

Formalisation d'un centre de ressources biologiques dédié aux parasitoïdes oophages : CRB Ep-Coll

Anaël Marchand¹, Nadine Sellier¹, Sylvie Warot¹, Michela Ion-Scotta¹, Nicolas Ris¹, Géraldine Groussier-Bout¹

Résumé. Les recherches en agronomie reposent souvent sur l'utilisation de ressources biologiques gérées de façon très variable en termes de (i) durée de conservation, (ii) formalisation des procédures, (iii) gestion de l'information et (iv) ouverture à l'extérieur. Dans ce contexte, les CRB (centres de ressources biologiques) représentent un aboutissement en termes d'organisation collective et de reconnaissance. Si les CRB sont fréquents dans certains domaines, les principaux voire seuls exemples en entomologie concernent le cas particulier du modèle biologique « drosophile ». Profitant du double intérêt que représentent les parasitoïdes oophages (potentiels auxiliaires de lutte biologique et modèles pertinents pour des questionnements en écologie évolutive), nous présentons ici les principales démarches en cours en vue d'une future certification du CRB EP-Coll (Egg Parasitoids Collection) dédié à ces organismes.

Mots clés : centre de ressources biologiques, écologie évolutive, lutte biologique, parasitoïdes oophages, *Trichogramma*

Introduction

Les CRB (centres de ressources biologiques) sont des structures dont la vocation est d'acquérir, conserver, étudier et distribuer du matériel biologique (organismes vivants ou morts, ou leurs sous-produits) d'origine végétale, microbienne ou animale. Des informations (moléculaires, physiologiques, etc.) sont associées à ce matériel biologique, l'ensemble des données (origine, échanges de matériel, procédures et modes opératoires) étant généralement regroupé dans un système d'Information (SI) et géré dans le cadre d'une démarche d'Assurance-Qualité (certification).

Au sein de l'Institut Sophia Agrobiotech et en collaboration avec des collègues du Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (A. Cruaud et J-Y. Rasplus), un CRB spécifique aux « parasitoïdes oophages » – des insectes dont le développement pré-imaginal (avant le stade adulte) se fait à l'intérieur et au détriment d'un œuf hôte, finissant par le tuer – est en cours de constitution, le CRB *Egg Parasitoids Collection* (CRB EP-Coll). Cette initiative s'inscrit dans la continuité des nombreux travaux de recherche menés sur les trichogrammes depuis plus de 40 ans au sein de l'INRA, avec la création en 1973 d'un laboratoire sur l'étude des trichogrammes dirigé par J. Voegelé, qui a abouti à la commercialisation en 1985 des premières souches de trichogrammes. Nous sommes également persuadés que les parasitoïdes oophages représentent un enjeu important pour le futur, que ce soit comme source d'auxiliaires de lutte biologique ou comme modèles pour des recherches plus académiques (écologie évolutive notamment). Cette ressource peut donc raisonnablement être considérée comme un enjeu stratégique dans ce domaine ce qui nécessite donc, au-delà de la « simple » conservation de souches, de mettre en place une organisation collective et mobiliser des compétences scientifiques, techniques et organisationnelles complémentaires.

Contexte

D'une façon générale, les CRB sont nombreux dans le domaine de la santé humaine (ex : Tumorothèque, Cellulothèque du CHU de Rennes, Biobanque du CHU D'Amiens, etc.) ainsi que pour certaines productions animales (ex : CRB Xénopes de Rennes, CRB Cryobanque nationale, etc.) ou végétales (ex : CRB Céréales à paille à Clermont-Ferrand, CRB Vigne à Marseillan, etc.). Dans le domaine de l'entomologie, les seuls CRB gérant des collections vivantes sont, à notre connaissance, ceux consacrés aux drosophiles (Japon, Etats Unis, etc.).

¹ Institut Sophia Agrobiotech, INRA-CNRS-UCA, 06903 Sophia Antipolis, France
anael.marchand@inra.fr



Leurs objectifs principaux sont d'entretenir des souches pour explorer des thématiques de recherche : biologie du développement, écologie, génétique, génomique comparative, immunologie, neurobiologie, physiologie, etc.

Si l'objectif d'EP-Coll est, à plus long terme, de couvrir plusieurs familles et genres des parasitoïdes oophages, les activités à court terme se concentrent essentiellement sur le genre *Trichogramma*. En effet, *Trichogramma* constitue déjà l'un des premiers marchés commerciaux dans le cadre de la lutte biologique à l'aide de macro-organismes (Smith 1996, Consoli et al., 2010) et il est une source potentielle de nouveaux agents de lutte biologique contre les lépidoptères nuisibles (Figueiredo et al., 2015, Ueese et al., 2014). En raison de leur temps de génération court, leur petite taille et la simplicité de leur élevage (utilisation bien maîtrisée d'hôtes de substitution), ils sont également utilisés comme modèle biologique dans le cadre de l'écologie évolutive (Wajnberg et al., 2000 ; Benvenuto et al., 2012 et Vercken et al., 2015).

