

Développement d'une méthode de piégeage à base de composés organiques volatils impliqués dans la communication sexuelle chez *Venturia canescens* (Hymenoptera : Braconidae)

Alexandra Auguste¹, Xavier Fauvergue¹

Résumé. Chez une soixantaine d'espèces d'hyménoptères haplo-diploïdes, et parmi elles des espèces d'intérêt comme l'abeille ou encore les parasitoïdes utilisés en lutte biologique, le sexe est déterminé par un seul gène. Les mâles sont haploïdes hémizygotes tandis que les femelles sont diploïdes hétérozygotes. Cependant, les croisements entre individus portant le même allèle au locus de détermination du sexe (sl-csd single-locus complementary sex determination), supposés plus fréquents dans les populations de faible diversité génétique, engendrent une certaine proportion de mâles diploïdes généralement non viables ou stériles. La production de mâles stériles, dans une petite population déjà sujette à la dérive à cause de sa taille, contribue à diminuer son taux d'accroissement. Si d'autres processus démographiques et génétiques s'en mêlent, la population est entraînée dans un vortex d'extinction. Nous avons ici tenté de développer une méthode de piégeage pour échantillonner les mâles dans les populations naturelles d'un parasitoïde de pyrale, *Venturia canescens* et approfondir les connaissances sur la présence de mâles diploïdes dans la nature, peu documentée jusqu'ici. Nous présentons tout d'abord les différentes étapes qui ont abouti à l'extraction des composés organiques volatils produits par les femelles de *V. canescens* et décrits comme fortement attractifs pour les mâles. Nous décrivons dans un second temps les étapes qui ont permis la validation des pièges sur le terrain et enfin nous terminons sur un exemple d'application de ces outils.

Mots clés : phéromone sexuelle, kairomone, parasitoïde, hôte, extraction, échantillonnage, diversité génétique

Introduction

La détermination du sexe chez les insectes a fait l'objet de nombreuses études. Chez les hyménoptères, il semble que le mode ancestral et dominant soit l'haplo-diploïdie où le sexe est expliqué par le nombre de chromosomes de l'individu et non par l'existence de chromosomes sexuels. Les femelles peuvent pondre des œufs non fertilisés par parthénogénèse arrhénotoque (mâles haploïdes) ou des œufs fertilisés par reproduction sexuée (femelles diploïdes) et ainsi ajuster le sexe ratio de leur descendance (**Figure 1a**). Chez 60 de ces espèces d'hyménoptères haplo-diploïdes, le sexe est influencé par la composition allélique à un seul locus. On parle alors de sl-csd (single-locus complementary sex determination). Les individus haploïdes hémizygotes sont mâles tandis que les individus diploïdes hétérozygotes et homozygotes sont respectivement femelles et mâles (**Figure 1b**). Les mâles diploïdes homozygotes sont souvent non viables ou inaptes à la reproduction, soit parce qu'ils ne peuvent pas s'accoupler avec les femelles soit parce qu'ils ne transfèrent pas de sperme (Fauvergue et al., 2015). On devine aisément les conséquences que peut avoir une forte baisse de la diversité génétique de ces populations. La probabilité de s'accoupler entre individus porteurs du même allèle au locus de détermination du sexe augmente et avec elle la production d'individus diploïdes homozygotes non viables ou stériles. Si d'autres processus génétiques (dérive) et démographiques (stochasticité démographique ou effet Allee) s'en mêlent, la population est progressivement entraînée dans un vortex qui peut la mener jusqu'à l'extinction (Zayed et Packer, 2005).

