

Entretenir des collections d'invertébrés d'intérêt agronomique sur hôtes vivants : un enjeu patrimonial et des contraintes spécifiques

Sylvie Pagès, Nadine Sellier, Philippe Castagnone-Sereno

▶ **To cite this version:**

Sylvie Pagès, Nadine Sellier, Philippe Castagnone-Sereno. Entretenir des collections d'invertébrés d'intérêt agronomique sur hôtes vivants : un enjeu patrimonial et des contraintes spécifiques. NOV'AE, 2022. hal-03837686

HAL Id: hal-03837686
https://hal.inrae.fr/hal-03837686

Submitted on 3 Nov 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Entretenir des collections d'invertébrés d'intérêt agronomique sur hôtes vivants : un enjeu patrimonial et des contraintes spécifiques

Sylvie PAGÈS[1]
Nadine SELLIER[2]
Philippe CASTAGNONE[2]

CORRESPONDANCE
sylvie.pages@inrae.fr
nadine.sellier@inrae.fr
philippe.castagnone@inrae.fr

RÉSUMÉ

L'entretien de collections de ressources biologiques est une nécessité pour la recherche fondamentale et appliquée. Les moyens mis en œuvre dans ce but peuvent être plus ou moins importants en fonction de la nature de ces ressources biologiques qui sont inertes ou vivantes. Les contraintes se font encore plus lourdes si ces ressources biologiques nécessitent la mise en œuvre d'hôtes vivants. Au sein de l'infrastructure de recherche RARe, c'est le cas notamment des collections de nématodes phytoparasites, de nématodes entomopathogènes, et de parasitoïdes oophages. En effet, ces organismes sont des parasites obligatoires, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent pas réaliser leur cycle biologique en l'absence de leur hôte vivant. Cet article décrit ces collections et présente les contraintes spécifiques liées à leur gestion.

MOTS-CLÉS

Nématodes phytoparasites, nématodes entomopathogènes, trichogrammes, ressources biologiques.

1 Diversité, Génomes & Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), UMR 1333 INRAE / Université de Montpellier, 34095 Montpellier.
2 Institut Sophia Agrobiotech (ISA), UMR 1355 INRAE / Université Côte d'Azur / 7254 CNRS, 06903 Sophia Antipolis

Maintaining collections of invertebrates of agronomic interest on living hosts: a challenge of heritage and specific constraints

Sylvie PAGÈS[1]
Nadine SELLIER[2]
Philippe CASTAGNONE[2]

CORRESPONDENCE
sylvie.pages@inrae.fr
nadine.sellier@inrae.fr
philippe.castagnone@inrae.fr

ABSTRACT
It is necessary to maintain collections of biological resources for fundamental and applied research. The resources implemented to this end can vary depending on the nature of these biological resources that are inert or living. The constraints become even greater if these biological resources require the utilization of living hosts. In the AgroBRC/RARe research infrastructure, this is the case in particular of collections of plant parasitic nematodes, entomopathogenic nematodes, and oophagous parasitoids. Indeed, these organisms are obligatory parasites, meaning that they cannot fulfil their biological cycle in the absence of their living host. This article describes these collections and presents the constraints specific to their management.

KEYWORDS
Plant parasitic nematodes, entomopathogenic nematodes, trichogramma, biological resources.

1 Diversité, Génomes & Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), UMR 1333 INRAE / Université de Montpellier, 34095 Montpellier.
2 Institut Sophia Agrobiotech (ISA), UMR 1355 INRAE / Université Côte d'Azur / 7254 CNRS, 06903 Sophia Antipolis

Introduction

Une collection est définie comme un *« ensemble d'échantillons de ressources génétiques prélevés et les informations afférentes, rassemblés et stockés, qu'ils soient détenus par les entités publiques ou privées »* (Article L412-4 8 du Code de l'Environnement).

Il existe de nombreuses collections au sein d'INRAE, dont certaines concernent des organismes maintenus vivants. Dans cet article, nous avons choisi de présenter trois collections regroupant des invertébrés d'intérêt agronomique, inscrites dans l'infrastructure de recherche RARe (Ressources Agronomiques pour la Recherche), et plus précisément au sein du Pilier Environnement (www.brc4env.fr ; Mougin et al., 2018). La gestion et les moyens mis en œuvre pour la conservation de ces organismes, bien qu'assez comparables à l'ensemble des collections de RARe, présentent toutefois des aspects partagés originaux, notamment une genèse commune et la nécessité de disposer d'un hôte vivant pour assurer leur maintenance.