La formalisation de notre CRB nécessite le développement et le renforcement d'actions dans plusieurs domaines d'activité notamment :

- ✓ la disposition d'infrastructures adaptées aux besoins techniques et conformes à la réglementation ;
- ✓ l'acquisition de souches ayant un intérêt pour nos « clients » potentiels ;
- ✓ l'optimisation des méthodes d'élevage ;
- ✓ la caractérisation génétique des souches ;
- ✓ la gestion des informations, échantillons et documents associés ;
- ✓ la communication auprès de clients potentiels.

Dans ce contexte, cet article présente plus précisément :

- ✓ dans un premier temps, les aspects scientifiques et techniques liés à l'acquisition et à la caractérisation génétique de nouvelles souches ;
- ✓ dans un second temps, un aperçu de certains aspects organisationnels, liés aux besoins de gestion et de communication.

Il est à noter que le volet « infrastructures-bioconfinement-réglementations » sera traité dans ce même numéro du Cahier des Techniques par M.Thao et collaborateurs (Thao et al., 2017) et que les modalités techniques d'entretien des souches sont proches de celles présentées par E. Colombel et collaborateurs (Colombel et al., 2017).

Acquisition des souches

Généralités

Compte tenu de (i) de notre infrastructure, (ii) des moyens humains mobilisés, (iii) du souhait, au-delà de l'élevage, d'assurer des activités de caractérisation et (iv) du « modèle économique » actuel (pas de « facturation aux clients » pour l'accès aux souches), nous avons, dans un premier temps, choisi de ne maintenir qu'une centaine de souches. Les souches proviennent de deux sources, les collectes de terrain que nous réalisons nous-même et la cession de souches par des tiers. Afin de garantir la traçabilité de ces échanges, ces cessions doivent se matérialiser par un accord de transfert de matériel (« Material Transfer Agreement » ou MTA) qui précise les modalités de la cession. D'une manière générale, le MTA est utilisé dans le cas d'un transfert de produits innovants, d'outils de recherche, de matériel biologique, protégés, ou non, vers un tiers, pour des besoins de recherche ou pour une évaluation technico-commerciale. A ce titre, un MTA spécifique aux besoins du CRB EP-Coll a été adapté à partir des modèles standards INRA.

Quel que soit le mode d'acquisition, une distinction doit être faite selon l'origine géographique des souches. En effet, alors que la détention des souches issues de France Métropolitaine ne nécessite pas d'autorisation, la détention de celles provenant d'autres aires géographiques nécessite un accord préalable conformément à l'arrêté

du 28/06/2012 portant sur les macro-organismes utilisables en lutte biologique (référence : AGRG1225395A). Une telle demande est actuellement en cours pour le CRB EP-Coll, demande qui s'appuie sur les dispositifs mis en place dans l'infrastructure Entomopolis (Thaon et al., 2017). Un autre aspect concernant les souches exotiques est celui de l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages (APA) découlant de leur utilisation dans un but commercial ou scientifique, et formalisé par le protocole de Nagoya (). Les modalités pour la prise en compte effective de ces APA font encore l'objet de réflexions au niveau national.

Focus sur deux campagnes d'échantillonnages (2015-2017)

Deux campagnes complémentaires d'échantillonnages sont conjointement menées dans le cadre d'un projet ANR appelé « TRIPTIC » (2015-2018 ; Coordinateur : J-Y. Rasplus, CBGP) pour collecter des hyménoptères parasitoïdes oophages (essentiellement de la famille des Trichogrammatidae) (**Figure 1**).

La première, à l'échelle nationale (**Figure 1**), se base notamment sur un réseau de collaborateurs bénévoles incluant des particuliers mais également des organismes (ex : adhérents de la Société Entomologique française ; Fondation Pierre VEROTS). L'objectif est d'explorer et de « capturer » la diversité d'espèces de trichogrammes français en déposant des œufs sentinelles préalablement stérilisés (*Ephestia kuehniella*, *Cydia pomonella*, etc.) sur une grande diversité de plantes cultivées ou sauvages, potentiellement hôtes de lépidoptères. Au-delà de l'acquisition de nouvelles souches, il s'agit également de documenter les distributions géographiques et écologiques des différentes espèces ainsi que leur diversité génétique. Une « Tripticbox », kit de piégeage composé des éléments nécessaires à la dépose puis à la récupération d'œufs sentinelles et incluant le service de livraison, est utilisée.

