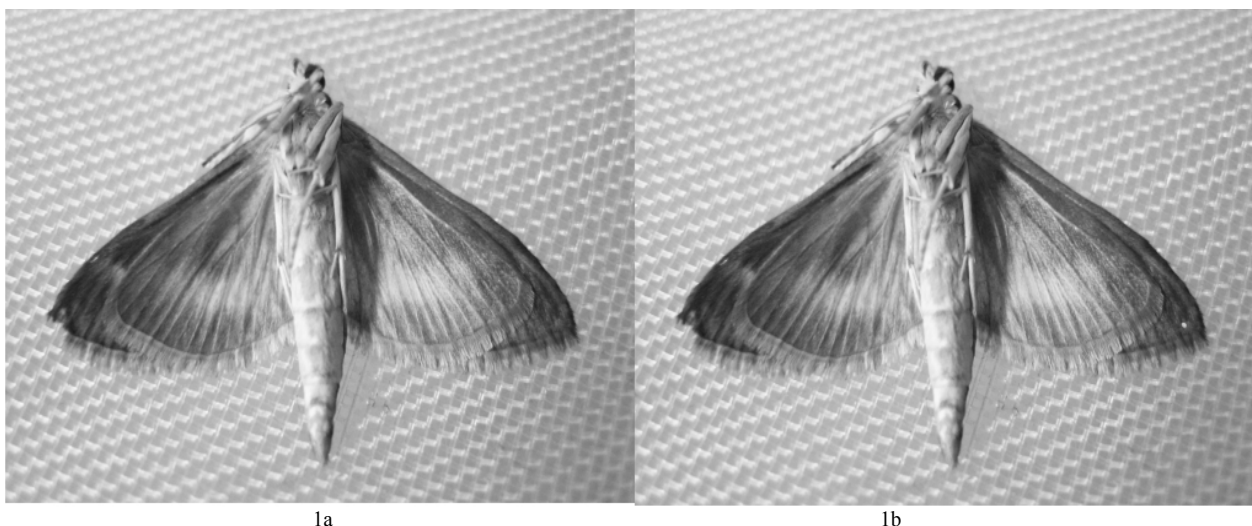


Marquage par aspiration - mutilation et suivi comportemental individuel de Lépidoptères nocturnes

Vincent Bonhomme¹ et Vincent Calcagno²

Résumé : Description d'un protocole, pour un suivi individuel de Lépidoptères nocturnes en conditions contrôlées, développé pour étudier le comportement reproducteur de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis*. Ce protocole, simple à mettre en oeuvre et économique, est peu traumatisant pour les individus. L'immobilisation par aspiration permet le perçage des surfaces alaires pour une identification fiable des individus, même dans le noir. Nous avons vérifié que ce type de marquage n'affecte pas le comportement et le succès reproducteur des individus. Avec cette méthode, des études intéressantes tant chez la pyrale que chez d'autres ravageurs de culture comparables sont envisageables. Cette méthode a par exemple permis de démontrer un isolement reproducteur entre deux races de pyrale du maïs.

Mots clés : Marquage, suivi comportemental, Lépidoptères, *Ostrinia nubilalis*.



Photos 1a et 1b : Individu mâle d'*Ostrinia nubilalis* immobilisé par aspiration avant (1a) et après (1b) marquage

1. Introduction et contexte

Les ravageurs des cultures, outre les études à but agronomique dont ils font l'objet, constituent des modèles biologiques de premier choix pour la biologie évolutive. Ils offrent, en effet, des exemples saisissants d'adaptation rapide, de changement d'hôtes et de spéciation³. Parmi eux, la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis* Hübner, Lépidoptères) est très étudiée en raison des dégâts qu'elle inflige aux cultures de maïs en Europe et aux Etats-Unis. En Europe, les

¹ INRA Centre de Biologie et de Gestion des populations (CBGP), Campus International de Baillarguet 34988 Montferrier sur Lez ☎ 33 (0) 4 99 62 33 66 bonhomme.vincent@gmail.com

² Même adresse : Doctorant : calcagno@isem.univ-montp2.fr

³ Spéciation : apparition de différences entre deux populations d'une espèce, entraînant leur séparation en deux espèces distinctes.

