

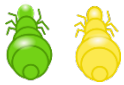
Fiche n°3

« Analyse biomoléculaire des contenus stomacaux des prédateurs insectivores et des crottes »

Type d'ennemis naturels et bio-agresseurs concernés



Arthropodes (carabes, coccinelles, araignées) et vertébrés (chiroptères)



Insectes (pucerons, tordeuses, mouches...) ; adventices.

Critères de caractérisation

Temps au champ : de quelques heures à 1 jour au minimum (collecte de durée variable selon le type et la densité-activité de l'ennemi naturel visé)

Temps au laboratoire : 1 jour pour l'extraction de 200 individus + au moins 1 jour de PCRs (selon le nombre de marqueurs à tester) + 1 jour de migration et d'analyse des résultats

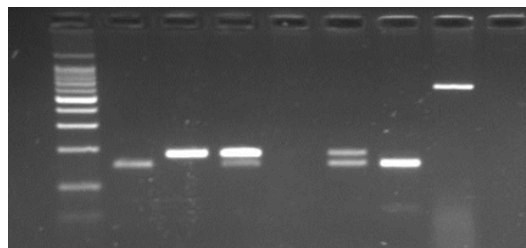
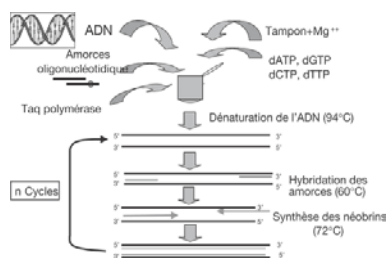
Matériel nécessaire : requiert l'utilisation de matériels de biologie moléculaire spécifiques (broyeur ; centrifugeuse ; thermocycleur ; cuves à électrophorèse ou séquenceur)

Investissement (coût) : élevé - Tester la présence d'un bio-agresseur sur 100 échantillons revient à environ 400 euros hors frais de main d'œuvre et hors amortissement du matériel. Ce prix peut être beaucoup plus élevé en prestation.

Expertise requise : difficile mais possible en prestation si méthodologie et protocole mis au point préalablement.

Pression d'observation requise : les taux de positifs vont rarement au-delà de 10%. Réaliser au moins 100 analyses pour un même ravageur recherché ou espèce prédatrice échantillonnée.

Typed'utilisation : acquisition de connaissances



Objectifs

Identifier la présence d'ADN d'un ou plusieurs bio-agresseurs d'une culture dans le contenu stomacal ou les fèces d'un de leurs prédateurs (c'est-à-dire un arthropode prédateur, une crotte de chauves-souris) par amplification PCR pour préciser les liens trophiques entre organismes. Il est possible de rechercher la consommation d'adventices pour les individus phytophages ou granivores également ^[4,5].

Principe

L'ADN est extrait des échantillons : « régurgitas », insectes entiers ou partiellement disséqués, crottes. Une réaction d'amplification est réalisée par biologie moléculaire (technique PCR), le plus souvent à l'aide d'amorces spécifiques d'un ou plusieurs bio-agresseurs ciblés (définies au niveau de l'espèce, genre ou famille). La mise en évidence d'une telle réaction d'amplification, considérée comme positive, à une (des) amorce(s) spécifique(s) permet de dire que l'échantillon a consommé le(s) bio-agresseur(s). Plus généralement cela permet d'affirmer que le taxon considéré est un prédateur et intervient dans le contrôle biologique du ravageur considéré.

Les amorces du bio-agresseur peuvent déjà exister (consultation banque de données ; ainsi par exemple existent déjà des amorces de divers pucerons, de tordeuses, de limaces, de graines d'adventices, de parasitoïdes et d'auxiliaires (c'est-à-dire carabes, araignées, syrphes, coccinelles) afin de tester la prédation intra-gilde ^[1] et les effets sur les espèces 'non-cibles' ^[2]. Dans d'autres cas les paires d'amorces doivent être « désignées » et leur spécificité doit être testée dans le cadre de l'étude réalisée (pour cela l'amorce mise au point doit être testée sur des individus proches de ceux visés et sur de nombreuses autres espèces fréquentant la zone d'étude). Pour le métabarcoding, les séquences présentes doivent être testées par rapport aux séquences qui existent déjà dans les bases de données de séquences en ligne ^[3].

