

# SuzuCI "Développement d'une méthode de lutte biologique contre le ravageur de cultures *Drosophila suzukii* basée sur l'utilisation de bactéries symbiotiques manipulatrices de la reproduction"

Responsable scientifique : Laurence Mouton

Partenaires : Patricia Gibert, Sylvain Charlat, Fabrice Vavre, David Lejon, Jean-François Granone

## 3. Rapport scientifique : 10 à 15 pages

### *Introduction*

#### *La lutte contre les insectes ravageurs*

Un des défis majeurs du XXIème siècle pour nos sociétés sera de produire à l'échelle mondiale une quantité suffisante de ressources alimentaires tout en maintenant un niveau de productivité économique satisfaisant, et à faible impact sur la biodiversité. Or, les insectes ravageurs de cultures réduisent d'environ 30% les rendements agricoles. Deux principaux phénomènes vont conduire à l'augmentation de l'introduction et de la distribution de nouvelles espèces potentiellement nuisibles : le dérèglement climatique et le commerce international. Les prédictions du dérèglement climatique à l'horizon 2050 prévoient une augmentation de 18% de l'aire de répartition des espèces invasives d'arthropodes connues actuellement. Dans l'optique d'une lutte durable et respectueuse de l'environnement contre ces ravageurs, il est indispensable de diversifier les méthodes de contrôle des populations pour proposer des alternatives concrètes aux produits phytosanitaires. C'est dans cette démarche que s'inscrit le projet SuzuCI.

#### *La Technique de l'Insecte Incompatible (TII)*

Le projet porte sur le développement d'une stratégie de lutte biologique basée sur l'utilisation de bactéries symbiotiques, *Wolbachia* en l'occurrence. Ces bactéries, qui sont très fréquentes chez les insectes (près de 80% des espèces seraient infectées), ont des effets phénotypiques variés qui leur permettent d'envahir très rapidement les populations d'insectes, parmi lesquels l'incompatibilité cytoplasmique (IC). L'IC entraîne la mort des embryons lors du croisement entre un mâle infecté par une bactérie et une femelle non infectée ou entre mâle et femelle infectés par des souches de cette bactérie dites incompatibles. Le lâcher de mâles infectés par une bactérie induisant de l'IC pourrait donc agir comme le lâcher de mâles stériles (lutte autocide), sans avoir recours à l'irradiation ou à des traitements chimiques pour stériliser les mâles. L'IC présente donc un avantage majeur par rapport aux méthodes standard de stérilisation, car les mâles stériles (infectés par la bactérie) montrent une capacité de survie et de copulation identiques à celle des mâles non-infectés. Le principe est donc d'introduire, en grand nombre, des mâles infectés par une bactérie induisant de l'IC dans une population naturellement non infectée par cette bactérie et qui seront en compétition avec les autres mâles.

#### *Drosophila suzukii : une invasion récente et une menace majeure*

Cette étude est réalisée sur un redoutable ravageur de cultures fruitières, *Drosophila suzukii*. Cette drosophile d'origine asiatique a été recensée pour la première fois en Europe (Italie, Espagne) en 2008, puis en France en 2010. Elle s'est ensuite propagée dans toute la France et dans de nombreux pays d'Europe. Contrairement à la plupart des drosophiles, ses larves ne se développent pas uniquement dans des fruits déjà abîmés car les femelles peuvent pondre dans des fruits sains en cours de maturation. *D. suzukii* possède une large gamme de plantes hôtes, principalement les fruits rouges. En Europe, *D. suzukii* a été inscrite sur la liste d'alerte de l'Organisation Européenne de Protection des Plantes en janvier 2010. Pour quelques cultures il existe des traitements chimiques

homologués, mais peu efficaces, et il n'existe pas encore de méthode de lutte biologique contre ce ravageur à ce jour.

L'objectif est de réduire les populations de *D. sukuzii* en utilisant la capacité de la bactérie *Wolbachia* à induire de l'IC Technique de l'Insecte Incompatible (TII).

### **Méthodes utilisées et résultats obtenus**

#### **Tâche 1 : Diversité de *Wolbachia* chez *D. sukuzii* et analyse phylogénétique**

Au début du projet, il y avait très peu de connaissances sur l'interaction entre *D. sukuzii* et la bactérie *Wolbachia* excepté le fait qu'on trouvait naturellement l'infection dans les populations naturelles de cette drosophile. Cependant aucune donnée n'était disponible concernant la prévalence de cette bactérie et la diversité des souches de *Wolbachia* chez cette espèce. Or, dans le cadre de l'utilisation de la TII, il est essentiel de savoir si, dans les populations ciblées, *Wolbachia* est fixée, absente ou en fréquence intermédiaire et si différentes souches sont présentes. En effet, dans le cas d'une prévalence intermédiaire, les mâles lâchers seront confrontés à deux types de femelles (infectées et non infectées). L'expression et l'intensité de l'IC doivent donc dans ce cas être testées pour ces deux types de croisements. La diversité potentielle de *Wolbachia* doit également être mesurée car il a été montré qu'au sein des populations naturelles, plusieurs souches peuvent être retrouvées et induire des phénotypes différents en terme d'IC, comme chez le moustique *Culex pipiens* par exemple. Une première étape du projet a donc consisté à faire l'état des lieux de l'association entre *D. sukuzii* et *Wolbachia*.

