

COLEOTOOL - Développement d'outils moléculaires en vue d'identifier les principaux charançons ravageurs du colza et leurs auxiliaires parasitoïdes

Robert C.¹, Bothorel S.¹, Luce S.¹, Lauvernay A.¹, Leflon M.¹, Delvare G.³, Streito J.C.², Pierre E.², Cruaud P.², Ollivier M.², Genson G.², Cruaud A.², Rasplus J.Y.²

¹ Terres Inovia, Thiverval-Grignon, France

² Institut National de la Recherche Agronomique - Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (INRA-CBGP), Montferrier-sur-Lez, France

³ Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement – Systèmes Biologiques (CIRAD-BIOS), Montferrier-sur-Lez, France

Correspondance: c.robert@terresinovia.fr

Résumé

Afin de réduire la dépendance en intrants, la lutte biologique par conservation est une stratégie de choix pour gérer les ravageurs. Cela nécessite de mieux comprendre les interactions entre ravageurs et auxiliaires. Sur colza, ces interactions concernent principalement les charançons et des micro-hyménoptères parasitoïdes qui sont leurs principaux ennemis naturels. L'étude de ces interactions se heurte à des verrous méthodologiques, notamment en termes d'identifications des ennemis naturels, qui appartiennent à des groupes taxonomiques mal connus. Le principal objectif de Coleotool est de lever un de ces verrous en proposant des outils d'identification des charançons ravageurs du colza et de leurs parasitoïdes et des méthodes de quantification du service de régulation.

Plusieurs méthodes et outils (élevages, clés d'identification, outils d'identification moléculaire haut débit...) ont été développés dans le cadre de notre projet. La plupart des sorties du projet sont accessibles à tous, directement en ligne via le site Coleotool (fiches descriptives, base de séquences et clés d'identifications des principales espèces de charançons et des parasitoïdes qui leur sont associés) : <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/coleotool/index.html>.

Le développement de ces outils a également permis de collecter de nombreux spécimens sur l'ensemble du territoire et ainsi de mettre à jour les références sur les espèces de parasitoïdes présentes en France, leur répartition, leur phénologie et leur potentiel de régulation.

Mots-clés : régulation naturelle, barcoding, clés d'identification, taux de parasitisme, *Ceutorhynchus*, parasitoïdes, colza.

Abstract: Development of molecular tools to identify the main weevil pests of oilseed rape and their natural enemies (parasitoid wasps).

Conservation biological control is a sustainable approach to pest management that can contribute to reduce our dependency on chemicals. A good understanding of the interactions between pests and their natural enemies which means, on oilseed rape (OSR), between weevils and parasitoid wasps is a prerequisite to implement such an approach. However, weevils and their parasitoids are difficult to identify to species by non-specialists. This limits our understanding of their interactions. The main objective of the project Coleotool was to develop tools to identify weevil pests and their parasitoid wasps and methods to quantify parasitism rate.

Several methods and tools (rearing, identification keys, high-throughput molecular identification ...) were used and developed during the project. The main outputs are publicly available through the Coleotool website: <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/coleotool/index.html>.

During this project, many specimens were collected all over France. Then, it was possible to update our records on parasitoids: their distribution, their phenology and their potential to control weevils associated with oilseed rape.

Keywords: biological control, barcoding, identification keys, parasitism rates, *Ceutorhynchus*, parasitoids, oilseed rape.

Introduction

Le monde agricole est aujourd'hui à un tournant important : les systèmes de culture actuels montrent leurs limites pour atteindre et concilier l'ensemble des performances attendues, que ce soit en termes de rentabilité, de productivité ou d'impacts environnementaux. Le colza est une culture qui occupe une place de choix dans les systèmes de culture pour ces nombreux avantages agronomiques. Elle est cependant impactée par tout un cortège d'insectes ravageurs qui développent progressivement des résistances aux insecticides, en particulier aux pyréthrinoides, la principale famille chimique encore homologuée. Les insecticides n'en restent pas moins les pesticides les plus employés sur cette culture. Il est plus que jamais urgent de trouver des solutions alternatives pour réduire la dépendance aux insecticides et en intrants de manière plus générale.

Un premier moyen de réduire l'usage des intrants, repose sur un diagnostic à la parcelle fiable afin d'éviter tout traitement inutile. La plupart des ravageurs du colza sont facilement identifiables par les techniciens et les agriculteurs ou ne nécessitent pas une identification jusqu'à l'espèce (altises, méligèthes). Cependant, pour d'autres, une identification à l'espèce est indispensable et délicate. C'est le cas des charançons (*Ceutorhynchus* spp.) qui sont les insectes les plus nuisibles sur colza : charançon du bourgeon terminal (*C. picitarsis* Gyllenhal, 1837), charançon de la tige du colza (*C. napi* Gyllenhal, 1837), charançon des siliques (*C. obstrictus* (Marsham, 1802)) (Pilorgé et al., 1997). Au stade adulte, leur identification est difficile pour les agriculteurs. Les stades pré imaginaires (œufs, larves et nymphes) ne sont quant à eux pas discernables.

Un second levier pour réduire le recours aux insecticides repose sur le développement de méthodes de lutte alternatives aux insecticides telle que la lutte biologique par conservation. Or, la mise au point de cette technique se heurte aujourd'hui à un manque important de connaissances sur la biologie et l'écologie des auxiliaires impliqués. Ces données sont difficiles à acquérir principalement par manque d'outils permettant une identification à l'espèce fiable et rapide des organismes, quel que soit leur stade de développement. Ceci rend les suivis des populations extrêmement lourds voire impossibles en l'absence de compétences en entomologie poussées. Parmi les auxiliaires entomophages participant à la régulation des charançons ravageurs du colza, les hyménoptères parasitoïdes sont parmi les plus efficaces. Les taux de parasitisme sont variables mais peuvent être supérieurs à 95% (Jourdeuil, 1960). Le nombre exact d'espèces de parasitoïdes s'attaquant aux charançons du colza en France n'est pas connu. Aucun inventaire récent n'a été réalisé et les derniers travaux réalisés par Jourdeuil datent des années 60. Ces espèces de parasitoïdes sont particulièrement difficiles à identifier. Un préalable à toute étude biologique ou agronomique était donc de réactualiser l'inventaire des charançons et de leurs parasitoïdes et d'utiliser des techniques innovantes pour permettre des identifications fiables sur de grandes séries d'insectes et sans avoir recours à des spécialistes.

Parmi les outils d'identification disponibles, la méthode du « barcoding » est bien adaptée à l'analyse de grandes séries d'échantillons et ne nécessite pas de spécialistes une fois validée. Elle consiste à

identifier les spécimens en utilisant un court fragment d'ADN d'une zone du génome mitochondrial bien conservée au sein d'une espèce, mais différente d'une espèce à l'autre (Hebert *et al.*, 2003). Chez les insectes, le fragment habituellement séquencé correspond au gène de l'ADN mitochondrial codant pour la sous-unité I de la cytochrome C oxydase (Hebert *et al.*, 2003). Cette technique d'identification peut être mise en œuvre à partir d'un fragment d'insecte, à n'importe quel stade de développement et indifféremment du sexe. C'est pourquoi elle est aujourd'hui couramment employée par de nombreuses équipes en Entomologie. Cette méthode utilisée en complément des techniques d'identification morphologique a permis la découverte de nouvelles espèces (Hebert *et al.*, 2004) et l'amélioration des clés de détermination. L'utilisation d'amorces universelles couplée aux nouvelles technologies de séquençage permet de détecter la présence de plusieurs espèces dont les « barcodes » sont connus et de les quantifier en partie, dans des échantillons comportant de nombreux spécimens. Les techniques de séquençage haut-débit couplées aux bibliothèques de barcodes permettent également d'envisager la détection de parasitoïdes à l'intérieur de n'importe quel stade de développement d'un charançon et ce, sans avoir à en réaliser l'élevage. Enfin, les techniques d'imagerie actuelles, permettent la réalisation de clés d'identification morphologique plus fiables et plus facilement accessibles.

Le projet Coleotool est né de la collaboration entre 3 organismes présentant des compétences et des besoins complémentaires :

- Terres Inovia (TI), l'Institut technique des oléagineux, protéagineux et du chanvre industriel, ayant un lien privilégié avec les acteurs du monde agricole et retardé dans certains travaux par le manque de compétences en entomologie.
- Le CIRAD (CBGP), pour son expertise en entomologie et plus particulièrement sur les hyménoptères parasitoïdes.
- L'INRA (CBGP) pour son expertise générale en entomologie et son expérience des outils de détection et de caractérisation moléculaire à haut débit.

