

PIQ : une plateforme confinée agréée pour les expérimentations sur insectes de quarantaine

Magali Eychenne^{1,2}

Résumé. La Plateforme pour Insectes de Quarantaine PIQ a été initialement conçue pour répondre à un besoin de l'UMR Diversité, Génomes et Interactions Micro-organismes – Insectes (DGIMI, INRA) : travailler sur *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis* et *Helicoverpa armigera*, trois ravageurs de culture soumis à confinement. Grâce à son infrastructure et aux procédures qui ont été mises en place pour minimiser le risque d'échappement accidentel de ces insectes dans l'environnement, la plateforme a été agréée pour la détention et la manipulation de ces trois nuisibles. Très bien équipée, cette structure nous permet depuis de développer de nouveaux projets de recherche innovants pour l'Unité concernant notamment la caractérisation de traits d'histoire de vie, ou le développement d'outils de génomique fonctionnelle. Elle est maintenant ouverte aux utilisateurs externes qui voudraient profiter de ce dispositif.

Mots clés : *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis*, *Helicoverpa armigera*, ravageurs, zone expérimentale

Introduction

Au laboratoire Diversité, Génomes et Interactions Micro-organismes – Insectes (DGIMI, INRA), nous étudions les mécanismes d'interactions entre des ravageurs de cultures et leur environnement : plante hôte et pathogènes ou macro-organismes parasites. Cette UMR de 40 personnes est située sur le campus de l'Université de Montpellier. Composée de quatre équipes de recherche, elle a pour objectif de mieux comprendre comment les ennemis naturels des insectes les mettent hors d'état de nuire et comment les ravageurs répondent à ces attaques ou s'adaptent à leurs plantes hôtes (<https://www6.montpellier.inra.fr/dgimi>).

Trois de nos insectes modèles, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis* et *Helicoverpa armigera*, sont des ravageurs de culture soumis à des exigences réglementaires de confinement. Nous nous sommes donc dotés d'une plateforme expérimentale agréée pour la détention et la manipulation de ces organismes de quarantaine : la plateforme pour insectes de quarantaine PIQ.



Figure 1. Stades larvaires des trois insectes modèles de l'UMR DGIMI qui sont soumis à confinement : **a)** *Spodoptera frugiperda*, **b)** *Spodoptera littoralis*, **c)** *Helicoverpa armigera* (photos : M. Frayssinet).

Dans cet article, nous présenterons comment la plateforme PIQ a été conçue, ce que l'on peut y faire et à qui elle s'adresse.

PIQ, une plateforme confinée agréée

L'autorisation de détenir et manipuler des organismes figurant sur l'annexe I de la Directive 2000/29/CE est soumise à l'obtention d'un agrément délivré par le Préfet de Région. Cet agrément porte sur une activité réalisée dans des locaux donnés en suivant des procédures précises. Après une analyse des risques d'échappement puis

1 Diversité, Génomes et Interactions Micro-organismes-Insectes, INRA, 34095 Montpellier, France

2 Université de Montpellier, Diversité, Génomes et Interactions Micro-organismes – Insectes, Montpellier, France
magali.eychenne@inra.fr

d'installation des insectes concernés dans la région, le demandeur doit prouver qu'il a mis en place toutes les mesures nécessaires pour limiter ces risques (voir encadré).

Comment obtenir un agrément pour une infrastructure accueillant des organismes de quarantaine

Afin d'obtenir un agrément au titre de la directive 2008/61/CE, c'est-à-dire concernant des organismes énumérés dans les annexes de la directive 2000/29/CE, vous devez effectuer les démarches suivantes :

- 1) réaliser une analyse du risque d'échappement et du risque d'installation des insectes dans la région en se basant sur la biologie des insectes et sur les conditions climatiques environnantes ;
- 2) concevoir des locaux et des procédures à suivre en tenant compte des analyses de risque ;
- 3) rédiger un dossier de demande d'agrément contenant les analyses de risque et la description des organismes de quarantaine, des locaux et des procédures ;
- 4) envoyer le dossier à la Direction régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt de votre région ;
- 5) défendre votre dossier lors d'une visite d'audit. Les auditeurs transmettent ensuite leur avis au Préfet de région.