Un échantillonnage réalisé en partie grâce aux collaborations mises en place au sein d'un projet CASDAR (financé par le ministère de l'agriculture) a permis d'obtenir 23 populations de *D. sukuzii* principalement en France mais aussi dans quelques pays Européens. La présence de *Wolbachia* a été étudiée par PCR. Les données indiquent que les populations naturelles de *D. sukuzii* sont partiellement infectées par *Wolbachia*, avec des prévalences qui varient de 0 à 100% avec une moyenne de 46% (Figure 1). Une analyse Multilocus Sequence Typing (MLST) effectuée sur 6 gènes a montré qu'une seule souche de *Wolbachia* était naturellement présente chez cette espèce, *wSuz*. Ces campagnes d'échantillonnage ont permis d'établir des lignées isofemelles au laboratoire. Nous avons conservé les lignées non infectées par *Wolbachia* et les lignées où l'infection par *Wolbachia* était fixée qui nous ont permis de créer des lignées infectées et non infectées avec un même fond génétique en utilisant deux méthodes : des traitements antibiotiques pour éliminer *Wolbachia* et des introgressions réalisées pendant 7 générations. L'induction potentielle d'IC par *wSuz* a été testée en comparant le taux d'éclosion des œufs issus des croisements potentiellement incompatibles (mâle infecté x femelle non infectée), à celui des croisements dits compatibles. Les résultats obtenus montrent que *wSuz* n'induit pas d'incompatibilité cytoplasmique significative chez *D. sukuzii*.

**Figure 1**



Prévalence de *Wolbachia* dans les populations naturelles de *D. sukukii*.

### **Tâche 2 : Analyse des relations de compatibilité entre *wSuz* et d'autres souches de *Wolbachia***

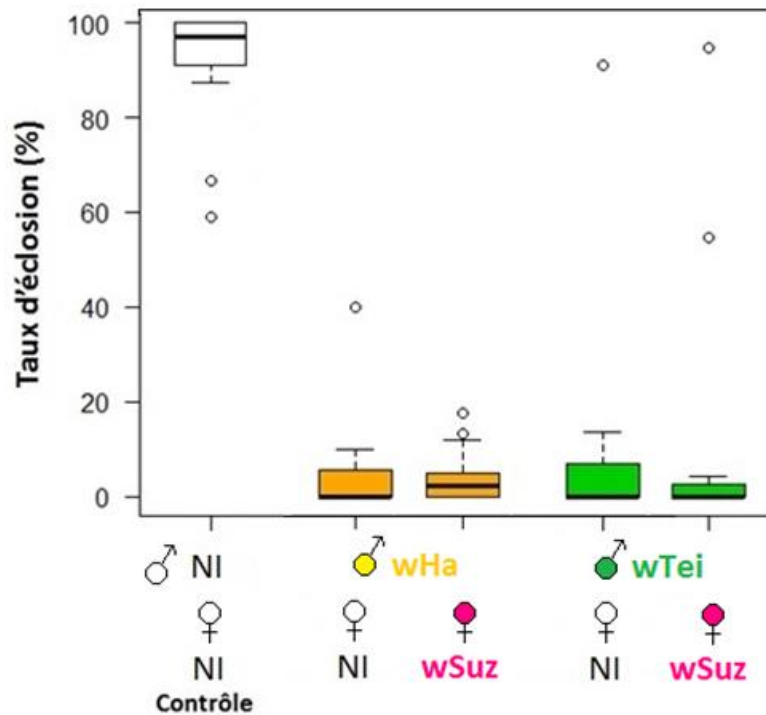
Afin de développer la TII pour limiter les densités de populations de *D. sukukii*, le facteur clé est de trouver des souches de *Wolbachia* capables d'induire de l'IC chez *D. sukukii*, et, puisque *Wolbachia* est présente dans les populations naturelles, que les femelles soient ou non infectées par *wSuz*. En effet, selon les modèles "modification-sauvetage", l'IC serait due à une modification par *Wolbachia* des chromosomes mâles lors de la maturation des spermatocytes, et la viabilité embryonnaire serait restaurée chez les femelles si la même souche de *Wolbachia* est présente. Il existe cependant des souches de *Wolbachia* capables de "sauver" les spermatozoïdes marqués par d'autres souches de *Wolbachia*. Pour identifier ces souches, il faut analyser les relations de compatibilité de *wSuz* avec des souches de *Wolbachia* potentiellement candidates pour développer la TII. Pour cela nous avons, dans un premier temps, introduit, par micro-injection embryonnaire, *wSuz* chez une espèce hôte proche, *Drosophila simulans* pour laquelle nous possédions, dans un même fond génétique, 10 souches de *Wolbachia*. Cela nous a permis de tester plusieurs souches de *Wolbachia* en transférant une seule souche de *Wolbachia* car les micro-injections sont difficiles à réaliser avec des taux d'échec et de mortalité très élevés. L'ensemble des micro-injections a été réalisé par un prestataire de service (Fly Lab, département de génétique à Cambridge). Cela a permis d'identifier 3 souches qui induisent des taux d'IC importants, *wRi*, *wHa* et *wTei*, et ce même en présence de *wSuz* chez les femelles.