Le principal objectif du projet Coleotool était de mettre en place des outils accessibles en ligne (outils moléculaires et clés d'identification morphologique) pour faire sauter les verrous afin d'identifier et dénombrer plus rapidement les insectes ravageurs et auxiliaires associés aux cultures de colza, dans différents milieux et à différents stades de développement. Ce projet s'est focalisé sur les charançons du genre *Ceutorhynchus* qui constituent les insectes ravageurs les plus fréquents et les plus nuisibles sur colza. Il s'est articulé autour de 3 principaux volets :

1) Échantillonnage et mise en place d'une collection de référence :

Dans ce premier volet, l'objectif principal était de créer une collection d'insectes et d'ADN clairement identifiés grâce à un échantillonnage massif dans les principales zones de production de colza. Ce travail a été l'occasion de prendre en main de nouvelles méthodes, notamment des méthodes d'élevages par le laboratoire de TI et d'acquérir de nouvelles références sur les hyménoptères parasitoïdes et les taux de parasitisme.

2) Séquençage et analyse de données :

Le fragment mitochondrial COI, code-barre universel, a été séquencé sur les espèces de charançons et de parasitoïdes associés collectés dans le 1^{er} volet du projet et identifiés par des taxonomistes experts de ces groupes. Ces séquences ont ensuite été regroupées dans une base de données accessible aux différents acteurs du projet et ont alimenté la base de données Arthemis du CBGP (<http://arthemisdb.supagro.inra.fr/>). La construction d'arbres phylogénétiques et la comparaison de ces résultats avec les identifications morphologiques a permis de valider l'ensemble des données et de constituer une bibliothèque de codes-barres de référence dénuée de toute erreur.

3) Valorisation et transfert de l'outil :

Le transfert et la valorisation de l'outil se sont faits à trois niveaux :

- Un transfert des méthodes de l'INRA-CBGP vers TI.
- La mise à disposition de clés d'identification, des séquences de « barcodes » et de fiches espèces ouvertes à un large public sur Internet.
- Le test de la méthode pour apporter de premiers éléments de réponse à une question de recherche.

1. Matériel et méthodes

1.1 Échantillonnage et mise en place d'une collection de références

Il a été décidé de travailler sur quatre espèces de charançons et les cortèges d'hyménoptères parasitoïdes qui leur sont associés :

- Le charançon du bourgeon terminal (*Ceutorhynchus piciparsis* Gyllenhal 1837) ;
- Le charançon de la tige du colza (*Ceutorhynchus napi* Gyllenhal 1837) ;
- Le charançon de la tige du chou (*Ceutorhynchus pallidactylus* (Marsham 1802)) ;
- Le charançon des siliques (*Ceutorhynchus obstrictus* (Marsham 1802)).

Les autres espèces de charançons rencontrées fréquemment sur colza ont été recherchées : le charançon gallicole du chou (*Ceutorhynchus assimilis* (Paykull 1792)), et les baris des crucifères (*Aulacobaris coeruleascens* Scopoli 1763, *Melanobaris laticollis* (Marsham 1802)). Il n'a pas été retenu de travailler sur les parasitoïdes de ces espèces, car elles sont peu/pas nuisibles pour la culture de colza.

Un important travail de collecte d'adultes et de plantes (mise en élevage de larves) au champ a été réalisé afin de construire les collections regroupant les insectes sélectionnés. Tous les individus provenant des élevages ainsi qu'une partie de ceux provenant des collectes massives aux champs ont été identifiés morphologiquement par le personnel du CBGP (INRA/CIRAD). Le séquençage d'un fragment du gène COI a été réalisé pour toutes les espèces obtenues, des individus représentatifs ont été montés et mis en collection.

1.1.1 Collecte au champ

La première année du projet, afin de maximiser les chances de capturer des spécimens intéressants, des collectes massives d'adultes aux champs ont été réalisées. L'objectif était de suppléer à l'échec éventuel des élevages dont le succès n'était pas certain. Ces collectes ont été conduites dans les stations Terres Inovia réparties sur tout le territoire français, à plusieurs dates au printemps et à l'automne, en utilisant plusieurs méthodes de capture (capture en cuvette jaune, à l'aide de tente Malaise et par battage/filet fauchoir). Ces collectes ont permis de rassembler 159 échantillons, composés chacun d'une à plusieurs centaines d'individus (Tableau 1).

L'analyse des échantillons collectés au champ consiste à trier « grossièrement » les spécimens présents, puis à identifier plus spécifiquement les spécimens présentant un intérêt potentiel. Seule une partie de ces échantillons a été analysée car le travail d'analyse est très chronophage et que l'échantillonnage obtenu à partir des élevages était bien représentatif des espèces recherchées.

Les années suivantes, quelques collectes ponctuelles de larves et/ou d'adultes ont été réalisées par le personnel de Terres Inovia et du CBGP afin de compléter l'échantillonnage pour les espèces difficiles à trouver.

Tableau 1 : Nombre d'échantillons collectés au champ par localité et méthode de collecte dans le cadre du projet Coleotool.

Région	Localité (département)	Méthode de collecte			TOTAL
		Cuvette jaune	Tente malaise	Battage ou filet fauchoir	
Aquitaine	Frespech (47)	3			12
	Roquefort (47)	2		1	
	Sainte Colombe en Bruilhois (47)			1	
	Saint Antoine de Ficalba (47)	3		2	
Bourgogne	Bretenièrre (21)			1	3
	Messigny et Vantoux (21)	2			
Centre	Civray (18)		7	4	29
	Lunery (18)	6	8	4	
Champagne-Ardenne	Bucey en Othe (10)	1	9		41
	Fontvannes (10)	10	15	6	
Ile de France	Orsonville (78)			1	36
	Thiverval Grignon (78)	14	18	3	
Lorraine	Rogéville (54)	2			2
Midi-Pyrénées	Lectoure (32)	1			11
	Montesquieu Lauragais (31)			1	
	Vieilleville (31)	4	3	2	
Picardie	Cartigny (80)	3	9	3	21
	Estrées Mons (80)	6			
Poitou-Charentes	Chambon (17)	1			4
	Brillac (16)	3			
TOTAL		61	69	29	

1.1.2 Élevages

Pour les quatre principales espèces de charançons ravageurs des crucifères, des plantes infestées ont été collectées au champ durant toute la durée du projet (Tableau 2).

Afin d'obtenir des adultes de charançons et de parasitoïdes larvaires, les larves des ravageurs ont été collectées de façon active (dissection) ou passive (récupération des larves quittant la plante) à partir des organes atteints, puis placées sur un milieu adéquat. Les élevages visant les endo-parasitoïdes ont été réalisés en boîtes fermées contenant un substrat composé d'un mélange terre/sable (50/50) ou terreau/sable (50/50). Les élevages visant les ecto-parasitoïdes ont été réalisés en piluliers contenant un papier filtre humide ou directement dans les organes placés en sachets micro-perforés. L'incubation s'est faite en conditions contrôlées afin de mimer le cycle naturel des insectes, et cela jusqu'à émergence des adultes (ravageurs et parasitoïdes). La mise au point des élevages s'est appuyée sur les méthodes répertoriées par Williams et ses collègues (Williams et al., 2007).

L'élevage des parasitoïdes d'œufs s'est fait sur plantes entières placées en sachets micro-perforés.

Tableau 2 : Récapitulatif des échantillons des campagnes 2014 et 2015 ayant servi aux élevages mis en place dans le projet Coleotool (à partir de larves ou d'œufs de ravageurs) - * lots prélevés sur le même site à deux dates différentes.