Variables mesurées

Le taux d'individus positifs à l'amplification PCR est mesuré, pour en déduire un pourcentage d'individus ayant consommé le bio-agresseur. Il est possible de connaître le stade de développement de la proie consommée en couplant aux relevés de terrain un monitoring du ravageur.

Résultats potentiels

Cette méthode permet de déterminer si une consommation s'est produite au champ. Elle permet d'approfondir une étude « in situ » sur les dynamiques spatio-temporelles ^[6] de la régulation d'un bio-agresseur et de déterminer à quel stade du cycle du ravageur la prédation a eu lieu. Une extension possible de cette méthode est de déterminer les types de végétaux consommés par un auxiliaire (au niveau de la famille végétale par exemple) ou par un ravageur ^[5].

Limites de la méthode

Cette méthode nécessite de prélever les régurgitas, les ennemis naturels et les fèces en minimisant les risques de contamination. Elle nécessite de collecter des échantillons avec une méthode appropriée ^[7] et les plus frais possible (ex : crottes de la nuit dans un gîte à chiroptères). Elle nécessite aussi de connaître le temps de détection après digestion (afin d'adapter le protocole d'échantillonnage de terrain) et donc de réaliser au préalable des tests alimentaires permettant d'évaluer la capacité à détecter les restes d'un ravageur donné au

cours du temps. Ces tests préalables permettent de connaître la sensibilité de l'amplification PCR. De plus, d'autres facteurs sont susceptibles de jouer sur la digestion et le temps de détectabilité : la taille de l'individu, son stade, son sexe, la température au moment de sa collecte etc. Il est possible de s'affranchir de ces analyses de sensibilité spécifique du couple prédateur-proie, bien que cela limite la possibilité de comparer les proies et les prédateurs entre eux.

Cette méthode qualitative ne permet pas de déterminer la quantité de proies consommées par un prédateur.

Conseils pour la mise en œuvre d'un protocole

Étapes préalables: selon le type d'étude il faut, par exemple échantillonner des ennemis naturels à différents stades du cycle d'un ravageur afin de déterminer la guildes de ses prédateurs.

Description des étapes au champ : Les ennemis naturels des bio-agresseurs des cultures ou leurs fèces ou régurgitas ^[5] proviennent de collectes de terrain réalisées de sorte à éviter les contaminations ADN entre échantillons et à l'ADN des échantillons collectés. Ils sont donc la plupart du temps collectés individuellement en microtube, mis dans l'alcool à 90°C et conservés au congélateur.

Description des étapes au labo Toutes les manipulations (notamment l'identification) sont ensuite réalisées rapidement pour ne pas sortir les individus du froid trop longtemps, et avec du matériel propre (nettoyé à la flamme ou avec de l'eau de javel, ou matériel neuf jetable comme des cure dents) pour chaque individu afin de ne pas contaminer avec de l'ADN de proies.

Les extractions d'ADN sont réalisées à l'aide de kit d'extraction (existant dans le commerce comme par exemple le kit Qiagen® « Blood et tissu ») ou de protocoles d'extraction ADN « maison ». Une dissection sommaire des individus peut être nécessaire afin d'éliminer les parties chitineuses génératrices d'inhibiteurs d'amplification (exemple des carabes dont seul l'appareil digestif est extrait à contrario des araignées qui peuvent être broyées directement). Trois méthodes PCR peuvent être utilisées pour détecter la ou les proies dans des contenus stomacaux: les PCR en simplex, en multiplex, ou le metabarcoding. Les PCR en simplex utilisent une paire d'amorces spécifiques par réaction PCR ^[8]. Les PCR en multiplex, utilisent plusieurs paires d'amorces spécifiques mélangées avant la réaction de PCR. Cette méthode demande beaucoup d'essais pour optimiser les temps, les conditions PCR et les quantités de chaque amorce et réactif, car la sensibilité de chaque amorce dépend aussi des autres amorces associées au multiplex.