La deuxième campagne est réalisée, dans le cadre de la thèse de Michela Ion-Scotta (Université Nice Sophia Antipolis), à l'échelle des Alpes-Maritimes, notamment la zone comprise entre la plaine du Var, le massif du Tanneron et l'arrière-pays Grassois (**Figure 1**). Cette zone d'échantillonnage choisie pour son hétérogénéité environnementale et climatique, s'étend sur un gradient altitudinal qui varie entre 0 et 1 500 m en 20-30 km, comprend deux climats (mésos- et supra- méditerranéens) et différents biotopes. L'objectif de cette campagne est d'évaluer quelles sont les espèces de trichogrammes présentes, comment elles sont distribuées dans le temps et dans l'espace et si/ comment les espèces largement distribuées s'adaptent à cette hétérogénéité. Les quarante-deux sites d'échantillonnage sélectionnés font l'objet d'un suivi mensuel (avril à novembre 2016) à l'aide d'œufs-sentinelles d'*Ephestia kuehniella* disposés sur plusieurs espèces végétales (10 par site).

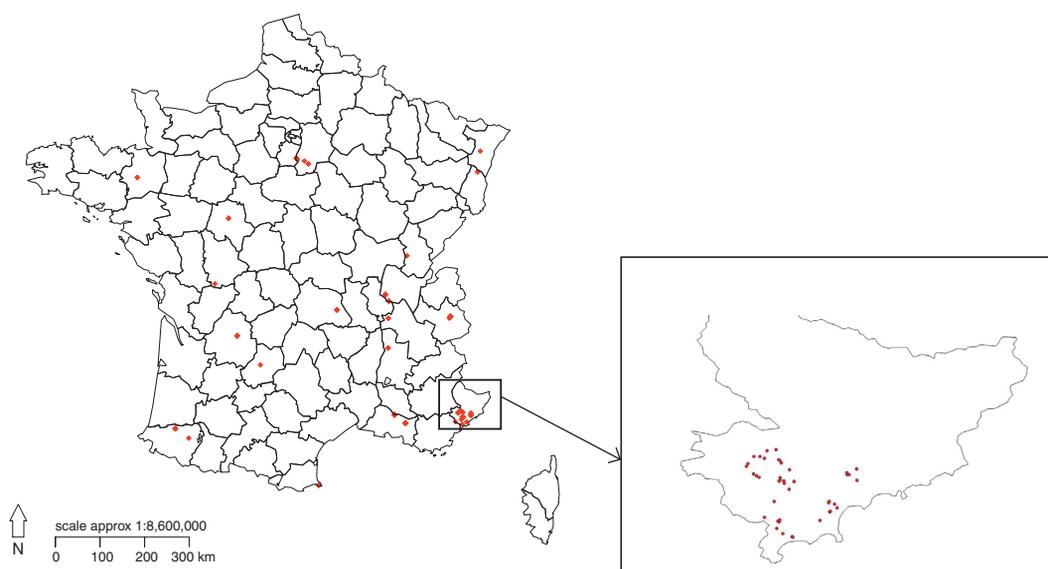


Figure 1. Dispositifs d'échantillonnage mis en place dans le cadre du projet ANR TRIPTIC.





Grâce à ces deux campagnes et d'autres programmes (Projets Ecophyto PSPE « INDREGARB » (Responsable : C. Lavigne, PSH) ou « BIOCCYD » (Responsable : N. Ris, ISA)), ce sont actuellement plus de 180 souches vivantes de trichogrammes qui ont été collectées et qui, après caractérisation complète et selon leur intérêt, pourront être intégrées dans le CRB.

Caractérisation des souches

Généralités sur la caractérisation

Quelles que soient les applications potentielles, lutte biologique ou recherche académique, il est impératif de caractériser chacune de ces souches. Au niveau morphologique, la classification des Trichogrammatidae n'est pas aisée, du fait notamment de leur petite taille et du manque de caractères distinctifs (voir par exemple Pintureau, 2008). Il est probable que des espèces soient regroupées dans des complexes d'espèces cryptiques non distinguables d'un point de vue morphologique. De plus, les approches morphologiques ne permettent pas d'aborder la caractérisation à l'échelle intra-spécifique. C'est pourquoi différents types de marqueurs sont utilisés ou en cours de développement : (i) séquençage de différents gènes dont le gène mitochondrial *Cytochrome Oxidase I* (COI), (ii) génotypage de marqueurs microsatellites, (iii) développement d'approches « nouvelles générations de séquençage ». De façon complémentaire, une approche expérimentale est initiée pour définir, lorsque cela est possible, le périmètre des espèces sur la base du critère d' « inter-fécondité » (Mayr, 1942).

Caractérisation moléculaire

Le séquençage d'une portion de la COI, gène d'une protéine mitochondriale de la chaîne respiratoire, est désormais une méthode de routine pour caractériser rapidement la biodiversité de taxons (Al khatib et al., 2014, Correa et al., 2016). Dans la mesure où, préalablement, des séquences identiques ou très proches ont été associées à une identification taxonomique par un spécialiste (démarche de « Barcoding »), cette caractérisation COI permet d'identifier précisément les espèces. En fait, le diagnostic se fait sur une portion d'environ 700 bp amplifiée en utilisant des amorces largement utilisées dans la littérature LCO1490 (Folmer et al., 1994). Le résultat des PCR est en général visualisé à l'aide de l'instrument QIAxcel (société QIAGEN) avec la cartouche « Fast analysis ». Les PCR positives sont séquencées dans un sens (HCO) par la méthode de Sanger par la société Beckman Coulter Genomics (Royaume Uni). Les séquences COI sont alignées grâce à l'algorithme ClustalW implémenté dans le logiciel MEGA version 6.06 (Tamura et al., 2013). A partir de ces alignements, tous les haplotypes sont déterminés et dénombrés grâce au logiciel Dna Sequence Polymorphism DnaSP. La construction de l'arbre phylogénétique des haplotypes (séquences originales) est réalisée sous MEGA6 en utilisant un des meilleurs modèles d'analyse phylogénétique déterminés par l'outil « Find best model ».

Les premières analyses laissent apparaître une vingtaine de clusters, pour certains sans correspondances évidentes dans Genbank (**Figure 2**). Une caractérisation plus complète est en cours, en vue d'obtenir une phylogénie multi-locus.

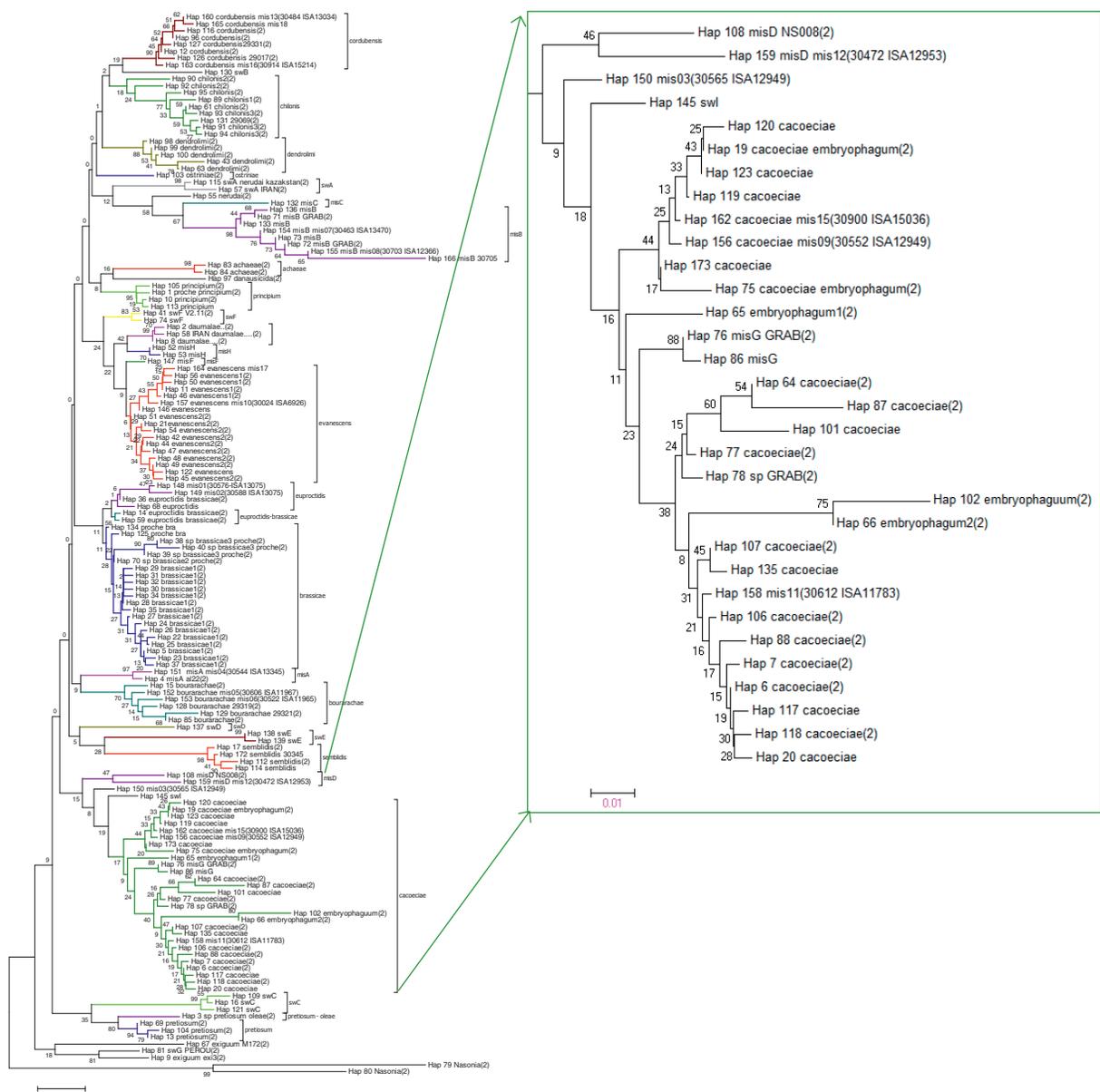


Figure 2. Arbre phylogénétique obtenu sur une portion du gène Cytochrome Oxidase I avec un focus sur les souches associées à l'espèce *Trichogramma cacaoeciae*.

Etude expérimentale de délimitation d'espèces par croisements

Une étude expérimentale de délimitation d'espèces a été initiée, à partir des souches de trichogrammes collectées ou présentes dans le CRB. Deux modes de reproduction existent chez les trichogrammes, (Stouthamer, 1993 ; Roopa et al., 2009) :

- ✓ un mode asexué dans lequel les femelles diploïdes peuvent produire des filles diploïdes sans accouplement et sans fécondation de leurs gamètes, cette forme de parthénogenèse appelée thélytoquie pouvant être soit une caractéristique de l'espèce, soit induite par des bactéries endosymbiotiques ;
- ✓ un mode sexué dans lequel la femelle va produire des filles diploïdes issues des gamètes fécondés et des fils haploïdes issus des gamètes non fécondés.



L'étude expérimentale du critère d'interfécondité n'est évidemment possible que pour les souches présentant ce deuxième mode de reproduction. Compte-tenu du nombre de souches à considérer, plusieurs « blocs » doivent être constitués, chacun d'entre eux impliquant un nombre restreint de souches croisées les unes avec les autres dans les deux sens de croisement ($\text{♀}_i \times \text{♂}_j$ et $\text{♀}_j \times \text{♂}_i$). Ces travaux sont encore en cours mais devraient permettre rapidement de mieux séparer les espèces proches au niveau moléculaire.

Gestion des échantillons, informations et documents du CRB

Généralités

La constitution et le fonctionnement d'un CRB obligent à gérer des objets et des informations variées. Dans le cadre particulier du CRB Ep-Coll, les enjeux les plus importants concernent principalement :

- ✓ les tubes d'élevage contenant les souches de façon à pouvoir garantir la traçabilité de la filiation ;
- ✓ les supports de conservation durable de l'ADN (plaques PCR), les « vouchers » (partie du corps nécessaire à l'identification morphologique, le plus souvent il s'agit de l'exosquelette de l'insecte préalablement passé en biologie moléculaire), les montages entre lames et lamelles ;
- ✓ les équipements associés (enceintes climatiques, congélateurs, etc.) ;
- ✓ les documents associés aux échanges ou cessions de matériel biologique (MTA par exemple) ;
- ✓ les procédures et modes opératoires ;
- ✓ les informations relatives aux souches (séquences moléculaires, données génétiques ou phénotypiques).

Nous présentons deux solutions logicielles mises en œuvre dans le CRB Ep-Coll.

Utilisation du logiciel e-SIToul Barcode

Par rapport à la liste précédente, le SI (système d'information) (e-SIToul Barcode (<http://get.genotoul.fr/index.php?id=208> ; <https://genomique.genotoul.fr/Barcode/tracabilite.pl>) a vocation à gérer des objets et leur filiation, donc les points (i), (ii) et (iii). Cet outil développé par la plateforme INRA GeT-PlaGe (Plateforme Génome et Transcriptome de Toulouse – Responsable : Gérald Salin) présente plusieurs avantages :

- ✓ son coût d'accès peu élevé ;
- ✓ son hébergement sur l'infrastructure sécurisée de la plateforme de Bio-informatique (INRA Toulouse) ;
- ✓ son accessibilité de n'importe quel poste *via* une interface Web ;
- ✓ ses possibilités d'évolution selon les besoins des utilisateurs.

Dans le cadre de l'élevage, les tubes contenant les trichogrammes élevés sur des plaquettes d'œufs d'*Ephesia kuehniella*, sont tous identifiés par une étiquette, avec un code-barres 2D unique et le nom de la souche (**Figure 3**). Un nouveau code-barres est créé à chaque génération. Diverses informations sont renseignées dans la base de données, telles que le n° de génération, la date de dépôt de la nouvelle plaquette d'œufs et la date de découpe de la plaquette d'œufs parasités (création de la nouvelle génération). La filiation entre deux générations successives d'une souche est faite par l'association à l'aide d'une douchette des codes-barres du tube « père » et du tube « fils ». Cette filiation peut être interrogée à tout moment pour remonter aux numéros de code-barres initiaux d'une souche. Lorsque le tube est détruit, l'information est renseignée.

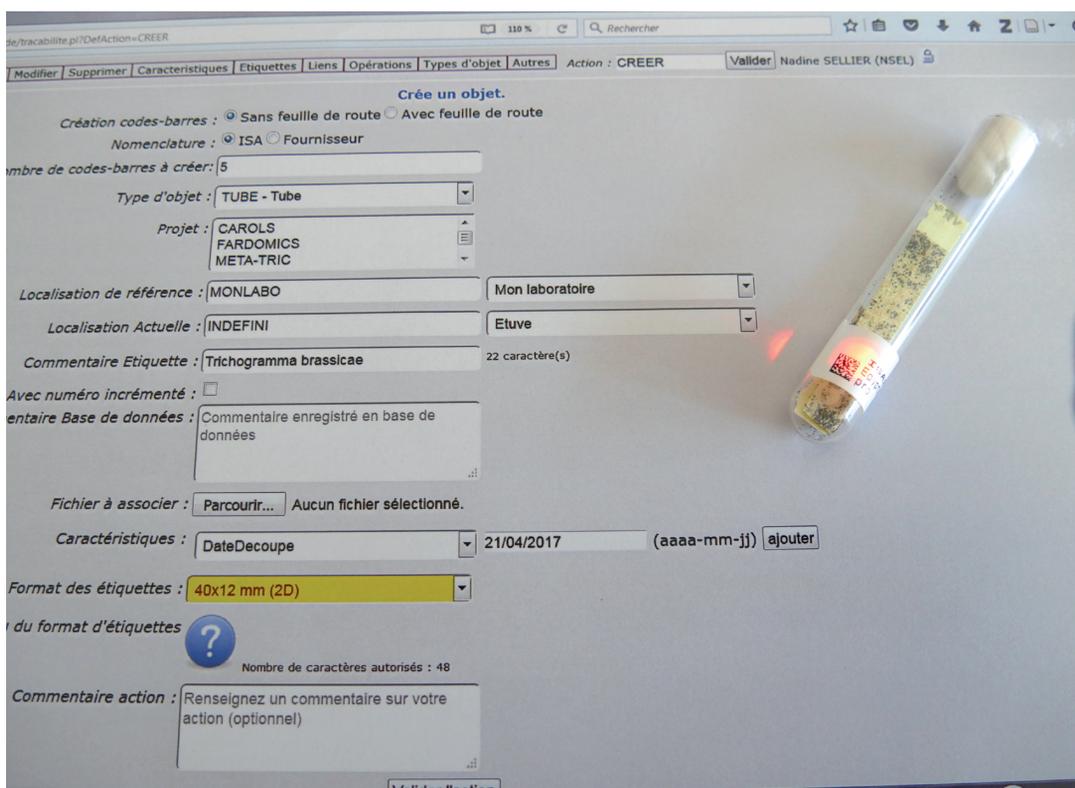


Figure 3. Figure composite illustrant le fonctionnement et les applications de e-SIToul Barcode (photo : A. Marchand).

Gestion de la démarche qualité – Logiciel AQ-Tools

La mise en place d'une démarche qualité inspirée de la norme NF S96-900, s'appuie sur des outils de gestion de la documentation, des équipements, des consommables, des compétences, ainsi que de tous les éléments du Système de Management de la Qualité, parmi lesquels les comptes- rendus de réunions, les plans d'actions, les tableaux de bord des indicateurs, etc.

Nous avons choisi l'outil AQ-Tools (<http://golo.cirad.fr/FR>), développé par le CRB-Tropicales du Cirad à Montpellier, pour lequel l'installation d'un applicatif sur le poste de travail permet d'accéder à tous les éléments susmentionnés. Les données sont sécurisées et leur confidentialité garantie. Différents niveaux d'utilisateurs sont définis, des mails d'alerte peuvent être générés automatiquement (pour la surveillance des équipements par exemple).

Evolutions souhaitables : système d'information (SI)

Les activités du CRB génèrent des informations nombreuses et de nature variée, comme l'origine des souches entretenues (provenance géographique, plantes et insectes hôtes, contributeurs et éventuels contrats de cession, etc.), leur caractérisation (moléculaire, morphologique et phénotypique), éventuellement les projets dans lesquels elles ont été utilisées et le cas échéant, les connaissances complémentaires acquises. En l'état, les solutions informatiques disponibles ne nous permettent pas encore de « croiser » toutes ces informations de façon simple, harmonisée, fiable et sécurisée. Seul un véritable système d'informations (SI), administré, permettant des niveaux de droits d'accès variables, et accessible rapidement permettrait d'atteindre ces objectifs. Un cahier des charges est en cours de réflexion, les solutions techniques et financières étant à l'étude. Des réflexions et initiatives communes avec d'autres CRB, notamment dans le cadre du réseau RARe (Ressources Agronomiques pour la recherche) pourraient être particulièrement profitables.



Communication autour du CRB

Généralités

La vocation d'un CRB, est de mettre ses ressources à la disposition d'un large panel de clients ou partenaires potentiels. Communiquer sur ces ressources est donc primordial. En lien avec la Démarche Qualité, différents supports de communication sont en cours d'élaboration. L'identité visuelle du CRB Ep-Coll, soulignée par un nouveau logo, pourra s'afficher sur une plaquette de présentation et un site Web, où les objectifs, finalités et services proposés par le CRB, ainsi qu'un catalogue des souches entretenues avec leurs caractéristiques phénotypiques et génétiques, seront présentés, tout en respectant des niveaux de précision et de confidentialité adaptés.

Focus sur la création du logo

Il nous est apparu évident d'avoir un logo représentant l'identité du CRB EP-Coll. Nous avons fait appel à une graphiste de formation entomologiste (Delphine Bourdais). Le logo finalement retenu (**Figure 4**) vise à faire passer différents messages :

- ✓ la référence aux parasitoïdes oophages avec le « O » de l'acronyme EP-Coll qui représente un œuf de lépidoptère ;
- ✓ la volonté de caractérisation intégrative matérialisée par la double hélice d'ADN (caractérisation moléculaire) et le microscope (caractérisation morphologique et phénotypique) ;
- ✓ l'ancrage agronomique (lutte biologique) au travers de l'épi et du jeu de couleurs (marron, jaune et vert).

De façon peut-être moins intuitive, nous avons retenu les alvéoles adjacentes pour, d'une part, illustrer la complémentarité des compétences réunies dans et autour du CRB et, d'autre part, faire un clin d'œil à l'abeille, un autre hyménoptère utile aux cultures et pour lesquels les enjeux concernant les ressources génétiques sont également importants.



Figure 4. Logo retenu comme logo officiel d'EP-Coll.

Focus sur le catalogue de souches d'accès public

La publication d'un catalogue des souches accessibles, permet d'informer sur les ressources biologiques disponibles, leurs caractéristiques et les conditions de leur mise à disposition. Dans le cas d'EP-Coll, les critères retenus pour le catalogue des souches sont divisés en six rubriques :

- ✓ des informations générales telles que le nom de la souche, des informations taxonomiques (ordre, famille, genre, espèce) ;

- ✓ des données concernant l'origine de la souche : insectes hôtes, plantes hôtes, pays d'origine, commune ou lieu-dit, coordonnées GPS (longitude et latitude), altitude, date de piégeage, date d'entrée au CRB ;
- ✓ des informations génétiques incluant notamment le mode de reproduction, les séquences moléculaires disponibles et la recherche d'endosymbiotes ;
- ✓ des informations concernant différents caractères phénotypiques ;
- ✓ des informations relatives aux conditions d'élevage ;
- ✓ les éventuelles publications associées à la souche.

Il est prévu que ce catalogue soit réactualisé chaque année, sa diffusion se faisant notamment *via* le site Web du CRB, au travers d'un moteur de recherche.

Conclusion

Grâce à la mobilisation de compétences complémentaires et aux soutiens financiers, le CRB EP-Coll a pu rapidement évoluer ces dernières années. Parallèlement à l'acquisition et au maintien de nouvelles souches, « la face visible de l'iceberg », des progrès très significatifs ont été réalisés d'une part, dans l'acquisition de données complémentaires et, d'autre part, dans la formalisation du fonctionnement global du CRB. Cette dynamique devrait permettre d'aboutir à une labellisation (NF S96-900) à l'horizon 2017-2018. A cet égard, des synergies sont attendues dans le cadre de l'Infrastructure « Ressources Agronomiques pour la recherche » (RARE – Responsable : Michèle Tixier-Boichard) et son pilier « Ressources Environnementales » (– Animateur : Christian Mougin), initiatives soutenues par l'alliance ALLENI.

Remerciements

Nous remercions vivement Louise Marti (Licence professionnelle « Animateur Qualité », IEQT) et Ghyslaine Gatsinzi (Master « Management des biobanques, ESTBB) pour leur investissement efficace dans la mise en place d'un Système de Management de la Qualité. Tous nos remerciements également à Hélène Wera (Master « Sciences de la Vie et de la Santé, UNS) pour son implication sur le volet « délimitations d'espèces ».

Nous tenons également à remercier Gérald Salin (Plateforme GeT-PlaGe ; Génopole Toulouse Midi-Pyrénées) pour son aide lors du déploiement de Barcode, son utilisation et les discussions autour de ses possibilités d'évolution ainsi que Karine Hugot (Equipe SPIBOC, UMR ISA) pour ses conseils et son soutien dans ce processus de certification.

Les activités présentées dans cet article ont été essentiellement soutenues financièrement par le projet ANR « TRIPTIC » (Responsable : J-Y. Rasplus, CBGP ; période : 2014-2019) et le projet GIS IBiSA « EP-Coll » (responsable : N. Ris, ISA ; période : 2014-2016).

Références bibliographiques

- Al Khatib F, Fusu L, Cruaud A, Gibson G, Borowiec N, Rasplus JY, Ris N, Delvare G (2014) An integrative approach to species discrimination in the *Eupelmus urozonus* complex (*Hymenoptera, Eupelmidae*), with the description of 11 new species from the Western Palaearctic. *System Entomol* **39** : 806-862.
- Benvenuto C, Tabone E, Vercken E, Sorbier N, Colombel E, Warot S, Fauvergue X, Ris N (2012) Intraspecific variability in the parasitoid wasp *Trichogramma chilonis* : can we predict the outcome of hybridization ? *Evol Appl* **5** : 498-510.



- 
- Colombel E, Venard M, Tabone E (2017) Technique d'élevage des trichogrammes. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, N° spécial Entomologie : 86-94.
- Consoli FL, Parra JRP, RAZ (2010) Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma*. Springer, Netherlands.
- Correa MCG, Palero F, Dubreuil N, Etienne L, Hulak M, Tison G, Warot S, Crochard D, Ris N, Kreiter P (2016) Molecular characterization of parasitoids from armored scales infesting citrus orchards in Corsica, France. *BioControl*, on Line first DOI : 10.1007/s10526-016-9752-1
- Figueiredo MDC, Cruz I, da Silva RB, Foster JE (2015) Biological control with *Trichogramma pretiosum* increases organic maize productivity by 19.4%. *Agron Sustain Develop*. **35** : 1175-1183.
- 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. *Mol Mar Biol Biotechnol* **3** : 294-299.
- Mayr E (1942) *Systematics and the origin of species*. USA Columbia University Press, New York.
- Pintureau B (2008) *Les espèces européennes de Trichogrammes*. France InLibro Veritas, Cergy-Pontoise.
- Roopa GR, Jalali SK, Nagaraja H, Lalitha Y (2009) Comparison of biological parameters among arrhenotokous and thelytokous forms of *Trichogramma*. *Pest Manag Hortic Ecosyst* **15** : 28-32.
- Smith SM (1996) Biological control with *Trichogramma*. Advances, successes, and potential of their use. *Ann Rev Entomol* **41** : 375-406.
- Stouthamer R (1993) The use of sexual versus asexual wasps in biological control. *Entomophaga* **38** : 3-6.
- Thaon M, Audant P, Ris N, Borowiec N (2017) Entomopolis : de la production de masse d'insectes auxiliaires au maintien de macro-organismes réglementés. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, spécial Entomologie : 59-68.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* **30** : 2725-2729.
- Ueesele A, Ridland PM, Stouthamer R, He YR, Ang G, Zalucki MP, Furlong MJ (2014) *Trichogramma chilonis* Ishii : A potential biological control agent of *Crociodomia pavonana* in Samoa. *Biol Control*. **73** : 31-38.
- Vercken E, Fauvergue X, Ris N, Crochard D, Mailleret L (2015) Temporal autocorrelation in host density increases establishment success of parasitoids in an experimental system. *Ecol Evol*. **5** : 2684-2693.
- Wajnberg E, Fauvergue X, Pons O (2000) Patch leaving decision rules and the Marginal Value Theorem : an experimental analysis and a simulation model. *Behav Ecol* **11** : 577-586.