Ravageur visé (Organe étudié)	Type de parasitisme visé	Quantité	Provenance		Date de prélèvement	Code
			Station	Localité (département)		
Baris (Plante)	Endo Larve	1 lot	Le Subdray	Lunery (18)	16/07/2014	B
Charançon du bourgeon terminal (Plante)	Endo Larve	3 lots	Troyes	Fontvannes (10) Savières (10) Savières (10)	10/03/2014 12/03/2015 01/04/2015	CBT1 CBT8* CBT9*
		1 lot	En Crambade	Auradé (32)	17/03/2014	CBT2
		1 lot	Le Subdray	Lunery (18)	19/03/2014	CBT3
		2 lots	Nancy	Gézoncourt (54) Dieulouard (54)	25/03/2014 05/05/2015	CBT4 CBT10
		1 lot	Dijon	Messigny et Vantoux (21)	11/04/2014	CBT5
	Oeufs	2 lots	Le Subdray	Civray (18) Plou (18)	19/03/2014 27/10/2015	CBT6 CBT11
		2 lots	Troyes	Savières (10) Savières (10)	25/11/2014 07/12/2015	CBT7 CBT14
		1 lot	Dijon	Messigny et Vantoux (21)	25/11/2015	CBT12
		1 lot	Agen	Roquelaure (32)	24/11/2015	CBT13
	Charançons de la tige du colza et du chou (Tiges) (Plante)	Endo Larve	3 lots	Dijon	Messigny et Vantoux (21) Messigny et Vantoux (21) Messigny et Vantoux (21)	11/04/2014 22/05/2014 11/06/2015
2 lots			Le Subdray	Lunery (18) Civray (18)	23/04/2014 21/04/2015	CT2 CT8
2 lots			En Crambade	Vieillevigine (31) Muret (31)	19/05/2014 22/04/2015	CT3 CT9
1 lot			Estrées Mons	Riencourt lès Bapaume (62)	22/05/2014	CT4
Oeufs		1 lot	Dijon	Messigny et Vantoux (21)	23/03/2015	CT6
		1 lot	Le Subdray	Civray (18)	25/03/2015	CT7
		3 lots	Agen	Saint Antoine de Ficalba (47) Lectoure (32) Lectoure (32)	13/05/2014 22/04/2015 04/05/2015	CS1 CS5* CS8*
Charançon des siliques (Siliques ou Inflorescences)	Endo Ecto Larve	3 lots	En Crambade	Vieillevigine (31) Vieillevigine (31) Muret (31)	19/05/2014 04/06/2014 22/04/2015	CS2* CS4* CS6
		2 lots	Le Subdray	Lunery (18) Civray (18)	27/05/2014 26/05/2015	CS3 CS10
		1 lot	Grignon	Thiverval Grignon (78)	07/05/2015	CS7
		1 lot	-	Mascarville (31)	12/05/2015	CS9

1.1.3 Conservation des spécimens

Tous les spécimens adultes ont été placés vivants en éthanol 75° et conservés au frais (5-10°C) pendant 2 à 3 semaines. Pour une conservation à plus long terme, ils ont été égouttés puis transférés en éthanol 96° et mis au congélateur (≈ -20°C).

Les larves de ravageurs et de parasitoïdes utilisées pour les analyses moléculaires, ont été placées vivantes en éthanol 96° et conservées au congélateur. Les larves utilisées pour les identifications morphologiques, ont été ébouillantées vivantes, puis placées en éthanol 70° et conservées au congélateur.

Une fois les échantillons transférés au CBGP, ceux-ci ont été conservés au congélateur à une température de -20°C avant et après traitement (identification morphologique/moléculaire). Tous les échantillons ont été conservés jusqu'à présent. Les spécimens barcodés ont été replacés en éthanol 96° après l'extraction non destructive de l'ADN. Ils sont venus compléter la collection des « vouchers » du CBGP, c'est-à-dire la collection de spécimens de référence associés à un barcode ADN.

Par ailleurs des spécimens représentatifs de chaque espèce ont été séchés et montés à sec sur paillettes en carton afin de constituer deux collections de références (l'une restant au CBGP et l'autre ayant été transmise à Terres Inovia).

1.1.4 Création de la base de données

L'ensemble des informations concernant les échantillons et les spécimens a été archivé dans une base de données relationnelles mise en place par le CBGP lors de précédents projets (Arthemis, <http://arthemisdb.supagro.inra.fr/>). La base a été nettoyée et les données vérifiées (identification morphologique et données moléculaires). Toutes les informations concernant les échantillons sont disponibles en ligne. Cette base contient les métadonnées associées à chaque échantillon ainsi que les séquences d'ADN de référence produites, des fiches et une iconographie pour chaque espèce. Elle contient par ailleurs des outils de blast qui permettent l'identification moléculaire par comparaison d'une séquence inconnue à l'ensemble des séquences validées de la base.

1.2 Séquençage et analyse de données

Avant Coleotool, les barcodes ADN étaient produits au CBGP par séquençage Sanger ; une technique couteuse et fastidieuse qui permet d'obtenir des séquences relativement longues et une seule séquence d'ADN pour chaque spécimen. En cas de parasitisme, on obtient avec cette technique la séquence de l'hôte et parfois celle du parasitoïde. Le début du projet a coïncidé avec le développement de nouvelles méthodes pour générer les barcodes afin de profiter des séquenceurs haut débit qui présentent plusieurs avantages par rapport au Sanger : un coût inférieur pour de grandes séries d'échantillons, la possibilité d'obtenir en un run de séquençage les séquences des hôtes et de leurs parasitoïdes (et donc la possibilité de calculer potentiellement des taux de parasitismes par séquençage). Le projet Coleotool demandant l'analyse de grandes séries d'échantillons et se focalisant sur le parasitisme, il a été décidé de changer de méthode de séquençage et donc de produire les barcodes par séquençage haut-débit. Il a fallu concevoir et tester un nouveau protocole complètement inédit qui est résumé ci-dessous.

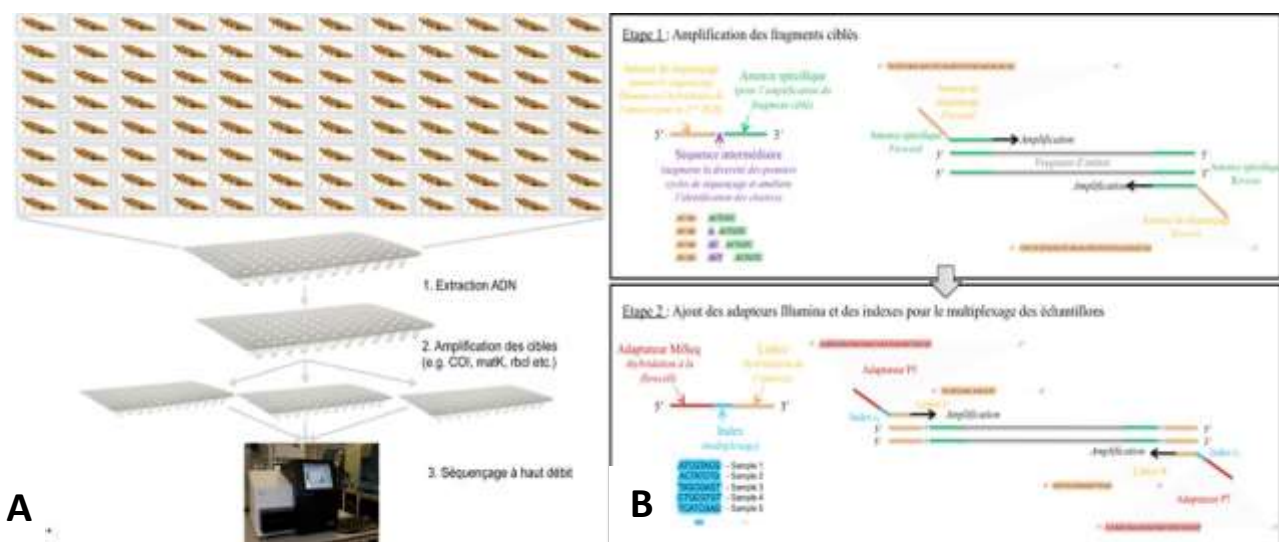


Figure 1 : Traitement des échantillons pour la construction de la base de données de référence (Cruaud et al., 2017).

La Figure 1.A. présente les 3 principales étapes du processus de traitement des échantillons. Ceux-ci sont traités par plaque de 96 individus. L'utilisation de la robotique est ainsi possible, permettant de traiter un grand nombre d'échantillons.

Tous les spécimens séquencés ont été identifiés morphologiquement au préalable par des spécialistes du CBGP.

L'extraction de l'ADN a été réalisée ensuite de manière non destructive, individu par individu, sur des spécimens entiers, en utilisant les kits « Qiagen DNeasy 96 Blood & Tissue extraction ». Les spécimens de référence séquencés ainsi que leur ADN ont été déposés dans les collections INRA du CBGP (Montferrier-sur-Lez, France). L'extraction non destructive de l'ADN et la mise en collection des spécimens de référence sont primordiales car elles nous ont permis de réexaminer chaque insecte en cas de non concordance entre la séquence obtenue et l'identification morphologique.

L'extraction d'ADN est suivie de l'amplification et du séquençage des marqueurs qui constitueront les catalogues de référence. La Figure 1.B. modifiée de Cruaud et al. (2017) détaille le protocole d'amplification des marqueurs. Deux étapes successives de Polymerase Chain Reaction (PCR) sont réalisées. La première permet d'amplifier le marqueur ciblé (barcode standard universel COI), la seconde permet d'attacher à chaque marqueur une combinaison d'index spécifiques de chacun des 96 individus de la plaque. Les produits de PCR peuvent ainsi être mélangés et séquencés tous en même temps sur les séquenceurs de nouvelles générations qui produisent jusqu'à environ 15 millions de séquences. Les séquenceurs haut-débit ne permettant pas l'obtention de séquences supérieures à 300 paires de base, le barcode universel du gène COI (Hebert *et al.*, 2003, 658 paires de base) a été séquencé en deux parties (COIFC et COIBR, Shokralla *et al.*, 2015). Les deux fragments ont ensuite été concaténés pour reconstituer le barcode complet.

