au moins 5 autres genres de parasitoïdes pouvaient être liés à la régulation naturelle des populations françaises de ces deux ravageurs. Multiplier les réactions PCR spécifiques pour chacun d'eux n'aurait pas permis d'obtenir une méthode avec des coûts compatibles à un monitoring ambitieux, même en cas de multiplexage de réactions. Il a donc été nécessaire d'utiliser une autre technique d'analyse. Pour conserver la souplesse de l'analyse PCR, tout en permettant de détecter une grande diversité de genres de parasitoïdes, la technique HRM a été choisie. Il s'agit d'une variante de la technique de qPCR SYBR Green. A l'image de cette dernière, elle permet d'analyser des amplicons grâce à une fusion d'ADN en fin de PCR. Mais contrairement au SYBR Green qui ne peut pas être utilisé de façon saturante, l'agent fluorescent utilisé en HRM se fixe entre chaque base de l'ADN double brin, ce qui permet de détecter des SNP. L'objectif a été d'utiliser des marqueurs hyménoptères non spécifiques permettant d'amplifier tous nos parasitoïdes d'intérêt, et

de les discriminer grâce aux courbes de fusion. La variabilité inter-espèce des séquences COI ne nous a pas permis de définir des marqueurs universels hyménoptères compatibles avec la technique HRM. Il a donc été nécessaire de réaliser une nouvelle base de données de référence en utilisant une autre cible génétique.

MATERIEL ET METHODES

Des analyses bio-informatiques ont été réalisées afin d'identifier une cible génétique compatible avec une approche HRM. Des marqueurs universels insectes ont ensuite été dessinés dans le but de séquencer environ 600 pb de cette cible chez 2 à 7 individus de chaque genre de ravageurs et de parasitoïdes d'intérêt. Ces séquençages ont été réalisés sur des ADN de référence obtenus dans les projets COLEOTOOL et MEMOCOL et sur des individus conservés dans la collection de Terres Inovia. La nouvelle base de données générée a permis de réaliser des alignements de séquences afin de définir des marqueurs permettant d'amplifier tous les hyménoptères d'intérêt de façon spécifique vis-à-vis de la grosse altise et du charançon du bourgeon terminal.

La capacité de ces marqueurs à détecter et identifier le genre des parasitoïdes d'intérêt a été testée en analysant des ADN témoins obtenus dans les projets COLEOTOOL et MEMOCOL (2 à 5 échantillons testés par genre) : *Tersilochus*, *Diospilus*, *Aneuclis* et *Trichomalus* pour la grosse altise, et *Tersilochus*, *Diospilus*, *Triaspis*, et *Necremnus* pour le charançon du bourgeon terminal. Des individus de grosses altises et de charançons du bourgeon terminal (5 pour chaque ravageur) conservés dans la collection de Terres Inovia, ont également été testés pour vérifier l'absence d'amplifications non spécifiques.

Un protocole d'extraction d'ADN à partir de larves de ravageurs et d'analyse de ces échantillons par HRM a ensuite été développé. Les différentes étapes ont été optimisées afin de réduire au maximum les coûts d'analyse. Chaque larve a été broyée individuellement dans un broyeur à bille. Les broyats ont ensuite été dilués dans de l'eau ultra-pure puis amplifiés individuellement par qPCR. En fin de qPCR, une étape de fusion a été réalisée pour analyser les amplicons par HRM. Les courbes de fusion obtenues ont été comparées à des profils témoins pour identifier les parasitoïdes.

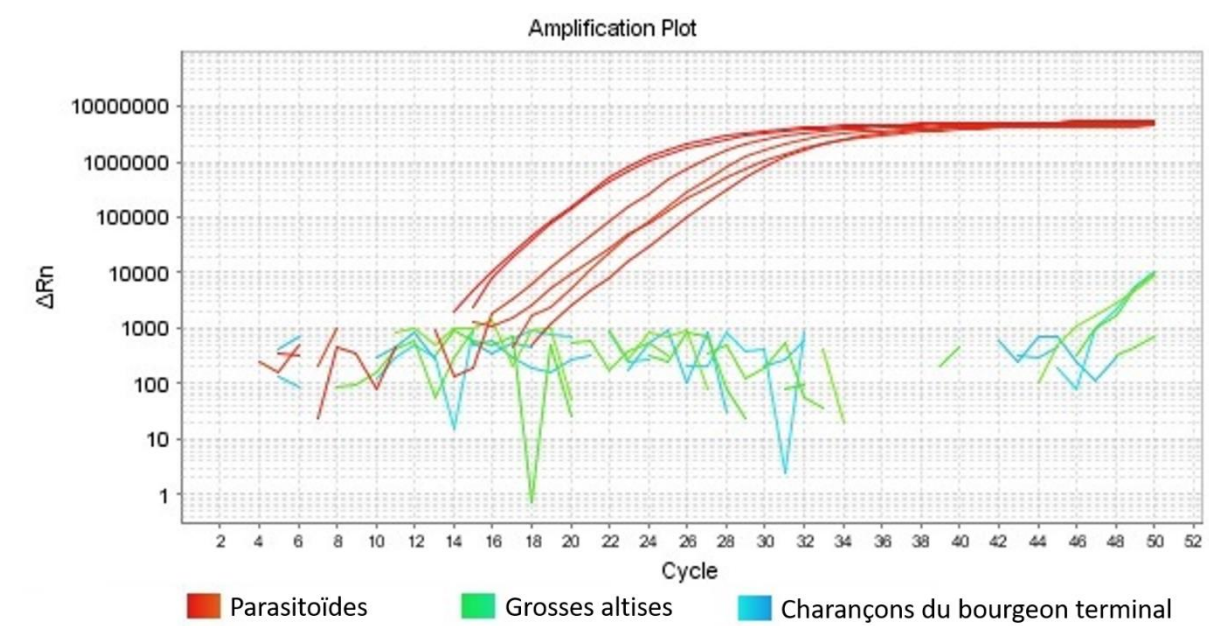
Afin de valider la capacité de ce protocole à détecter et identifier un parasitoïde présent dans une larve de ravageur, des broyats de larves parasitées, analysées par la méthode PCR avec amorces spécifiques *Tersilochus* ont été utilisés. Pour chaque espèce de ravageur, 25 larves parasitées et 25 larves non parasitées ont été analysées avec la méthode HRM.