Le metabarcoding utilise des amorces universelles, tous les ADN de l'échantillon sont amplifiés, le grand volume de données des séquences générées est ensuite analysé par bio-informatique ^[3]. Dans le passé, ces méthodes ont été plus sensibles aux contaminations avec de l'ADN de l'environnement car tous les ADN présents sont amplifiés et la compétition entre ADN peut rendre indétectable les faibles quantités d'ADN de proies. Ces méthodes sont actuellement de plus en plus fiables. Chaque produit PCR est reconnu après la migration par la longueur du fragment d'ADN amplifié (nombre de paires de bases) et la couleur du fluorochrome accroché.

Intérêt du couplage avec d'autres méthodes

Cette méthode peut être complétée avec des méthodes d'exclusion (Fiche n°6) ou d'expérimentation de la prédation en conditions contrôlées (Fiche n°2) de façon à confirmer les liens de consommation entre les observations de populations de ravageurs et les ennemis naturels observés.

Exemples d'application

Exemple 1: Présence de ravageurs des vergers dans des crottes de chauves-souris identifiés par PCR (synthèse de différents travaux Ctifi-INRA PSH Auignon) : ces analyses ont permis de mettre en évidence la consommation de mouche de l'olive et de deux espèces de tordeuses par plusieurs espèces de chiroptères.

ESPECE FRUITIERE	LIEU	ANNEE ET MOIS	CROTTE ANALYSEES	% DE CROTTE POSITIVES POUR :		
				MOUCHE DE L'OLIVE	CARPOCAPSE DE LA POMME	TORDEUSE ORIENTALE DU PÊCHER
Olivier	Bellegarde (Gard)	2005 (Septembre)	12	33 %		
Olivier	Bellegarde (Gard)	2005 (Octobre)	12	17 %		
Pommier	Avignon (Vaucluse)	2009 (Mai-Octobre)	86		7 %	15-21 %
Pommier	Avignon (Vaucluse)	2010 (Mai-Juin)	93		5-14 %	
Pommier	Avignon (Vaucluse), Bellegarde (Gard)	2013 (Mai-juin)	87		15-21 %	12-14 %
Pommier	Bellegarde (Gard)	2014 (Avril-Juin)	500			2-18 %
Pommier	Bellegarde, Beaucaire, St Gilles, Garons (Gard)	2015 (Avril-Juin)	507		2-10 %	1 %
Pommier	Bellegarde (Gard) + Alpes de Hte Provence	Juin et Septembre 2016	154		6%	

Exemple 2 : Présence de tordeuse de la vigne dans des crottes de chauves-souris identifiés par PCR (travaux IFU- INRA UMR SAVE)

Sur vigne, un des objectifs était d'apporter la preuve que certaines espèces de chiroptères exercent une pression de prédation sur les tordeuses. Les travaux menés en Bourgogne durant les campagnes 2015 et 2016 ont permis de collecter pendant la période de vol des tordeuses de la vigne, plus de 3000 échantillons contenant des fèces de *Pipistrellus pipistrellus*, *Pipistrellus Kuhlii*, *Rhinolophus hipposideros*.

L'INRA UMR SAVE a développé trois couples d'amorces spécifiques permettant d'amplifier des fragments courts d'ADN d'eudémis (Lb-nb4F/Lb-nb3R et Lb-nb5F/R) ou de cochyli-pyrale (Ea-nbF/R). Le couple d'amorce (Ea-nbF/R) amplifie un fragment court (175 pb) au niveau de l'ADN de cochyli mais aussi de la pyrale de la vigne. La sensibilité des amorces a été estimée via des tests alimentaires réalisés avec des chauves-souris se trouvant en

captivité au centre de soins de la LPO Aquitaine. Respectivement 90 % et 70 % des fèces sont positifs 6 h et 70 h après ingestion d'eudémis. Pour cochylis, 73 % des guanos sont positifs 6 h après ingestion.