Une fois toutes ces étapes validées, le Préfet de région vous délivre un agrément pour une durée de 5 ans.

La plateforme PIQ a été conçue, en répondant à cette contrainte, pour accueillir des expérimentations sur des insectes ravageurs pouvant présenter un risque pour l'environnement.

Les espèces que nous souhaitons manipuler dans la plateforme étaient au nombre de trois : *Spodoptera frugiperda* (la noctuelle du maïs), *Spodoptera littoralis* (la noctuelle du cotonnier) et *Helicoverpa armigera* (la noctuelle de la tomate (**Figure 1**)). Pour obtenir l'agrément, nous avons d'abord analysé le risque d'établissement en cas d'échappement pour ces trois espèces. Ces ravageurs de cultures polyphages vivent respectivement sur le continent américain, dans le pourtour méditerranéen et dans toute l'Europe du sud. Signalons que, bien que ces espèces soient soumises à confinement (listées dans l'annexe I de la Directive 2000/29), des populations naturelles de *Spodoptera littoralis* et *Helicoverpa armigera* sont recensées dans le sud de la France, signifiant que ces espèces peuvent s'implanter dans la région de Montpellier en cas d'échappement accidentel. En ce qui concerne *Spodoptera frugiperda*, espèce nord-américaine, nous avons mis en évidence, en nous basant sur la biologie de ces insectes, que le risque d'établissement de cette espèce dans l'environnement de Montpellier est très faible à cause de conditions hivernales trop rudes, et ce malgré la présence de plantes hôtes dans la région. Ce risque n'est cependant pas nul notamment en cas de réchauffement climatique. Nous avons donc mis en œuvre une structure et des procédures permettant d'écarter au maximum le risque d'échappement de ces ravageurs. Les deux principaux risques d'échappement sont dus à la mobilité et au transport passif (par l'expérimentateur). Afin de les prévenir, plusieurs mesures ont été prises :

- ✓ infrastructure étanche (cloisons, fenêtres, sol, plafond, gaine électrique sans passage possible pour des organismes de la taille des espèces concernées quel que soit leur stade) ;
- ✓ zone en dépression et présence de filtres au niveau des arrivées et des reprises d'air ;
- ✓ présence d'un sas à l'entrée de la zone avec piège à insectes ;
- ✓ port de blouses et de sur-chaussures obligatoire dans la zone confinée ;
- ✓ décontamination systématique de tout ce qui sort de la zone par congélation ou par ajout de RELY+ONTM VIRKON® (Phagogene) pour les déchets liquides.



Nous avons également mis en place une formation systématique du personnel ayant accès à la plateforme ainsi qu'une traçabilité de tout ce qui entre et de tout ce qui sort de PIQ en termes de personnel, d'insectes, d'appareillage, de déchets, etc.

Toutes ces mesures nous ont permis d'obtenir en 2014 un agrément de la plateforme PIQ pour *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis* et *Helicoverpa armigera*.

PIQ, une vaste zone d'expérimentation bien équipée

La plateforme PIQ est une zone d'expérimentation d'environ 200 m² située au 4^e étage d'un bâtiment du campus de l'université de Montpellier. Sa fonction est complémentaire de celle de l'insectarium, structure de 80 m² implantée dans un autre bâtiment et qui nous permet de maintenir des élevages sans risque de contaminations avec les expérimentations (notamment des pathogènes d'insectes qui y sont étudiés).