### **Tâche 3 : Création de lignées de *D. sukukii* infectées par des souches de *Wolbachia* induisant de l'IC**

Les trois souches de *Wolbachia* identifiées dans la tâche 2 ont été injectées chez *D. sukukii*. Une fois ces lignées trans-infectées établies, nous avons vérifié leur capacité à induire de l'IC chez *D. sukukii*, l'induction de l'IC dépendant à la fois de la souche de *Wolbachia* et du génotype de l'hôte. Des expériences de croisements ont montré que deux de ces trois souches induisent un fort taux d'IC, avec un taux d'éclosion moyen de 3% lors de croisements entre mâles stérilisants et femelles non infectées ou infectées par *wSuz* (Figure 2). Ces expériences ont été réalisées avec des mâles âgés de trois jours. Cependant, plusieurs articles rapportent qu'il existe une corrélation positive entre l'intensité de l'IC et la densité bactérienne dans les spermatocytes et que la densité peut diminuer au cours de la vie du mâle, diminuant ainsi l'intensité de l'IC. Pour l'application de la TII, une forte diminution de l'IC avec l'âge des mâles stérilisants serait un problème majeur. En effet, si les mâles

lâchés devenaient rapidement majoritairement fertiles, ils rentreraient directement en compétition avec les mâles stériles et cela augmenterait le nombre de partenaires sexuels disponibles et fertiles pour les femelles. Nous avons donc réalisé les mêmes expériences de croisements avec des mâles âgés de 7-8j ou 11-12j. Nous avons observé une influence de l'âge des mâles sur les taux d'IC exprimés mais ces taux restent élevés puisqu'ils sont compris entre 70 et 85%.

**Figure 2**



Taux d'éclosion lors de croisements entre femelles non infectées par *Wolbachia* (NI) ou infectées par *wSuz* et mâles des différents statuts d'infection. Une diminution du taux d'éclosion par rapport aux croisements contrôles indique de l'IC.

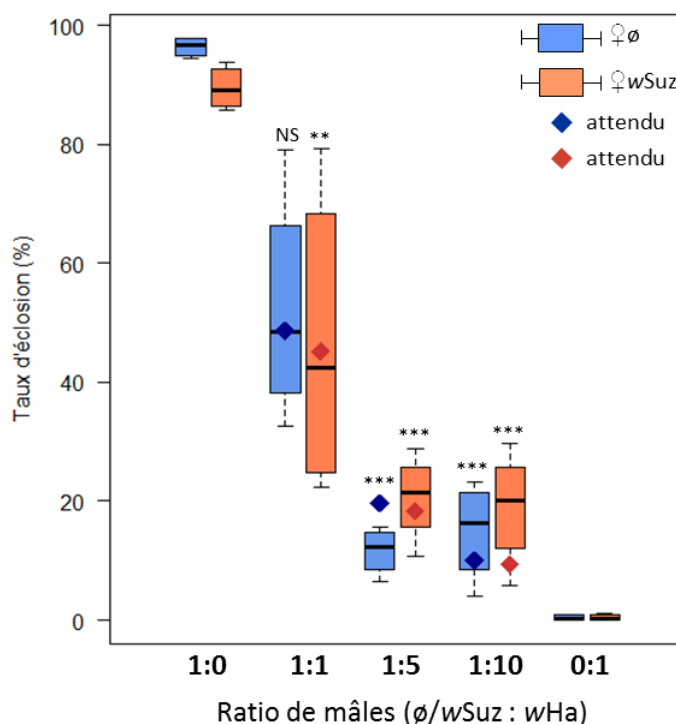
Un autre point crucial pour l'efficacité de la TII est la compétitivité des mâles stérilisants qui se traduit par leur capacité à accéder à la reproduction et à survivre le plus longtemps possible. Ces paramètres vont directement dépendre des conséquences physiologiques liées à la présence des *Wolbachia* exogènes nouvellement introduites dans l'espèce cible. De nombreuses études rapportent que *Wolbachia* peut diminuer la valeur sélective de son hôte et que ces coûts varient selon les génotypes hôtes, bactériens, et selon les conditions environnementales. De tels coûts pourraient nuire à l'efficacité de la TII, que ce soit à travers une diminution de la compétitivité des mâles ou par des effets négatifs qui peuvent compromettre l'élevage et la production en masse de l'insecte. Nous avons donc mesuré différents traits d'histoire de vie (survie, fécondité, taux d'éclosion, développement larvaire) sur nos 4 lignées, non infectées ou infectées par *wSuz*, *wHa* ou *wTei*, et nous avons ainsi montré que les deux souches exogènes de *Wolbachia* n'induisent pas de coût physiologique à leur nouvel hôte.