Dans les années 1970, les travaux de recherches conduits à l'INRA d'Antibes dans le domaine de la protection des cultures se sont orientés vers l'étude de divers macro et microorganismes, qu'ils soient bio-agresseurs ou, au contraire, potentiels agents de lutte biologique, tels que les nématodes phytoparasites, les trichogrammes et les nématodes entomopathogènes. Progressivement, un ensemble de ressources biologiques y ont été rassemblées, maintenues et enrichies, aboutissant à la constitution de collections. Au fil des évolutions structurelles de l'INRA, ces collections ont été transférées en 1999 dans l'unité DGIMI (Diversité, Génomes & Interactions Microorganismes-Insectes) à Montpellier pour les nématodes parasites d'insectes, et en 2004 sur le site de l'unité ISA (Institut Sophia Agrobiotech) à Sophia Antipolis pour les nématodes parasites de plantes et les trichogrammes.

Ces collections présentent un intérêt fort à titre patrimonial pour les recherches appliquées et/ou fondamentales qui visent à étudier la biodiversité des organismes et répondre aux enjeux majeurs du changement de paradigme de l'agriculture dans le monde. Pour entretenir ces ressources biologiques vivantes et faire vivre les collections, les besoins en installations dédiées, adaptées, ainsi qu'en moyens humains et matériels sont des contraintes majeures, renforcées ici par le besoin de production des hôtes vivants associés.

Présentation des collections

La position systématique des invertébrés d'intérêt agronomique regroupés dans les trois collections décrites ici est présentée dans le tableau 1.

Les nématodes parasites de plantes

Trois collections vivantes de nématodes phytoparasites sont hébergées au sein de l'ISA à Sophia Antipolis, qui concernent des groupes majeurs aux plans agronomique et/ou environnemental : les nématodes à galles (*Meloidogyne* spp.), les nématodes vecteurs du virus du court-noué de la vigne (*Xiphinema* spp.) et les nématodes du pin (*Bursaphelenchus* spp.).
Actuellement, 145 souches échantillonnées à l'échelle mondiale sont multipliées, ce nombre étant évolutif dans le temps :

- *Bursaphelenchus* spp. : 35 souches appartenant à 10 espèces ;
- *Meloidogyne* spp. : 80 souches appartenant à 10 espèces ;
- *Xiphinema* spp. : 30 souches appartenant à 10 espèces.

Tableau 1 : Invertébrés d'intérêt agronomique considérés dans cet article

ORGANISMES	EMBRANCHEMENT	CLASSE	ORDRE	FAMILLE	GENRE
Trichogrammes	**Arthropode**	**Insecta**	Hymenoptera	Trichogrammatidae	Trichogramma
Nématodes à galles	**Nématode**	**Chromadorea**	Tylenchida	Meloidogynidae	Meloidogyne
Nématodes du pin	**Nématode**	**Chromadorea**	Rhabditida	Parasitaphelenchidae	Bursaphelenchus
Nématodes entomopathogènes	**Nématode**	**Secernentea**	Rhabditida	Heterhorhabditidae	Heterhorhabditis
Nématodes entomopathogènes	**Nématode**	**Secernentea**	Rhabditida	Steinernematidae	Steinernema
Nématodes vecteurs de virus	**Nématode**	**Enoplea**	Dorylaimida	Xiphinematidae	Xiphinema

Au sein de l'ISA, les travaux de recherche sur ces ressources biologiques concernent (i) la diversité génétique et l'évolution des nématodes ; (ii) les mécanismes à l'origine du pouvoir pathogène des nématodes ; (iii) les mécanismes de la résistance des plantes aux nématodes ; (iv) les stratégies de lutte contre les nématodes.

Les installations dédiées au maintien de ces collections (serres, locaux techniques, enceintes climatiques, laboratoires ; Figure 1) bénéficient d'un agrément préfectoral pour la manipulation des espèces de quarantaine (*M. chitwoodi, M. fallax* et *B. xylophilus*). À ce jour, la distribution hors de l'unité de ces matériels biologiques se fait essentiellement dans le cadre de collaborations avec des partenaires académiques et/ou privés.