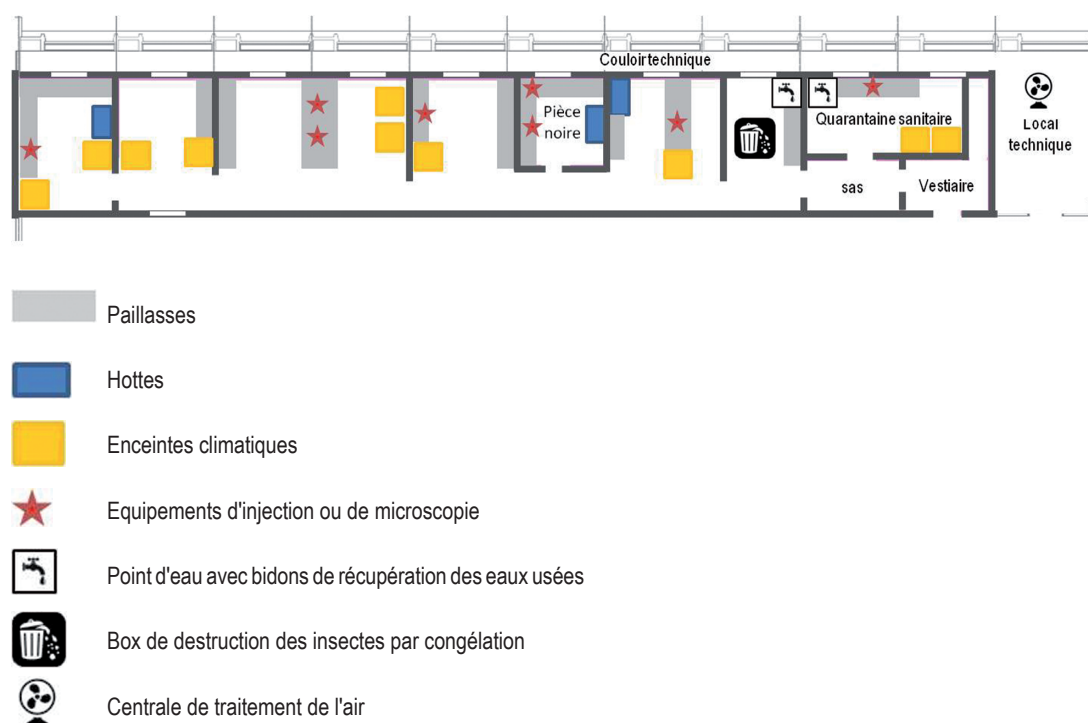


Figure 2. Plan de la plateforme PIQ.

La zone expérimentale est découpée en sept boîtes (Figures 2 et 3) permettant de manipuler les différents pathogènes étudiés au laboratoire. Elle comprend également un box indépendant, dit « de quarantaine sanitaire », dédié au maintien des insectes prélevés sur le terrain.



Figure 3. Vue d'ensemble d'un box équipé de paillasse, stéréomicroscopes, cages, etc. (photo : M. Frayssinet).

La plateforme PIQ, très bien équipée, permet la mise en place d'expérimentations variées.

Une dizaine d'enceintes climatiques sont réparties dans les différents box de la plateforme. Elles permettent de maintenir les insectes en élevage en adaptant les paramètres de température, d'hygrométrie et de photopériode à chaque expérimentation. Elles peuvent être utiles pour tester différentes conditions expérimentales en parallèle.

PIQ possède également le matériel nécessaire à la réalisation de tests pathologiques avec des virus, des bactéries ou des nématodes entomopathogènes. Elle dispose d'un pousse-seringue KDS200 (KD Scientific®), de postes de sécurité microbiologique pour travailler stérilement et de nombreuses loupes binoculaires pour des observations ou des dissections d'insectes.

De grandes cages étanches (BioQuip®) sont utilisées pour des expériences de choix d'oviposition. Des papillons, lâchés dans ces grandes cages, sont suivis afin de déterminer si l'espèce, la variété ou les conditions culturales des plantes qui leur sont proposées influencent leur choix de support d'oviposition.

Un Fentojet® Express (Eppendorf®) et un micromanipulateur (Narishige®) permettent de faire des micro-injections dans des insectes à différents stades (œufs, nymphes...) (**Figure 4**). Nous pouvons ainsi réaliser des expériences d'édition de génome ou de RNAi afin d'élucider la fonction de gènes d'intérêt.

Un macrozoom fluorescent (Olympus®) permet de suivre l'apparition de fluorescence rouge ou verte dans des individus vivants afin de suivre la propagation d'un pathogène fluorescent ou l'expression d'un transgène.

Enfin, la plateforme possède le matériel nécessaire à la préparation d'échantillons pour des analyses moléculaires grâce à une sorbonne, une centrifugeuse réfrigérée et des réfrigérateurs et congélateurs pour conserver les échantillons.



Figure 4. Système pour micro-injections et observations (photo : M. Frayssinet).



PIQ, un atout pour des projets de recherche innovants

Grâce à l'espace de travail confiné et aux équipements proposés par la plateforme PIQ, nous avons pu mettre en place des projets de recherche innovants pour l'Unité.