#### Tâche 4 : Essais en cages à populations

Pour que la technique proposée soit efficace, il est indispensable que les mâles stérilisants : (1) induisent un taux d'IC très élevé et (2) aient une compétitivité similaire à celle des mâles sauvages afin qu'ils stérilisent efficacement le plus grand nombre de femelles et ce le plus longtemps possible. Cette compétitivité va bien sûr dépendre du coût physiologique lié à la présence des bactéries exogènes mais également de leur capacité à s'accoupler et féconder les femelles en présence de mâles naturels. Le premier point a été validé dans la tâche 3. L'objectif de cette tâche 4 était donc de confronter les mâles stérilisants infectés par *wHa* et les mâles infectés ou non par *wSuz* afin d'évaluer leur compétitivité sexuelle. Le taux d'éclosion des œufs a été utilisé comme un proxy pour mesurer cette compétitivité. En effet, si le taux d'éclosion est de 0% dans les croisements incompatibles, et de 100% dans les croisements compatibles, lorsque les deux types de mâles sont en même proportions, le taux d'éclosion attendu sous l'hypothèse d'une compétitivité sexuelle similaire est de 50%. Ces expériences ont été réalisées dans des cages à populations (30x30x30cm), chaque cage contenait un nombre constant de femelles vierges (soit infectées par *wSuz* ou non infectées) plus un nombre constant de mâles mais avec des proportions différentes selon les statuts d'infection. Cinq ratio ont été testés : 0:1:1 ( $0\sigma wHa:40\sigma\emptyset:40\emptyset\emptyset$ ) ; 1:1:1 ( $20\sigma wHa:20\sigma\emptyset:40\emptyset\emptyset$ ) ; 5:1:1 ( $35\sigma wHa:7\sigma\emptyset:40\emptyset\emptyset$ ) ; 10:1:1 ( $40\sigma wHa:4\sigma\emptyset:40\emptyset\emptyset$ ) ; et 1:0:1 ( $40\sigma wHa:0\sigma\emptyset:40\emptyset\emptyset$ ).

Les taux d'éclosion obtenus dans les croisements contrôles, 1:0 et 0:1 nous ont permis de calculer les taux d'éclosions attendus sous l'hypothèse d'une compétitivité sexuelle similaire entre les différents mâles pour les ratios 1:1, 1:5 et 1:10 (Figure 4). Pour chacun des ratios testés, il existe une différence significative entre le taux d'éclosion observé et celui attendu, sauf pour le ratio 1:1 lors de la confrontation entre les mâles *wHa* et les individus non infectés. Cependant, il est important de noter que malgré ces différences significatives, les taux d'éclosions observés sont pour chacun des ratios testés très proches des valeurs attendues. Cela indique que les mâles infectés par *wHa* ont une survie similaire aux autres mâles et que les femelles, infectées ou non par *wSuz*, ne sont pas capables de discriminer les mâles trans-infectés.

Figure 4



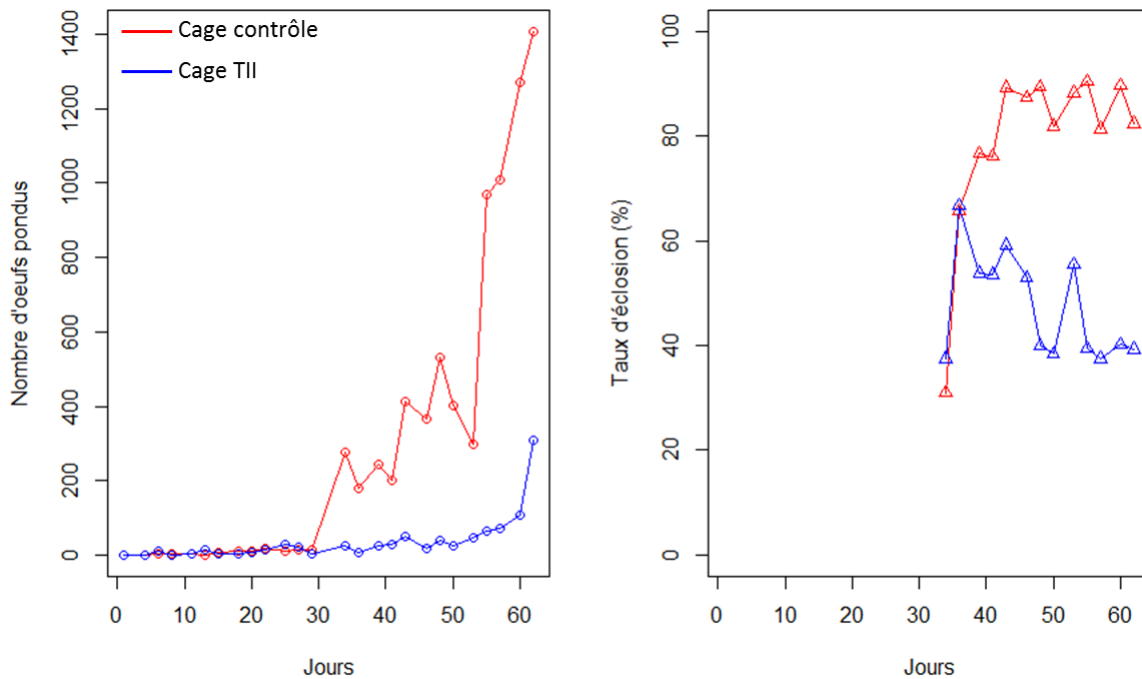
Diminution de la fertilité des femelles  $\emptyset$  et *wSuz* avec l'augmentation de la proportion des mâles *wHa* par rapport aux mâles  $\emptyset$  ou *wSuz*. Les boxplot en bleu et rouge indiquent les résultats obtenus lors des croisements avec des femelles respectivement non infectées et infectées par *wSuz*. Les losanges bleu et orange indiquent les taux d'éclosion attendus sous l'hypothèse d'une compétitivité sexuelle similaire entre les mâles *wHa* et les mâles non infectés (bleu) et infectés (orange) par *wSuz*. NS : pas de différence significative;  $P > 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ .

## Tâche 5 : Essais en conditions semi-naturelles

L'objectif de cette tâche était de simuler la TII dans des grandes cages placées dans des enceintes climatiques permettant de contrôler la température, l'humidité et la luminosité. La TII peut être utilisée pour diminuer la taille des populations mais également pour limiter l'introduction et l'explosion démographique d'une population. C'est ce dernier point qui a été examiné ici. Cette expérience a été réalisée au sein de l'installation pilote de la plateforme de ROVALTAIN. Deux cages identiques de 3x3x2m ont été placées séparément dans des enceintes climatiques aux conditions similaires. Dans la cage contrôle 20 femelles et 20 mâles non infectés ou infectés par wSuz (en même proportion) ont été introduits au début de l'expérimentation. Puis tous les 7 jours, 20 femelles et 20 mâles ont été introduits dans la cage. Dans la cage « traitement » la même procédure expérimentale a été réalisée sauf qu'en plus des 40 individus lâchés toutes les semaines, 260 mâles infectés par wHa étaient injectés dans la cage. Ainsi un ratio de mâles lâchés de 13:1 a été maintenu chaque semaine. Le nombre de mâles stérilisants lâchés a été choisi en fonction de notre capacité à produire chaque semaine une quantité stable de mâles. L'expérimentation a duré 62 jours. L'objectif était d'évaluer l'évolution de la taille de chaque population au cours du temps. Pour cela des sites de pontes ont été introduits dans chaque cage et le nombre d'œufs pondus a été utilisé comme un proxy de la taille de la population.

Dans la cage contrôle, le nombre d'œufs pondus a très nettement augmenté 38 jours après les premiers lâchers (Fig 5), durée qui correspond à environ deux générations. A ce moment-là de l'expérimentation, 100 femelles fécondées avaient déjà été introduites dans chacune des cages. Le nombre d'œufs pondus a ensuite constamment augmenté dans la cage contrôle jusqu'à atteindre à la fin de l'expérimentation 1408 œufs pondus en 48h. Dans la cage dans laquelle ont été introduits 260 mâles stérilisants par semaine (cage TII), le nombre d'œufs pondus est resté stable et compris entre 0 et 49 jusqu'au 53ème jour d'expérimentation puis a légèrement augmenté pour atteindre 308 à la fin de l'expérimentation. L'utilisation de la TII a donc permis de maintenir la taille de la population à un niveau 4,6 fois inférieur à celui de la cage contrôle. De plus, les taux d'éclosion observés dans la cage TII étaient très inférieurs à ceux obtenus dans la cage contrôle. Ainsi, sur les 308 œufs comptés lors du dernier relevé de l'expérience dans la cage TII, seulement 120 étaient viables (39%), comparé à 1150 sur 1408 dans la cage contrôle (82%). En fin d'expérience, après 62 jours, les individus vivants ont été capturés, comptés et sexés dans chacune des cages. Dans la cage contrôle 2184 individus, dont 1194 femelles (54.7%) ont été récupérés alors que seulement 664 individus dont 275 femelles (41.4%) étaient vivants dans la cage TII. Le nombre de mâles stérilisants lâchés dans la cage TII était beaucoup plus important que les mâles  $\emptyset$  ou wSuz. La prise en compte du nombre de mâles pourrait donc biaiser la comparaison des tailles de population dans chacune des cages. Le nombre de femelle est un indicateur fiable. Ainsi, à la fin de l'expérience, il y avait 4,3 fois moins d'individus dans la cage TII que dans la cage contrôle, proportion similaire à celle obtenue par le comptage des œufs. Cette expérience a permis de montrer que, dans de grandes cages à population, la TII pouvait être efficace pour limiter l'augmentation de la taille des populations de *D. sukii*.