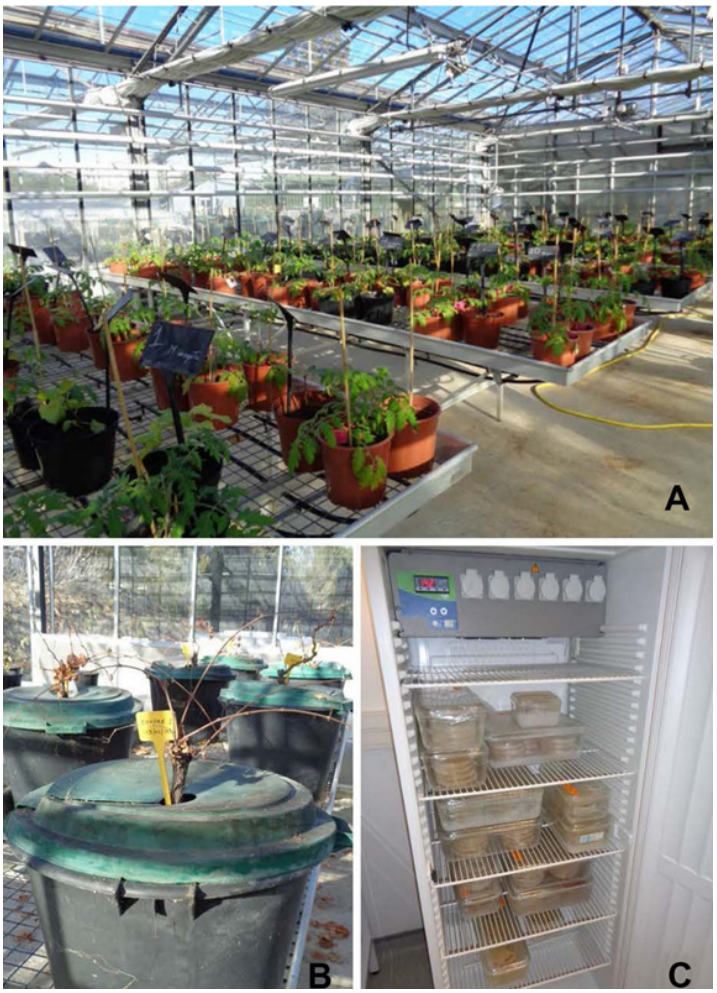


Figure 1. Les collections vivantes de nématodes phytoparasites maintenues à l'Institut Sophia Agrobiotech. (A) Nématodes à galles *Meloidogyne* spp. (B) Nématodes vecteurs de virus *Xiphinema* spp. (C). Nématodes du pin *Bursaphelenchus* spp.

Les parasitoïdes oophages

L'ISA héberge également une collection de parasitoïdes oophages, des insectes hyménoptères dont le développement pré-imaginal, avant le stade adulte, se fait à l'intérieur d'un œuf hôte, finissant par le tuer. Cette collection, dénommée EP-Coll (pour Egg Parasitoids Collection), est reconnue en tant que Centre de Ressources Biologiques (CRB ; https://www6.inrae.fr/crb-eggparasitoids-coll/), labellisée par le GIS IBiSA (Infrastructures en Biologie, Santé et Agronomie) depuis 2015 et certifiée ISO 9001:2015 depuis 2018. Ces marques de reconnaissance lui permettent de s'inscrire dans le réseau RARe et de garantir la qualité de son organisation. Si, à terme, l'objectif du CRB EP-Coll est d'élargir sa collection à d'autres genres, actuellement il est centré sur le genre *Trichogramma* ; ce dernier constitue l'un des premiers marchés commerciaux dans le cadre de la lutte biologique à l'aide de macro-organismes (Smith, 1996 ; Consoli et al., 2010) et une source potentielle de nouveaux agents de lutte biologique contre les lépidoptères nuisibles (Figueiredo et al., 2015 ; Uelese et al., 2014).

Un trichogramme est un hyménoptère d'environ 1 mm, dont l'élevage se fait dans des tubes en verre bouchés avec du coton (Figure 2B), avec un apport de miel et la fourniture d'œufs vivants d'*Ephestia kuehniella* (la teigne de la farine). Ces tubes sont placés dans une pièce dont les conditions abiotiques sont contrôlées. Le cycle de vie est de l'ordre de 3 à 4 semaines à 18 °C. L'origine de ces souches peut être exotique, c'est pour cela que la collection est maintenue dans un bâtiment confiné, bénéficiant d'agréments pour la détention d'organismes de quarantaine.

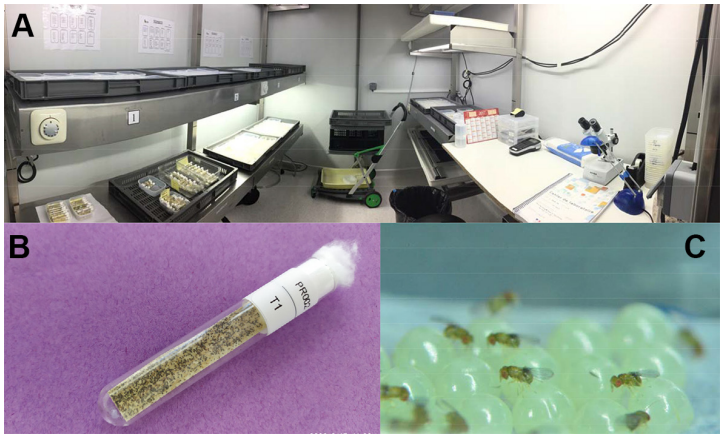


Figure 2 : (A) Laboratoire pour la gestion des souches de trichogrammes. (B) Tube d'élevage d'une souche de trichogrammes. (C) Femelles de trichogrammes en train de pondre dans des œufs de *Spilosoma lutea*.