Un pipeline analytique de traitement des données de séquençage a été également mis en place lors du projet (Cruaud et al. 2017). Il permet de supprimer les pollutions, les séquences incomplètes ou chimériques, de réassocier chaque fragment d'ADN au bon spécimen, et enfin de recoller les deux fragments d'ADN pour obtenir une séquence COI complète de 656 paires de bases.

1.3 Valorisation et transfert de l'outil

1.3.1 Outils accessibles en ligne

Une grande partie des livrables de Coleotool est accessible sur Internet. Un site Web dédié au projet Coleotool a été créé, il renvoie également vers différentes plateformes : la base de données Arthemis et le site E-phytia.

- Adresse du site Coleotool : <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/coleotool/charancons.html>
- Adresse d'accès direct des fiches sur les charançons (E-phytia) : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/11322/hypp-Curculionidae>
- Adresse d'accès direct de la base de données des séquences (Arthemis) : <http://arthemisdb.supagro.inra.fr/>

Sont ainsi accessibles en ligne :

- Une présentation globale du projet ;
- Des clés d'identification morphologique polytomiques des charançons et des parasitoïdes ;
- L'ensemble des séquences validées qui constitue une librairie de référence permettant d'identifier moléculairement les charançons du colza et leurs parasitoïdes (base de données Arthemis). Les séquences générées par un utilisateur du site peuvent être comparées à l'ensemble des séquences contenues dans la base par BLAST pour obtenir une identification.

Les séquences peuvent également être positionnées dans un arbre phylogénétique comprenant l'ensemble des séquences de la base.

- Des fiches de présentation des différentes espèces de charançons et des parasitoïdes en anglais (base de données Arthemis). Des fiches en français sur les charançons ont été créées sur le portail E-phytia de l'INRA et ont été mises à jour dans le cadre du projet.

▪ Construction des clés d'identification

Le choix des caractères discriminants les espèces repose sur des clés de détermination existantes (Delvare, no date ; Hoffmann, 1954 ; Aubert et Jourdeuil, 1958 ; Townes , 1971 ; Bouček et Rasplus, 1991 ; Ferguson *et al.*, 2010), mais également sur des observations à la loupe binoculaire permettant de déterminer des caractères inédits pour les espèces difficiles à distinguer malgré les caractères existants ou pour les espèces cryptiques mises en évidence par la topologie des arbres phylogénétiques réalisés.

LUCID® est le logiciel retenu pour la création d'une clé digitale polytomique. Dans l'éventualité d'un polymorphisme sexuel, mâle et femelle de chaque espèce ont été évalués.

Une fois en ligne, une session de tests de la clé d'identification a été organisée afin que des utilisateurs, formés ou non à l'entomologie puissent donner leurs critiques pour améliorer la compréhension et les performances de l'outil avant sa transmission finale à Terres Inovia.

▪ Réalisation de clichés

Des clichés des spécimens collectés pendant le projet COLEOTOOL, ainsi que de spécimens provenant des collections du CBGP, des collections personnelles de J. Haran et de G. Delvare (CIRAD) et des collections du muséum de Lausanne ont été réalisés à l'aide du matériel photographique et d'analyse d'images disponible au CBGP. Les illustrations obtenues ont permis d'alimenter les différents livrables du projet, notamment les clés d'identification et les fiches espèces.

▪ Conception de fiches pédagogiques

La liste des espèces et des champs à aborder dans les fiches a été définie par le comité de pilotage. Les fiches sont synthétiques et complètes ; y sont développés pour chaque espèce de charançons et parasitoïdes les points présentés dans le Tableau 3. Ces champs ont été complétés à chaque fois que cela a été possible soit grâce à la bibliographie existante, soit grâce aux observations réalisées dans le cadre du projet. Toutefois de nombreuses informations ne sont pas disponibles notamment concernant les stades pré-imaginaux des parasitoïdes quasi inconnus.

Tableau 3 : Champs renseignés dans les fiches synthèses des charançons et hyménoptères parasitoïdes consultables sur Arthemis.

Champs de la fiche par thématique		Charançons	Parasitoïdes
Taxonomie	Nom de l'espèce et descripteur	X	X
	Rang taxonomique	X	X
	Classification taxonomique	X	X
	Validité du taxon	X	X
	Synonymes de l'espèce	X	X
	Nom vernaculaire français	X	
	Nom vernaculaire anglais	X	
Morphologie	Stade permettant l'identification	X	X
	Morphologie de l'œuf	X	X
	Morphologie des stades immatures	X	X
Biologie	Morphologie de l'adulte (intégrant les caractères discriminants mâle et femelle)	X	X
	Nombre de générations annuel	X	X
	Cycle biologique (parfois illustré)	X	X
	Régime alimentaire	X	X
	Stade actif	X	X
	Substrat nutritif (organe de la plante)	X	
	Plante hôte	X	X
	Plante hôte d'intérêt commercial	X	
	Type de nuisible	X	
Distribution	Espèces associées (hôtes ou ennemis naturels)	X	X
	Région biogéographique de distribution	X	X
	Distribution d'origine	X	X
Impact économique	Distribution mondiale (liste des pays recensés)	X	X
	Symptômes et dégâts	X	
Illustrations	Photos habitus mâle et femelle	X	X
	Photos de symptômes et dégâts	X	
Bibliographie	Références	X	X
Liens externes	Liens vers des sources externes	X	X
	Spécimens disponibles en collection (dont spécimens séquencés)	X	X
Informations	Auteur	X	X
	Date de création	X	X
	Date de dernière mise à jour	X	X

1.3.2 Formation et réponse à une question de recherche

En fin de projet, après transfert des différents protocoles (analyses moléculaires et informatiques), une formation de 2 semaines au CBGP a été organisée pour apprendre au personnel de TI à utiliser les clés d'identification et mettre en application les techniques de biologie moléculaire mises en œuvre dans le cadre du projet Coleotool.

Cette formation a été l'occasion de tester le transfert de la technique mise au point mais aussi de tester la méthode développée pour répondre à trois questions fondamentales pour TI :

1. Est-il possible d'identifier les différentes espèces de charançons à l'état larvaire ?
2. Est-il possible de détecter les parasitoïdes larvaires, de les identifier et de calculer des taux de parasitisme ?
3. Existe-t-il des différences de taux de parasitisme entre modalités traitées et non traitées avec des insecticides au printemps ?

Au cours de cette formation, une partie des échantillons acquis par TI au cours des campagnes 2016 et 2017 a été analysée. Ces échantillons comprennent des larves des 5 espèces de *Ceutorhynchus* étudiées. Certains ont été collectés dans des parcelles de colza avec des modalités traitées et non traitées (d'a minima 1ha) au printemps, dans l'optique de comparer les taux de parasitisme obtenus et ainsi mettre en évidence l'impact potentiel des traitements de printemps sur la régulation des charançons du colza. Le set d'échantillons analysé est disponible dans le tableau 4.

Tableau 4 : Liste des échantillons utilisés pour la formation et la mise en situation (réponse à une question de recherche).

Echantillon	Couple	Modalité	Localité (département)	Ravageur visé	Date de récolte
1	-	Traitée	Plou (18)	<i>C. obstrictus</i>	06/06/2016
2	-	Traitée	Plou (18)	<i>C. obstrictus</i> + ecto-parasitoïde	06/06/2016
3	-	-	Neuville sur Brenne (37)	<i>C. obstrictus</i>	13/06/2016
4	-	-	Neuville sur Brenne (37)	<i>C. obstrictus</i> + ecto-parasitoïde	13/06/2016
5	-	-	Lunery (18)	<i>C. assimilis</i>	21/11/2016
6	1	Traitée	Bourges (18)	<i>C. picitarsis</i>	30/03/2017
7		Non traitée	Bourges (18)	<i>C. picitarsis</i>	30/03/2017
8	-	Traitée	Malay le Petit (89)	<i>C. pallidactylus</i> (<i>C. picitarsis</i> ?)	03/04/2017
9	2	Traitée	Bourges (18)	<i>C. picitarsis</i>	11/04/2017
10		Non traitée	Bourges (18)	<i>C. picitarsis</i>	11/04/2017
11	3	Traitée	Vieillevigne (31)	<i>C. napi</i> / <i>C. pallidactylus</i> (<i>C. picitarsis</i> ?)	19/04/2017
12		Non traitée	Vieillevigne (31)	<i>C. napi</i> / <i>C. pallidactylus</i>	19/04/2017

2. Résultats et discussion

2.1 Échantillonnage et mise en place d'une collection de références

2.1.1 Élevages et collecte au champ

- **Taux d'émergence et de parasitisme.**

Les élevages réalisés durant le projet Coleotool ont permis de collecter un grand nombre de ravageurs et leurs parasitoïdes associés.