**Figure 5**



Evolution du nombre d'œufs pondus (gauche) et du taux d'éclosion (droite) dans la cage contrôle (sans lâchers de mâles stérilisants) et dans la cage TII (avec lâchers massifs et répétitifs de mâles stérilisants infectés par wHa).

### **Discussion et conclusion**

L'objectif de ce projet était de développer une nouvelle méthode de lutte pour contrôler les populations de *D. sukii*. Plus précisément, il s'agissait de savoir si la Technique de l'Insecte Incompatible (TII) pouvait être une technique efficace pour diminuer les densités de populations de ce ravageur. Cette technique repose sur des lâchers inondatifs et fréquents de mâles infectés par *Wolbachia* afin qu'ils stérilisent, via l'IC, les femelles en populations naturelles. Afin de répondre à cette problématique, nous avons dans un premier temps acquis des données sur la biologie de cet insecte, en particulier sur ses interactions avec les bactéries *Wolbachia*. Nous avons mis en évidence que les populations européennes de *D. sukii* étaient infectées par une seule souche de *Wolbachia*, *wSuz*, qui présente des prévalences intermédiaires dans la majorité des populations étudiées, et qui n'induit pas une IC forte dans son hôte naturel. Cette étude descriptive a permis d'orienter les recherches à suivre pour le développement de la TII chez *D. sukii*, mais également de participer à l'apport de connaissances sur les interactions hôte-*Wolbachia*. De plus, la description de cette association naturelle nous a conduit à nous interroger plus spécifiquement sur les interactions entre *D. sukii* et sa seule souche de *Wolbachia*, *wSuz*, notamment sur le maintien de ce symbiote en prévalence intermédiaire dans les populations mondiales. Nous avons pu mettre en évidence que *wSuz* pouvait être un symbiote mutualiste facultatif car elle peut conférer à son hôte une protection antivirale.

Le projet de développement de la TII a essentiellement pris forme grâce à l'analyse des relations d'IC entre *wSuz* et d'autres souches de *Wolbachia* chez *D. simulans* puis chez *D. sukii*. Cette analyse nous a permis de sélectionner deux souches de *Wolbachia* potentiellement intéressantes, *wHa* et *wTei*, qui induisent des taux d'IC proches de 100% lors de croisements avec des femelles infectées ou non par *wSuz*. De plus, cette étude nous a permis de confirmer les connaissances acquises sur les

facteurs qui influencent l'expression de l'IC. Nous avons par exemple confirmé des résultats antérieurs tels que des effets forts du génotype hôte et bactérien sur l'expression et l'intensité de l'IC. Ces souches de *Wolbachia* exogènes, *wHa* et *wTei*, n'affectent pas les traits d'histoire de vie de *D. sukuzii*, les mâles infectés induisent des taux d'IC élevés tout au long de leur vie et ont une compétitivité sexuelle similaire à celle des mâles infectés ou non par *wSuz*. Nous avons également montré que des lâchers massifs et répétitifs des mâles stérilisants permettent de limiter l'augmentation de la taille d'une population dans une grande cage en enceinte climatique.

L'ensemble de ces données montre que la TII est un outil prometteur pour lutter contre *D. sukuzii*. Cependant, toutes nos expériences ont été réalisées en laboratoire, il est donc maintenant nécessaire de réaliser des expériences en serre « insect-proof », mais pour cela plusieurs verrous techniques doivent être levés. Parmi eux, deux points majeurs : une méthode de sexage et un système de production en masse de l'insecte.

### *Deux verrous majeurs : la production en masse et la méthode de sexage*

#### La production en masse

La TII repose sur des lâchers fréquents et inondatifs de mâles stérilisants dans l'environnement. Un système d'élevage en masse doit donc être développé chez *D. sukuzii*. Plusieurs composantes très importantes doivent être optimisées : l'aspect économique, la conception des installations, le lieu de production, les préoccupations environnementales liées aux fuites d'insectes fertiles, la lignée de l'insecte choisie, la production et l'automatisation du système d'élevage. L'élevage est une étape cruciale car les caractéristiques du milieu d'élevage comme les éléments nutritifs, les contaminants, l'humidité, la texture et le pH peuvent influencer la taille, la survie, la longévité, la capacité de vol et copulatoire, et la réactivité à la lumière. La production en masse peut aussi conduire à des différences génétiques entre les populations de laboratoire et naturelles. Des traits peuvent être sélectionnés durant l'élevage en masse, comme des comportements d'accouplements inappropriés. Des renouvellements réguliers du patrimoine génétique par l'introduction d'individus piégés dans la nature doivent donc être réalisés. Plusieurs types de milieu d'élevage ont été testés dans notre équipe, milieu classique, à base de fruits rouges ou de carottes. L'ensemble de ces milieux d'élevage permet à *D. sukuzii* d'accomplir correctement son cycle de développement et de maintenir les adultes en vie pendant plusieurs jours. Cependant, contrairement à *D. melanogaster* ou à *D. simulans*, l'amplification des lignées de *D. sukuzii* est plus difficile, notamment à cause de la faible fécondité des femelles en conditions de laboratoire et des fortes variabilités de facilité d'élevage selon les lignées utilisées. Notre équipe participe actuellement à un projet Franco-Autrichien<sup>1</sup> dont l'un des objectifs est justement la mise au point d'une technique de production en masse de *D. sukuzii*.