La collection du CRB représente un catalogue d'environ 130 souches vivantes caractérisées. Une souche est définie comme une combinaison d'une espèce, d'une origine géographique, d'un type de climat, d'une plante et/ou insectes hôtes, voire d'un haplotype « rare », pouvant présenter un intérêt pour la caractérisation de la biodiversité ou la lutte biologique. En parallèle, environ 200 souches en cours

de caractérisation morphologique et phénotypique sont également entretenues pour l'activité de R&D du CRB. La distribution de ces ressources biologiques se fait essentiellement dans le cadre de collaborations avec des partenaires académiques (ex : projets ANR, AAP Ecophyto Maturation, etc.) et/ou privés.

Les nématodes parasites d'insectes

La collection de nématodes entomopathogènes (NEPs ; *Steinernematidae, Heterorhabditidae*) est hébergée dans l'UMR DGIMI à Montpellier. Les souches les plus anciennes sont conservées dans la collection depuis les années 1980. Cette collection est source de collaborations et d'échanges de ressources biologiques avec des laboratoires européens et aussi dans le monde entier (États-Unis, Rép. Tchèque, Liban…).

Les larves de NEPs sont des agents de biocontrôle à forte valeur ajoutée, utilisés en agriculture biologique contre les insectes ravageurs pour protéger les plantes cultivées en serre (ex : charançons du fraisier), dans les vergers (ex : carpocapse des pommiers) ou chez les particuliers. Des travaux antérieurs ont montré leur efficacité au champ, en milieu insulaire et tropical pour les cultures d'agrumes ou de canne à sucre (Mauléon et al., 1993).

Ce sont des vers ronds anguilliformes de petite taille (300 µm à 1,2 mm), ubiquistes, présents sur tous les continents sauf en Antarctique et vivant libres dans les sols, préférentiellement dans les sols sableux ; ils sont retrouvés dans les prairies, les forêts et potentiellement dans les parcelles cultivées. Ils se reproduisent dans les larves d'insectes, le cycle de développement parasitaire comprend 4 stades larvaires, des œufs et des adultes.

La collection des NEPs comprend 130 souches et ce nombre est évolutif dans le temps :

- *Steinernematidae* : 87 souches regroupant 15 espèces différentes ;
- *Heterorhabditidae* : 43 souches regroupant 4 espèces différentes.

Les travaux menés sur cette collection concernent (i) la taxinomie des NEPs, la taxinomie et la génomique de leurs microbiotes associés ; (ii) l'étude des mécanismes d'interactions existant entre les nématodes, les bactéries et les insectes hôtes ; (iii) la spécificité d'hôtes. Par exemple, dans le cadre du plan Ecophyto, l'unité DGIMI a bénéficié de financements pour travailler sur l'utilisation et l'optimisation des NEPs comme agents de biocontrôle. Ces projets portaient sur la recherche de méthodes alternatives au traitement chimique pour lutter contre l'un des ravageurs de culture majeur en France, le taupin (*Agriotes* spp.) (Campos-Herrera & Gutierrez, 2009).

Production des hôtes vivants pour le maintien des collections

Les trois collections décrites dans cet article ont un point commun fort et original, à savoir qu'elles doivent être entretenues vivantes, en passant par un ou plusieurs hôtes vivants (Figure 3). Le tableau 2 résume les conditions de multiplication pratiquées dans nos laboratoires.

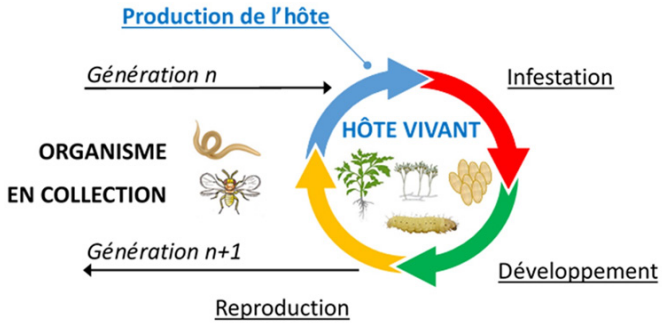


Figure 3. Représentation schématique du processus de mise en collection d'un organisme d'intérêt (nématode, insecte) sur un hôte vivant (plante, oeuf ou larve d'insecte, champignon). Pour des informations spécifiques à chaque organisme concerné, voir le texte.