RESULTATS

La nouvelle base de données génétique générée a permis de réaliser des alignements de séquences afin de définir des marqueurs permettant d'amplifier un fragment d'environ 150 pb chez tous les hyménoptères d'intérêt, sans hybridation sur l'ADN de grosse altise et de charançon du bourgeon terminal. Des analyses bio-informatiques ont montré que ces marqueurs s'hybrident également sur une large gamme d'hyménoptères parasitoïdes d'autres ravageurs, et que le fragment amplifié est spécifique au genre mais pas à l'espèce.

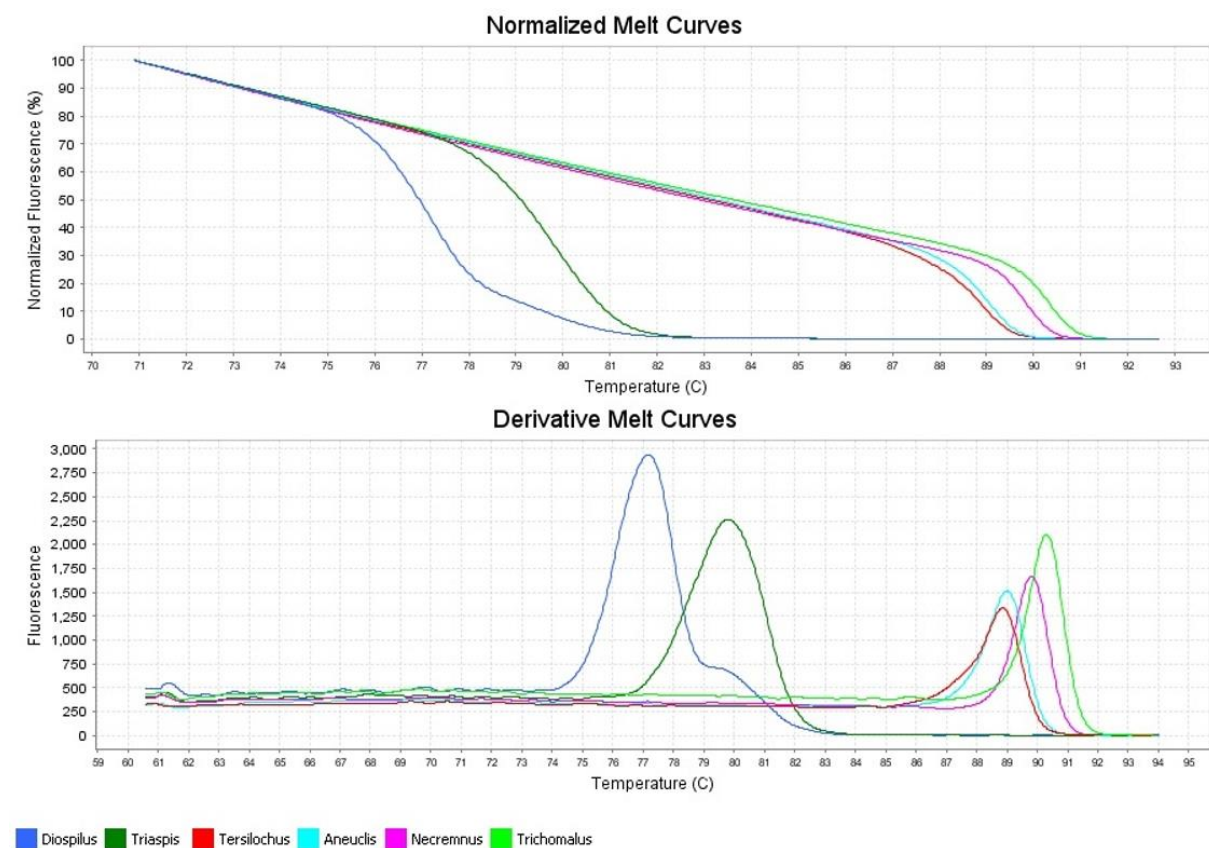
Les analyses qPCR réalisées ont ensuite montré la capacité des marqueurs à amplifier tous les ADN témoins des parasitoïdes d'intérêt (*Tersilochus*, *Diospilus*, *Aneuclis*, *Trichomalus*, *Triaspis* et *Necremnus*). Aucun ADN de grosse altise ou de charançon du bourgeon terminal n'a été amplifié (figure 1).

