

Technique d'élevage des trichogrammes

Etty Colombel¹, Marine Venard¹, Elisabeth Tabone¹

Résumé. La lutte biologique est une réelle alternative à la lutte chimique. Grâce au savoir-faire dans le maintien de l'élevage de trichogrammes au sein du Laboratoire Biocontrôle de l'UEFM (Unité Entomologie Forêt méditerranéenne) de l'INRA, la recherche finalisée pour réguler les populations des lépidoptères ravageurs forestiers n'a pas dit son dernier mot. Cette collection vivante de parasitoïdes oophages est un véritable patrimoine de la recherche française.

Mots clés : trichogramme, élevage, *Ephestia kuehniella*, parasitoïde oophage, lutte biologique, biocontrôle

Introduction

Aujourd'hui, il est admis par tous que la lutte chimique a des conséquences néfastes sur l'environnement (santé humaine, pollution des eaux, résistance des insectes ravageurs...). C'est donc naturellement que l'utilisation d'organismes vivants pour réguler les populations des divers ennemis des cultures maraîchères, fruitières, grandes cultures et forêts est devenue une alternative à la lutte chimique. La lutte biologique à l'aide d'entomophages date de la fin du XIX siècle, aux Etats-Unis comme en Europe. En France, c'est en 1973 que fut créé un laboratoire de trichogrammes par J. Voegelé à la Station de Lutte biologique d'Antibes (INRA) (dirigée par J. Jourdeuil) pour entreprendre et développer des recherches fondamentales et finalisées sur le contrôle de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (*Lepidoptera* : *Crambidae*)).

Pour développer ces travaux, il a été nécessaire de produire un grand nombre de trichogrammes en laboratoire. Pour cela, une synchronisation est nécessaire entre le cycle de développement des trichogrammes et celui de l'hôte d'élevage. Afin de réduire les coûts de production, gérer les périodes de besoin et assurer la meilleure fitness des parasitoïdes, ces élevages ont été effectués sur un support de production différent de l'hôte naturel, le papillon de la teigne de la farine *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (*Lepidoptera* : *Pyralidae*). C'est un papillon ravageur cosmopolite des denrées stockées, connu des entomologistes depuis 1879. Les expérimentations sur *E. kuehniella* ont été réalisées à partir de deux cents chenilles récoltées en 1962 dans un moulin des Alpes- Maritimes (Daumal et Pintureau, 1985). Les résultats des travaux du laboratoire de zoologie à Antibes ont montré que ce lépidoptère, par rapport à d'autres hôtes de substitution, avait une place de choix pour l'élevage des trichogrammes car il permet une fitness optimale des trichogrammes produits. De plus, il est possible d'appliquer un traitement aux rayons ultra-violet pour empêcher le développement des chenilles sans endommager les œufs (Voegele et al., 1974) et ainsi palier le cannibalisme.

L'absence totale de procédé dans ce domaine a conduit l'INRA d'Antibes à continuer ses travaux de recherche puis à s'associer avec une bio-fabrique, afin de mettre au point une technique innovante qui a été protégée par plusieurs brevets. Plusieurs dizaines de millions d'œufs d'*Ephestia kuehniella* ont ainsi été produits par jour à un moindre coût (Daumal et al., 1975).

En 1974, des essais de lutte biologique, en plein champ, à l'aide de trichogrammes ont été effectués avec succès en Alsace, contre la pyrale du maïs (*O. nubilalis*), permettant d'atteindre des taux de parasitisme jusqu'à 90 % (Voegelé, 1975). De nos jours, environ 120 000 ha de maïs en France sont traités avec les trichogrammes (*T brassicae*).