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

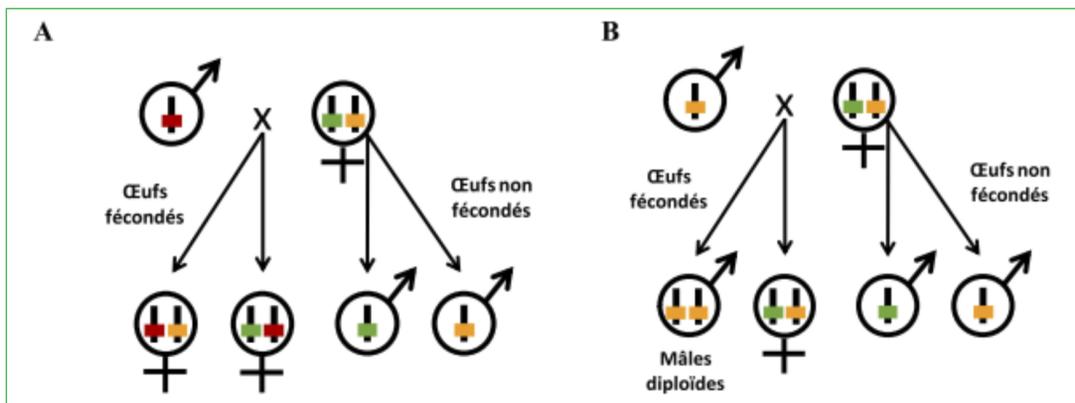


Figure 1. Génotypes au gène du CSD (complementary sex determination) des descendants de parents haplo-diploïdes portant des allèles différents (a) ou portant un allèle en commun (b). Ce dernier cas engendre la production de mâles diploïdes (Vayssade, 2014).

Etant donné le rôle clef que jouent les hyménoptères parasitoïdes dans la régulation des populations de phytophages dans les écosystèmes naturels et les agrosystèmes, on pourrait s'attendre à ce que la présence de mâles diploïdes non viables ou stériles dans les populations naturelles de ces organismes soit bien documentée. Or la proportion de mâles diploïdes dans la nature n'a été mesurée que chez trois espèces : *Cotesia glomerata* (Ruf et al., 2013), *C. rubecula* (Boer et al., 2012) et *C. vestalis* (Boer et al., 2015). Il nous a semblé alors intéressant d'approfondir les connaissances sur la présence et l'abondance des mâles diploïdes dans les populations naturelles d'hyménoptères parasitoïdes. Nous avons donc choisi pour cela de développer une méthode d'échantillonnage permettant d'estimer la proportion de mâles diploïdes dans les populations de *Venturia canescens*, un endoparasitoïde des pyrales de la caroube ; d'une part parce que ce parasitoïde est soumis au sl-csd comme bien d'autres auxiliaires de lutte biologique (Beukeboom, 2001), et d'autre part car la biologie de *V. canescens* est déjà bien décrite dans la littérature scientifique.

Un moyen efficace pour échantillonner les populations naturelles d'insectes consiste à utiliser les composés organiques volatils impliqués dans la communication sexuelle. L'implication des phéromones sexuelles dans la



Figure 2. Femelle de *Venturia canescens* posée sur une feuille de caroubier au Mont Boron, Nice (photo : X. Fauvergue).

localisation du partenaire sexuel à distance est répandue dans le monde animal, y compris chez les insectes parasitoïdes. Généralement, les phéromones sexuelles émises par un individu sont suffisamment efficaces pour induire une réponse comportementale chez les individus conspécifiques de sexe opposé. Peu d'études ont montré que les phéromones sexuelles pouvaient être combinées à d'autres indices environnementaux tels que les synomones émises par les plantes infestées par des phytophages ou encore les kairomones émises par les hôtes (sécrétion mandibulaire déposée lors de l'alimentation par exemple) (McAuslane et al., 1990 ; Benelli et Canale, 2013). *V. canescens* (Figure 2) est une des rares espèces chez qui les mâles utilisent plusieurs sources d'informations olfactives pour localiser leur partenaire sexuel : les phéromones sexuelles émises par les femelles vierges et les kairomones émises par les hôtes. Ces informations olfactives agissent en synergie et augmentent

significativement l'efficacité des mâles lors de la recherche des femelles à distance. En effet, en tunnel de vol, les femelles et les larves d'*Ephestia kuehniella* (ici hôte de substitution) attirent trois fois plus de mâles que les femelles seules. Les hôtes seuls, en revanche, ne sont pas du tout attractifs pour les mâles (Metzger et al., 2010).

