

## Un outil moléculaire simple et abordable pour identifier les larves de taupins du genre *Agriotes*

Frédérique Mahéo<sup>1</sup>, Jörn Lehmus<sup>2</sup>, Philippe Larroudé<sup>3</sup> et Ronan Le Cointe<sup>1</sup>

Mahéo Frédérique

[frederique.maheo@inrae.fr](mailto:frederique.maheo@inrae.fr)



Technicienne de recherche en biologie moléculaire au sein de l'UMR IGEPP à Rennes depuis 2010, je réalise des analyses de génotypage par microsatellites et de typage de symbiotes sur des insectes et plus particulièrement des pucerons. Mon travail s'inscrit dans des projets de recherche qui visent à comprendre les mécanismes d'adaptation des insectes à leur environnement.

Le Cointe Ronan

[ronan.le-cointe@inrae.fr](mailto:ronan.le-cointe@inrae.fr)



Assistant ingénieur en épidémiologie végétale au sein de l'UMR IGEPP à Rennes depuis 2011, mon activité scientifique se situe au niveau du couplage entre modélisation et expérimentation végétale sur des thématiques scientifiques telles que l'épidémiologie et l'agro-écologie et a pour finalité la conception de méthodes innovantes et durables en protection des cultures permettant une réduction significative de l'utilisation des pesticides.

**Résumé.** Dans cet article, nous décrivons une méthode d'identification des larves de taupins du genre *Agriotes* (coléoptère, Elateridae) par PCR multiplexe. Depuis une quinzaine d'années, nous observons une recrudescence de dégâts dus aux larves de taupins. En France, les dégâts sont principalement causés par quatre espèces : *A.sordidus*, *A.lineatus*, *A.obscurus* et *A.sputator*. Ces trois dernières espèces sont particulièrement difficiles à différencier au stade larvaire alors que leur cycle biologique et leur nuisibilité diffèrent potentiellement. C'est dans

---

<sup>1</sup> IGEPP, INRAE, Agro campus Ouest, Université de Rennes 1, 35650 Le Rheu, France  
[ronan.le-cointe@inrae.fr](mailto:ronan.le-cointe@inrae.fr)

<sup>2</sup> Julius Kühn Institute, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Germany

<sup>3</sup> ARVALIS, Institut du végétal, 21, chemin de pau 64121 MONTARDON, France

ce contexte que nous avons modifié une méthode d'identification des espèces d'*Agriotes* par PCR multiplexe en utilisant les amorces précédemment développées par un laboratoire autrichien. Les principales modifications concernent la méthode d'extraction et la mise au point du mélange réactionnel. Ce travail permet de proposer un service d'identification des larves d'*Agriotes* rapide et à coût réduit qui fait défaut actuellement en France.

**Mots-clés** : insecte, identification, taupins, *Agriotes*, PCR multiplexe

**Abstract.** Here, we describe a polymerase chain reaction (PCR)-based approach to identify click beetle larvae within the genus *Agriotes* (Coleoptera: Elateridae) commonly known as wireworms. Since 15 years, damages due to wireworms within the genus *Agriotes* have significantly upsurged on several crops. From the four main species occurring in France (*A.sordidus*, *A. lineatus*, *A. obscurus* and *A. sputator*), the last three are very difficult to morphologically identify in their larval stage. It is in this context that we have modified a method of identifying *Agriotes* species by Multiplex PCR using the primers previously developed by an Austrian laboratory. The main modifications involve the extraction method and the development of the reaction mixture. This work makes it possible to offer a rapid and low-cost identification service for larvae of *Agriotes* which is currently lacking in France.