Afin de mesurer le taux de réussite des élevages réalisés, le taux d'émergence global a été calculé de la façon suivante :

$$\text{Taux d'émergence global} = \frac{\text{Nombre de charançons émergents} + \text{Nombre de parasitoïdes émergents}}{\text{Nombre de larves mises en élevage}}$$

Ce taux n'a pu être calculé que pour les élevages de larves visant les endo-parasitoïdes et est très variable d'un lot à l'autre puisqu'il varie de 2,7% à 95% (Tableau 5). L'élément déterminant à la réussite de ce type d'élevage est l'âge des larves. Si celles-ci sont trop jeunes et non prêtes à entrer en nymphose, elles ont des difficultés à terminer leur développement dans le sol. Le protocole mis en place ici est également délicat car les larves sont récupérées manuellement par dissection des plantes et extraction des larves avec une pince. Il est donc aisé de les blesser ce qui peut entraîner leur mort une fois dans les boîtes d'élevage.

Afin de mesurer le niveau de régulation dans la zone de prélèvement des plantes, le taux de parasitisme de chaque lot a été calculé de la façon suivante :

$$\text{Taux de parasitisme} = \frac{\text{Nombre de parasitoïdes émergents}}{\text{Nombre de charançons émergents} + \text{Nombre de parasitoïdes émergents}}$$

Les taux de parasitisme sont également très variables (Tableau 5). Il s'agit d'une observation courante dans la littérature (Jourdeuil, 1960 ; Ulber *et al.*, 2010). Les taux de parasitisme varient ici entre 0% et 83,3%. Ils sont plus importants pour le charançon du bourgeon terminal (de 3,5% à 74,2%, moyenne=41,1%), seuls des endo-parasitoïdes ont été détectés. Ils sont moyens pour les charançons des siliques (de 0% à 83,3%, moyenne=19,5%), seuls des ecto-parasitoïdes ont été détectés. Ils sont moindres pour les charançons de la tige du chou et du colza (de 2,3% à 16,7%, moyenne=9,4%), des endo- et ecto-parasitoïdes ont été obtenus. Aucun parasitoïde n'a été collecté pour les baris avec toutefois un nombre de larves disponibles pour l'élevage et un taux d'émergence faible.

Pour les deux sites où il y a eu deux prélèvements à des dates différentes visant le charançon du bourgeon terminal ou le charançon de la tige, le taux de parasitisme est toujours plus élevé pour le deuxième prélèvement. Le taux de parasitisme passe de 6.6% à 28.9% pour les lots CBT8 et CBT9

(prélèvements effectués à 3 semaines d'intervalle), et de 0% à 9.7% pour les lots CT1 et CT5 (prélèvements effectués à 6 semaines d'intervalle). Pour le site où il y a eu deux prélèvements à des dates différentes visant le charançon des siliques, le taux de parasitisme est similaire pour les deux prélèvements (6,3% et 5,9%, prélèvements effectués à 2 semaines d'intervalle). Cela confirme que les taux de parasitisme observés sont très dépendants du moment où les plantes sont prélevées (variabilité du stade des larves de ravageurs et vols de parasitoïdes).

Tableau 5 : Taux d'émergence et de parasitisme selon les sites et les charançons visés - * lots prélevés sur le même site à deux dates différentes.

Ravageur ciblé (Parasitisme)	Lot	Émergence		Taux d'émergence (%)	Taux de parasitisme (%)
		Nombre de ravageurs	Nombre de parasitoïdes		
Baris	B	9	0	16.4	0
Charançon du bourgeon terminal (Endo)	CBT1	8	12	11.4	60
	CBT2	137	395	64.6	74.2
	CBT3	71	82	25.2	53.6
	CBT4	138	5	49.1	3.5
	CBT5	205	114	57.2	35.7
	CBT8*	57	4	33.3	6.6
	CBT9*	64	26	30.0	28.9
	CBT10	3	2	27.8	40
Charançons de la tige du colza et du chou (Endo + Ecto)	CT1*	8	0	40.0	0.0
	CT2	84	2	62.3	2.3
	CT3	133	23	63.4	14.7
	CT4	69	2	43.3	2.8
	CT5*	112	12	100	9.7
	CT8	5	1	2.7	16.7
	CT9	138	9	30.7	6.1
	CT10	311	52	55.3	14.3
Charançon des siliques (Ecto)	CS1	2	0	18.2	0
	CS2*	89	6	54.3	6.3
	CS3	5	2	71.4	28.6
	CS4*	80	5	63.0	5.9
	CS6	11	2	45.8	15.4
	CS7	9	0	75.0	0
	CS8	433	10	74.9	2.3
	CS9	1	5	100.0	83.3
	CS10	20	10	90.9	33.3

- **Proportions des différentes espèces obtenues.**

Pour la plupart des lots étudiés, les ravageurs ciblés sont bien ceux retrouvés en plus grandes proportions (Figure 2).

Pour les lots ciblant le charançon du bourgeon terminal, quelques *Ceutorhynchus pallidactylus* ont été obtenus en plus des *C. piciparsis*. Ces individus provenaient du lot prélevé le plus tardivement au printemps 2014, ce qui a permis l'arrivée et les pontes des charançons de la tige du chou sur la parcelle avant le prélèvement. Les parasitoïdes ayant émergé de ces lots appartiennent principalement aux espèces *Tersilochus obscurator* et *Triaspis caudata*. Quelques individus appartenant aux espèces *Diospilus capito*, *Necremnus hippia* et *Tersilochus stenocari* ont également été obtenus.

Pour les lots visant les charançons de la tige, plusieurs espèces de ravageurs émergent généralement de chaque lot, avec une espèce très majoritaire. Les individus de *C. picitarsis* obtenus avec les charançons de la tige du chou proviennent d'un lot prélevé tôt dans la saison. Le deuxième prélèvement ayant eu lieu sur la même parcelle ne contient plus que des *C. pallidactylus*. Une très grande variété de parasitoïdes est associée aux *C. pallidactylus* (*Aneucelis melanaria*, plusieurs espèces de *Diospilus*, *Mesopolobus morys*, *Stenomalina gracilis*, plusieurs espèces de *Tersilochus* et plusieurs espèces de *Trichomalus*). Les parasitoïdes associés à *C. napi* sont majoritairement des *Tersilochus fulvipes*, quelques *Tersilochus obscurator* et un *Trichomalus*.