En 2017, 144 fèces ont été analysés, 66 % d'entre eux sont positifs ADN tordeuses (eudémis, cochylis-pyrale ou eudémis et cochylis-pyrale). Le rôle fonctionnel des chauves-souris est confirmé, *Pipistrellus pipisterellus*, *Pipistrellus Kuhlii*, ainsi que *Rhinolophus hipposideros* sont des espèces prédatrices d'imagos de tordeuses de la vigne.

Bibliographie

- [1] Davey, J.S., Vaughan, I.P., Andrew King, R., Bell, J.R., Bohan, D.A., Bruford, M.W., Holland, J.M. & Symondson, W.O.C. (2012) Intraguild predation in winter wheat: prey choice by a common epigeal carabid consuming spiders (ed Y Clough). *Journal of Applied Ecology*, **50**, 271–279.
- [2] King, R.A., Vaughan, I.P., Bell, J.R., Bohan, D.A. & Symondson, W.O.C. (2010) Prey choice by carabid beetles feeding on an earthworm community analysed using species- and lineage-specific PCR primers. *Molecular Ecology*, **19**, 1721–1732.
- [3] Derocles, S.A.P., Bohan, D.A., Dumbrell, A.J., Kitson, J.J.N., Massol, F., Pauvert, C., Plantegenest, M., Vacher, C. & Evans, D.M. (2018) Biomonitoring for the 21st Century: Integrating Next-Generation Sequencing Into Ecological Network Analysis. *Advances in Ecological Research*, **58**, 1–62.
- [4] Wallinger, C. (2016) Molecular detection of seed DNA in regurgitates of granivorous carabid beetles. Entomological Society of America. doi:10.1603/ICE.2016.114542
- [5] Wallinger, C., Sint, D., Baier, F., Schmid, C., Mayer, R. & Traugott, M. (2015) Detection of seed DNA in regurgitates of granivorous carabid beetles. *Bulletin of Entomological Research*, **105**, 728–735.
- [6] Bohan, D.A., Bohan, A., Glen, D.M., Symondson, W.O.C. & Wiltshire, C. (2000) Spatial dynamics of predation by carabid beetles on slugs. *Journal of Animal Ecology*, **69**, 367–379.
- [7] King, R.A., Davey, J.S., Bell, J.R., Read, D.S., Bohan, D.A. & Symondson, W.O.C. (2011) Suction sampling as a significant source of error in molecular analysis of predator diets. *Bulletin of Entomological Research*, 1–6.
- [8] King, R.A., Moreno-Ripoll, R., Agusti, N., Shayler, S.P., Bell, J.R., Bohan, D.A. & Symondson, W.O.C. (2011) Multiplex reactions for the molecular detection of predation on pest and nonpest invertebrates in agroecosystems. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 370–373.

Ainsi que:

- Garcin A., Mouton S., 2006. Le régime alimentaire des carabes et staphylins. In : Infos-Ctifl, n° 218, P. 19-24.
- Ricard J.M., Garcin A., Damian-Picollet S., Bousquet L., 2007. Biodiversité des arthropodes du sol en verger d'olivier et recherche de prédateurs de la mouche de l'olive. Infos-Ctifl n°229, mars 2007.
- Jay M., Boreau de Roince C., Ricard J.M., Mandrin J.F., Garcin A., Lavigne C., Bouvier J.C., Tupinier Y., Puechmaille S., 2012. Biodiversité fonctionnelle en verger de pommier. Les chauves-souris consomment-elles des ravageurs ? (4ème partie). Infos-Ctifl n°286, novembre 2012.
- Lefebvre M., Ricard J.M., Mandrin J.F., Lavigne C., Franck P., 2015. Les araignées comme agent de régulation des ravageurs. Info-Ctifl n° 315, octobre 2015, p45-53.
- Unruh, T.R., Miliczky, E.R., Horton, D.R., Thomsen-Archer, K., Rehfield-Ray, L. & Jones, V.P. (2016) Gut content analysis of arthropod predators of codling moth in Washington apple orchards. *Biological Control*, **102**, 85-92.