Compte tenu de ces informations, les objectifs de notre étude ont été, dans un premier temps, de confirmer l'effet synergique phéromones/kairomones sur l'attraction des mâles dans la nature chez *V. canescens* puis de mettre au point une méthode à base d'extraits de phéromones sexuelles de *V. canescens* et de kairomones d'*E. kuehniella* pour échantillonner les mâles dans les populations naturelles de *V. canescens* et connaître ainsi *a posteriori* la proportion de mâles diploïdes. Nous présenterons ici les méthodes d'extractions des composés organiques volatils impliqués, la validation des pièges sur le terrain puis nous terminerons en décrivant brièvement une application de ces outils.

Effet synergique des informations olfactives *in natura*

Pour tester l'effet synergique des différentes informations olfactives sur l'attraction des mâles de *V. canescens*, nous avons mis en place un plan expérimental à deux facteurs : présence/absence de femelles vierges de *V. canescens* et présence/absence de larves d'*E. kuehniella* dans les pièges. L'élevage d'*E. kuehniella* provient de l'élevage de masse de Bioline, Livron-sur-Drôme, France. Les œufs sont déposés sur de la semoule de blé blanche et fine et sont maintenus dans une chambre de culture à 26 °C, entre 60 et 80 % d'humidité relative et à une photopériode 12 h-12 h. *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera : Ichneumonidae) est un endoparasitoïde solitaire de larves de pyrales telles que *Plodia interpunctella* Hübner, *Ephestia kuehniella* Zeller et *Ephestia elutella* Hübner (Lepidoptera : Pyralidae), ravageurs de denrées stockées causant de grandes pertes économiques. Ce parasitoïde est largement distribué à travers le monde. Il existe deux morphes de *V. canescens* : l'un est rencontré dans les milieux anthropisés (moulins et divers lieux de stockage de denrées, vergers) et se reproduit par parthénogénèse thélytoque (uniquement des filles dans la descendance). Le second, utilisé pour cette étude, se rencontre davantage en milieu naturel où il peut parasiter la pyrale de la caroube *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae), qui infeste également les fruits secs et les fruits à coques (dattes, amandes ...). Les femelles font, comme indiqué précédemment, de la parthénogénèse arrhénotoque pour produire des fils et de la reproduction sexuée pour produire des filles. Au laboratoire, *V. canescens* s'attaque aux individus d'*E. kuehniella* entre le 2^e et le 5^e stade larvaire et sont maintenus dans les mêmes conditions environnementales que les hôtes. Les femelles vierges utilisées comme stimulus sont isolées dans une cage d'élevage dès l'émergence et sont nourries avec une solution constituée de 50 % d'eau et 50 % de miel pendant 48 h. Les expérimentations ont été menées dans une forêt de caroubiers au Mont Boron, à Nice (43°41'29.3"N, 7°18'03.6"E), où l'on peut rencontrer des populations naturelles de *V. canescens* arrhénotoques.

Les pièges sont constitués d'une plaque jaune engluée de 20 cm de diamètre où sont collés : i/ 50 g de semoule contenant des larves d'*E. kuehniella*, ii/ 50 g de semoule contenant des larves d'*E. kuehniella* et trois femelles vierges de *V. canescens*, iii/ trois femelles vierges de *V. canescens* et iiiii/ piège ne contenant ni hôtes ni femelles de *V. canescens* (**Figure 3**). Ces quatre combinaisons de niveaux de traitement constituent un bloc qui au total a été répété 49 fois sur 12 jours répartis entre le 22 juillet et le 2 octobre 2011. Pour chacun des blocs, les quatre types de piège sont accrochés dans un arbre à une distance minimale de 1 m les uns des autres, et sont laissés ainsi pendant 2 jours. Le nombre de mâles capturés pour chacun des pièges est noté (**Figure 4**). Etant donné la nature de nos données, l'effet des phéromones et des kairomones, seules ou combinées, a été analysé par un modèle linéaire généralisé (loi de Poisson) avec le logiciel R.