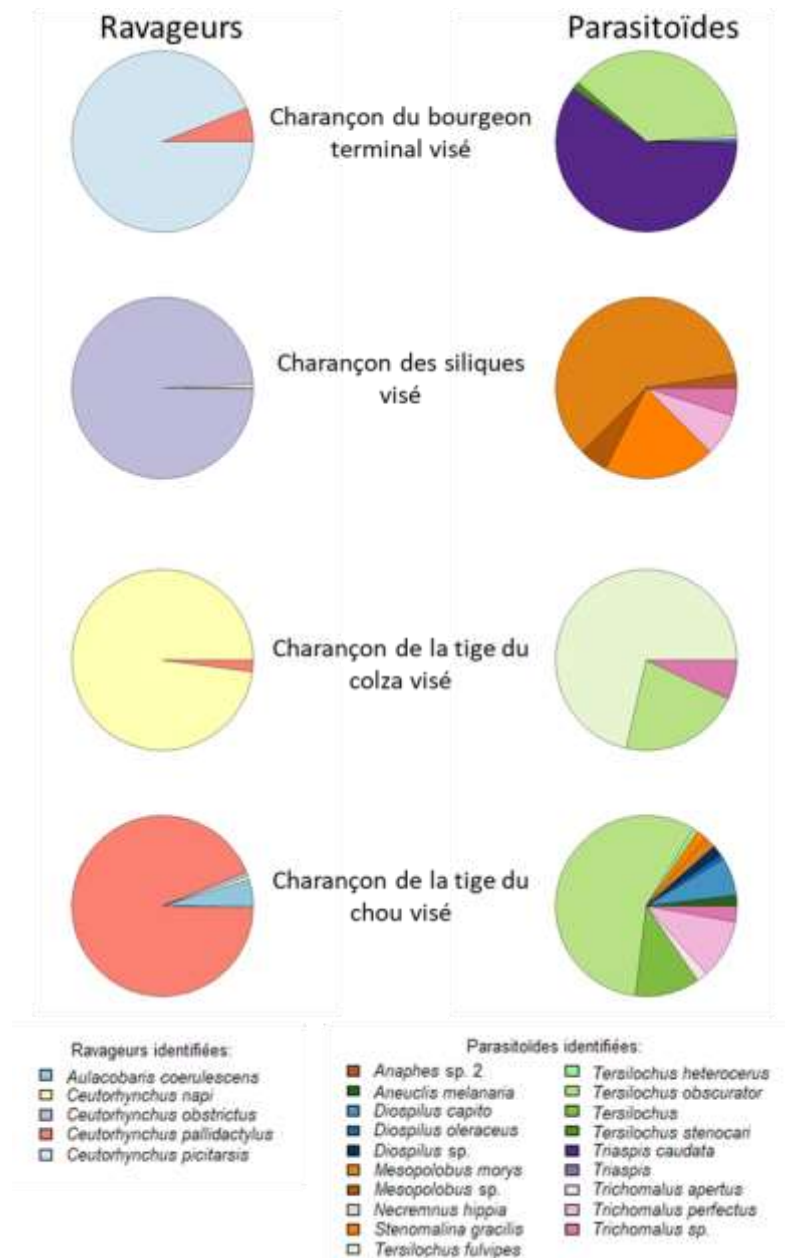


Figure 2 : Proportions des différentes espèces observées pour les ravageurs et les parasitoïdes, en fonction du nombre total d'adultes ayant émergé pour chaque charançon visé dans le cadre des élevages mis en place dans le projet Coleotool.

Pour les lots visant le charançon des siliques, les ravageurs émergents sont quasiment exclusivement des *C. obstrictus*, seuls quelques charançons de la tige ont été retrouvés (provenant certainement des tiges associées aux inflorescences). Les micro-hyménoptères associés à ces ravageurs sont des ectoparasitoïdes appartenant à deux espèces de *Mesopolobus*, *Stenomalina gracilis* et à deux espèces de *Trichomalus*.

- **Dynamiques d'émergence.**

La très grande majorité des insectes adultes récupérés vivants à partir de nos élevages sortent avant la mise au froid (durée de l'élevage <50 jours, Figure 3), ce qui correspond à des ravageurs/parasitoïdes actifs pendant l'été/l'automne.

Concernant les baris (*A. coerulescens*), l'émergence des adultes peut se faire avant ou après la mise au froid. Ce comportement reflète bien la biologie du ravageur qui effectue son développement à l'intérieur de la racine pivotante du colza et sort soit à la fin de l'été/automne soit au printemps suivant.

De même, pour le charançon de la tige du colza (*C. napi*), les adultes sortent aussi bien avant qu'après la mise au froid. Ceci est concordant avec leur biologie et les conditions des élevages :

- Il est établi que les adultes de ce charançon réalisent leur métamorphose au printemps (mai-juin) puis estivent sous terre. Au début de l'hiver, à la fin de la phase de diapause obligatoire, ils peuvent redevenir actifs si la température du sol dépasse les 6°C. Si les conditions redeviennent défavorables, ils retournent s'abriter dans le sol.
- Nos élevages étant réalisés à la température constante de 20°C, cette température est « limite » (température été/automne), et induit des comportements différents en fonction des individus.

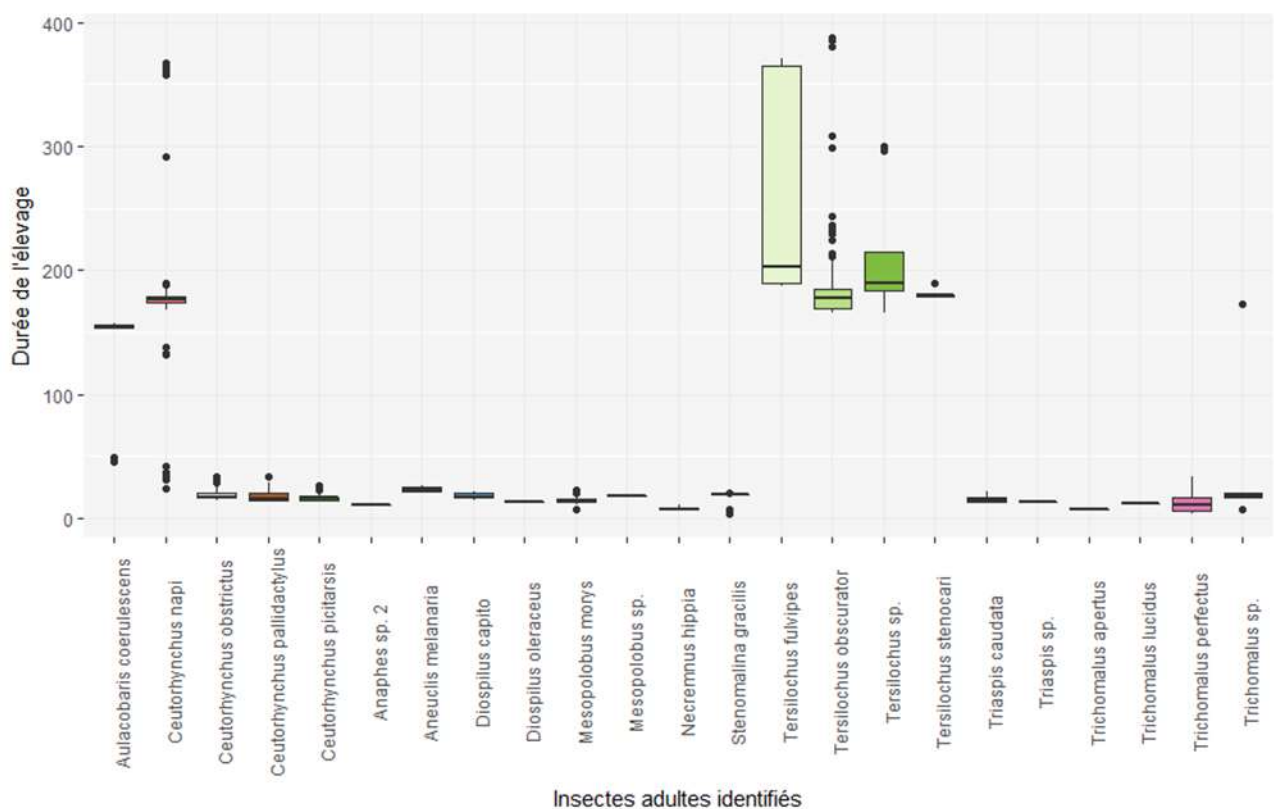


Figure 3 : Durée de l'élevage en jours (date d'émergence – date de mise en élevage, durée de mise au froid ≈120j/période incluse) pour les insectes adultes récupérés vivants en fonction de leur espèce dans le cadre de Coleotool.

Tous les parasitoïdes du genre *Tersilochus* sortent après un (voire deux) passage(s) au froid. Ceci est concordant avec les descriptions faites par Jourdeuil (nécessité d'un abaissement prolongé de la température aux alentours de 10°C pour induire la métamorphose) (1960).

- **Collecte au champ.**

L'analyse d'une partie des échantillons collectés au champ a permis d'augmenter les effectifs d'un certain nombre d'espèces de ravageurs et de parasitoïdes. Plusieurs espèces de parasitoïdes non rencontrés dans les élevages ont également été ajoutées à partir de ces échantillons (*Anaphes* sp.1, *Trichomalus lucidus*, *Phradis morionellus* et *Phradis* sp.). Une autre espèce de charançon a également été ajoutée à la liste de départ (*Ceutorhynchus typhae* (Herbst 1795)), car celle-ci a été retrouvée à plusieurs reprises dans les pièges et peut être facilement confondue avec *C. obstrictus*.

Une analyse plus fine de ces échantillons pourrait être envisagée afin de connaître les dynamiques de présence des différents ravageurs et de leurs parasitoïdes.

2.1.2 Conservation des spécimens et création de la base de données

Le matériel biologique (charançons et hyménoptères, spécimens et ADN) a été archivé, conservé de manière appropriée et informatisé. Quelques spécimens de chaque espèce ont été préparés afin de constituer deux collections de références (l'une restant au CBGP, Figure 4 et l'autre ayant été transmise à Terres Inovia).



Figure 4 : Collection de spécimens obtenus au cours du projet Coleotool disponible au CBGP.

2.2 Séquençage et analyse de données

Ce protocole développé dans le cadre du projet Coleotool permet de séquencer des gènes d'intérêt (ici COI, le code-barre standard des insectes (Hebert *et al.*, 2003)) sur des centaines d'insectes en parallèle. Au-delà de la constitution d'une base de données de référence, il ouvre de nombreuses perspectives telles que l'analyse de taux de parasitisme sans élevage ou l'analyse de contenu de pièges pour évaluer la diversité des espèces présentes sur un site donné.