Le genre *Trichogramma* comprend plusieurs espèces de parasites d'œufs d'insectes principalement de lépidoptères. Deux cent quatre-vingts espèces de trichogrammes sont actuellement identifiées dans le monde (Pintureau, 2012). Le Laboratoire de Zoologie à Antibes (devenu aujourd'hui le laboratoire Biocontrôle UEFM (Unité Entomologie Forêt méditerranéenne) INRA), s'est spécialisé au fil du temps dans la lutte biologique contre les lépidoptères ravageurs à l'aide de trichogrammes. Après le maïs, les trichogrammes ont été utilisés contre divers ravageurs comme la noctuelle du chou (*Mamestra brassicae*) et le carpocapse des pommes (*Cydia pomonella*).

¹ Entomologie et Forêt méditerranéenne, INRA, site Villa Thuret, 06160 Antibes, France
etty.colombel@inra.fr

Aujourd'hui, au sein de l'UEFM, le laboratoire Biocontrôle situé à Antibes est dirigé par E. Tabone. Notre équipe a continué à y travailler, notamment contre le foreur de la canne à sucre (*Chilo sacchariphagus*), la teigne du chou (*Plutella xylostella*), le brun du pélargonium (*Cacyreus marshalli*), la mineuse de la tomate (*Tuta absoluta*) et plus récemment contre le papillon du palmier (*Paysandisia archon*) et la pyrale du buis (*Cydalima perspectalis*). Tous ces programmes sont développés selon une méthode rigoureuse, par étapes successives, en adaptant les protocoles de recherche à chaque nouveau ravageur et nouvel écosystème.

Matériel et méthodes

Le trichogramme

Le trichogramme doit son nom au phénotype de ses ailes antérieures : « tricho » signifiant « soie » et « gramme » signifiant « ligne ». Il appartient à l'ordre des hyménoptères, à la famille des chalcidiens. Il a une taille inférieure au millimètre. Ce parasitoïde se différencie des parasites par sa phase libre. L'utilisation du trichogramme comme moyen de lutte biologique contre un lépidoptère visé nécessite au préalable le choix de l'espèce la plus efficace, d'où l'importance d'avoir en permanence plusieurs espèces et souches dans le laboratoire.

Le « Souchier » est une collection de différentes espèces et souches de trichogrammes maintenues vivantes en pièce climatique confinée. Depuis sa création, le « Souchier » a évolué grâce à l'introduction régulière de nouvelles souches, en fonction de chaque nouveau programme de recherche. Actuellement, il est composé de soixante souches (issues de différentes zones géographiques) correspondant à quinze espèces différentes. Pour chaque espèce, plusieurs milliers d'individus sont élevés pour permettre les expérimentations et choisir les meilleures souches.

Le cycle de développement du trichogramme dépend des conditions climatiques (température, humidité relative et photopériode). En effet, le trichogramme, insecte poïkilotherme, a un développement dépendant de la température. Ce paramètre joue sur la régulation de la vitesse de son métabolisme.

La larve de trichogramme se développe à l'intérieur de l'œuf hôte, ici un papillon (**Figure 1**). En pondant dans l'œuf hôte, la femelle trichogramme libère du venin. L'action de ce venin est d'autant plus lente que l'embryon de l'hôte est évolué (Voegelé et al., 1974). La larve de trichogramme se nourrit des tissus et du vitellus (réserve énergétique pour l'embryon) de l'hôte en assurant son développement jusqu'à sa métamorphose, transformation en nymphe puis en « imago » (insecte adulte) (Hawlitzky, 1992). Peu avant sa nymphose, la larve de trichogramme sécrète une substance visqueuse qui s'applique contre la membrane vitelline de l'œuf hôte et qui durcit. Cette enveloppe de couleur noire est caractéristique des œufs hôtes parasités par les trichogrammes.

Pour émerger le trichogramme découpe un orifice dans le chorion (l'enveloppe de l'œuf) par lequel il sortira. Puis, la femelle se consacrera à l'accouplement et à la recherche d'œufs hôtes pour y déposer sa ponte.