Figure 3. Le piège constitué d'une plaque ronde, jaune et engluée de 20 cm de diamètre, contient 50 g de semoule infestée de larves d'*Ephestia kuehniella* et trois femelles vierges vivantes de *Venturia canescens* (photo : X. Fauvergue).



Figure 4. Mâle de *Venturia canescens* capturé sur une plaque jaune engluée (photo : X. Fauvergue).

Au total, 92 mâles ont été capturés, dont 74 sur les pièges contenant des femelles et des hôtes et 15 sur les pièges contenant uniquement des femelles. Comme au laboratoire, très peu d'individus ont été capturés sur les pièges contenant les hôtes seuls et sur les pièges servant de contrôle (respectivement 1 et 2 individus). Les analyses statistiques des données effectuées à l'aide de modèle linéaire généralisé montrent que la présence concomitante des femelles de *V. canescens* et des hôtes sur les pièges a bien un effet significatif sur le nombre de mâles capturés (respectivement $ddl = 206$; $Pr(Chi) < 2.2 \times 10^{-16}$ et $ddl = 206$; $Pr(Chi) < 9.662 \times 10^{-10}$) (Figure 5).

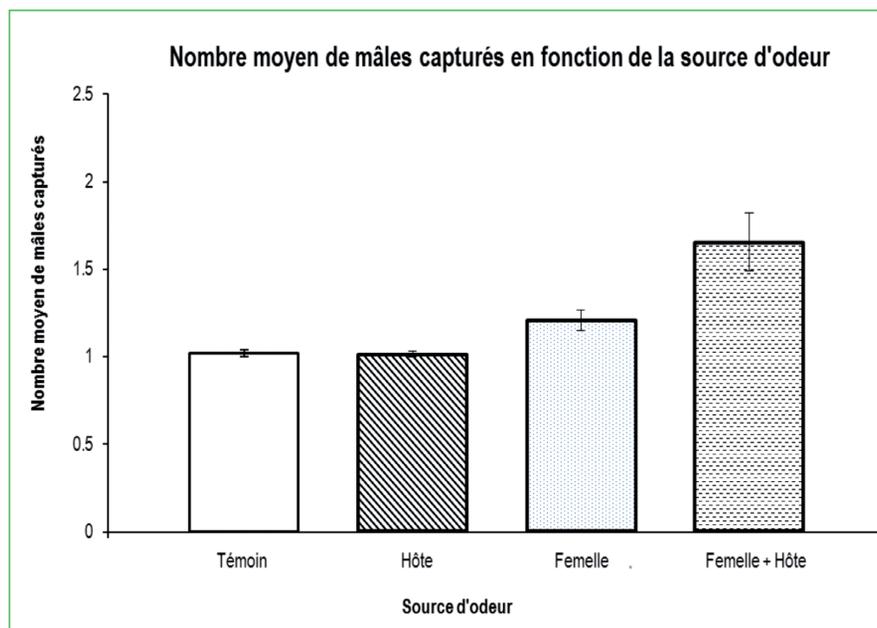


Figure 5. La figure représente le nombre moyen de mâles capturés dans la forêt du Mont Boron en fonction du contenu du piège utilisé.

Cependant, nous n'avons pas pu détecter d'effet synergique entre ces deux sources d'odeurs ($ddl = 205$, $Pr(Chi) = 0,06767$). Nos résultats tendent à montrer que les mâles de *V. canescens* combinent bien différentes sources d'informations, un signal (phéromones sexuelles émises par les femelles vierges conspécifiques) et un indice

environnemental (kairomones émises par les hôtes) pour localiser leurs partenaires sexuels. La densité de population de *V. canescens* est très faible au Mont Boron. Une étude de Schneider et al. (Schneider et al., 2003) a montré que seules 9 % des caroubes disséquées étaient infestées par en moyenne une larve de pyrale et moins de 3 % de ces pyrales étaient parasitées par *V. canescens*. Il est possible que le petit nombre de parasitoïdes capturés lors de notre campagne d'échantillonnage n'ait pas permis de mettre en évidence une interaction significative entre les deux facteurs. Cependant, même en l'absence d'interaction, nos résultats proches de ceux obtenus au laboratoire permettent de valider *in natura* l'efficacité des pièges.