Toutes les espèces de charançons connues comme ravageurs du colza en France ont pu être séquencées de façon satisfaisante à l'exception de *C. assimilis* qui n'a pu être collecté en nombre suffisant au cours du projet (Tableau 6). À noter que cette espèce est très peu rencontrée dans les parcelles de colza. La portion du gène COI étudiée permet de discriminer de façon fiable les différentes espèces cibles. La base de séquences disponibles en ligne peut être utilisée de manière fiable pour des identifications en routine.

Au total, 152 spécimens de charançons ont été séquencés et 149 séquences ont été validées. Plus de 10 séquences pour chaque espèce ont été validées sauf pour *C. assimilis*. *C. typhae* a été ajouté à la liste de charançons de départ suite à la collecte de ce charançon dans des champs de colza au cours de l'étude. Même s'il ne s'agit pas d'un ravageur du colza il peut être prélevé en même temps que les espèces cibles et confondu avec elles. Quelques charançons Ceutorhynchini sauvages ont été séquencés pour valider notre outil et notamment vérifier qu'il pouvait les discriminer, ce qui a bien été le cas.

Tableau 6 : Nombre de séquences obtenues et validées pour chaque espèce de charançon (les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de spécimens identifiés) au cours du projet Coleotool.

Noms communs	Noms latins	Nombre de séquences validées
C. de la tige du chou	<i>Ceutorhynchus pallidactylus</i>	35 (996)
C. de la tige du colza	<i>Ceutorhynchus napi</i>	32 (511)
C. du bourgeon terminal	<i>Ceutorhynchus picitarsis</i>	19 (633)
C. des siliques	<i>Ceutorhynchus obstrictus</i>	39 (1199)
C. gallicole	<i>Ceutorhynchus assimilis</i>	7 (17)
	<i>Ceutorhynchus typhae</i>	5
Baris	<i>Aulacobaris coeruleascens</i>	12 (381)
Total		149

Le même travail a été réalisé sur les parasitoïdes mais la rareté de certaines espèces ne nous a pas toujours permis d'atteindre les 10 séquences valides par espèce que nous estimons nécessaires pour constituer un outil d'identification.

Tableau 7 : Nombre de séquences obtenues et validées pour chaque espèce de parasitoïde (les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de spécimens identifiés) lors du projet Coleotool.

Noms latins	Nombre de séquences validées
Braconidae	
<i>Diospilus</i> sp.	0 (2)
<i>Diospilus capito</i>	9 (14)
<i>Diospilus oleraceus</i>	1 (1)
<i>Triaspis</i> sp.	7 (10)
<i>Triaspis caudata</i>	19 (435)
Eulophidae	
<i>Necremnus hippia</i>	3 (4)
Ichneumonidae	
<i>Aneuclis melanaria</i>	2 (3)
<i>Phradis</i> spp.	2 (4)
<i>Phradis morionellus</i>	1 (2)
<i>Tersilochus</i> sp.	0 (19)
<i>Tersilochus fulvipes</i>	6 (10)
<i>Tersilochus heterocerus</i>	0 (2)
<i>Tersilochus obscurator</i>	76 (311)
<i>Tersilochus stenocari</i>	7 (7)
Mymaridae	
<i>Anaphes</i> sp. 1	3 (3)
<i>Anaphes</i> sp. 2	1 (1)
Pteromalidae	
<i>Mesopolobus morys</i>	16 (26)
<i>Mesopolobus</i> sp.	1 (2)
<i>Stenomalina gracilis</i>	5 (10)
<i>Trichomalus</i> sp.	2 (6)
<i>Trichomalus apertus</i>	2 (3)
<i>Trichomalus lucidus</i>	5 (5)
<i>Trichomalus perfectus</i>	9 (16)

69% des espèces de parasitoïdes des charançons du colza connues à ce jour en France ont été retrouvées, 6 espèces nouvelles ont été obtenues et 5 non retrouvées.

Un total de 179 individus a été séquencé et 177 séquences ont été validées (Tableau 7). Cela représente 20 espèces séquencées avec succès et notamment toutes les espèces significativement importantes en termes de régulations des populations de charançons. Quelques espèces rarissimes n'ont pu être séquencées faute de matériel frais suffisant.

2.3 Valorisation et transfert de l'outil

2.3.1 Outils disponibles en ligne

▪ Clés d'identification des charançons.

Les résultats d'identification ont conduit à introduire huit espèces dans la clé digitale : *Ceutorhynchus napi*, *C. pallidactylus*, *C. assimilis*, *C. typhae*, *C. obstrictus* (*Ceutorhynchinae*), *Aulacobaris coeruleascens* et *Melanobaris laticollis* (*Baridinae*). *C. typhae* a également été ajoutée aux 7 espèces écrites comme nuisibles sur colza. 19 caractères morphologiques ont été utilisés pour séparer ces 8 espèces au stade imaginal.

Les tests d'utilisation de la clé réalisés aussi bien par des entomologistes que par des non entomologistes ont permis de souligner que : (i) l'outil est efficace et le vocabulaire compréhensible par tous grâce aux illustrations, (ii) faire figurer le nom de l'espèce photographiée serait un plus pour l'identification, (iii) les spécimens tests ont pu être identifiés correctement.

Les pistes d'amélioration concernent la mesure des tailles de plusieurs spécimens de chaque espèce afin de mieux appréhender la variabilité intra et interspécifique pour ce caractère et l'ajout de *C. gallorhenanus*, espèce proche de *C. obstrictus*, dans l'éventualité où il se trouverait piégé sur colza.

La clé est utilisable dans l'état et permet à des praticiens de terrain, qui disposent d'une loupe binoculaire, d'identifier facilement les charançons capturés en parcelle de colza. Une clé d'identification digitale des larves a été envisagée en raison des différences morphologiques existantes au niveau de leur capsule céphalique. Aucune clé n'a finalement été développée par manque de spécimens de *C. assimilis* et *M. laticollis* et à cause de l'hétérogénéité des stades larvaires des spécimens envoyés par Terres Inovia, qui ne permet pas toujours l'observation des soies. Cependant, l'outil moléculaire est en mesure d'identifier les larves des espèces collectées au cours du projet.

▪ Clés d'identification des parasitoïdes.

À ce jour, 18 espèces d'hyménoptères parasitoïdes ont été introduites dans la clé digitale : *Aneuclis* sp., *Phradis* sp., *Tersilochus obscurator*, *T. microgaster*, *T. heterocerus*, *T. fulvipes*, *Triaspis caudata*, *Diospilus capito*, *D. oleraceus*, *Microctonus melanopus*, *Mesopolobus morys*, *Trichomalus perfectus*, *Stenomalina gracilis*, *Necremnus hippia*, *Anaphes* sp., *Eupelmus vesicularis*, *E. messene*, *Eurytoma curculionum*. Du fait de l'obtention tardive des résultats moléculaires, toutes les espèces identifiées ne figurent pas dans la clé (*T. stenocari*). De même, *Aneuclis* sp. et *Phradis* sp. n'avaient pas encore été déterminés à l'espèce au moment de sa conception. *T. microgaster* et *T. heterocerus* sont des *Tersilochus* qu'il est important de bien différencier des autres espèces du même genre car ils sont parasitoïdes d'altise et méligèthe, respectivement, et pourraient se trouver piégés également. *M. melanopus*, *E. vesicularis*, *E. messene* et *E. curculionum* figurent, d'après la bibliographie, dans le cortège parasitaire des charançons du colza et sont donc intégrés également. 38 caractères, dont 36 morphologiques et 2 biologiques ont été utilisés pour séparer ces 18 espèces au stade imaginal.

L'amélioration de cette clé nécessiterait la révision et l'ajout de quelques caractères afin d'intégrer les espèces nouvellement découvertes. Les précisions morphologiques effectuées suite aux identifications morphologiques et moléculaires seront intégrées à cette clé polytomique.

- **Fiches pédagogiques.**

Sur Arthemis, 7 fiches pédagogiques pour les charançons et 19 fiches pour les parasitoïdes sont en ligne en version anglaise. Sur E-phytia, les informations relatives à 6 espèces ont été mises à jour en français.

2.3.2 Formation et réponse à une question de recherche

Le personnel de Terres Inovia a pu mettre en œuvre, à la fin du projet, la méthode moléculaire développée au sein des locaux du CBGP. L'analyse des séquences obtenues a été réalisée par le CBGP, afin de répondre aux questions posées initialement :

- **Est-il possible d'identifier les différentes espèces de charançons à l'état larvaire ?**

Les résultats des identifications de larves de charançons par analyse moléculaire sont globalement cohérents avec les suppositions faites lors de la récupération de celle-ci (date de récolte, partie de la plante colonisée). Il est donc possible, grâce à la méthode de barcode moléculaire, d'identifier à l'espèce tous les charançons et de lever certains doutes concernant l'identification faite sur la base de l'organe depuis lequel la larve a été collectée.