Dès son ouverture, les installations confinées de la plateforme PIQ ont permis à une étudiante en thèse et à ses collaborateurs de caractériser des traits d'histoire de vie de deux variants génétiques de l'espèce polyphage *Spodoptera frugiperda* en travaillant avec des plantes. Dans la nature, le variant « maïs » est retrouvé principalement dans des champs de maïs, de sorgho et de coton alors que le variant « riz » est plutôt retrouvé dans des cultures de riz et sur différentes herbacées. Des expérimentations de transplantation réciproque (chenilles de chacun des variants placées sur plants de maïs ou de riz) ont pu être réalisées dans des enceintes climatiques de la plateforme (Figure 5). Le suivi comparé du développement et de la croissance pondérale des chenilles sur les deux plantes a permis de mettre en évidence que la plante a un effet majeur sur le développement. En effet, les larves des deux variants se développent plus rapidement et prennent plus de poids sur la plante maïs que sur la plante riz. Par contre, seul le variant « maïs » montre une meilleure survie lorsqu'il est nourri sur maïs par rapport au riz, indiquant une possible spécialisation de ce variant à sa plante hôte. En parallèle, une expérience de préférence d'oviposition des deux variants a été mise en place à l'aide de cages souples d'1m³ afin de tester l'hypothèse d'un choix préférentiel de la plante par la mère. Bien qu'une différence de comportement de ponte entre les deux variants ait été mise en évidence (le variant « riz » préférant pondre sur le voile des cages que sur une plante, contrairement au variant « maïs » qui pond plus fréquemment sur la plante), aucun des deux variants ne montrait de spécialisation à une plante en particulier. Ces travaux, complétés par une étude par RNAseq du transcriptome des deux variants, vont prochainement donner lieu à une publication (Orsucci et al., *en prep*).



Figure 5. Expérimentations de transplantation réciproque réalisées dans une enceinte climatique de la plateforme PIQ. Des chenilles de chacun des deux variants de *Spodoptera frugiperda* sont placées sur des plants de maïs ou de riz afin de mettre en évidence une éventuelle adaptation à la plante hôte (photo : M. Orsucci).

Plus récemment, nous avons profité des équipements de la plateforme PIQ pour mettre au point des outils de génomique fonctionnelle chez notre insecte modèle *Spodoptera frugiperda*. Les scientifiques de l'UMR DGIMI ne disposaient jusqu'alors d'aucun outil pour valider la fonction de leurs gènes d'intérêt. Après avoir mis en évidence, comme de nombreuses autres équipes de recherche, que la technologie de l'ARN interférence fonctionnait très mal chez les lépidoptères (Terenius et al., 2011 ; Garbutt et al., 2012), nous avons choisi de développer une approche par mutagénèse grâce à la technique de CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic

repeats / CRISPR associated proteins 9). Pour ce faire, nous avons d'abord optimisé les étapes préliminaires de cette expérimentation, en améliorant les conditions d'élevage des insectes et de récolte des œufs et le taux de survie de ces derniers aux injections. Nous avons ensuite choisi avec attention les ARN guides (ARNg), molécules responsables de la reconnaissance de la séquence cible qui sera clivée par la protéine Cas9, afin de maximiser la spécificité et l'efficacité de coupure du système. Nous avons enfin injecté les ARNg et la protéine Cas9 fournis par la plateforme Tacgene (Muséum national d'histoire naturelle, Paris) dans les œufs de *Spodoptera frugiperda* à l'aide d'un Fentojet® Express (Eppendorff®) et d'un micromanipulateur (Narishige®). Nous avons ainsi obtenu plusieurs mutants possédant une délétion au locus cible. Cependant, nous n'avons pas pu stabiliser ces mutations par l'obtention de lignées homozygotes mutantes car il s'est avéré que le gène cible choisi était essentiel à la survie des insectes. Toutes ces optimisations ont permis de valider la faisabilité de la mutagenèse par CRISPR-Cas9 chez *Spodoptera frugiperda* et d'apporter un outil fonctionnel « clef en main » aux scientifiques de l'Unité souhaitant valider la fonction d'un gène chez cet insecte.