L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle nécessite le transport de matériel biologique vivant sur le terrain. Il est alors difficile d'organiser des missions de longue durée car il est probable qu'une partie des individus meurent avant d'être utilisés. De plus, malgré nos précautions, quelques larves d'*E. kuehniella* pourraient parvenir à s'échapper des pièges et seraient ainsi introduites accidentellement dans la nature. Enfin, le stress subi par les parasitoïdes et les hôtes au moment de la pose sur le piège peut diminuer l'efficacité de ces derniers (via la production de phéromones d'alarmes par les individus stressés par exemple). Pour remédier à tous ces problèmes, nous avons choisi de travailler avec les extraits de phéromones et de kairomones.

Méthode de piégeage à base d'extraits de phéromones sexuelles et de kairomones

Le piégeage à base d'extraits de phéromones est largement répandu, notamment dans le cadre d'actions de management des populations de phytophages. Cette méthode est davantage utilisée pour détecter les infestations que pour réguler les populations bien établies. Les pièges sont par exemple décrits comme une mesure raisonnable de protection contre le scolyte du pin *Ips typographus* (Wermelinger, 2004). Une autre étude montre que les pièges à phéromones ont diminué de 50 % l'expansion des populations de *Lymantria dispar* aux Etats unis en permettant la détection de colonies isolées (Sharov et al., 2002). De Lury et al., en 1999 ont suggéré que les phéromones sexuelles d'*Ascogaster quadridentata* peuvent améliorer le contrôle des populations de *Cydia pomonella*, le carpocapse du pommier, en permettant de détecter la présence de parasitoïdes et ainsi d'augmenter les chances de capture (en vue d'une introduction future). L'extraction des composés volatils contenus dans le bouquet phéromonal est donc une méthode bien connue. Notre objectif se distingue légèrement dans la mesure où notre extrait doit contenir à la fois les phéromones sexuelles de *V. canescens* et les kairomones d' *E. Kuehniella*.

Dans un premier temps, nous procédons à l'extraction des kairomones des hôtes. Cinquante grammes de semoule de blé contenant des larves d'*E. kuehniella* au 4^e stade larvaire sont trempés dans 100 mL d'hexane, à température ambiante, pendant 45 min. Les extraits sont ensuite filtrés et stockés à - 20 °C. Des femelles vierges de *V. canescens* âgées de 48 h sont endormies au congélateur pendant 1 min 30 s. Chaque femelle est ensuite plongée dans une fiole en verre de 2 mL à bouchon en téflon, contenant 100 µL d'extrait de kairomones. Les fioles sont rebouchées et laissées à température ambiante pendant 3 h. Les femelles sont ensuite retirées des fioles, qui sont stockées à l'obscurité, à - 20 °C, jusqu'à utilisation.

Pour tester l'efficacité de la mixture kairomones/phéromones sur l'attraction des mâles de *V. canescens in natura*, nous avons mis au point une expérimentation ayant pour unique facteur le type de piège présenté (insectes vivants, extraits, contrôle). Les pièges étaient constitués d'une plaque jaune collante sur les deux faces (125 × 200 mm) où étaient collés : i/ 20 g de semoule infestée de larves d'*E. kuehniella* au 4^e stade larvaire et une femelle vierge de *V. canescens* âgée de 48 h, ii/ d'une fiole contenant 100 µL d'extrait de kairomones d'*E. kuehniella* et de phéromones d'une femelle vierge de *V. canescens* et iii/ un contrôle (ni extrait, ni insectes) (**Figure 6**). Chaque bloc a été répété 54 fois sur 5 jours répartis entre le 16 août et le 18 septembre 2012. Les pièges ont été, comme précédemment, placés à 1 m les uns des autres dans les arbres, entre 50 et 150 cm de hauteur. Les extraits commencent à être attractifs dès que la totalité de l'hexane s'est évaporée, soit environ une demi heure après la pose. Les pièges ont été laissés sur place pendant 48 h. Les mâles capturés sur chaque piège ont été comptés puis stockés dans l'éthanol 96 %, à - 20 °C.





Figure 6. Piège collant où est fixée une fiole contenant 100 μ L d'extrait de kairomones de larves d'*Ephesia kuehniella* et de phéromones sexuelles de *Venturia canescens* (photo : A. Auguste).

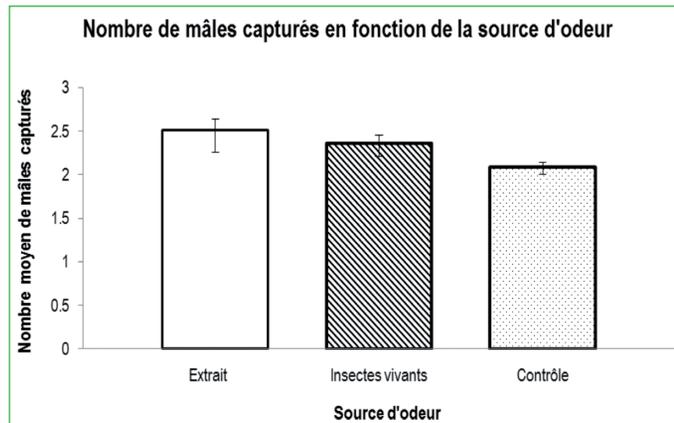


Figure 7. Le graphe ci-dessus représente le nombre moyen de mâles de *Venturia canescens* capturés par un piège au Mont Boron en fonction de la source d'odeur utilisée.

Les résultats obtenus démontrent l'existence d'un effet du type de piège utilisé sur le nombre de mâles capturés ($ddl = 131$, $Pr(\text{Chi}) = 7.916 \times 10^{-05}$). En effet, les pièges contenant les insectes vivants et les pièges contenant les extraits permettent de capturer plus de mâles que les pièges témoins (respectivement 19 et 29 versus 5) ($ddl = 129$, $Pr(>|z|) = 0.007906$ et $Pr(>|z|) = 0.000283$). Ce qui nous intéresse particulièrement ici, c'est l'absence de différence entre le nombre de mâles capturés avec les insectes vivants d'une part et le nombre de mâles capturés avec les extraits d'autre part. En effet, pour être efficaces, les pièges avec extraits doivent être au moins aussi attractifs que les pièges contenant les insectes vivants. Nos résultats montrent que les extraits sont au moins aussi attractifs que les insectes eux-mêmes ($ddl = 86$, $Pr(>|z|) = 0.1519$) (**Figure 7**). Les pièges développés nous ont donc semblé suffisamment efficaces pour échantillonner les populations naturelles et ainsi tester des hypothèses en biologie des populations de *V. canescens*.

Relation entre le type d'habitat, la diversité génétique et la proportion de mâles diploïdes

En l'absence de flux de gènes, il est probable que les petites populations isolées d'hyménoptères parasitoïdes pratiquant le *sl-csd* possèdent une faible diversité génétique, y compris au locus de détermination du sexe. Par conséquent, la probabilité pour qu'un individu s'accouple avec un autre individu portant le même allèle au locus *csd* augmente. Les petites populations isolées devraient donc présenter une proportion importante de mâles diploïdes comparées aux populations de grande taille et de plus grande richesse allélique (apport régulier de nouveaux allèles par migration). Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché à comparer la proportion de mâles diploïdes dans des populations de *V. canescens* appartenant à différents habitats (populations continentales, insulaires et captives). Notre prédiction était que la proportion de mâles diploïdes devrait être moins importante : i/ dans les populations continentales que dans les populations insulaires et ii/ dans les populations insulaires que dans les populations captives. Nous avons donc utilisé les pièges à phéromones décrits précédemment pour échantillonner les mâles dans des populations continentales (France et Espagne) et insulaires (Crète, Sicile, Majorque, Malte, Chypre, Corse et Porquerolles) entre 2011 et 2013 (18 localités au total). Les individus des populations captives provenaient de trois élevages différents. Au total, 11 populations ont été échantillonnées et 627 mâles ont été capturés et génotypés à l'aide de marqueurs microsatellites. Comme attendu, les proportions