chenilles de la pyrale s'attaquent également à des plantes hôtes, tant sauvages (e.g. Armoise, Amarante) que cultivées (e.g. Houblon, Sorgho, Tournesol, Poivron) et forment sur ces plantes des sous-populations indiscernables morphologiquement. Ceci rend l'espèce intéressante pour étudier la spécialisation écologique sur les plantes, la formation de « races d'hôte » et, à terme, de nouvelles espèces adaptées à différentes plantes. L'étude de l'isolement reproducteur⁴ entre les races d'hôte, au-delà de son intérêt fondamental, est cruciale pour une gestion optimale de la résistance aux insecticides et aux maïs OGM, par la mise en place de stratégies spécifiques (Bourguet et al. 2000).

La compréhension de l'isolement reproducteur nécessite l'étude des comportements sexuels : localisation des femelles par les mâles, choix de partenaires, compétition entre individus du même sexe, accouplement, etc... Les études en milieu naturel, très contraignantes, sont relayées par des travaux en laboratoire, en conditions contrôlées. Dans les deux cas, le mode de vie nocturne de la pyrale, comme celui de nombreux Lépidoptères ravageurs, rend difficile l'observation et la reconnaissance des individus.

Différents types de marquages individuels existent en entomologie (Hagler et Jackson 2001). La fragilité des Lépidoptères (écailles, ailes, antennes, etc.) ne permet pas de marquage lourd, comme cela est possible pour les coléoptères par exemple. Chez la pyrale, outre des méthodes génétiques et isotopiques qui nécessitent de tuer les individus pour obtenir leur marquage, des expériences de « marquage - lâcher - recapture » ont été menées grâce à un marquage du milieu de culture, entraînant celui des larves.

La méthode consiste à élever les larves sur du milieu artificiel contenant du bleu ou du rouge soudan (Sureau et Stockel 1983). Ce colorant se retrouve dans le corps des adultes que l'on peut ainsi distinguer chez les adultes sauvages. Cette technique présente deux inconvénients. D'une part, la toxicité du soudan qui provoque un taux de mortalité non négligeable des jeunes individus et une diminution de la performance reproductive des adultes, par exemple une moindre capacité de dispersion ou d'accouplement. D'autre part, seules deux couleurs, le bleu et le rouge, peuvent être utilisées pour le marquage. Face à ce problème, d'autres études ont été menées qui consistaient à marquer directement les adultes à l'encre (Dalecky et al. 2006). Toutefois la présence d'une peinture chimique est susceptible d'altérer le comportement des lépidoptères, très sensibles aux composés volatils. De plus, même si la palette des couleurs est supérieure à celle offerte par la précédente technique, elle reste très limitée par les risques de confusion entre des couleurs trop proches les unes des autres. Il est de plus impossible de discriminer ces couleurs dans la pénombre. En effet, contrairement à des expériences de type lâcher-recapture, l'observation des comportements sexuels nécessite un marquage très discriminant (idéalement pouvant identifier chaque individu) et lisible sans perturbation de l'animal, en conditions de pénombre, et en un temps réduit.

Pour suivre individuellement le comportement reproducteur de papillons issus de plusieurs races d'hôte, nous avons développé une technique de marquage par mutilation, facilement observable en cellule climatique, même en conditions de très faible éclairage. Cette technique est facile et rapide à mettre en oeuvre, et elle n'utilise aucun marquage ostentatoire mais au contraire des « blessures » discrètes qui ne sont guère plus importantes que des blessures naturelles mais tout à fait distinctes (**photos 1a – 1b**) ; nous avons vérifié que cette méthode n'affectait pas significativement le comportement ou le succès reproducteur des papillons.

⁴Isolement reproducteur : Changement de période de reproduction ou de signaux sexuels entraînant la formation de deux communautés sympatriques mais isolée sur le plan de la reproduction. Les deux populations ainsi isolées, subissent une évolution séparées pouvant mener à terme à un phénomène de spéciation.

2. Description du système

La « station de marquage » décrite ci-dessous est rudimentaire ; les éléments nécessaires se trouvent couramment dans les laboratoires d'entomologie de telle sorte que sa mise en place ne nécessite aucun investissement financier particulier.

2.1 Aspiration

Après plusieurs essais imprécis de marquage sans aspiration, nous avons conçu un système d'immobilisation des papillons par aspiration. Pour cela nous nous sommes équipés d'un aspirateur ménager, d'un bidon vide d'eau déminéralisée de 5 litres ouvert sur une face latérale, de ruban Téflon[®] pour réaliser l'étanchéité des jonctions, et de moustiquaire plastique sur laquelle placer les individus (**figure 1 et photo 2**). De l'ouverture du bidon dépendra la puissance d'aspiration, dont l'optimum est très étroit entre immobilisation imparfaite et plaquage trop violent. L'augmentation progressive de cette surface couplée à l'observation des individus relâchés permettra de trouver facilement cet optimum. Dans notre cas – i.e. avec un aspirateur de 1400 W -, l'ouverture optimale était d'environ 250 cm².

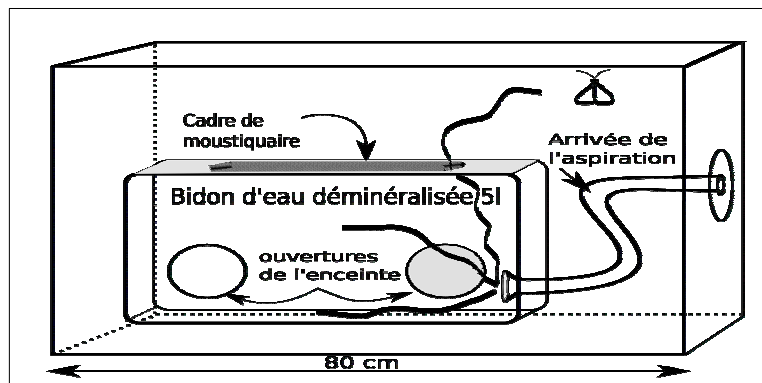


Figure 1 : Schéma de la station de marquage



Figure 2 : Photographie de notre station de marquage.

1. Bidon d'eau déminéralisée surmonté d'un cadre de moustiquaire mobile,
2. Lampe à alcool, 3) Aspirateur ménager 1400W, 4) Pain de glace.

L'intensité de l'aspiration laissait systématiquement les écailles et la musculature parfaitement intactes (**photo 3** et observations personnelles) tout en immobilisant suffisamment les papillons. La station de marquage est facilement améliorable, mais le modèle présenté ici est parfaitement fonctionnel.

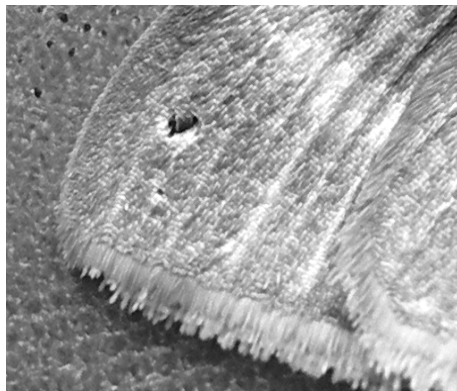


Photo 3 : *Détail du marquage alaire.*

2.2 Marquage par mutilation

Pour récupérer les individus éventuellement « échappés » de l'aspiration, le marquage est réalisé dans une enceinte close. L'idéal est de se trouver en cellule climatique réfrigérée ou d'abaisser avec des pains de glace la température de l'enceinte, aux alentours de 10°C, seuil en dessous duquel les papillons ne peuvent pas voler. Le placement préalable des individus à 4°C les immobilise pour un temps et rend la séance de marquage plus rapide pour l'expérimentateur et moins traumatisante pour l'individu. On soulève le cadre de moustiquaire pour régler la force d'aspiration et pour positionner l'individu, qui doit être bloqué, les ailes largement déployées, face ventrale vers l'expérimentateur. Par des déplacements latéraux du cadre on recentre l'individu dans la fenêtre d'aspiration : la mobilité de la moustiquaire est cruciale pour le bon fonctionnement de la technique. Le marquage est effectué en perçant la zone postérieure des ailes avec une aiguille fine (de type aiguille d'acupuncture) chauffée à la flamme ; ce chauffage garantit un perçage net (**photo 3**).

En résumé, les étapes du mode opératoire sont les suivantes :

- 1) Récupération de l'individu du réfrigérateur;
- 2) Allumage de l'aspiration ;
- 3) Lâcher de l'individu qui vient s'immobiliser sur le cadre de moustiquaire ;
- 4) Chauffage de l'aiguille ;
- 5) Marquage ;
- 6) Extinction de l'aspiration ;
- 7) Récupération de l'individu.

Le nombre de trous percés sur chaque aile détermine le pouvoir discriminant du marquage. Un marquage simple, de deux trous par aile, permet déjà d'identifier 18 individus (0, 1 ou 2 trou(s) par aile, soit 9 possibilités par sexe, facilement identifiable chez la pyrale). Des marquages plus élaborés, selon la position relative des perforations, ou avec plus de trous, sont envisageables qui augmenteraient la reconnaissance des individus mais au prix d'une plus grande difficulté de marquage.

2.3 Observation et identification

Les individus marqués sont dans l'idéal lâchés dans une cage d'observation transparente et dans l'obscurité. Un éclairage rouge (auquel les papillons sont peu sensibles) placé derrière les papillons immobilisés, seuls ou accouplés, permet une identification individuelle car les trous apparaissent alors facilement en transparence (**photo 3**), ou éventuellement en éclairage rasant. L'aménagement du poste d'observation facilitera cette dernière pour cela nous posons les cages sur un support pivotant (sans vibrations qui perturberaient les papillons).

2.4 Suivi reproducteur

Les individus ainsi marqués sont facilement reconnaissables. L'accouplement chez la pyrale du maïs dure de une à plusieurs heures, aussi, un relevé des accouplements toutes les heures fournit un suivi suffisant de la dynamique de reproduction.

Dans nos cages en plexiglass d'environ 1 m³, contenant entre 15 et 30 papillons, l'identification d'un individu en particulier prend entre 5 et 30 secondes, selon sa position et son niveau d'activité.

Nous avons vérifié que dans ces conditions (assez d'espace pour que le papillon puisse voler, compétition entre mâles, et possibilité pour les femelles de choisir) la technique n'affecte pas le succès reproducteur des individus et les individus marqués (mâles et femelles) ont autant de chances de s'accoupler que les individus non marqués :

[n = 34 accouplements observés, $P \chi^2 > 0.99$ NS].

Conclusion

Les méthodes de marquage par mutilation sont classiques pour d'autres ordres (Coléoptères, Orthoptères, etc. Hagler et Jackson, 2001) mais ne sont pas fréquentes chez les Lépidoptères, surtout de petite taille. Notre approche, simple et efficace grâce à l'immobilisation par aspiration, permet de marquer et de suivre individuellement en conditions contrôlées un nombre important d'individus de notre modèle *Ostrinia nubilalis*, et ce, sans traumatisme. Cette technique pourrait s'appliquer à d'autres papillons similaires, parmi lesquels des ravageurs de cultures tels que le ver du coton *Spodoptera littoralis* ou le carpocapse des pommes *Cydia pomonella* pour les mêmes études comportementales

Bibliographie

- Bourguet D, Bethenod M.T, Pasteur N et Viard F (2000) Gene flow in the European corn borer *Ostrinia nubilalis*: implications for the sustainability of transgenic insecticidal *Bt* maize. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*. 267:117-122.
- Dalecky A, Ponsard S, Bailey R.I, Péliissier C et Bourguet D (2006) Resistance evolution to *Bt* crops: predispersal mating of European corn borers. *PLoS Biology* 4: 1048-1057.
- Hagler James R et Jackson Charles G (2001) Methods for marking insects: current techniques and future prospects. *Annual Review of Entomology* 46:511–543.
- Sureau F et Stockel J (1983) Mise au point d'une technique de marquage in vivo des adultes de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hb. (Lépidoptère Pyralidae), par alimentation larvaire sur milieu artificiel coloré. *Acta oecol., Oecol. appl.* 4 : 299-308.