#### La méthode de sexage

Contrairement à la Technique de l'insecte stérile qui repose sur l'irradiation, la TII repose sur des lâchers massifs exclusivement composés de mâles, ce qui nécessite une méthode de sexage très efficace et à grande échelle. De nombreux projets ont été initiés afin de développer la TII contre des ravageurs de cultures comme *C. capitata* ou *B. oleae* mais cette technique n'est à l'heure actuelle pas utilisée en milieu naturel. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer cela, mais l'absence de techniques efficaces de sexage à grande échelle, sans avoir recours à la modification génétique est certainement le point essentiel et charnière permettant de passer à des programmes

---

<sup>1</sup> Appel à projets 2015 de l'ANR "Call for French-Austrian Joint Projects". 2016-2019. Projet Suzukill : Managing cold tolerance and quality of mass-produced *Drosophila sukuzii* flies to facilitate the application of biocontrol through incompatible and sterile insects release methods. Porteur du projet : H. Colinet (ECOBIO, Rennes).



de grandes envergures. Trois techniques différentes ont été développées pour différencier les mâles des femelles : mécanique, comportementale et génétique.

Dans sa forme la plus simple, le sexage mécanique est réalisé à l'œil nu, mais dans un contexte de lâchers inondatifs, cette méthode est insuffisante. Classiquement, le sexage mécanique se base sur un système automatisé de reconnaissance de dimorphisme sexuel à des stades particuliers du développement de l'insecte. Cependant, le défaut majeur du sexage mécanique est de réduire considérablement la quantité d'individus à la sortie des tris. Les systèmes de sexage basés uniquement sur des différences physiques ne sont soutenables que pour des programmes à petites échelles. Pour être efficaces, de tels systèmes doivent être séquentiels, c'est-à-dire que des tris à plusieurs stades de développement doivent avoir lieu. Chez *D. sukukii*, on pourrait imaginer un système de sexage aux stades de larves, pupes et adultes, sachant que pour chacun de ces stades, il existe un dimorphisme sexuel.

Des manipulations du comportement peuvent aussi être exploitées. On pourrait imaginer utiliser des systèmes d'attractifs composés de phéromones spécifiques. Cependant, en plus d'avoir des efficacités variables, les sexages mécaniques et comportementaux peuvent être logistiquement et économiquement compliqués à mettre en œuvre. L'approche génétique apporte alors une alternative concrète.

Les lignées de sexage génétique, appelées dans la littérature GSS pour « Genetic Sexing Strain », se basent sur deux composantes bien distinctes : (1) une mutation sur un gène porté par un autosome qui peut être utilisée comme un marqueur sélectionnable pour la séparation des deux sexes et (2) une translocation pour lier ce gène au chromosome Y. Il faut donc d'abord disposer d'une lignée mutante qui exprime un phénotype qui peut être exploité pour le sexage. Des GSS ont été développées sur une vingtaine d'espèces différentes.

#### *Les risques associés à l'utilisation de la TII*

Le risque principal lié à la TII est le lâcher accidentel de femelles trans-infectées par *wHa* ou *wTei*. Dans ce cas, il peut y avoir un remplacement des populations naturelles par ces populations trans-infectées à cause de l'IC induite par ces souches qui est proche de 100%, et d'un faible coût associé à l'infection. Ainsi, la TII ne serait plus efficace pour contrôler les populations de *D. sukukii*. Dans ce cas le processus de développement de la TII devrait être reconduit, c'est-à-dire à nouveau transférer des souches exogènes de *Wolbachia*, qui devraient exprimer de l'IC avec la souche qui vient d'envahir les populations. Dans notre cas, nous avons la chance d'avoir identifié deux souches de *Wolbachia* pour développer la TII chez *D. sukukii*, qui sont mutuellement incompatibles. Ainsi, si la première souche de *Wolbachia* envahit les populations, la TII pourra être réalisée avec la seconde souche de *Wolbachia*. Le risque est alors que les individus porteurs de ces souches exogènes de *Wolbachia* aient une survie, une fécondité ou des résistances supérieures à celles des individus anciennement présents dans la population. Certaines souches de *Wolbachia* peuvent en effet développer des interactions de type mutualiste avec leurs hôtes, comme conférer une protection contre des ennemis naturel ou une amélioration de la valeur sélective des individus. Cela pourrait augmenter les dégâts sur cultures et compliquer davantage le contrôle des populations. Cependant, ce risque de remplacement des populations n'est plus possible si la TII est combinée avec la TIS, ce qui semble être une bonne approche pour lutter contre *D. sukukii*. Ainsi, les risques liés à l'utilisation de la TII chez *D. sukukii* semblent peu nombreux et, en comparaison à d'autres techniques, comme l'utilisation de produits phytosanitaires ou l'introduction de parasitoïdes exotiques, la TII semble être la technique la moins à risques et la plus raisonnée en terme d'impacts sur l'environnement et les communautés.