Pour les nématodes à galles et les nématodes vecteurs de virus, le cycle biologique est simple et ne fait intervenir qu'un hôte végétal. Les nématodes du pin présentent un cycle biologique plus complexe faisant intervenir *in natura* un insecte vecteur, un hôte principal (le pin) et un hôte secondaire (des champignons associés au pin). Cependant, en conditions contrôlées, les nématodes du pin peuvent être multipliés sur champignon sans passer par l'hôte végétal (phase fongivore). Pour maintenir la reproduction des nématodes en continu, il est nécessaire de produire très régulièrement des hôtes adaptés (tomates et figuiers en pots pour *Meloidogyne*, *Botrytis cinerea* sur milieu de culture gélosé pour *Bursaphelenchus*). À noter que pour *Xiphinema*, l'hôte est une plante pérenne (vigne), il n'est donc pas nécessaire de procéder à des repiquages aussi fréquents. Cette production des hôtes vivants, entièrement réalisée sur site, est une étape indispensable - et chronophage - à la maintenance des collections. Ceci est particulièrement vrai pour la collection de nématodes à galles, dont le repiquage systématique est réalisé toutes les six à huit semaines. De plus, pour les deux collections maintenues en serre, l'état physiologique et sanitaire des plantes hôtes doit être contrôlé quotidiennement.

Tableau 2 : Les conditions de multiplication des collections

	HÔTE	ESPACE DÉDIÉ	NÉCESSITÉ DE CONFINEMENT	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE DU CYCLE DANS CES CONDITIONS
NÉMATODES PHYTOPATHOGÈNES					
Bursaphelenchus spp.	Botrytis cinerea	Enceinte climatique	Oui	13 - 15	Environ 2 semaines
Meloidogyne spp.	Tomate, figuier	Serre	Oui	Ambiante	De 6 à 8 semaines
Xiphinema spp.	Vigne	Serre	Non	Ambiante	De 2 à 4 mois
NÉMATODES ENTOMOPATHOGÈNES					
Heterorhabditis spp.	*Galleria mellonella*	Enceinte climatique	Non	15	De 2 à 6 mois
Steinernema spp.	*Galleria mellonella*	Enceinte climatique	Non	9	De 6 à 9 mois
TRICHOGRAMMES					
Trichogramma spp.	*Ephestia kuehniella*	Pièces climatiques	Oui	18	Environ 3 semaines

Les trichogrammes sont reproduits sur des œufs d'*E. kuehniella* (Lépidoptère) livrés chaque semaine par une bio-fabrique située en France. À la réception des œufs, un contrôle qualité est réalisé afin de s'assurer que les œufs n'ont pas été « contaminés » par d'éventuels trichogrammes sauvages. Pour le renouvellement d'une population de trichogrammes, les œufs d'*Ephestia*, conservés à 4 °C, sont collés sur des bandelettes de papier adhésif et préalablement « stérilisés » aux rayons UV pendant 20 mn, afin de garantir qu'aucune larve de lépidoptère n'émergera risquant de dévorer les œufs parasités, entrainant ainsi la perte de la population de trichogrammes. Les souches de trichogrammes ne sont pas « synchronisées », le renouvellement est donc étalé dans le temps, et chaque jour il peut être nécessaire de mettre des œufs d'*Ephestia* à disposition d'un groupe de souches, d'où une contrainte forte de surveillance quotidienne.

Les populations de nématodes entomopathogènes sont produites en masse sur des larves de l'insecte *Galleria mellonella* (Teigne des ruches, Lépidoptère), qui est un hôte sans contrainte particulières d'élevage et très permissif aux nématodes. Au sein de l'unité DGIMI, le personnel de l'insectarium assure l'élevage et la production de *Galleria* en quantité suffisante pour pérenniser le renouvellement régulier des souches de la collection des nématodes. Parfois, pour répondre à certains besoins en recherche, la production des NEPs est réalisée avec des hôtes dits de « quarantaine » nécessitant une structure confinée. Après l'étape d'infestation de l'hôte, le cycle parasitaire se réalise dans le cadavre de la larve d'insecte, et la génération n+1 qui émerge du cadavre (Figure 4A) est récoltée au bout de 3 à 4 semaines pour conservation. La récolte est stockée dans des flacons de culture de 250 mL dans une solution de Ringer dans des enceintes thermostatées réfrigérées à porte pleine, car les nématodes entomopathogènes sont sensibles aux UV qui leur font perdre leur pouvoir infestant (Figure 4B). La majorité des souches est renouvelée deux fois par an. Certaines souches plus fragiles nécessitent un renouvellement plus fréquent, par exemple tous les deux mois pour l'espèce *Heterorhabditis indica*. Pour une gestion plus sereine et pour limiter la surcharge de travail, un renouvellement de dix à quinze souches chaque mois est planifié.