PIQ, une plateforme ouverte aux équipes externes

La plateforme PIQ a été conçue avant tout pour les équipes du laboratoire DGIMI. Cependant le projet a aussi pour vocation de permettre l'accueil d'équipes scientifiques extérieures, partenaires ou non, du secteur public ou privé pour répondre à des besoins ponctuels d'espaces confinés. Elle est ouverte aux personnes désireuses de travailler sur des insectes de quarantaine dans la liste déjà établie, et pourquoi pas sur d'autres, pour peu que l'agrément auprès de la préfecture puisse être obtenu.

Elle offre à ces utilisateurs :

- ✓ des locaux confinés et agréés pour la manipulation d'insectes soumis à confinement,
- ✓ la fourniture d'insectes pour les expérimentations,
- ✓ une formation et des conseils pour mener à bien les expérimentations tout en respectant les procédures de confinement.

Pour avoir accès à la plateforme, tout futur utilisateur doit contacter au préalable les responsables (contact : magali.eychenne@inra.fr). Après avoir vérifié l'adéquation entre les expérimentations prévues et les règles de confinement et de fonctionnement de PIQ, si son projet est validé, le futur utilisateur sera alors formé afin de pouvoir travailler de façon autonome sur la plateforme. Il s'engage, par la signature d'un document, à respecter les règles de fonctionnement de PIQ. Il pourra être conseillé, tout au long de son projet, par les responsables de la plateforme afin d'améliorer ses expérimentations.

La plateforme PIQ est bien implantée dans la communauté scientifique locale et nationale. Elle fait partie du RAM (Réseau des Animaleries de Montpellier) et du réseau VME (Vecteur et Maladies Emergentes) qui vise à structurer, à Montpellier, un pôle à visibilité internationale sur les vecteurs et les maladies émergentes animales ou zoonotiques. Au sein de l'INRA, elle est labellisée par la CNUe (Commission nationale des unités expérimentales) et la CNOC (Commission nationale des outils collectifs). Cette interconnexion nous permet de jouir d'une bonne visibilité et d'améliorer continuellement les structures confinées.

Conclusion

La Plateforme pour Insectes de Quarantaine PIQ est agréée pour l'expérimentation sur trois insectes de quarantaine : *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis* et *Helicoverpa armigera*. Elle est équipée pour accueillir des expérimentations diverses pouvant porter sur la pathogénicité ou sur les traits d'histoire de vie des insectes. Elle permet également de réaliser des expériences de génomique fonctionnelle ou de maintenir des élevages en conditions confinées. Enfin, c'est un outil essentiel aux activités de recherche de l'UMR DGIMI mais qui est également ouvert à la communauté scientifique publique et privée s'intéressant aux ravageurs de cultures.





Remerciements

Nous remercions tout d'abord la région Languedoc-Roussillon, l'université de Montpellier, le département Santé des Plantes et Environnement de l'INRA, le centre INRA de Montpellier, la CNUE et la société InVivo AgroSolutions pour le financement de la plateforme PIQ et de son équipement. Nous remercions également le groupe informel du confinement et le groupe du confinement INRA pour leur aide dans la rédaction de la demande d'agrément. Nous remercions enfin les groupes de travail PIQ et insectarium de l'UMR DGIMI (Gaëtan Clabots, Gaëlle Cres, Clotilde Gibard, Marie Frayssinet, Sylvie Gimenez, Nadège Ginibre, Alain Givaudan, Véronique Jouan, Doriane Mutuel, Sylvie Pages et Anne-Nathalie Volkoff), Nicolas Nègre, Marion Orsucci, Réjane Streiff ainsi que tous les utilisateurs pour leur participation au bon fonctionnement de la plateforme.

Références bibliographiques

Directive 2008/61/CE de la commission du 17 juin 2008. *J Off Union Eur.*

Directive 2000/29/CE du conseil du 8 mai 2000, Annexe I, partie a, Organismes nuisibles dont l'introduction et la dissémination doivent être interdites dans tous les états membres. *J Off Union Eur.*

Garbutt JS, Bellés X, Richards EH, Reynolds SE(2012) Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success : Evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. *J Insect Physiol* **59** : 171-178.

Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An C, Aymeric JL et al. (2011) RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J Insect Physiol* **57** : 231-245.