#### **4. Contribution au plan Ecophyto (et à l'agroécologie)**

Il s'agit de discuter des sorties opérationnelles du projet (par rapport à ce qui avait été annoncé), en distinguant :

- Ce qui a été effectivement produit et transféré (ex : un outil proposé avec un guide d'utilisation et ayant fait l'objet de formation avec des utilisateurs)
- Les sorties identifiées, produites à l'état de prototypes ayant fait l'objet de discussion avec des utilisateurs potentiels
- Les sorties projetées ou envisageables en indiquant comment une finalisation pourrait intervenir
- Les connaissances, informations et/ou recommandations que des acteurs pourront exploiter, par exemple pour amplifier la contribution de la biodiversité à la réduction de l'utilisation des PPP

Dans tous les cas, on suggérera comment « aller plus loin » et avec qui.

### *Valorisation scientifique*

L'intérêt scientifique de ce projet est double. D'un point de vue strictement fondamental, il apporte une étude de cas approfondie sur les relations de compatibilité entre différentes souches de *Wolbachia* chez les drosophiles. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'incompatibilité cytoplasmique sont encore obscurs à ce jour, et l'apport de ce type de données permet de guider les recherches sur des pistes précises, en particulier en confrontant les patrons de compatibilité aux modèles théoriques visant à prédire les gènes impliqués dans ce phénomène. Par ailleurs, ce projet contribue à évaluer le potentiel des bactéries symbiotiques en tant qu'auxiliaires efficaces en lutte biologique.

### *Valorisation des résultats opérationnels et transférables au bénéfice du plan Ecophyto*

*D. suzukii* représente une menace sérieuse pour les cultures en France et dans le monde entier. L'apport d'une technique de lutte durable, efficace et respectueuse de l'environnement contre ce ravageur, objectif premier du présent projet, constitue une valorisation importante de ces travaux sur le plan phytosanitaire. Les relations déjà établies avec des partenaires des filières de production et des acteurs privés constituent des avantages importants pour la diffusion de cette technique. De plus, dans le cadre du projet « Suzukill »<sup>1</sup>, nous collaborons avec l'IAEA (International Atomic Energy Agency).

### *Objectifs et résultats attendus*

L'objectif est de réduire les populations de *D. suzukii* en utilisant la capacité de la bactérie *Wolbachia* à induire de l'IC. Le but n'est pas de contrôler les populations naturelles de *D. suzukii* sur une large aire géographique mais plutôt de contrôler les densités de populations dans les serres de production de fruits. La réalisation de ce projet devrait aboutir à des retombées appliquées pour la lutte contre ce ravageur et, de manière plus générale, permettra d'initier une réflexion sur l'utilisation de bactéries symbiotiques comme nouveau moyen de lutte contre les insectes ravageurs.

### *Perspectives : combiner la TIS et la TII*

L'ensemble de nos données montre que la TII est un outil prometteur pour lutter contre *D. suzukii*. Cependant, comme nous l'avons évoqué précédemment, il existe deux verrous majeurs pour le développement de cette technique, une méthode de sexage et un système de production en masse de l'insecte. Une alternative au problème de sexage serait de combiner l'irradiation à la TII. Chez de nombreux insectes, les femelles sont stérilisées à de plus faibles doses d'irradiation que les mâles. L'idée est donc de limiter la dose d'irradiation afin que la compétitivité sexuelle des mâles irradiés ne soit pas diminuée. Cette combinaison permettrait de s'affranchir d'une technique de sexage car les femelles relâchées seraient stériles. C'est un des objectifs du projet « Suzukill »<sup>1</sup>, déjà évoqué précédemment. Les premiers résultats indiquent que *D. suzukii* est une espèce très résistante à

l'irradiation. S'il faut des doses importantes pour complètement stériliser les mâles, les femelles sont rendues stériles à des doses d'irradiation bien plus faibles que les mâles. Les expériences en cours ont pour but notamment de tester la compétitivité des mâles irradiés et de mesurer leur capacité à induire de l'IC quand ils sont infectés par nos deux souches candidates *wHa* et *wTei*.

### *Divers*

- Participation à une table ronde sur la Technique de l'Insecte Stérile et *Drosophila suzukii*. Montpellier. Novembre 2017.

- Le projet et les résultats obtenus ont fait l'objet de communications orales devant des professionnels du secteur fruits et légumes :

*Journées Drosophila suzukii. Centre CTIFL de Balandran. Décembre 2016.*

*Journées du réseau EMBA. Avignon. Décembre 2016.*

Présentation devant les producteurs de fruits à petits noyaux. AG de l'AVFF. SICOLY. Janvier 2018.

## **5. Rapport financier**

**En conformité avec la convention.**