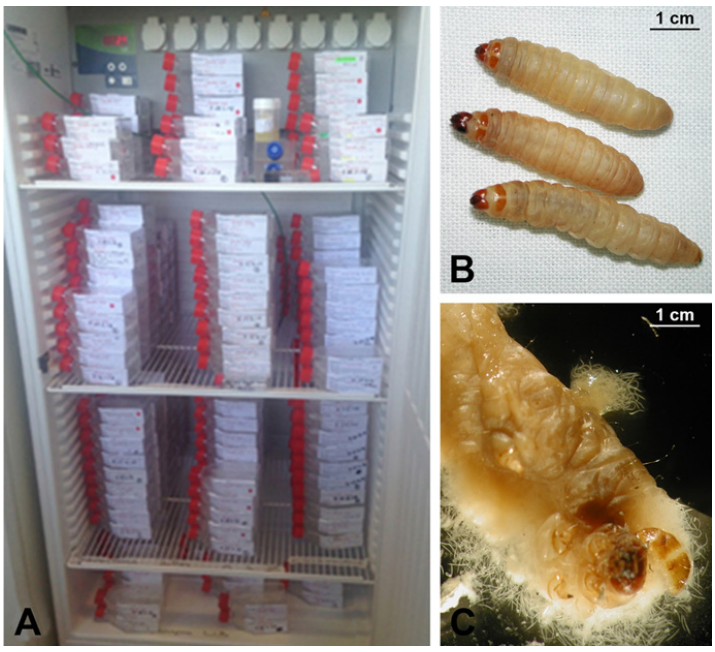


Figure 4. (A) Les collections de nématodes entomopathogènes maintenues vivantes dans des flacons de culture stockées en enceinte réfrigérée dans l'unité DGIMI. (B) Larves de *Galleria mellonella* saines utilisées comme hôte pour la reproduction des nématodes. (C) Sortie massive des larves infestantes de nématodes entomopathogènes du cadavre de la larve d'insecte.

Contraintes communes aux trois collections

Température

La température est un facteur abiotique important pour la conservation de chacune des collections (Tableau 2) et doit être contrôlée en permanence. Par exemple, à l'ISA, ce contrôle se fait par des enregistreurs pilotés par un système de gestion centralisée et reliés à un logiciel de surveillance et d'alarme. Dans le cas des nématodes entomopathogènes, le renouvellement des souches (génération n+1) se fait généralement à 23 °C, mais la température d'infestation varie selon l'origine des souches entre 18 °C et 28 °C. Si la température est inadaptée, cela entraine une diminution de la production, qui peut conduire à la perte de la souche au fil des générations. En 2017, une panne d'enceintes réfrigérées a entrainé la perte de 20 % des souches de la collection.

Caractérisation spécifique

À l'échelle des trois types d'organismes considérés ici, seules les approches de caractérisation biochimique et/ou moléculaire peuvent être mises en œuvre pour distinguer les espèces de manière fiable et s'assurer de l'absence de mélanges et/ou de contaminations, sans recourir à l'expertise d'un spécialiste en taxinomie.

Dans le cas des trichogrammes, c'est le séquençage d'une portion du gène codant pour la première sous-unité de la cytochrome oxydase (COI), protéine mitochondriale de la chaine respiratoire, qui est utilisé en routine pour caractériser rapidement la biodiversité des taxons (Al khatib et al., 2014 ; Correa et al., 2016). Cette méthode consiste, à partir d'individus identifiés morphologiquement et assignés à une espèce, à associer les séquences COI correspondantes. Par la suite, les séquences identiques ou proches pourront être assignées aux espèces correspondantes.
Dans le cas des nématodes phytoparasites, afin de permettre la caractérisation spécifique des souches en collection et identifier d'éventuels mélanges, différents marqueurs biochimiques (isoestérases) ou moléculaires (ADN satellite, SCAR, ADN ribosomique, ADN mitochondrial) sont utilisés en routine au laboratoire.

La caractérisation des espèces de nématodes entomopathogènes est réalisée en routine par des méthodes moléculaires basées sur le séquençage du gène codant de l'ARNr 28S ou de la région intergénique ITS. La morphométrie reste, cependant, la méthode de référence utilisée dans la littérature scientifique pour la caractérisation taxinomique de nouvelles espèces.

Organisation du travail

La réception, le renouvellement des populations dans les meilleures conditions, c'est-à-dire sans perte de souches et sans contaminations entre souches, ainsi que la mise à disposition de matériel biologique nécessitent une organisation solide, avec des contraintes ponctuelles et récurrentes, mais aussi d'autres irrégulières, exigeant une bonne coordination des tâches. Certains CRB bénéficient de personnel dédié à 100 %, pour l'entretien, le renouvellement des élevages et l'enregistrement des données associées, c'est le cas du CRB EP-Coll, mais d'autres n'ont pas cette chance et doivent faire face à des problématiques d'organisation fortes, pour être en mesure d'assurer la grande diversité des tâches afférentes au maintien des collections vivantes.
Un volant très important de l'activité concerne la gestion des données associées au matériel biologique, qui peut se faire à l'aide d'outils dédiés (SI Biolomics, Système d'Information déployé au sein de RARe dans plusieurs CRB par exemple), ou bien avec des moyens plus restreints, comme pour la collection des nématodes entomopathogènes où l'ensemble des données est actuellement stocké dans différents fichiers Excel.