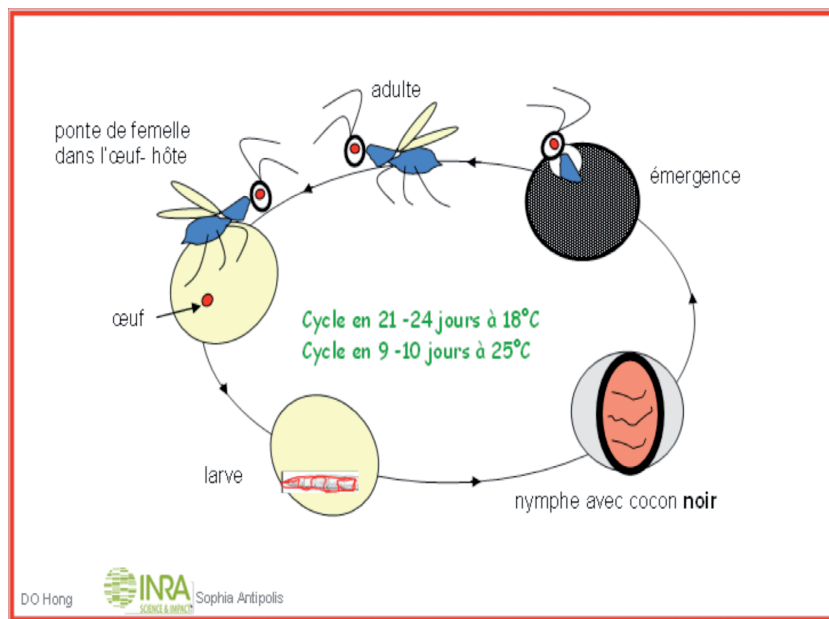


Figure 1. Cycle de développement du trichogramme.

Le maintien des diverses souches de trichogramme est réalisé dans une pièce climatisée ($T18^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, HR $75\pm 5\%$, 16 L: 8 D). Cette température est la plus adaptée pour que toutes les souches indigènes et exotiques puissent se développer correctement.

E. kuehniella

La production des trichogrammes est tributaire de la disponibilité et de la qualité de son hôte d'élevage. L'hôte de substitution doit être lui-même facile à produire et donner des descendants à la fitness optimale. *E. kuehniella* est cet hôte de choix. Il permet une meilleure fécondité, ainsi qu'une longévité et une capacité de vol plus élevées par rapport à *Sitotroga cerealella*, (Olivier, 1789) (Lepidoptera : Tineidae) qui était l'hôte le plus couramment utilisé jusque-là.

Méthodes

Pour éviter toute perte de souche, chacune est doublée avec un décalage de date. Pour optimiser cet élevage, une troisième répétition est stockée dans les mêmes conditions, dans une enceinte climatique en parallèle. Ceci est fait pour parer à tout problème technique qui pourrait tuer les trichogrammes. En effet, les différents stades de développement des trichogrammes ont des sensibilités variables aux écarts climatiques.

Les souches sont conditionnées dans des tubes à hémolyse placés dans un support comportant trois lignes (Figure 2) :

- ✓ la première ligne correspond à la fin du cycle de développement des trichogrammes : "l'inoculum",
- ✓ la seconde représente la première partie du cycle des trichogrammes : "la ponte",
- ✓ la troisième représente "la réserve" des trichogrammes.



Figure 2. Le « Souchier » de trichogrammes (photo : E.Colombel).

Technique d'élevage

Étapes préparatoires

Préparation des tubes d'élevage

Les trichogrammes sont élevés dans des tubes en plastique, et non pas en verre, pour éviter toute dispersion des insectes en cas de chute et de casse du tube. A l'aide d'une aiguille fine, des gouttelettes de miel biologique sont déposées sur la paroi des tubes. Les gouttes de miel doivent être très petites pour empêcher que les trichogrammes ne s'y collent. La disponibilité en miel augmente la longévité des trichogrammes et la fécondité des femelles, ce qui permet un meilleur parasitisme des œufs. Les tubes sont fermés avec du coton afin de permettre les échanges gazeux.