de mâles diploïdes sont en moyenne plus importantes dans les populations captives et dans les populations insulaires (jusqu'à respectivement 16 % et 14 %) que dans les populations continentales (jusqu'à 6 %). Nos résultats démontrent bien l'existence d'une relation entre la proportion de mâles diploïdes, la diversité génétique de la population et la taille de l'habitat. Plus l'habitat est petit et isolé, plus la diversité génétique aux marqueurs microsatellites est faible et la proportion de mâles diploïdes importante. La diversité génétique au locus *csd* et la diversité génétique aux marqueurs microsatellites étant concomitantes, la proportion de mâles diploïdes dans une population d'hyménoptères parasitoïdes pourrait être un bon indicateur de la diversité génétique des populations. Notre étude suggère que les petits organismes, tels que les insectes, peuvent eux aussi souffrir de la destruction et de la fragmentation de l'habitat (Collet et al., 2016).

Références bibliographiques

- Benelli G, Canale A (2013) Do tephritid-induced fruit volatiles attract males of the fruit flies parasitoid *Psytalia concolor* (Szepligeti) (Hymenoptera : Braconidae)? *Chemoecology* **23** : 191-199.
- Beukeboom LW (2001) Single-locus complementary sex determination in the ichneumonid *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera). *Neth J Zool* **51** : 1-15.
- Boer JG, Kuijper B, Heimpel GE, Beukeboom LW (2012) Sex determination meltdown upon biological control introduction of the parasitoid *Cotesia rubecula*? *Evol Appl* **5** : 444-454.
- Boer JG, Groenen MA, Pannebakker BA, Beukeboom LW, Kraus RH (2015) Population-level consequences of complementary sex determination in a solitary parasitoid. *BMC Evol Biol* **15**, doi :10.1186/s12862-015-0340-2
- Collet M, Vayssade C, Auguste A, Mouton L, Desouhant E, Malausa T, Fauvergue X (2016) Diploid male production correlates with genetic diversity in the parasitoid wasp *Venturia canescens*: A genetic approach with new microsatellite markers. *Ecol Evol* **6** : 6721-6734.
- DeLury NC, Gries G, Gries R, Judd GJR, Brown JJ (1999) Sex pheromone of *Ascogaster quadridentata*, a parasitoid of *Cydia pomonella*. *J Chem Ecol* **25** : 2229-2245.
- Fauvergue X, Chuine A, Vayssade C, Auguste A, Desouhant E (2015) Sterile males in a parasitoid wasp with complementary sex determination : from fitness costs to population extinction. *BMC Ecol* **15**.
- McAuslane HJ, Vinson SB, Williams HJ (1990) Influence of host plant on mate location by the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Environ Entomol* **19** : 26-31.
- Metzger M, Fischbein D, Auguste A, Fauvergue X, Bernstein C, Desouhant E (2010) Synergy in information use for mate finding : demonstration in a parasitoid wasp. *Anim Behav* **79** : 1307-1315.
- Ruf D, Dorn S, Mazzi D (2013) Unexpectedly low frequencies of diploid males in an inbreeding parasitoid with complementary sex determination. *Biol J Linnean Soc* **108** : 79-86.
- Schneider MV, Driessen G, Beukeboom LW, Boll R, van Eunen K, Selzner A, Talsma J, Lapchin L (2003) Gene flow between arrhenotokous and thelytokous populations of *Venturia canescens* (Hymenoptera). *Heredity* **90** : 260-267.
- Sharov AA, Leonard D, Liebhold AM, Clemens NS (2002) Evaluation of preventive treatments in low-density gypsy moth populations using pheromone traps. *J Econ Entomol* **95** : 1205-1215.
- Vayssade C (2014) Interaction entre démographie et génétique dans les petites populations : études sur un hyménoptère parasitoïde avec incompatibilités génétiques. Thèse de Doctorat.
- Wermelinger B (2004) Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* - a review of recent research. *Forest Ecol Manag* **202** : 67-82.
- Zayed A, Packer L (2005) Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proc Natl Acad Sci* **102** : 10742-10746.