De plus, depuis quelques années, la détention et l'utilisation de ressources biologiques sont soumises à des règlementations (Protocole de Nagoya, Règlementation européenne, Loi Française). D'un point de vue juridique, le gestionnaire de collections doit pouvoir renseigner les utilisateurs dans le cadre de contrats privés ou publics et transmettre, si nécessaire, les documents ad hoc selon l'origine de la ressource.

Agréments/Confinement

Pour les trichogrammes, une distinction doit être faite selon l'origine géographique des souches. En effet, alors que la détention d'organismes issus de France Métropolitaine ne nécessite pas d'autorisation, la détention de ceux provenant d'autres aires géographiques nécessite un accord préalable, conformément à l'arrêté du 28/06/2012 portant sur les macroorganismes indigènes utilisables en lutte biologique (référence : AGRG1225395A).

Certaines des espèces de nématodes phytoparasites détenues à l'ISA sont des organismes de quarantaine (par exemple, *B. xylophilus* ou *M. chitwoodi*), qui doivent impérativement être manipulés dans des installations confinées et bénéficiant d'un agrément préfectoral au titre du règlement 2019/829/CE.

Efforts en Recherche & Développement

Allongement du temps intergénérationnel

L'entretien de ces collections d'organismes vivants, qui nécessitent obligatoirement au cours de leur cycle de vie un hôte vivant dont la production ou l'approvisionnement est géré par le laboratoire, est particulièrement chronophage. Du personnel dédié n'est pas toujours disponible, et des voies d'améliorations doivent être recherchées pour réduire le temps consacré au renouvellement des générations. Plusieurs pistes sont explorées, telle que la cryopréservation dans l'azote liquide pour les nématodes phytoparasites, en adaptant des protocoles déjà expérimentés sur les nématodes à galles (Carneiro et al., 2005 ; Irdani et al., 2011 ; Van der Beek et al., 1996). Les premiers résultats sont encourageants quant à la survie des individus, mais le protocole nécessite des essais complémentaires pour évaluer le pouvoir infestant des nématodes après décongélation.

Des études portant sur l'induction de périodes de quiescence ou de diapause sont également en cours sur les trichogrammes, en jouant sur des expositions à des températures et des photopériodes adaptées et appliquées à des stades précis du développement de l'embryon à l'intérieur de son hôte. Là encore, les premiers résultats sont encourageants, mais mettent en évidence des variabilités importantes entre espèces notamment, et nécessitent d'être approfondis.

La cryoconservation des NEPs a été pratiquée, mais elle n'est pas un moyen de conservation utilisé dans le laboratoire, car la méthodologie doit être adaptée à chaque espèce.

Amélioration des outils de caractérisation moléculaire

Même si certaines méthodes d'identification moléculaire sont déjà utilisées en routine sur les trois collections, les recherches se poursuivent pour développer de nouvelles approches qui soient plus fiables et plus discriminantes. Afin de détecter plus efficacement et plus rapidement les possibles contaminations entre souches de trichogrammes, le CRB Ep-Coll, en collaboration avec des collègues du CBGP (Centre de Biologie et de Gestion des populations, Montpellier), travaille à la mise au point d'une nouvelle méthode de vérification, applicable directement sur des pools d'individus, à l'aide des technologies NGS (séquençage nouvelle génération). En ciblant à nouveau le gène mitochondrial COI, le protocole combine deux amplifications PCR successives et un séquençage avec le système Illumina MiSeq. Pour ce qui concerne les nématodes parasites de plantes, l'objectif est d'amener le pouvoir de résolution au niveau infra spécifique, afin de différencier aisément les isolats appartenant à la même espèce. L'approche par séquençage NGS est également privilégiée.

Amélioration du protocole d'infestation

Des pertes récurrentes de certaines espèces de nématodes entomopathogènes ont conduit à modifier des paramètres importants liés aux conditions de renouvellement des souches. En effet, des études ont montré que la durée du stockage et la température ont un effet sur le pouvoir infestant des NEPs (Molyneux, 1985 ; Stauch et al., 2000 ; Lalramliana & Yadav, 2016). Les premiers résultats d'une étude menée sur une espèce de la collection se sont avérés concluants et ont permis d'adapter la méthodologie. Dans le cadre d'une démarche d'Assurance Qualité, l'objectif est maintenant d'étendre les expérimentations à d'autres espèces, afin de déterminer les conditions optimales pour garantir une survie et une infectivité maximales de l'ensemble des souches.