Œufs hôtes : assurer la qualité

Dans un but de simplification de notre chaîne de production, les œufs hôtes sont actuellement achetés. Le lot d'œufs est alors stocké à $T 2 \pm 1^\circ\text{C}$, HR $75 \pm 5\%$ pour assurer sa qualité. Toutefois avant de les utiliser, nous vérifions systématiquement tout risque de contamination accidentelle des œufs reçus. Pour cela, deux échantillons pris au hasard dans le lot d'œufs, à l'aide d'un post-it® servent de contrôle. Ils sont placés dans une enceinte climatique à $T 25 \pm 1^\circ\text{C}$, HR $75 \pm 5\%$ pendant 5 jours (temps nécessaire pour déceler une éventuelle contamination).

Confection des bandelettes en carton

Les bandelettes sont préparées à partir d'une feuille de bristol qui est coupée aux dimensions intérieures du tube d'élevage (0,9 cm x 6 cm).

Elaboration des plaquettes

Dans une salle indemne de tout parasitoïde, les œufs hôtes sont saupoudrés sur la bandelette préalablement encollée avec de la colle à eau non toxique. Les plaquettes ainsi préparées sont mises dans trois boîtes correspondant aux différents jours d'utilisation de la semaine (lundi, mercredi, vendredi). Le fait de séparer la totalité des plaquettes de la semaine en trois boîtes permet une meilleure fiabilité de la qualité des œufs. Après fabrication, les plaquettes sont stockées au froid à $T 2 \pm 1^\circ\text{C}$, HR $75 \pm 5\%$.



Mode opératoire

Préparation de l'inoculum

Environ 15 jours après l'émergence (durée de vie moyenne des trichogrammes à 18°C), un inoculum est préparé. Par précaution, on limite au maximum l'ouverture des tubes quand les trichogrammes sont vivants. On obtient l'inoculum en coupant 10 % de la plaquette d'œufs parasités qu'on introduit dans un nouveau tube propre et préalablement miellé (**Figure 3**). Ce nouveau tube sera placé dans la première ligne du support et les 90 % de la plaquette restante seront mis dans la troisième ligne du support « réserve » qui pourra servir à d'éventuelles expérimentations.

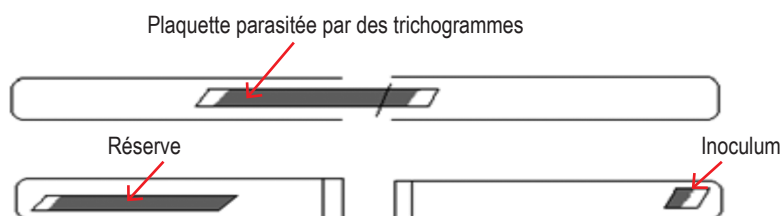


Figure 3. Préparation de l'inoculum.

Mise en ponte

Une plaquette d'œufs d'*E. kuehniella* est introduite dans le tube pour que les femelles puissent pondre (**Figure 4**). La face lisse de l'inoculum et celle de la plaquette sont mises dos à dos pour éviter l'écrasement des œufs et favoriser la sortie des imagos. Ce tube à essai sera placé en seconde ligne du support.

Tous les tubes sont placés dans le support, culot vers la lumière, les trichogrammes ayant un phototropisme positif, pour limiter les risques de fuite des trichogrammes par le bouchon en coton.

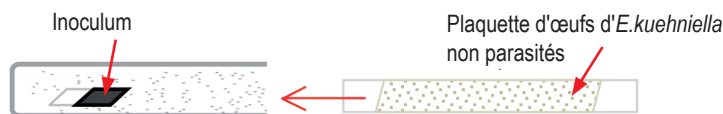


Figure 4. Mise en ponte.