**Keywords:** insect, identification, click-beetle, *Agriotes*, PCR-Multiplex

## Introduction

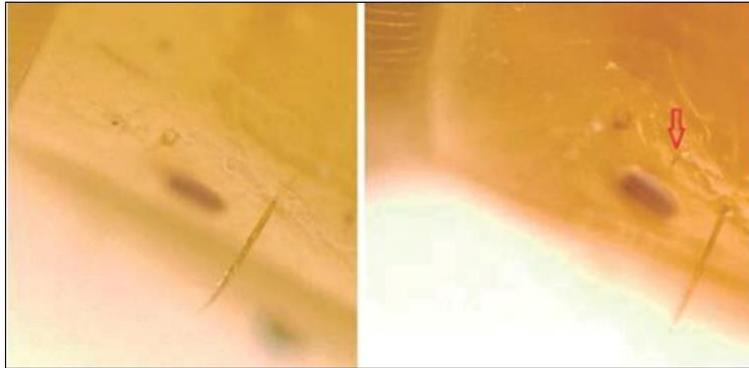
Les taupins ont été reconnus comme des ravageurs importants des cultures dès la fin du XIXème siècle (Balachowski and Mesnil, 1935). En 1912, Truffaut les considère comme les ravageurs les plus nuisibles aux grandes cultures à une époque où l'arsenal chimique développé dans le courant des années 1960-1990 n'était pas encore disponible. Depuis une vingtaine d'années, les dégâts dus aux larves de taupins ont ré-émergé comme préoccupation majeure du monde agricole (Poggi *et al.*, 2018).



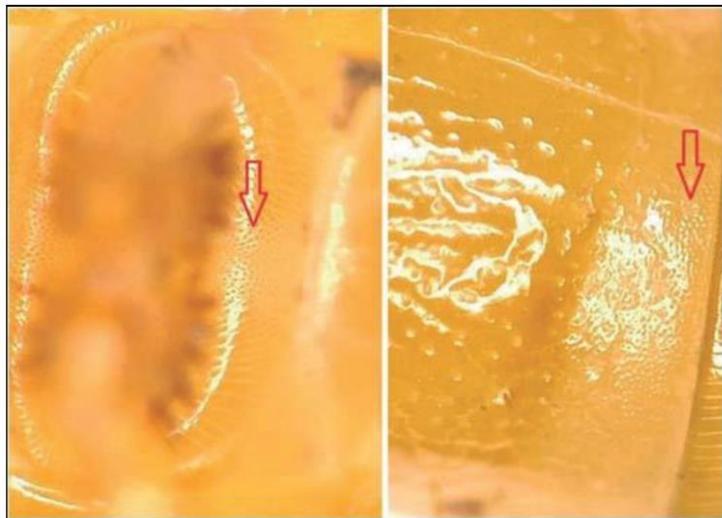
**Photo 1.** Larve d'*Agriotes* (photo : R. Le Cointe)

## Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020 (102)

En France, l'essentiel des dégâts causés est principalement dû à quatre espèces du genre *Agriotus* : *A.sordidus*, *A.lineatus*, *A.obscurus* et *A.sputator* (Larroudé, 2015). Ces trois dernières espèces sont très difficiles à différencier morphologiquement au stade larvaire sur des critères très spécifiques (voir Photo 2 et 3) mais aussi variables.



**Photo 2.** Soies au-dessus des stigmates d'*A. Lineatus* (à gauche) et d'*A. Obscurus* (à droite). Hormis les grandes soies à droite du stigmat, on trouve des soies assez petites, parfois tronquées au-dessus des stigmates chez *A. obscurus* et *A. sputator*. Ces soies sont supposées être absentes chez *A. lineatus* selon COCQUEMPOT et al. (1999). (photo : J. Lehmus).



**Photo 3.** Les granulations entre les jambes (à gauche) et à la base des segments abdominaux (à droite) permettent d'identifier *A.sputator*. (photo : J. Lehmus).

Récemment, Jörn Lehmus et Franck Niepold ont montré les limites des caractères morphologiques décrits par Coquempot et al., 1999 et Klausnitzer (1994) même pour des larves issues d'élevage. L'identification devient encore plus difficile avec des larves collectées sur le terrain car celles-ci peuvent être abimées, avec des soies manquantes ou des mandibules usées (voir tableau 1).

Tableau 1. Fréquence des individus non-identifiables ou « aberrants » caractères morphologiques décrits par Coquempot *et al.*, 1999 et Klausnitzer, 1994.

Espèces <sup>(1)</sup>	Origine	Année	NB	Pourcentage de spécimens non-identifiables selon KLAUSNITZER, 1994 <sup>(2)</sup>	Pourcentage de spécimens "Aberrants" selon COCQUEMPOT <i>et al.</i> , 1999 <sup>(3)</sup>
<i>A. obscurus</i>	Bärau (CH)	2013	44	2.3%	15.9%
<i>A. obscurus</i>	Suderburg (DE)	2014	52	36.5%	13.5%
<i>A. obscurus</i>	Braunschweig (DE)	2013	200	39.5%	9.0%
<i>A. obscurus</i>	Braunschweig (DE)	2014	51	43.1%	7.8%
<i>A. lineatus</i>	Zürich (CH)	2014	22	18.2%	13.6%
<i>A. lineatus</i>	Braunschweig (DE)	2013	200	28%	6.5%
<i>A. sputator</i>	Braunschweig (DE)	2013	200	21.5%	2.0%

<sup>(1)</sup> Les individus sont issus de la mise en élevage d'imagos collectés au champ dont l'identification morphologique est beaucoup plus simple grâce à la clé de détermination de Lohse, 1979.

<sup>(2)</sup> Quand le spécimen n'ouvre pas les mandibules ou que les mandibules sont trop abrasées, l'angle de la dent de remplacement par rapport à l'extrémité de la mandibule ne peut être examiné.

<sup>(3)</sup> Un spécimen est dit « aberrant » dans les cas suivants. *A. sputator* : faibles granulations à la base des segments abdominaux ou entre les pattes. *A. obscurus*: deuxième soie extrêmement petite, presque invisible dans tous les segments ou manquante dans plusieurs segments. *A. lineatus*: présence de petite deuxième soie dans tous les segments abdominaux.

Ceci est problématique car leur cycle biologique et donc leur nuisibilité diffèrent potentiellement selon les conditions du milieu et leur stade de développement (Furlan, 2004, 1996). A titre d'exemple, Lorenzo Furlan a établi les seuils de nuisibilité pour les espèces présentes en Italie (Furlan, 2014), ces seuils sont de 2.5 larves par piège appât pour *Agriotes brevis* (espèce présente dans le sud de l'Europe : Italie, Autriche, Slovaquie) et de 5 larves par piège appât pour *Agriotes sordidus* alors que André Chabert et Yves Blot situaient en 1993 à 0.5 larves par piège appât le seuil pour le genre *Agriotes* sans préciser l'espèce (Chabert and Blot, 1992). Ceci peut expliquer pourquoi il est parfois difficile de lier les niveaux d'infestation avec les dégâts.

C'est dans ce contexte que nous avons modifié une méthode d'identification des espèces d'*Agriotes* par PCR multiplexe en utilisant les amorces précédemment développées par un laboratoire autrichien (Staudacher *et al.*, 2010). Les principales modifications concernent la méthode d'extraction et la mise au point du mélange réactionnel. Ce travail permet de proposer un outil d'identification des larves d'*Agriotes* rapide et à coût réduit qui fait défaut actuellement en France.

# Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020 (102)

## Matériel et méthodes

### Origine des larves d'*Agriotes*

Des larves des quatre principales espèces d'*Agriotes* présentes en France ont été utilisées (*A.sordidus*, *A.lineatus*, *A.obscurus* et *A.sputator*) pour la mise au point de l'outil d'identification moléculaire. Les larves d'*A.sputator* et d'*A. obscurus* sont d'origine allemande issues de l'élevage du Julius Kühn Institut, les larves d'*A. lineatus* sont d'origine française (Le Rheu, Bretagne) et issues de l'élevage de INRAE IGEPP et les larves d'*A.sordidus* sont issues des essais mis en place par Arvalis dans le sud de la France et préalablement identifiées grâce au concours de M. PUISSANT du Muséum d'Histoire Naturelle de Dijon.

### L'extraction de l'ADN

La méthode précédemment utilisée pour extraire l'ADN des larves de taupins impliquait l'utilisation de WLB (Worm Lysis Buffer). Développé pour extraire l'ADN de nématodes, ce tampon de lyse contient notamment du  $\beta$ -mercaptoéthanol, une substance très toxique. Ici, nous avons préféré adapter une méthode initialement développée pour extraire l'ADN de pucerons (Sunnucks and Hales, 1996) avec un tampon de lyse contenant du TNES (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 400 mM, EDTA 20 %, SDS 0,5 %) et de la protéinase K.

Les trois premiers segments abdominaux de chaque larve de taupin ont été prélevés pour l'extraction d'ADN. Dans une plaque 96 puits de 0,8 mL, nous disposons des billes de verre, 300  $\mu$ L de TNES, 6  $\mu$ L de protéinase K (5 mg/mL) et les tissus prélevés sur chaque larve. Les tissus sont ainsi broyés à l'aide d'un mélangeur à peinture pendant cinq minutes et mis à incuber à 37°C pendant une nuit.

Après incubation, les protéines sont précipitées avec 85  $\mu$ L de NaCl 5M et centrifugées à 14 000 tr / min pendant 30 min. Ensuite l'ADN contenu dans le surnageant a été prélevé et précipité avec un volume d'éthanol à 100 %.

L'ADN est ensuite lavé une fois dans de l'éthanol à 70 %, séché à l'aide d'un SpeedVac et resuspendu dans 50  $\mu$ L d'eau ultra pure. Les concentrations d'ADN, mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000), sont comprises entre 30 et 400 ng/ $\mu$ L.

### La PCR et l'électrophorèse sur gel d'agarose

#### Le mélange réactionnel

Dans la publication de Staudacher *et al.*, 2010, le mélange réactionnel est constitué d'un kit PCR de la marque Qiagen, ce kit étant très coûteux (notamment la taq 0,70 € l'unité pour la taq Qiagen contre 0,09 € l'unité pour la taq Hotstart de Promega) nous avons choisi de mettre au point notre propre mélange réactionnel.

## Frédérique Mahéo, Jörn Lehmus, Philippe Larroudé et Ronan Le Cointe

Dans un volume de 10  $\mu$ L, nous déposons 1,5  $\mu$ L d'ADN, 0,1  $\mu$ L (10 $\mu$ M) de chaque oligonucléotide publié dans Staudacher *et al.*, 2010 (voir tableau 2), 0,1  $\mu$ L de Taq, 0,8  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,6  $\mu$ L de dNTP (10mM), 2  $\mu$ L de tampon de charge (fourni avec l'enzyme), et le complément en eau ultra-pure stérile.\*

**Tableau 2. Couples d'amorces spécifiques pour chaque espèce recherchée.** Une amorce est utilisée pour 2 espèces (Agr-obs/lin/pro-A213) mais l'amplification reste spécifique grâce à la 2ème amorce du couple.

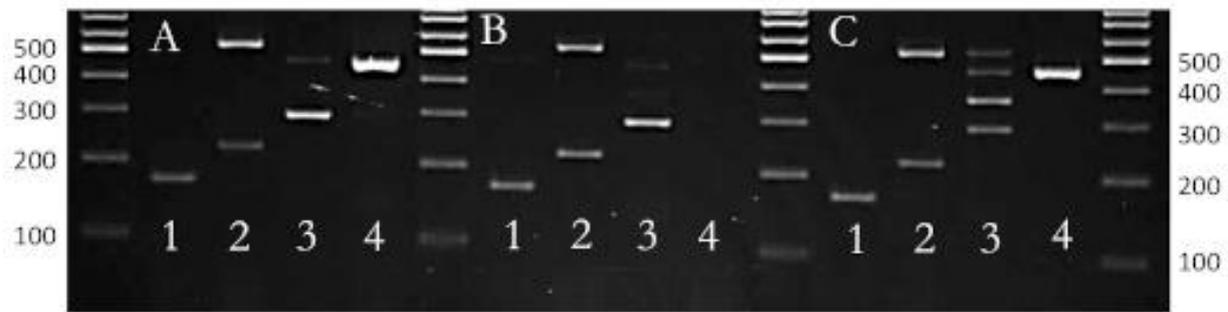
Espèce cible	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Taille du fragment obtenu (en paires de bases)
<i>Agriotes sputator</i>	Agr-gen-S212	AGATTTACAATGTTATTGTAACAGCA	168 pb
	Agr-bre/spu-A215	AAGGTGGAAGAAATCAAAATCTC	
<i>Agriotes sordidus</i>	Agr-sor-S213	GGTATTTCTTCTATTCTTGGTGCT	225 pb
	Agr-sor-A216	AGGGTCTCCTCCCCC	
<i>Agriotes lineatus</i>	Agr-lin/pro-S211	CCCCTTCCCTCTCCCTG	293 pb
	Agr-obs/lin/pro-A213	TGCTAAGACAGGTAAGCATAAAAGA	
<i>Agriotes obscurus</i>	Agr-obs-S215	GAAATGACCAGATCTACAATGTTATC	464 pb
	Agr-obs/lin/pro-A213	Voir ci-dessus	

### Le protocole d'amplification

Nous reprenons ici le protocole publié dans Staudacher *et al.*, 2010. Il comprend une première phase d'activation de la Taq de 15 minutes à 95°C, suivie par 35 cycles de 30 s à 94°C, 90 s à 61°C, 60 s à 71°C et une phase finale à 72°C pendant 10 minutes.

### L'électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits PCR obtenus sont déposés sur un gel d'agarose à 2,5 % coloré à l'aide de colorant Thermofisher SYBR® Safe DNA Gel Stain (1 goutte pour 50 mL) et migrés par électrophorèse à 140 V pendant 90 min. Les bandes produites sont ensuite visualisées sous lumière bleue. Leurs tailles sont évaluées à l'aide du marqueur de taille 100 pb DNA Ladder (Solis Biodyne).



**Figure 1.** Produits de la PCR multiplexe des quatre espèces d'*Agriotes*. Les lettres majuscules désignent les réplicats, les chiffres sur les côtés désignent la taille des fragments de l'échelle de poids moléculaire (en pb) et les chiffres blancs désignent chaque espèce : (1) *A. sputator*, 168pb (2) *A. sordidus*, 225 et 530pb (3), *A. lineatus*, 293pb et (4) *A. obscurus*, 464pb.

### Résultats

La figure 1 montre les produits de la PCR multiplexe des quatre espèces travaillées dans cette étude. Les lettres majuscules désignent les réplicats, les chiffres sur les côtés désignent l'échelle de taille des fragments amplifiés et les chiffres blancs désignent chaque espèce : (1) *A. sputator*, 168pb (2) *A. sordidus*, 225 et 530pb (3), *A. lineatus*, 293pb et (4) *A. obscurus*, 464pb.

Nous notons que si la méthode est répétable pour les espèces *A. sputator* et *A. sordidus*, nous observons parfois des bandes multiples en présence d'*A. lineatus* en plus de la bande à 293pb caractéristique d'*A. lineatus* (Fig 2 . Réplicat C). En présence d'*A. obscurus* (Fig 2. Réplicat B), nous observons parfois une absence d'amplification. Ceci est conforme aux résultats précédemment obtenus par le laboratoire ayant généré les couples d'amorces (communication personnelle : Christiane Zeisler, Innsbruck).