Figure 1 : Résultats d'amplifications qPCR d'échantillons d'ADN de référence avec les marqueurs HRM
Results of qPCR amplifications of reference DNA samples with HRM markers



L'étape de fusion des amplicons par HRM a permis d'obtenir des profils spécifiques pour chaque genre de parasitoïde testé (figure 2). Les profils *Tersilochus* et *Aneucelis* sont proches, mais la représentation « Derivative Melt Curves » permet de les discriminer.

Figure 2 : Résultats HRM obtenus pour les différents genres de parasitoïdes d'intérêt
HRM results obtained for the different parasitoid genus of interest



L'analyse HRM des ADN de larves de grosses altises et de charançons du bourgeon terminal déjà analysés par PCR spécifique *Tersilochus* a permis de détecter toutes les larves parasitées, et d'identifier le genre *Tersilochus* grâce aux courbes de fusion. L'analyse des larves non parasitées n'a donné aucune amplification, sauf pour un échantillon de charançon du bourgeon terminal pour lequel l'analyse a identifié la présence d'un *Diospilus* (cette cible n'avait pas été recherchée lors de l'analyse PCR).

Ces résultats ont permis de valider la capacité du protocole HRM à détecter la présence d'un parasitoïde dans une larve de ravageur, sans amplification non spécifique. La capacité de la méthode à discriminer les différents genres de parasitoïdes d'intérêt a également été validée.

DISCUSSION, CONCLUSION

La méthode HRM a montré sa capacité à déterminer des taux de parasitisme chez la grosse altise et le charançon du bourgeon terminal, tout en identifiant les parasitoïdes. Elle va représenter un outil déterminant pour évaluer le niveau de régulation naturelle des populations de ravageurs, et sera valorisée rapidement dans le cadre du projet R2D2. La méthode HRM va en effet être utilisée pour analyser 7 populations de grosses altises et 4 populations de charançons du bourgeon terminal prélevées au printemps 2020 dans la zone témoin suivie dans ce projet (une centaine de larves par prélèvement). Les résultats vont permettre de poursuivre un monitoring amorcé en 2019 visant à évaluer l'impact des leviers mis en place sur l'évolution du niveau de régulation naturelle de ces ravageurs.

La stratégie d'utilisation de marqueurs non spécifiques va également permettre d'étendre facilement le domaine d'application de la méthode à d'autres ravageurs. En effet, la majorité des parasitoïdes sont de l'ordre des hyménoptères, et les études bio-informatique ont montré que les marqueurs développés s'hybrident sur une large gamme d'hyménoptères, y compris des ectoparasites et des parasitoïdes de ravageur adultes. En plus des parasitoïdes déjà identifiés chez la grosse altise et le charançon du bourgeon terminal, la méthode HRM permettra d'assurer une veille sur l'émergence d'autres hyménoptères liés à la régulation naturelle de ces deux espèces. Cette méthode pourra également être utile à des partenaires pour le suivi de la régulation naturelle des ravageurs de leurs cultures.

Au-delà de son large domaine d'application, l'autre atout du protocole développé est son faible coût. Une seule réaction d'amplification est en effet suffisante pour détecter et identifier tous les parasitoïdes d'intérêt. D'autre part, la robustesse de la Taq polymérase utilisée permet de travailler sur ADN non purifié. L'extraction d'ADN est donc très peu coûteuse car elle se limite à un broyage de l'insecte et une dilution dans de l'eau ultra-pure. Cette méthode constitue donc une solution adaptée pour un monitoring à grande échelle.

BIBLIOGRAPHIE

ROBERT, C. *et al.* (2019) - COLEOTOOL : Développement d'outils moléculaires en vue d'identifier les principaux charançons ravageurs du colza et leurs auxiliaires parasitoïdes, *Innovations Agronomiques*, 71, PP. 181-200.

ROBERT, C.(2018) - MEMOCOL : Appropriation des méthodes de biologie moléculaire développées pour identifier les parasitoïdes des coléoptères ravageurs du colza et quantifier le service rendu par ces organismes, *Institut Carnot Plant2Pro*.

CERRUTTI, N. (2018) - R2D2 : Restauration de la régulation naturelle et augmentation de la robustesse des systèmes de culture des plateaux de Bourgogne pour une réduction durable de la dépendance aux insecticides, *DEPHY EXPE*.