Qualité des trichogrammes

Risques climatiques

Chaque pièce et chaque enceinte climatique est équipée d'un thermo-hygromètre et d'un enregistreur. Alors que le premier permet une lecture directe de la température et de l'humidité, le second permet de conserver les données climatiques pour les éventuelles expérimentations et de connaître en cas de panne, la température à laquelle les trichogrammes ont été exposés.

Risque de mélange

Pour éviter tout risque de mélange, il est indispensable d'ouvrir *a minima* les tubes d'élevage et de les manipuler au fond d'un plateau blanc à bord haut pour repérer rapidement toute fuite d'insecte. Dès la fermeture du tube, il est obligatoire d'essuyer le fond du plateau avec un morceau de coton imbibé d'alcool dans le but d'écraser d'éventuels trichogrammes sortis.

La préparation de l'inoculum est effectuée après la mort des trichogrammes (après 15 jours de vie) afin d'éviter une fuite des parasitoïdes lors du découpage de l'inoculum.

Contrôle qualité

Les trichogrammes étant utilisés dans de nombreux programmes de recherche finalisés et fondamentaux, il est important de disposer de parasitoïdes oophages dont l'espèce et l'origine sont fiables ; c'est-à-dire : la bonne espèce, sans mélange, une bonne qualité physiologique et une origine bien référencée.

Qualité physiologique des souches de trichogramme

Chaque année, dix répétitions de chaque souche de trichogramme du « Souchier » sont contrôlées. Pour cela, dix femelles accouplées sont placées individuellement dans des tubes puis mises en ponte à T 25±1°C, avec HR, 75±5 % et une photopériode de 16 L : 8 D. La fécondité, le taux d'émergence et le sex-ratio des descendants sont étudiés après émergence. Ceci a pour but de vérifier régulièrement la qualité des trichogrammes de l'élevage.

Traçabilité

Le principe général de la traçabilité est l'aptitude à retrouver l'historique et l'origine de chaque souche au moyen d'une identification enregistrée. L'intérêt est d'échanger des informations fiables sur chaque spécimen.

Identité de chaque souche de trichogramme

Un tableau informatisé (**Figure 5**) référence l'identité de chaque souche de trichogramme. Un maximum d'informations qui caractérisent l'origine de la population de trichogramme récoltée est répertorié dans un tableau général. Ce tableau est tenu à jour pour chaque ajout de nouvelles souches ou retrait d'anciennes souches.

Référence souche	Espèce	Reproduction	Auteur	Hôte de piégeage	Plante piégeage	Origine	Localité	Date de récolte	Collecteur	Donateur	Date de donation
ChiSTBen	<i>Trichogramma chilonis</i>	Bisexuée	Ishii	<i>Chilo sacchariphagus</i>	Canne à sucre	Réunion	Sainte Marie	Janvier 98	Fernandez	Goebel	1998

Figure 5. Exemple d'information de l'identité d'une souche : référence de *Trichogramma chilonis*, souche Réunionnaise.

Codification de chaque souche

Pour chaque souche, un code barre spécifique est affecté. Pour les inoculums : le nom de la souche et la date de la dernière ponte sont spécifiées (**Figure 6a**). Pour les pontes, une étiquette spécifique reprend les informations suivantes : le nom de la souche, la dernière date de ponte puis la date du jour (**Figure 6b**).

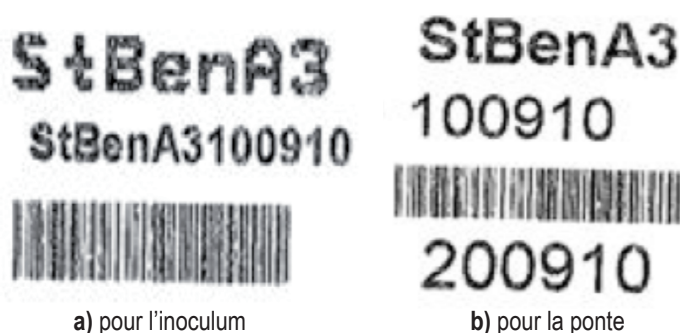


Figure 6. Exemple de code-barres de référence selon le stade.



Caractérisation des souches

Pour chaque souche mise en élevage dans le « Souchier » il est nécessaire de connaître avec certitude l'espèce. Dans un premier temps, c'est la détermination morphologique qui nous renseigne sur le nom de l'espèce. Parallèlement, il est nécessaire d'effectuer une caractérisation moléculaire pour avoir à terme une correspondance d'identification des souches. Le séquençage moléculaire nous permettra alors de pouvoir contrôler régulièrement le « Souchier ».

Préparation des échantillons

Pour chaque souche, les caractérisations morphologiques et moléculaires se font sur des individus apparentés. A partir du tube de réserve, les insectes sont séparés en trois lots, qui vont subir un conditionnement spécifique pour chaque type d'identification.

On utilise le comportement naturel des trichogrammes pour les faire migrer. La migration consiste à prendre le tube, le tenir à la verticale, ouverture vers le haut, et de lui juxtaposer un nouveau tube à hémolyse (**Figure 7**). Sachant que le trichogramme montre un géotropisme négatif (il s'éloigne de la terre) et un phototropisme positif (il est attiré vers la lumière), il migrera vers le nouveau tube.

Les tubes dédiés à la détermination morphologique seront remplis avec de l'alcool à 70 % avec deux gouttes de glycérol. Pour la caractérisation moléculaire, les tubes seront remplis avec de l'alcool absolu puis conservés à -20°C. Pour toutes les souches, un troisième tube rempli d'éthanol absolu sera conservé au congélateur comme référence.

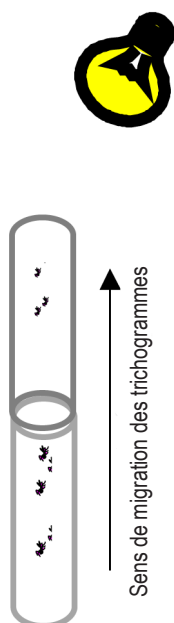


Figure 7. Migration des trichogrammes.

La détermination morphologique

Cette identification des trichogrammes s'appuie sur la reconnaissance de l'appareil génital (*genitalia*) et sur la longueur des soies des antennes des mâles. Deux techniques de montage sont utilisées selon le temps de conservation envisagé :

- ✓ pour une conservation de référence (longue durée), plusieurs bains sont nécessaires dans des produits différents. Afin de les déshydrater au maximum, les trichogrammes sont plongés dans un premier temps dans un bain d'éthanol à 70 % pendant une heure, dans un deuxième temps dans un bain d'éthanol à 90 % puis

dans un bain d'éthanol absolu pendant deux fois une heure. Ils sont ensuite plongés 48 h dans un dernier bain de benzoate de méthyle pour décolorer leur cuticule ;

- ✓ pour la détermination, six trichogrammes mâles sont choisis au hasard parmi la population du tube. Ils sont respectivement placés sur une lame contenant une goutte d'un mélange de baume du Canada et de xylène. La dissection des genitalia et des antennes est effectuée dans cette goutte sous binoculaire à l'aide de minuties. Une fois la dissection réalisée, une lamelle est posée sur les différentes parties disséquées. Les préparations sont alors séchées à 25°C. Ce travail est effectué sous hotte aspirante ;
- ✓ pour une détermination ne nécessitant pas un stockage de longue durée, la dissection se fait directement dans une goutte de liquide de Faure (Coutin, 1990). Une lamelle est également déposée sur les différentes parties disséquées.

La caractérisation moléculaire

Le séquençage moléculaire est un outil d'investigation complémentaire permettant de différencier, par la voie du génome, des souches entre elles.

Lorsqu'on fait un diagnostic moléculaire, on cherche à comparer chez les individus la séquence située à certains endroits particuliers qu'on appelle des marqueurs. La PCR (polymérase chain reaction) va permettre d'amplifier *in vitro* ces marqueurs en quantité importante à partir d'un échantillon d'ADN complexe et peu abondant. Pour cela, on va prélever dans le tube quelques trichogrammes dont on va extraire l'ADN qui sera dénaturé, hybridé puis subira une élongation, selon la technique de la PCR. Les fragments ainsi obtenus subiront une migration par la technique de l'électrophorèse.

L'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée pour séparer les macromolécules (ici les fragments d'ADN) en fonction de leur taille et de leur charge électrique. Les bandes de migration par électrophorèse seront alors envoyées pour le séquençage.

Les séquences d'ADN des différents échantillons sont ensuite comparées les unes aux autres. Le principe est d'aligner les séquences entre elles afin d'en quantifier les similitudes. Les séquences parfaitement alignées feront partie d'un même groupe (espèces génétiquement très proches). Celles qui ne pourront pas s'aligner parfaitement feront partie d'un groupe différent (espèces éloignées).

Caractériser régulièrement notre « Souchier » est nécessaire pour contrôler la fiabilité de nos souches et garantir qu'il n'y a pas eu de contamination.

Conclusion

La collection vivante de trichogrammes est un outil fondamental dans la lutte biologique contre les lépidoptères ravageurs. L'utilisation de ces parasitoïdes oophages est une arme naturelle qui agit avant même que les premiers dégâts occasionnés par les chenilles n'apparaissent. Pour les recherches, il est indispensable que le « Souchier » soit irréprochable tant au niveau de la détermination que de la qualité des trichogrammes. Les insectes sont mis à la disposition de toute la communauté scientifique, aussi bien pour les recherches fondamentales que finalisées.

Remerciements

Nous tenons à remercier Bernard Pintureau pour son initiation à la morphologie des *genitalia* des trichogrammes, ainsi que Patrice Boland pour sa formation à la dissection des trichogrammes et aux différentes techniques de conservation des lames.

Et merci à nos trichogrammes qui ont toujours donné le meilleur d'eux-mêmes et sans qui cet article n'existerait pas.



Références bibliographiques

Daumal J, Voegelé J, Brun P (1975) Les trichogrammes. II : Unité de production massive et quotidienne d'un hôte de substitution *Ephestia kuehniella* Zell. (Lepidoptera, Pyralidae). *Ann Zool Ecol Anim* **7** : 45-59.

Daumal J, Pintureau B, 1985. Etude de la variabilité de la durée du développement chez *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep. Pyralidae). *Acta Oecologica Oecol Applic* **6** : 367-380.

Hawitzky N (1992) La lutte biologique à l'aide de trichogrammes. *Courrier de la cellule environnement INRA* **16** : 11-25.

Pintureau B (2012) Les hyménoptères parasitoïdes oophages d'Europe. Collection « Guide pratique ». Editions Quae, Versailles, 84 p.

Voegelé J, Daumal J, Brun P, Onillon J (1974) Action du traitement au froid et aux ultraviolets de l'œuf d'*Ephestia kuehniella* (Pyralidae) sur le taux de multiplication de *Trichogramma evanescens* et *T. brasiliensis* (Hymenoptera : Trichogrammatidae). *Entomophaga* **19** : 341-348.

Voegelé J, Brun P, Daumal J (1974) Les trichogrammes. I : Modalité de la prise de possession et de l'élimination de l'hôte chez le parasite embryonnaire *Trichogramma brasiliensis*. (Hym. chalcidoidea). *Ann Soc Entomol Fr* **10** : 757-761.

Voegelé J, Stengel M, Schubert G, Daumal J, Pizzol J (1975) Les trichogrammes. V(a) : premiers résultats sur l'introduction en Alsace sous forme de lâchers saisonniers de l'écotype moldave de *Trichogramma evanescens* Westw. contre la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübn. *Ann Zool Ecol Anim* **7** : 535-551.