### Conclusion

Dans cet article, nous décrivons une méthode d'identification des larves de taupins du genre *Agriotes* par PCR multiplexe. Ce travail permet de proposer un service d'identification des larves d'*Agriotes* rapide et à coût réduit qui fait défaut actuellement en France. L'identification moléculaire via du séquençage et des méthodes de barcoding revient quant à elle aux alentours de 25 € par individu. Ici, notre méthode revient à environ 5 € l'échantillon. Cette méthode rend plus accessible l'identification des larves de taupins présentes dans les parcelles et permettra, à l'avenir, de définir les seuils d'intervention spécifiques à chaque espèce.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA).



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les

auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Le Cahier des Techniques de l'Inra », la date de sa publication et son URL).

## Bibliographie

- Balachowski A., Mesnil L., (1935) Les taupins, in: Tome I "Les Insectes Nuisibles Aux Plantes Cultivées : Leurs mœurs, leur destruction, traité d'entomologie agricole concernant la France, la Corse, l'Afrique du Nord et les régions limitrophes, Paris, 754–787.
- Chabert A., Blot Y. (1992) Estimation des populations larvaires de taupins par un piège attractif, *Phytoma* 436, 26–30.
- Coquempot C., Martinez M., Courbon R., Blanchet A., Caruhel P. (1999) Nouvelles données sur l'identification des larves de taupins (Coleoptera : Elateridae) : une aide à la connaissance biologique et à la cartographie des espèces nuisibles. In: ANPP—5ème conférence internationale sur les ravageurs en agriculture, ANPP, Montpellier, 477–486.
- Furlan L. (2014) IPM thresholds for Agriotes wireworm species in maize in Southern Europe, *Journal of Pest Science* 87, 609–617. doi:10.1007/s10340-014-0583-5
- Furlan L. (2004) The biology of Agriotes sordidus Illiger (Col., Elateridae), *Journal of Applied Entomology* 128(9-10), 696–706. doi:10.1111/j.1439-0418.2004.00914.x
- Furlan L. (1996) The biology of Agriotes ustulatus Schaller (Col., Elateridae). I. Adults and oviposition, *Journal of Applied Entomology* 120(1-5), 269–274. doi:10.1111/j.1439-0418.1996.tb01605.x
- Klausnitzer B. (1994) Elateridae., in: Klausnitzer, B. (Ed.) Die Käfer Mitteleuropas, Larven2 (L2): Myxophaga, Polyphaga1. Krefeld, Goecke & Evers, 118–189.
- Larroudé P. (2015) Espèces de taupins : une cartographie est désormais disponible. *Perspectives Agricoles* 427, 46–49.
- Lehmhus J., Niepold F. (2015) Identification of Agriotes wireworms – Are they always what they appear to be?, *Journal Fur Kulturpflanzen* 67, 129–138. doi:10.5073/JFK.2015.04.03
- Lohse G.A. (1979) 34. Familie: Elateridae, 103–186, in H. Freude, K. Harde and G. A. Lohse (eds.). Die Käfer Mitteleuropas, Band 6: Diversicornia.
- Poggi S., Le Cointe R., Riou J.-B., Larroudé P., Thibord J.-B., Plantegenest M. (2018) Relative influence of climate and agroenvironmental factors on wireworm damage risk in maize crops, *Journal of Pest Science* 91(2), 585–599. doi:10.1007/s10340-018-0951-7
- Staudacher K., Pitterl P., Furlan L., Cate P., Traugott M. (2010) PCR-based species identification of Agriotes larvae, *Bulletin of Entomological Research* 101(2), 201–210. doi:10.1017/S0007485310000337
- Sunnucks P., Hales D.F. (1996) Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus Sitobion (Hemiptera: Aphididae), *Molecular Biology and Evolution* 13(3), 510–524. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025612