Conclusion

La gestion d'une collection n'est pas seulement et simplement limitée à l'accumulation d'échantillons inertes ou de populations d'organismes vivants, accompagnés ou non de leurs organismes hôtes associés, mais procède bien d'un processus dynamique, avec l'entrée et la sortie de souches au fil du temps. Elle s'accompagne de la manipulation d'une somme considérable de données caractérisant ces ressources. Cet ensemble représente une richesse inestimable, source de projets de recherche et réservoir de potentiels agents de lutte biologique (cas des trichogrammes et des NEPs) qui doit être pérennisée dans le temps. Pour cela, une organisation collective avec des moyens humains complémentaires, en termes de compétences scientifiques et techniques, ainsi que des moyens matériels adaptés, doit être mobilisée. ■

Remerciements

Ces trois collections ne pourraient pas exister sans l'investissement quotidien de nombreux collègues des unités ISA et DGIMI, que nous remercions chaleureusement. Nous adressons également nos remerciements au Département Santé des Plantes et Environnement (SPE) pour les moyens humains et matériels qui nous ont été attribués, au cours des dernières années, pour le maintien des collections. Enfin, nous remercions la CNUE, l'infrastructure RARe et le GIS IBiSA pour leur soutien en moyens d'équipement et de fonctionnement.

Références

Al Khatib F., Fusu L., Cruaud A., Gibson G., Borowiec N., Rasplus J.Y., Ris N and Delvare G., 2014. An integrative approach to species discrimination in the Eupelmus urozonus complex (Hymenoptera, Eupelmidae), with the description of 11 new species from the Western Palaearctic. Systematic Entomology 39(4) : 806-862.

Campos-Herrera R. and Gutiérrez C., 2009. Screening Spanish isolates of steinernematid nematodes for use as biological control agents through laboratory and greenhouse microcosm studies,

Journal of Invertebrate Pathology 100(2) : 100-105.

Carneiro R.M.D.G., Martins I., Oliveira Teixera A.C. and De Castro Mota F., 2005. Freezing and storing Meloidogyne spp. in liquid nitrogen. Nematologia Brasileira 29 : 221-224.

Consoli F.L., Parra J.R.P. and R.A. Zucchi, 2010. Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma Springer Netherlands.

Correa M.C.G., Palero F., Dubreuil N., Etienne L., Hulak M., Tison G., Warot S., Crochard D., Ris N. and Kreiter P., 2016. Molecular characterization of parasitoids from armored scales infesting citrus orchards in Corsica, France. BioControl, on Line first. BioControl 61 : 639-647.

Figueiredo M.D.C., Cruz I., da Silva R.B. and Foster J.E., 2015. Biological control with Trichogramma pretiosum increases organic maize productivity by 19.4%. Agronomy for Sustainable Development 35(3) : 1175-1183.

Irdani T., Scotto C. and Roversi P.F., 2011. Low cryoprotectant concentrations and fast cooling for nematode cryostorage. Cryobiology 63 : 12-16.

Lalramliana and Yadav A.K., 2016. Effects of storage temperature on survival and infectivity of three indigenous entomopathogenic nematodes strains (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Meghalaya, India. Journal of Parasitic Diseases 40 : 1150-1154.

Mauléon H., Barré N. and Panoma S., 1993. Pathogenicity of 17 isolates of entomophagous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the ticks Amblyomma variegatum (Fabricius), Boophilus microplus (Canestrini) and Boophilus annulatus (Say). Experimental and Applied Acarology 17(11) : 831-838.

Molyneux A.S., 1985. Survival of infective juveniles of Heterorhabditis spp. and Steinernema spp. (Nematoda : Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. Revue de Nématologie 8 : 165-170.

Mougin C., Artige E., Marchand F., Mondy S., Ratié C., Sellier N., Castagnone-Sereno P., Coeur D'Acier A., Esmenjaud D., Faivre-Primot C., Hamelet V., Granjon L., Lange F., Pagès S., Rimet F., Ris N., and Sallé G., 2018. BRC4Env, a network of Biological Resource Centres for research in environmental and agricultural sciences. Environmental Science and Pollution Research 25 : 33849-33857.

Smith S.M., 1996. Biological control with Trichogramma. Advances, successes, and potential of their use. Annual Review of Entomology 41 : 375-406.

Strauch O., Niemann I., Neumann A. et al., 2000. Stockage et formulation des nématodes entomopathogènes Heterorhabditis indica et H. bacteriophora. BioControl 45 : 483-500.

Uelese A., Ridland P.M., Stouthamer R., He Y.R., Ang G., Zalucki M.P. and Furlong M.J., 2014. Trichogramma chilonis Ishii: A potential biological control agent of Crocidolomia pavonana in Samoa. Biological Control 73 : 31-38.

Van der Beek H.J.G., Veldhuis W.B.J., Zijlstra C. and Van Silfhout C.H., 1996. Preservation of Meloidogyne hapla and M. chitwoodi in liquid nitrogen: Differences in response between populations. Fundamental and Applied Nematology 19 : 227-234.

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 « NOV'AE», la date de sa publication et son URL.