Des résultats intéressants sont apparus pour deux espèces : *C. assimilis* et *C. picitarsis*.

Des difficultés ont été rencontrées pour séquencer *C. assimilis*. Le nombre de séquences valides à ce jour est très faible. Au cours du projet, les arbres phylogénétiques générés montrent une diversité intraspécifique importante liée notamment à des séquences dont l'origine géographique est différente. Des études plus poussées sont nécessaires pour déterminer l'existence d'un possible complexe d'espèce.

Un grand nombre d'individus de *C. picitarsis* a également été séquencé. La diversité des séquences est plus importante que pour les autres espèces. Toutefois ce résultat n'empêche aucunement l'assignation d'une larve à l'espèce *C. picitarsis*.

- **Est-il possible de détecter les parasitoïdes larvaires, de les identifier et de calculer des taux de parasitisme ?**

Sur l'ensemble de l'échantillonnage, 2.9% des larves ont été détectées comme étant parasitées. Un seul parasitoïde a été trouvé par hôte. Plusieurs espèces de parasitoïdes ont été identifiées.

Cependant les ecto-parasitoïdes larvaires de *C. obstrictus* n'ont pas été détectés lors du séquençage. Plusieurs hypothèses sont émises et sont à creuser. Dans le cas présent, la larve de charançon et de parasitoïde ont été analysées ensemble ; il pourrait être nécessaire de séparer les larves de charançon et d'ecto-parasitoïde afin de déterminer si cela pourrait avoir une incidence sur la détection des deux organismes. En effet, les amorces de PCR utilisées pourraient avoir amplifié préférentiellement l'ADN du charançon. Les taux de parasitisme se sont avérés très faibles et l'analyse statistique des résultats de ce fait difficile. Afin de valider définitivement la méthode pour calculer des taux de parasitisme, il serait nécessaire de comparer les sorties des élevages et des analyses de biologie moléculaire sur une même population avec les limites que cela implique (individus différents) et de tester la méthode sur des lots plus volumineux.

- **Existe-t-il des différences entre modalités traitées et non traitées concernant les taux de parasitisme ?**

Ces premières analyses ne montrent pas de différences nettes entre modalités traitées et non traitées. Trois comparaisons entre parcelles traitées et non traitées ont été possibles :

- Couple 1 : les parasitoïdes sont présents dans les échantillons des deux modalités à des taux similaires.

- Couple 2 : deux parasitoïdes ont été détectés, provenant uniquement des échantillons de la modalité traitée.
- Couple 3 : quatre parasitoïdes ont été détectés, provenant uniquement des échantillons de la modalité non traitée.

Il s'agissait d'une première expérimentation destinée à tester la méthode. Afin d'étudier l'impact des traitements, il faudrait également analyser les résultats des piégeages dans les parcelles de colza, s'ils sont disponibles, afin notamment de vérifier si les parasitoïdes étaient présents au moment des traitements.

Il n'en reste pas moins que les taux de parasitisme sont très faibles même en zone non traitée. Si ces taux sont réellement aussi bas et non liés à un artefact expérimental, il sera nécessaire d'augmenter la taille des échantillons afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Conclusion

L'objectif premier de Coleotool est atteint puisque plusieurs méthodes et outils (élevages, clés d'identification, outils d'identification moléculaire...) ont été développés dans le cadre du projet. Il est à présent possible d'identifier les charançons ravageurs du colza et leurs parasitoïdes. Certains outils sont utilisables dès aujourd'hui (les clés morphologiques), d'autres nécessitent encore soit une certaine appropriation par le laboratoire de TI (barcoding) soit des ajustements (taux de parasitisme par analyses moléculaires) mais devraient être opérationnels prochainement. Les principales sorties du projet sont accessibles à tous (fiches descriptives, base de séquences et clés d'identifications des principales espèces de charançons et des parasitoïdes qui leur sont associés), directement en ligne. Le projet Coleotool a également été une opportunité pour développer une nouvelle méthode de séquençage haut débit qui ouvre de nouvelles perspectives d'études pour mieux comprendre les relations trophiques entre les ravageurs du colza et leurs principaux auxiliaires. Depuis la fin du projet, cette technique haut-débit est utilisée en routine au CBGP pour produire des barcodes ou explorer des réseaux trophiques.

Le développement de ces outils a permis d'identifier de nombreux spécimens collectés sur l'ensemble du territoire et ainsi de mettre à jour les références sur les espèces de parasitoïdes présentes en France, leur répartition, leur phénologie et leur potentiel de régulation. C'est un travail sans équivalent en Europe. Le même travail est en cours sur l'altise d'hiver (*Psylliodes chrysocephalus*) et ses parasitoïdes.

Au cours des années à venir, grâce aux méthodes et outils développés dans le projet Coleotool, les travaux destinés à évaluer l'impact des pratiques et du paysage sur la régulation des ravageurs du colza vont pouvoir prendre un nouvel essor et ainsi apporter de nouveaux éléments pour réduire la dépendance aux insecticides.

Références bibliographiques

Aubert J.N., Jourdheuil P., 1958. Nouvelle description et biologie de quelques Ichneumonides appartenant aux genres *Aneuclis* Först., *Isurgus* Först. et *Thersilochus* Holm, *Revue de Pathologie végétale et d'Entomologie agricole de France*, 37 : 175–193.

Bouček Z., Rasplus J.Y., 1991. Illustrated key to West-Palaearctic genera of Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). Illustrated key to West-Palaearctic genera of Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19920512600> (Accessed: 23 October 2018).

Cruaud P., Rasplus J.Y., Rodriguez L.J., Cruaud A., 2017. High-throughput sequencing of multiple amplicons for barcoding and integrative taxonomy. *Scientific reports*, 7 :41948

Delvare G. No date. Clés de détermination des superfamilles et principales familles d'hyménoptères du monde.

Ferguson A.W., Williams I.H., Castle L.M., Skellern M., 2010. Key Parasitoids of the Pests of Oilseed Rape in Europe: A Guide to Their Identification. In *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 77–114. doi: 10.1007/978-90-481-3983-5_3.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences. The Royal Society*, 270(1512) : 313–21. doi: 10.1098/rspb.2002.2218.

Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *PNAS*, 101(41) : 14812–14817.

Hoffmann A., 1954. Coléoptères Curculionides (2ème partie). in Lechevalier, P. (ed.) *Faune de France*. Paris, pp. 487–1208.

Jourdheuil P., 1960. Influence de quelques facteurs écologiques sur les fluctuations de population d'une biocénose parasitaire: étude relative à quelques Hyménoptères (Ophioninae, Diospilinae, Euphorinae) parasites de divers Coléoptères inféodés aux crucifères. *Annales des Epiphyties*, 11 : 445–658.

Pilorgé E., Maisonneuve C., Ballanger Y., 1997. Les ravageurs du colza d'hiver. Edited by C. T. I. des O. Métropolitains.

Shokralla S., Porter T.M., Gibson J.F., Dobosz R., Janzen D.H., Hallwachs W., Golding B.G., Hajibabaei M., 2015. Massively parallel multiplex DNA sequencing for specimen identification using an Illumina MiSeq platform. *Scientific reports* 5:9687.

Townes H.K., 1971. The genera of Ichneumonidae. Part 4. Cremastinae, Phrudinae, Tersilochinae, Ophioninae, Mesochorinae, Metopiinae, Anomalinae, Acaenitinae, Microleptinae, Orthopelmatinae, Collyriinae, Orthocentrinae, Diplazontinae & Ichneumoninae. *Memoirs of the American Entomological Institute*, 17 : 1- 372.

Ulber B., Williams I.H., Klukowski Z., Luik A., Nilsson C., 2010. Parasitoids of oilseed rape pests in Europe: key species for conservation biocontrol. in Williams, I. H. (ed.) *Biocontrol-based integrated management of oilseed rape pests*. Springer, pp. 45–76.

Williams I.H., Büchi R., Ulber B., 2007. Sampling, trapping and rearing oilseed rape pests and their parasitoids. in *Biocontrol of Oilseed Rape Pests*. John Wiley & Sons, p. 366. Available at: https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=_Tv-0bmKqVMC&oi=fnd&pg=PA145&dq=sampling,+trapping+and+rearing+oilseed+rape+pest+and+their+parasitoids&ots=hLyXJknpJn&sig=8lbpFrZ5pjG5v1mztfPvCKvI03w#v=onepage&q=sampling%2C+trapping+and+rearing+oilseed+rape+pest+and+their+parasitoids&f=false (Accessed: 29 October 2018).

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

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 « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL)