



HAL
open science

Atropa belladonna, une nouvelle plante hôte sauvage pour la mouche invasive *Drosophila suzukii*

Agathe Roussel

► **To cite this version:**

Agathe Roussel. Atropa belladonna, une nouvelle plante hôte sauvage pour la mouche invasive *Drosophila suzukii*. Sciences agricoles. 2015. dumas-01212531

HAL Id: dumas-01212531

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01212531>

Submitted on 6 Oct 2015

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.

AGROCAMPUS
OUEST

CFR Angers

CFR Rennes



Année universitaire : 2014 - 2015

Spécialité :

Horticulture

Spécialisation (et option éventuelle) :

Gestion Durable du Végétal en horticulture
et aménagements paysagers

Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Atropa belladonna, une nouvelle plante hôte sauvage pour la mouche invasive *Drosophila suzukii*

Par : Agathe ROUSSEL

Soutenu à Angers, le 16 septembre 2015

Devant le jury composé de :

Président : Patrice CANNAVO

Maître de stage : Sylvie BALTORA-ROSSET

Enseignant référent : Josiane LE CORFF

Autres membres du jury (Nom, Qualité)

Mickaël DELAIRE

Pascal RICHOMME

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Confidentialité :

Non Oui si oui : 1 an 5 ans 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible⁽¹⁾.

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant).

Date et signature du maître de stage⁽²⁾ : 22/09/15

S. Boltora

Droits d'auteur :

L'auteur⁽³⁾ autorise la diffusion de son travail

Oui Non

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

Date et signature de l'auteur :

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant :

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé

Oui Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3) Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes maîtres de stage pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité d'Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés (EDYSAN) : M. Patrice Eslin du Laboratoire de Biologie des Insectes Phytophages et Entomophages (BIPE), Mme Sylvie Baltora-Rosset et M. Oliver Chabrierie du Laboratoire de Géoécologie des Ecosystèmes et des Paysages (GEP). Ils ont su m'apporter leur soutien et leurs conseils avisés tout au long de mon stage. Je les remercie également pour le temps qu'ils m'ont consacré et pour l'aide accordée lors des différentes étapes de la rédaction de ce mémoire.

Je remercie ensuite Mlle Cindy Simon, M. Christophe Bienaimé et M. Lamine Bensaddek du Laboratoire GEP pour leur contribution aux analyses CCM de mes échantillons. Merci à M. Jacques Attoumbré et M. Serge Pilard de la Plateforme Analytique pour leur travail sur les analyses LC-MS.

Je souhaite remercier également Mme Manuella Catterou du Laboratoire d'Agroécologie, Ecophysiologie et Biologie intégrative, pour son aide précieuse lors des dosages de sucres et d'acides aminés.

Durant ces six mois, toutes ces personnes ont contribué, par leurs compétences et leur disponibilité, à rendre enrichissant et motivant ce stage de fin d'études.

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
A. Synthèse bibliographique	3
1. <i>Drosophila suzukii</i> , ravageur des cultures fruitières en Europe	3
1.1. Aire de répartition et propagation de <i>Drosophila suzukii</i>	3
1.2. Conséquences sur la production fruitière	4
1.3. Gamme d'hôtes	6
1.4. Moyens de lutte contre <i>Drosophila suzukii</i>	7
2. <i>Atropa belladonna</i> , plante toxique hôte pour <i>Drosophila suzukii</i>	8
2.1. <i>Atropa belladonna</i> , la Belladone	8
2.2. Atropine, un alcaloïde tropanique.....	9
2.3. Rôle des alcaloïdes chez les plantes	9
B. Travail expérimental.....	11
1. Matériels et méthodes.....	11
1.1. Matériels biologiques utilisés	11
1.2. Analyses biochimiques des fruits d' <i>Atropa belladonna</i>	12
1.2.1. Dosage des sucres et des acides aminés.....	12
1.2.1.1. Extraction des sucres solubles et des acides aminés	12
1.2.1.2. Protocoles de dosage des sucres solubles et des acides aminés	13
1.2.2. Extraction des alcaloïdes.....	13
1.2.3. Analyses des métabolites secondaires	14
1.3. Développement et survie des Drosophiles sur les fruits d' <i>A. belladonna</i>	17
1.4. Analyses statistiques	18
2. Résultats	18
2.1. Caractérisation biochimique des fruit d' <i>Atropa belladonna</i>	18
2.1.1. Profils en métabolites primaires	18
2.1.2. Profils en métabolites secondaires	21
2.1.2.1. Résultats obtenus par CCM.....	21
2.1.2.2. Résultats obtenus par LC-MS	23
2.2. Taux de survie et durée de développement des Drosophiles.....	28
2.2.1. Survie des Drosophiles	28
2.2.2. Durées de développement des Drosophiles	29
C. Discussion.....	31
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	36
BIBLIOGRAPHIE	39
ANNEXES	47

Introduction

La répartition des espèces sur l'ensemble de la planète est constamment en mouvement et cela impacte les écosystèmes et les services qu'ils rendent à l'homme. L'anthropisation de la planète, avec la recrudescence des transports de marchandises et de personnes, a fortement influencé les déplacements des espèces qui sont une des clés de la dynamique des écosystèmes (Carlton & Geller, 1993 ; Sousa *et al.*, 2011). De tels déplacements peuvent engendrer des phénomènes d'invasions biologiques, certaines espèces y trouvant l'opportunité de conquérir de nouveaux territoires. Ces invasions biologiques ont pour conséquence de modifier les communautés et tendent à diminuer et homogénéiser la biodiversité (McKinney & Lockwood, 1999 ; Mack, *et al.*, 2000). L'introduction d'espèces non indigènes est considérée comme la deuxième cause de l'érosion de la biodiversité après la destruction des habitats (Sax & Gaines, 2003). Ce processus d'invasion, permettant à une espèce exotique de devenir une espèce envahissante sur une nouvelle aire de répartition, se décompose en trois phases : l'introduction, l'établissement et l'expansion. Chaque phase du processus d'invasion agit comme un filtre sélectionnant une minorité d'individus et influençant fortement le succès de l'invasion. C'est pourquoi les processus d'invasion peuvent échouer et les introductions d'espèces exotiques aboutissant à l'expansion d'une espèce envahissante sont minoritaires (Williamson & Fitter, 1996). Dans la très grande majorité des cas, les individus fondateurs ne parviennent pas à établir une population pérenne dans l'écosystème d'introduction (Williamson & Brown, 1986). Cependant, en cas d'absence de prédateurs ou de pathogènes spécifiques dans la nouvelle aire de répartition, l'espèce exotique se trouve favorisée. Cette situation facilite alors la constitution d'une population suffisamment viable aux travers d'adaptations génétiques (Sax *et al.*, 2007) et d'étranglements de populations (Allendorf & Lundquist, 2003). La plasticité phénotypique des individus est un paramètre important permettant de compenser la faible diversité génétique initiale des espèces introduites (Roderick & Vernon, 2009). La nouvelle espèce envahissante peut alors n'avoir aucune conséquence sur l'écosystème de la nouvelle aire d'introduction ou bien le perturber, voire même devenir un ravageur des agrosystèmes engendrant de lourdes conséquences économiques (Pimentel, *et al.*, 2005 ; Rodriguez, *et al.*, 2005 ; Olson, 2006 ; Haack, *et al.*, 2010).

Drosophila suzukii (Matsumura, 1931) (*Diptera* : *Drosophilidae*) originaire du Japon est un exemple d'espèce exotique ayant effectué avec succès un processus d'invasion biologique très récent. Elle est aujourd'hui très bien implantée dans les écosystèmes européens. Très polyphage, cette drosophile s'attaque à de nombreuses espèces de fruits et réalise son développement dans des fruits sains en cours de maturation (Hauser, 2011). *Drosophila suzukii* est également capable de se développer en dehors des agrosystèmes et de survivre aux hivers européens (Cini, *et al.*, 2012).

La majorité des études réalisées sur *D. suzukii* est centrée sur son interaction avec les espèces cultivées étant données les pertes engendrées et les conséquences économiques sur la filière fruitière. Très peu de travaux s'intéressent à la gamme de plantes hôtes sauvages de *D. suzukii*. Cependant, des études réalisées au sein du laboratoire BIPE ont montré que cette mouche invasive est capable de se développer dans la nature sur certaines plantes hôtes sauvages (Poyet, 2014). Parmi ces hôtes sauvages, nous pouvons citer *Atropa belladonna* et *Solanum nigrum*, connues pour être des plantes riches en composés toxiques.

En septembre 2012 dans la vallée de la Somme, Mathilde Poyet, alors étudiante en thèse, a collecté des baies d'*Atropa belladonna* dont il a émergé au laboratoire plusieurs individus

de *D. suzukii*. Ces résultats interpellent car la Belladone est connue pour synthétiser des composés toxiques dont l'atropine, un alcaloïde tropanique. *Atropa belladonna* n'est pas présente au Japon, la zone d'indigénat de *D. suzukii*. En revanche une espèce de Solanacées analogue à la Belladone, *Scopolia japonica*, y vit. Forts de ces premières observations, nous avons cherché à caractériser, d'une part le contenu biochimique des fruits de Belladone à différents stades de maturité et d'autre part le développement de *D. suzukii* sur ces fruits aux mêmes stades. Au vu des nombreux concepts évoqués sur les invasions biologiques, nous avons également testé l'hypothèse selon laquelle, comparée à une souche japonaise considérée comme non-envahissante, la souche envahissante de drosophile pourrait être mieux adaptée à cette plante riche en composés toxiques.

La première partie du mémoire présente la caractérisation du contenu biochimique des fruits d'*Atropa belladonna* en fonction de leur stade de maturité. L'objectif est d'établir le profil en métabolites primaires et secondaires des fruits d'*Atropa belladonna* au cours de leur maturation. Lors de leur développement sur la Belladone, les larves de Drosophile se nourrissent de la pulpe des fruits. La composition biochimique des fruits peut alors avoir une incidence sur le développement des Drosophiles. La deuxième partie du mémoire s'intéresse à l'étude du développement de *D. suzukii* sur les fruits d'*A. belladonna* en fonction de différents stades de maturité. L'étude porte sur la comparaison entre souche envahissante et non-envahissante de *D. suzukii*, mais aussi sur une souche de *D. melanogaster*, espèce modèle classiquement considérée comme un standard de comparaison et coexistant avec *D. suzukii* dans les écosystèmes naturels et cultivés.

A. Synthèse bibliographique

1. *Drosophila suzukii*, ravageur des cultures fruitières en Europe

Drosophila suzukii (Matsumura, 1931) est une espèce d'insecte diptère de la famille des *Drosophilidae*. Elle appartient au sous-genre *Sophophora* divisé en plusieurs groupes d'espèces parmi lesquels le groupe *melanogaster* contenant la très connue et étudiée *Drosophila melanogaster* Meigen (Powell, 1997). Le groupe *melanogaster* est lui-même divisé en sous-groupes d'espèces dont l'un correspond au sous-groupe *suzukii* auquel appartient l'espèce *D. suzukii* (Kopp & True, 2002 ; Schawaroch, 2002 ; Van Der Linde, *et al.*, 2010).

1.1. Aire de répartition et propagation de *Drosophila suzukii*

Drosophila suzukii est originaire du Japon où elle a été observée pour la première fois s'attaquant aux cerises en 1916 (Kanzawa, 1936), elle fut par la suite décrite en 1931 par Matsumura. Depuis, elle a été recensée dans la partie orientale de la Chine (Peng, 1937), en Corée du Sud et du Nord (Chung, 1955 ; Kang & Moon, 1968), en Thaïlande (Okada, 1976), à Taiwan (Lin, *et al.*, 1977), en Birmanie (Toda, 1991), en Russie orientale (Sidorenko, 1992), au Pakistan (Amin ud Din, *et al.*, 2005) et également en Inde où elle a été décrite en tant que *D. suzukii indicus* (Parshad & Duggal, 1965 ; Parshad & Paika, 1965).

Actuellement, *D. suzukii* se propage dans de nombreuses régions du globe où elle a été involontairement introduite, telles que les Etats-Unis, le Canada, le Mexique et l'Europe (Hauser, 2011). En Europe, elle a été signalée pour la première fois à l'automne 2008 en Espagne dans la province de Rasquera (Calabria, *et al.*, 2012). Cependant, le récent examen en 2011 du contenu de pièges en Toscane (San Giuliano Terme, Pise, Italie) en 2008, révèle la présence dans cette région d'adultes de *D. suzukii* simultanément avec ceux découverts en Espagne (Raspi, *et al.*, 2011). En 2009, *D. suzukii* a été signalée dans d'autres régions d'Espagne et d'Italie mais également pour la première fois à Montpellier et dans les Alpes maritimes (Grassi, *et al.*, 2009 ; Calabria, *et al.*, 2012 ; Cini, *et al.*, 2012). A partir de 2010, l'aire d'invasion de *D. suzukii* s'est rapidement étendue vers le Nord et l'Est de l'Europe. Elle a été observée en Suisse (Baroffio & Fisher, 2011), en Slovénie (Seljiak, 2011), en Croatie (Milek, *et al.*, 2011), en Autriche (Lethmayer, 2011), en Allemagne (Vogt, *et al.*, 2012), en Belgique (Mortelmans, *et al.*, 2012), aux Pays-Bas (ONPV, 2012), au Royaume-Uni (OEPP, 2012), en Hongrie (Kiss, *et al.*, 2013) et au Portugal (Franco, 2013) (Figure 1).

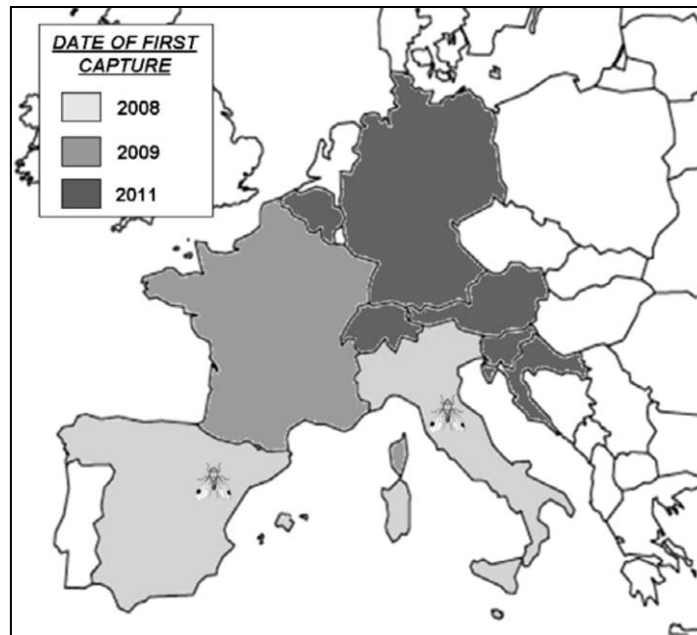


Figure 1 : Propagation de *D. suzukii* en Europe. La localisation des 1ères observations est indiquée par les dessins de mouche (Cini, *et al.*, 2012).

1.2. Conséquences sur la production fruitière

Environ 1500 espèces du genre *Drosophila* sont connues (Markow & O’Grady, 2006). Parmi les 2 espèces connues pour pondre sur des fruits sains et intacts, *Drosophila suzukii* est celle qui inflige le plus de dégâts aux productions fruitières (Walsh, *et al.*, 2011). Les autres espèces de drosophiles frugivores se développent sur des fruits endommagés ou trop mûrs (Sasaki & Sato, 1995). L’une des caractéristiques uniques de *Drosophila suzukii* correspond à la présence d’un ovipositeur denté présent chez les individus femelles (Figure 2). Celui-ci leur permet d’endommager les fruits sains et intacts lors du processus d’oviposition. Outre les dégâts causés par les larves durant leur développement dans le fruit, des dégâts secondaires peuvent se manifester. En effet, les blessures provoquées par la ponte peuvent engendrer le développement de champignons, de levures, de bactéries voire même d’autres insectes (Calabria, *et al.*, 2010 ; Walsh, *et al.*, 2011).



Figure 2 : Ovipositeur de *Drosophila suzukii* femelle (Poyet, 2014)

Le développement des larves au sein des fruits les rend très rapidement mous et pourris. Ainsi, les rendements sont fortement diminués impliquant d'importantes pertes économiques (Walsh, *et al.*, 2011). Outre ces pertes, de nombreux coûts liés à la lutte contre *Drosophila suzukii* s'ajoutent : surveillance des cultures, achats de produits phytosanitaires, étape de sélection des fruits plus longue, réduction de la conservation des fruits en post-récolte et coûts de stockage (Goodhue, *et al.*, 2011). Par ailleurs, la lutte chimique contre *D. suzukii* entraîne également des pertes financières supplémentaires en raison des volumes de fruits devenus invendables à cause du niveau trop élevé de résidus de produits phytosanitaires (Haviland & Beers, 2012). Il existe relativement peu d'études permettant de chiffrer l'impact économique de *D. suzukii*. En 2010, Bolda et collaborateurs ont toutefois établi une estimation des pertes engendrées par la drosophile en 2008 aux Etats-Unis pour la Californie, l'Oregon et Washington. Dans cette étude, les pertes sont estimées à 40% pour les myrtilles, 50% pour les mûres et framboises, 33% pour les cerises et 20% pour les fraises. Ces pertes représenteraient un total de 511 millions de dollars en cumulant les dégâts directs et les coûts de la mise en place de méthodes de protection des cultures.

Le cycle de développement de *D. suzukii* est commun à celui des autres Drosophiles (Figure 3). En conditions contrôlées, l'adulte émerge en moyenne 14 jours après la ponte à 20°C. Après l'éclosion de l'œuf, trois stades larvaires se succèdent jusqu'à la pupaison qui dure environ une semaine avant l'émergence d'un adulte. Les individus adultes atteignent leur maturité deux jours après leur émergence durant les saisons chaudes et l'accouplement a lieu dès les premiers jours. Un minimum de 8 jours est nécessaire entre la ponte et l'émergence des adultes (Cini, *et al.*, 2012). Ce cycle de développement court permet à plusieurs générations de *Drosophila suzukii* de se développer au cours d'un même cycle de culture. Les femelles pondent 1 à 3 œufs par site de ponte, 7 à 13 œufs par jour soit en moyenne 380 œufs au cours de leur vie (Kansawa, 1939 ; Mitsui, *et al.*, 2006 ; Walsh, *et al.*, 2011). En fonction des conditions climatiques, de 7 à 15 générations par an peuvent se développer conduisant à une augmentation de la population très conséquente (Kanzawa, 1939; Mitsui *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2011). L'activité biologique de *D. suzukii* pourrait être limitée par les fortes chaleurs estivales et la baisse des températures en période hivernale pendant laquelle les adultes rentreraient en diapause (Mitsui, *et al.*, 2010 ; Cini, *et al.*, 2012).

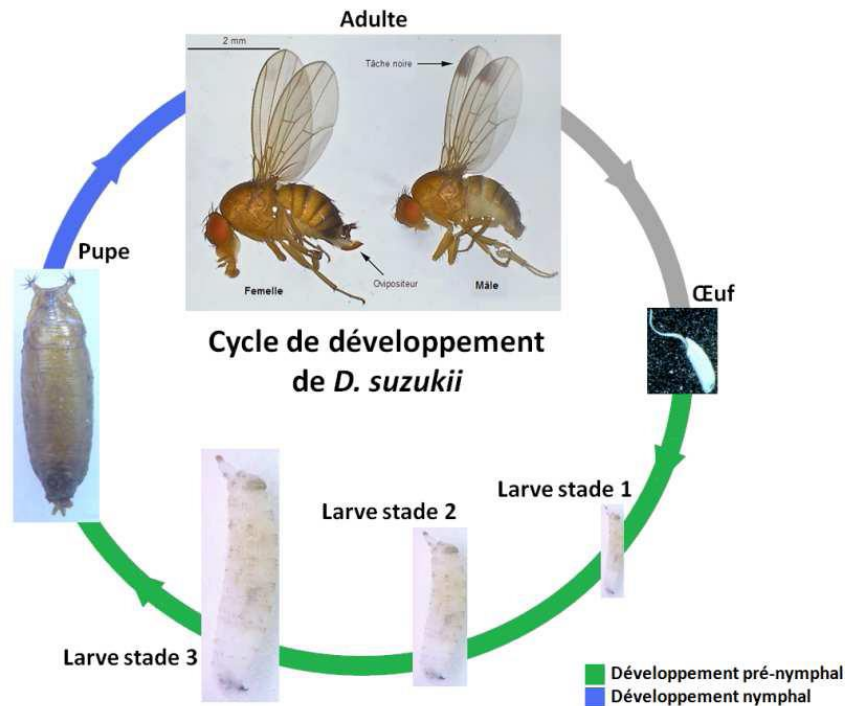


Figure 3 : Cycle de développement de *D. suzukii* (Lamy, 2013)

1.3. Gamme d'hôtes

Les études récentes menées sur *Drosophila suzukii* mettent en avant sa très grande polyphagie. Les premières observations au Japon montrent que *D. suzukii* pond préférentiellement sur cerises, pêches, prunes, kakis, fraises et raisins (Kanzawa, 1936). *In natura*, *D. suzukii* a été observée sur de nombreux fruits rouges tels que framboises, fraises, groseilles, mures mais aussi sur pommes, poires, oranges, abricots (Cini, *et al.*, 2012 ; Grassi, *et al.*, 2012 ; Lee, *et al.*, 2011 ; Walsh, *et al.*, 2011 ; Mitsui, *et al.*, 2010 ; Kansawa, *et al.*, 1936).

Cependant, très peu d'études sont publiées sur les gammes d'hôtes sauvages de *D. suzukii* lui permettant de maintenir ses populations en absence de cultures et hors des périodes de fructification. Les modalités de survie de *D. suzukii* en hiver sont très peu connues. L'étude de ces plantes hôtes sauvages permettrait de comprendre comment *D. suzukii* survie pendant la saison hivernale et quelles sont les espèces refuges qui favorisent son maintien et son expansion. Les premiers travaux sur l'utilisation de baies sauvages françaises par *D. suzukii* ont été réalisés par Mathilde Poyet lors de sa thèse visant à étudier les différents paramètres favorisant l'invasion de *D. suzukii* en France. Parmi les 67 plantes hôtes sauvages collectées en Picardie, le développement de *D. suzukii* a notamment été observé sur *Atropa belladonna* mais également sur *Prunus serotina*, le cerisier tardif (Poyet, *et al.*, 2014).

1.4. Moyens de lutte contre *Drosophila suzukii*

Encore actuellement, la lutte contre *Drosophila suzukii* s'appuie essentiellement sur l'utilisation d'insecticides. Cependant, à ce jour il existe peu d'insecticides efficaces contre *Drosophila suzukii* autorisés en France. Cette liste tend à se réduire avec le retrait progressif de nombreux insecticides à trop large spectre ou d'insecticides très nocifs pour l'utilisateur et l'environnement (Bruck, *et al.*, 2011). Des essais en conditions de laboratoire et de terrain ont pu montrer l'efficacité de certains insecticides. C'est le cas notamment de certains pyréthrinoïdes de synthèse ou d'organophosphorés qui semblent être efficaces en pulvérisation dès l'apparition des premiers adultes sur les cultures (Beers, *et al.*, 2011 ; Bruck, *et al.*, 2011). Cependant, l'efficacité des néonicotinoïdes en tant qu'adulticide n'est pas satisfaisante car ils sont souvent absorbés trop rapidement par la plante (Bruck, *et al.*, 2011).

Ce faible nombre de spécialités phytosanitaires disponibles conduit à des difficultés pour mettre en place une alternance dans l'utilisation des insecticides (Woltz, *et al.*, 2014). Compte tenu du grand nombre de générations par an chez les drosophiles, le risque d'apparition de résistances aux insecticides est accru (Ffrench-Constant, *et al.*, 1991). L'apparition de résistances aux insecticides peut être évitée ou retardée en alternant les modes d'action des insecticides (Mallet, 1989).

L'augmentation de la pression exercée par *Drosophila suzukii* sur les cultures fruitières engendre une augmentation de l'utilisation d'insecticides. A pus ou moins long terme, ces insecticides risquent de devenir de moins en moins efficaces et perturber les éventuels prédateurs naturels (Woltz, *et al.*, 2014). Le développement du contrôle biologique de *Drosophila suzukii* a pour objectif de mettre au point des stratégies efficaces sur le long terme. Ces stratégies se basent sur l'introduction ou le maintien d'ennemis naturels de *Drosophila suzukii*. Les recherches d'agents de lutte biologiques se portent sur l'utilisation de champignons entomopathogènes, de virus ou encore de prédateurs. Toutefois, l'utilisation de parasitoïdes en tant qu'agents de lutte biologique est la voie la plus étudiée (Chabert, *et al.*, 2012). Les premières expérimentations menées par Kanzawa en 1939 au Japon avaient testé l'efficacité de *Phaenopria spp.* (Hymenoptera Diapriidae) dans des conditions de laboratoires avec des résultats peu satisfaisants. Plus récemment, il a été montré que *Leptopilina japonica* (Hymenoptera Figitidae) a la capacité de s'attaquer aux larves de *D. suzukii* dans les fruits tombés et en cours de décomposition (Mitsui, *et al.*, 2010). L'utilisation d'*Asobara japonica*, un parasitoïde larvaire présent infestant *D. suzukii* dans son aire d'indigénat est une des nombreuses pistes étudiées. Il est cependant à noter que certains auteurs émettent des réserves quant à son efficacité en tant qu'agent de contrôle biologique (Nomano, *et al.*, 2014). La lutte biologique contre *D. suzukii* semble ainsi être difficile. De récentes études ont permis de montrer que *Drosophila suzukii* possède un grand nombre de cellules immunitaires (hémocytes), ce qui lui conférerait une résistance accrue aux parasitoïdes larvaires (Kacsoh & Schlenke, 2012 ; Poyet, *et al.*, 2013).

Comme toute stratégie de lutte contre un ravageur, il est impératif d'alterner les méthodes pour assurer un bon contrôle de *Drosophila suzukii*. Le contrôle biologique, comme le traitement chimique, doit être couplé à des mesures de prophylaxie. L'utilisation de pièges semble être une mesure efficace même si les résultats dépendent fortement de la culture visée et du type de piège utilisé (Lee, *et al.*, 2012). D'autres méthodes de lutte, plus anecdotiques, sont en cours de développement comme l'utilisation de revêtements comestibles sur les fruits qui pourrait réduire le nombre d'œufs pondus sur certains fruits tels que les framboises (Swoboda-Bhattarai, *et al.*, 2014).

2. *Atropa belladonna*, plante toxique hôte pour *Drosophila suzukii*

2.1. *Atropa belladonna*, la Belladone

La Belladone (*Atropa belladonna*) est une plante herbacée vivace de la famille des Solanacées native d'Europe centrale et méridionale affectionnant les milieux frais tels que les clairières et les bois (Rouy, *et al.*, 1908 ; Ashtiani & Sefidkonb, 2011) (Figure 4). Elle est connue pour ses propriétés pharmacologiques (Goullé, *et al.*, 2004). La totalité de la plante est considérée comme très toxique, l'ingestion des baies peut provoquer de graves intoxications.



Figure 4 : *Atropa belladonna* (photographies par Guiseppe Mazza, photomazza.com)

La plante est riche en métabolites secondaires dont une majorité d'alcaloïdes tropaniques. Les alcaloïdes tropaniques sont synthétisés au niveau des racines et transportés vers les parties aériennes via le xylème (Georgiev, *et al.*, 2013 ; Fattorusso & Tagliatela-Scafati, 2008). On dénombre 13 alcaloïdes tropaniques distincts dans les racines et 7 dans les parties aériennes (Rita *et al.*, 2011). Les alcaloïdes majoritairement présents dans la plante sont l'atropine et l'hyoscyamine, représentant 90 à 95% des alcaloïdes totaux (Goullé, *et al.*, 2004). Le troisième alcaloïde majoritaire est la scopolamine, représentant 2 à 3 % des alcaloïdes totaux. L'apoptropine et la belladonine peuvent être citées parmi les autres alcaloïdes présents chez la Belladone (Hammiche *et al.*, 2013). Les teneurs en alcaloïdes, atropine et hyoscyamine décrites chez *Atropa belladonna* diffèrent selon les auteurs (Tableau 1).

Tableau 1 : Teneurs en alcaloïdes, atropine et hyoscyamine dans la plante d'*Atropa belladonna*, quelques références bibliographiques.

Source	Molécules	Plante	Fruit	Feuille	Racine	Dose létale
Bruneton, 2005	Alcaloïdes	-	0.65%	0.50%	0.85%	0.2 mg/kg
	Atropine	-	~1 mg	-	-	-
Hammiche <i>et al.</i> , 2013	Alcaloïdes	0.3 à 1%	Jusqu'à 0.6%	0.3 à 0.6%	0.7 à 0.9%	2 à 5 baies = 4 à 10 mg
	Atropine	-	~1 mg	-	-	-
Rita <i>et al.</i> , 2011	Hyoscyamine	-	-	-	2.1 mg/g (+/-0.2)	-

2.2. Atropine, un alcaloïde tropanique

Les alcaloïdes tropaniques sont une classe d'alcaloïdes caractérisée pour la présence d'un noyau tropane, un composé cyclique azoté. Plus de 200 alcaloïdes tropaniques sont recensés à travers le monde. Principalement 3 familles de plantes synthétisent ces alcaloïdes tropaniques : les Solanacées, les Erythroxylacées et les Convolvulacées (Christen, 2000). L'atropine, la cocaïne et la scopolamine sont les trois alcaloïdes tropaniques les plus répandus chez les végétaux (Aniszewski, 2007). L'atropine est un racémique de l'hyoscyamine, c'est-à-dire un mélange équimolaire des énantiomères lévogyre et dextrogyre de l'hyoscyamine (Figure 5)

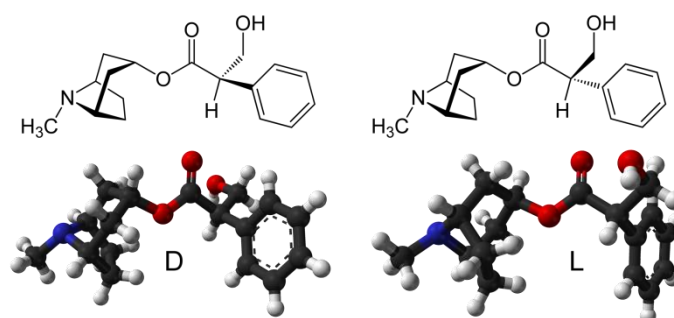


Figure 5 : Atropine, énantiomère dextrogyre (D) et lévogyre (L)

2.3. Rôle des alcaloïdes chez les plantes

Bien que considérés pendant longtemps comme des déchets métaboliques (Luckner, 1972), les métabolites secondaires sont à présent connus pour jouer un rôle dans la protection des plantes (Wink, 2003 ; Wink & Mohamed, 2003). Les métabolites secondaires sont impliqués dans la protection des plantes face à ses ennemis (Roberts & Wink, 1998 ; Wink, 1993) aussi bien insectes, mammifères, bactéries, champignons et virus (Fattorusso & Tagliatalata-Scafati, 2008). La nicotine présente dans les feuilles de tabac étant l'exemple le

plus connu du rôle des alcaloïdes dans la protection de la plante. La présence de nicotine protège la plante des insectes phytophages (Heldt, *et al.*, 2005). Les alcaloïdes procurent un goût amer à la plante. Pour certaines espèces comestibles contenant des alcaloïdes, l'agriculture a cherché à sélectionner des variétés avec une concentration en alcaloïdes la plus faible possible. C'est le cas du lupin (*Lupinus sp.*), pour lequel il a été montré que les espèces comestibles sélectionnées pour être faibles en alcaloïdes sont préférentiellement attaquées par les lapins en comparaison avec les espèces sauvages (Fattorusso & Taglialatela-Scafati, 2008 ; Wink, 1992).

De façon plus minoritaire, les métabolites secondaires peuvent également jouer un rôle physiologique dans le transport et le stockage d'azote (Wink, 1993 ; Wink, 1988).

Un phénomène de coévolution s'est mis en place entre la plante synthétisant des alcaloïdes et ses prédateurs. Hartmann *et al.* (2005), montre ainsi que certains insectes se sont spécialisés pour continuer à se nourrir sur ces plantes. Ces insectes ont développé des voies de détoxification des alcaloïdes et résistent alors à ces molécules. Au contraire, d'autres insectes ont su tirer bénéfice de la présence de ces métabolites secondaires. La séquestration des alcaloïdes par certains insectes leur confère un goût amer, dissuasif pour les prédateurs, voire les rendent toxiques (Fattorusso & Taglialatela-Scafati, 2008 ; Aniszewski, 2007 ; Narberhaus *et al.*, 2005). Il s'agit alors d'une interaction avec le troisième niveau trophique (Hartmann *et al.*, 1999 ; Abe *et al.*, 2001).

Au vu de ces éléments de bibliographie et de l'observation de *Drosophila suzukii* sur *Atropa belladonna*, plusieurs questions sont soulevées. Parmi ces questions, l'évolution biochimique des fruits d'*A. belladonna* au cours de leur maturation et son éventuelle influence sur le développement des Drosophiles ont suscité ce travail.

B. Travail expérimental

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels biologiques utilisés

- *Plante hôte :*

Les fruits de *Belladone* ont été récoltés en 2013 sur différents sites de la Picardie à trois stades de maturité différents et ont été stockés au congélateur à -80°C. Les stades de maturité des fruits testés sont :

- Baies vertes, récoltées en juillet 2013 (30 échantillons de 15 à 20 baies)
- Baies matures, récoltées en septembre 2013 (30 échantillons de 13 à 25 baies)
- Baies très matures, récoltées en novembre 2013 (20 échantillons de 14 à 32 baies)

- *Insectes :*

Au cours de cette étude, deux espèces de *Drosophiles* sont utilisés : *D. suzukii* et *D. melanogaster*.

Deux souches de *Drosophila suzukii* sont utilisées. L'une est issue d'individus envahissants, c'est-à-dire piégés en France sur l'aire d'invasion récente et l'autre est originaire du Japon, l'aire d'indigénat. La souche française de *Drosophila suzukii* (*D. suzukii* COMP) a été collectée en octobre 2011 dans la forêt de Compiègne (60, Oise) (Figure 6). La souche japonaise de *Drosophila suzukii* (*D. suzukii* TSM92) a été capturée en 2006 à Tsumi (Japon). Ces deux souches sont élevées en laboratoire sur milieu « Banane » en conditions contrôlées, soit à 20°C avec une photopériode de 13h/11h.

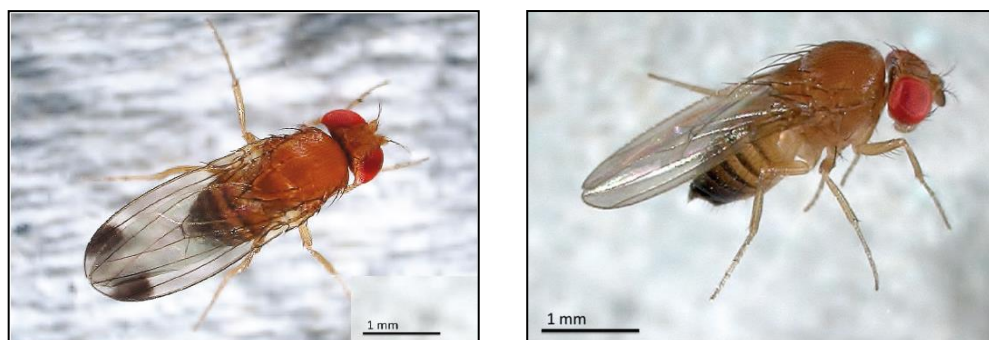


Figure 6 : *Drosophila suzukii*, individus mâle (gauche) et femelle (droite) (Poyet, 2014)

La souche de *Drosophila melanogaster* utilisée dans cette étude a été capturée en 1994 à Sainte-Foy-Les-Lyon (69, Rhône). Les mouches sont élevées sur milieu « fermenté » dans les mêmes conditions contrôlées que les souches de *D. suzukii*.

La composition des milieux d'élevage des différentes souches de *Drosophila* utilisés pour cette étude est détaillée dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2 : composition des milieux Banane et Fermenté

Milieu	agar	eau	banane	levure	farine	sucre	Nipagine
Banane	10g	250mL	200g	25g	15g	10g	2g
Fermenté	10g	500mL	0g	7.5g	50g	60g	0.3g

1.2. Analyses biochimiques des fruits d'*Atropa belladonna*

1.2.1. Dosage des sucres et des acides aminés

1.2.1.1. Extraction des sucres solubles et des acides aminés

Parmi les 30 plantes échantillonnées par stade de maturité, 6 plantes sont testées pour chaque stade de maturité. Pour chaque plante, 10 baies sont prélevées afin d'obtenir un échantillon homogène. Pour prévenir la dégradation potentielle des acides aminés, toutes les étapes sont réalisées en maintenant les échantillons dans la glace. Comme pour le dosage des métabolites secondaires, les fruits sont décongelés puis disséqués sous loupe binoculaire afin de retirer les graines. La peau, la pulpe et le jus de chaque échantillon sont ensuite broyés à l'aide d'un broyeur à billes Retsch® MM 400 afin d'obtenir une purée homogène.

L'extraction des sucres se déroule selon le protocole de Harisson *et al.* (2003). A partir de 100 mg ($\pm 5\%$) de matière fraîche (MF), une 1^{ère} extraction hydroalcoolique est réalisée avec 1mL d'éthanol 80 % à 4°C pendant 2h sous agitation (120 tr/min) puis l'échantillon est centrifugé à 1200 g pendant 5min à 4°C. Le surnageant est récupéré et le culot subit une 2^{ème} extraction avec 1mL d'éthanol 60 % pendant 2h sous agitation à 4°C. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et ajouté à celui de la 1^{ère} extraction. Le culot subit une 3^{ème} extraction avec 1 mL d'eau pendant 2h sous agitation à 4°C. Après centrifugation, le surnageant est ajouté aux deux précédents. Pour chaque échantillon, deux tubes de 1mL de surnageant sont ensuite évaporés au speed-vac LABCONCO à 50°C. Le matériel restant est resolubilisé dans 220 μ L d'eau puis les contenus des deux tubes sont rassemblés pour obtenir 440 μ L d'extrait.

Pour le dosage des sucres solubles et le dosage des acides aminés, trois répliques techniques par extrait sont effectuées, soit trois dosages par extrait.

1.2.1.2. Protocoles de dosage des sucres solubles et des acides aminés

➤ Dosage des sucres solubles

Le dosage des sucres solubles est réalisé en microplaque à l'aide du kit commercial de bioanalyses enzymatiques commercialisé par *R-Biopharm*. Ce dosage permet de déterminer les concentrations en glucose, fructose et saccharose solubles contenus dans les extraits (Annexe I). Le dosage du glucose et du fructose se réalise à partir d'une prise d'essai de 5 μL des extraits dilués au $1/10^{\text{ème}}$. Pour le dosage du saccharose, les prises d'essais sont de 6 μL pour les fruits de juillet et 3 μL pour les fruits de septembre et novembre.

Afin de pouvoir doser le glucose dans les fruits d'*Atropa belladonna*, une gamme de glucose est réalisée à partir d'une solution mère de glucose à 0,5 g/L. Après action des enzymes, hexokinase et glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6DPH), la densité optique (DO) est mesurée à 340 nm. La concentration en fructose est obtenue en retranchant la concentration en glucose initialement présente dans les extraits à la concentration en glucose obtenue après l'action combinée de l'hexokinase et de la phosphoglucose isomérase (PGI). La concentration en saccharose dans les fruits est mesurée à l'aide d'une gamme étalon réalisée à partir d'une solution mère de saccharose à 0,5 g/L. Le saccharose est dosé après action d'une enzyme, l'invertase, qui libère les sucres réducteurs c'est-à-dire le glucose et le fructose.

➤ Dosage des acides aminés

Le dosage des acides aminés se réalise en microplaques et se déroule en deux étapes (Annexe II). Un premier dosage permet de titrer toutes les fonctions NH_2 donc essentiellement les acides aminés et l'ammonium contenus dans les échantillons. Ce dosage fait intervenir une réaction colorimétrique à la ninhydrine selon le protocole de Rosen (1957). Une gamme de glutamine est réalisée à partir d'une solution mère à 4 nmol/ μL pour permettre de doser les fonctions NH_2 . Après réaction, la lecture de densité optique (DO) se fait à 570 nm. Pour ce dosage, les prises d'essais des extraits sont de 15 μL pour les trois stades de maturité des fruits. La deuxième étape permet de doser l'ammonium contenu dans les échantillons selon la méthode Berthelot (1859). Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère d'ammonium à 2 nmol/ μL . Ce dosage est basé sur une réaction colorimétrique faisant intervenir le bleu d'indophénol, puis la lecture de DO se fait à 635 nm. Les prises d'essais sont de 10 μL pour les trois stades de maturité des fruits. Pour obtenir la teneur finale en acides aminés, il suffit alors de retrancher la quantité d'ammonium aux résultats du dosage Rosen.

1.2.2. Extraction des alcaloïdes

Une étape d'extraction est nécessaire pour déterminer le profil en métabolites secondaires et les concentrations en alcaloïdes présents dans les baies d'*Atropa belladonna*. Parmi les 30 plantes échantillonnées par stade de maturité, 8 plantes sont testées pour chaque stade de maturité. Pour chaque plante testée, 10 baies sont sélectionnées afin d'obtenir un mélange homogène représentatif et une masse fraîche suffisante pour l'extraction. Les fruits sont décongelés au réfrigérateur pendant 12 h puis disséqués sous loupe binoculaire pour retirer les graines, non consommées par les larves. La peau, la pulpe et le jus des baies sont placés dans

un tube en plastique de 30 mL. Un volume de méthanol est ajouté dans le tube pour se ramener à un volume total de 25 mL. Le mélange est broyé à l'ULTRA-TURRAX pendant 2 min. à puissance maximale. Les tubes sont disposés dans une cuve à ultrasons remplie d'eau et soumis aux ultrasons pendant 15 min à puissance 7 et à température constante de 30°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 8 min. à 6000 tr/min. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et placé dans un ballon. Les échantillons sont évaporés à l'évaporateur rotatif. Après évaporation totale, les extraits sont mis en solution dans du méthanol pour obtenir une concentration de $1g_{\text{extrait}} / 10mL_{\text{MeOH}}$ soit 100 mg/mL.

1.2.3. Analyses des métabolites secondaires

➤ **Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM)**

○ *Principe*

La CCM permet de séparer les différents composés d'un mélange et de les visualiser par des systèmes de révélation spécifiques. Elle est basée sur les différences d'affinité de ces composés vis-à-vis de deux phases : une phase stationnaire solide (généralement de la silice ou de l'alumine) et une phase mobile liquide, le solvant de migration ou éluant.

Pour la CCM, la phase stationnaire (adsorbant) est répartie en une couche mince sur une feuille de plastique, d'aluminium ou sur un support de verre. L'éluant est constitué d'un ou de plusieurs solvant(s) qui migre (-nt) par capillarité le long de la plaque de manière ascendante. La phase mobile entraîne les constituants du mélange à analyser à des vitesses différentes, selon leur affinité pour celle-ci, induisant ainsi leur séparation.

La mise en évidence des composés ayant migré se fait avec un révélateur spécifique des composés recherchés et/ou par une lampe UV si ces derniers absorbent entre 200 et 450 nm. La migration différentielle des composés permet leur caractérisation par le calcul de leur rapport frontal (Rf).

○ *Protocole*

La chromatographie sur couche mince nous a permis de séparer les composants contenus dans les solutions préparés précédemment. Les séparations sont réalisées sur des plaques de gel de silice déposées sur des feuilles d'aluminium. Les dépôts sont effectués avec une seringue Hamilton de 10 μ L. L'éluant utilisé (Tableau 3) permet la migration et la séparation des métabolites secondaires. Cet éluant est couramment utilisé au laboratoire et est particulièrement adapté pour l'étude des métabolites secondaires polaires parmi lesquels on trouve les alcaloïdes et les composés glycosylés.

Tableau 3 : Composition de l'éluant CCM

Composition de l'éluant CCM	Acétate d'éthyle	Acide formique	Acide acétique	Eau
	100mL	11mL	11mL	20mL

Après migration, les plaques sont séchées et les différentes molécules sont révélées à l'aide des réactifs suivants :

- Dragendorff, spécifique des alcaloïdes
- Réactif de Liebermann et Burchard, spécifique des stérols, des stéroïdes et des triterpènes
- Thymol sulfurique, spécifique des sucres.
- Réactif de Neu, spécifique des composés phénoliques et des flavonoïdes
- Vanilline sulfurique, réactif universel
- Acétate de plomb, spécifique des coumarines
- DPPH, détection de l'activité anti-oxydante
- Potasse alcoolique (KOH), spécifique des coumarines et des quinones
- FeCl₃, spécifique des tanins

Nous utiliserons dans le cadre de ce mémoire uniquement les résultats obtenus avec les trois premiers révélateurs : Dragendorff, Liebermann et Burchard, Thymol sulfurique.

➤ **Analyse quantitative par LC-MS**

○ *Principe*

La LC-MS correspond à l'association de deux instruments analytiques la chromatographie liquide (HPLC) et la spectrométrie de masse (MS). Ces instruments sont couramment utilisés pour la séparation (LC) et l'identification (MS) des substances chimiques dans des milieux complexes.

La chromatographie liquide (LC) est une méthode physique de séparation à partir de laquelle les composés sont sélectivement distribués entre deux phases non-miscibles ; la phase mobile « liquide » parcourant la phase stationnaire « polymérique » fixée dans une colonne. La rétention d'un composé dans la phase stationnaire dépend de son affinité (polarité, structure chimique...) avec cette dernière et des conditions d'élution.

Divers détecteurs sont utilisés pour l'HPLC, le plus simple et le plus courant est un spectromètre UV qui peut opérer à une ou plusieurs longueurs d'onde.

La spectrométrie de masse est un détecteur plus universel qui permet la détection et l'identification des substances chimiques grâce à la mesure du ratio de la masse moléculaire sur la charge électrique (m/e) des ions générés dans la source. Malgré tout, certaines molécules chimiques s'ionisent mal en mode négatif et/ou positif et leur détection peut être difficile.

La mesure de la masse molaire ne garantit pas l'identification des substances, il est aussi nécessaire d'analyser les schémas de fragmentation et de les comparer à ceux de témoins ou à ceux décrits dans la littérature ou dans des bases de données pour avoir des déterminations structurales univoques. Une détermination quantitative est alors possible après réalisation de courbes étalons avec des échantillons de concentrations connues.

○ *Protocole*

Les analyses LC-MS sont effectuées sur l'appareillage constitué d'un système UFLC Prominence (Shimadzu) muni d'un détecteur UV Shimadzu SPD-20A fixé à 202 nm couplé à un spectromètre de masse Q-TOF Ultima Global high-resolution hybrid quadrupole time-of-flight instrument (Waters-Micromass) équipé d'une interface d'ionisation electrospray et contrôlé par le logiciel MassLynx 4.0 SP4 software

Les analyses ESI-MS sont réalisées en mode positif et négatif avec une tension capillaire de ± 2.5 kV et des tensions de cône de 50 et 250 V.

Pour chacun des extraits et des échantillons de la courbe d'étalonnage, 2 μ L sont injectés sur une colonne Prevail reverse-phase C18 column (Grace) (250 \times 4.6 mm, 5 μ m). Les séparations sont menées à 30°C avec un débit de 1 mL/min. La phase mobile est constituée d'un mélange d'eau (A) et d'acétonitrile (B) contenant chacun 0,1 % (V/V) d'acide formique. Les conditions d'élution sont décrites dans le tableau suivant (Tableau 4).

Tableau 4 : Conditions d'élution des échantillons et de la courbe d'étalonnage

Minutes	(A)	(B)
0	95	5
3	95	5
33	5	95
35	5	95
36	95	5
40	95	5

Ces conditions sont utilisées pour les courbes de calibration de l'atropine et de la scopolétine. Celles-ci sont obtenues par injection en triplicat de 6 solutions de 1 mg/mL à 0,0625 mg/mL préparées par des dilutions successives au demi d'une solution mère à 1 mg/mL. Les aires des pics d'intérêt sont mesurées et la droite d'étalonnage est obtenue sous Excel.

1.3. Développement et survie des Drosophiles sur les fruits d'*A. belladonna*

L'objectif est de caractériser le développement de *D. suzukii* (souches française et japonaise) et de *D. melanogaster* suite à une infestation artificielle sur les fruits d'*Atropa belladonna* en fonction des trois stades de maturité : fruits verts, fruits matures et fruits très matures. Pour chaque souche et pour chaque stade de maturité, 40 répétitions sont effectuées.

Pour obtenir un nombre suffisant d'œufs, des lames de ponte sont réalisées 24h avant l'infestation des fruits. Les lames de ponte sont des lames de plexiglas rectangulaires (environ 8*2,2cm) recouvertes d'environ 1 mm de milieu « banane ». La lame est introduite dans un tube de propylène de 30 mL fermé par un bouchon en mousse. Une trentaine d'individus, mâles et femelles, âgés de 5 à 10 jours sont introduits dans le tube et laissés pendant au moins 5h à 20°C.

Les infestations s'effectuent en conditions de développement individuel, soit un œuf pour un fruit, afin d'éviter toute compétition entre les larves. Pour simuler l'oviposition, le fruit est percé près de la cicatrice du pédoncule à l'aide d'une minutie. Un œuf est ensuite déposé à côté du trou à l'aide d'une pipette pasteur effilée. La quantité minimale de nourriture disponible pour les larves de Drosophile dans les baies de *Belladone* pourrait être un facteur limitant le développement et la survie des individus. Afin de déterminer si ce facteur est limitant ou non, un œuf est déposé sur une quantité donnée de milieu « Banane ». Cette quantité minimale est estimée à partir du calcul du poids moyen de 20 baies vertes, stade présentant les fruits les plus petits, sur lesquelles on a préalablement procédé au retrait des graines (Tableau 5).

Tableau 5 : Diamètre et poids moyen pour 1 baie verte de *Belladone*

	Diamètre	Poids Baie entière	Poids Graines	Poids Pulpe et peau
Moyenne	1 cm	0,4138 g	0,1392 g	0,2745 g
Ecart-type	0,2128	0,1279	0,0704	0,0776

Le milieu banane est chauffé au four micro-onde afin de le rendre liquide et de pouvoir en couler 0,27 g dans des bouchons eppendorf. Une fois le milieu refroidi, la surface est légèrement scarifiée à l'aide d'une pince pour faciliter la pénétration de la larve après éclosion. Un œuf est déposé sur le milieu banane à l'aide d'une pipette pasteur effilée.

Les baies et les milieux infestés sont placés individuellement dans un godet en plastique. Le fond du godet est recouvert de coton hydrofuge stérilisé imbibé d'eau distillée stérilisée afin de limiter le développement de moisissures. Les godets sont refermés avec un bouchon en mousse propre puis ils sont conservés dans une enceinte climatisée à une température de 20°C jusqu'à émergence des adultes. Les cotons sont réhydratés tous les 7 jours environ en veillant à ce que le milieu banane et les baies ne se dessèchent pas ce qui pourrait perturber le développement des individus.

Les godets sont observés quotidiennement afin de noter la date d'émergence et ainsi estimer la durée de développement et le taux de survie des mouches appartenant aux différentes souches. Les durées de développement sont classées en trois catégories : émergences à 14 jours et moins, émergences entre 15 et 17 jours et enfin émergences à 18 jours et plus. A leur émergence, les individus sont retirés des godets et placés individuellement dans des tubes eppendorf de 1.5mL. Ces tubes sont conservés au congélateur à -80°C pour permettre d'autres analyses ultérieures.

1.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec du logiciel Statview 5.0.1 (SAS Institut Inc.). Les résultats des dosages en métabolites primaires et secondaires ont été analysés grâce aux tests de Khruskal-Wallis et Mann-Withney. Les paramètres de survie et de durée de développement ont été analysés grâce au test du Khi². Pour chaque résultat significatif, c'est-à-dire inférieur au seuil de $\alpha = 5\%$, un test de comparaisons multiples a été réalisé au seuil de $\alpha = 5\%$.

2. Résultats

2.1. Caractérisation biochimique des fruit d'*Atropa belladonna*

2.1.1. Profils en métabolites primaires

2.1.1.1. Résultats des dosages des sucres solubles

Le dosage des sucres réducteurs dans les fruits d'*Atropa belladonna* s'effectue à l'aide des gammes étalon de glucose (Figure 7) et de fructose (Figure 8).

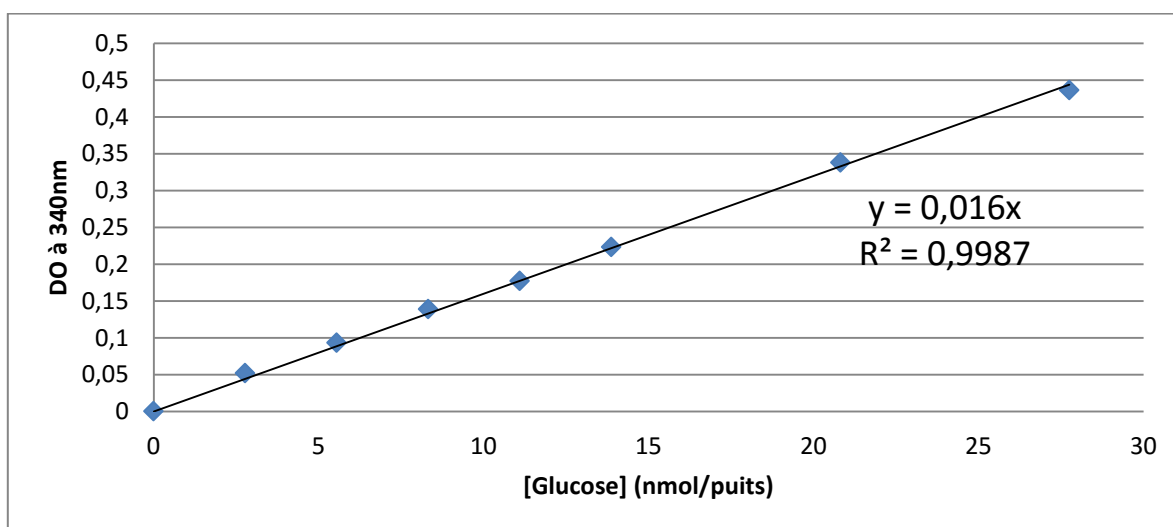


Figure 7 : Gamme étalon de glucose – Concentration de glucose en nmol / puits en fonction de la DO (340 nm)

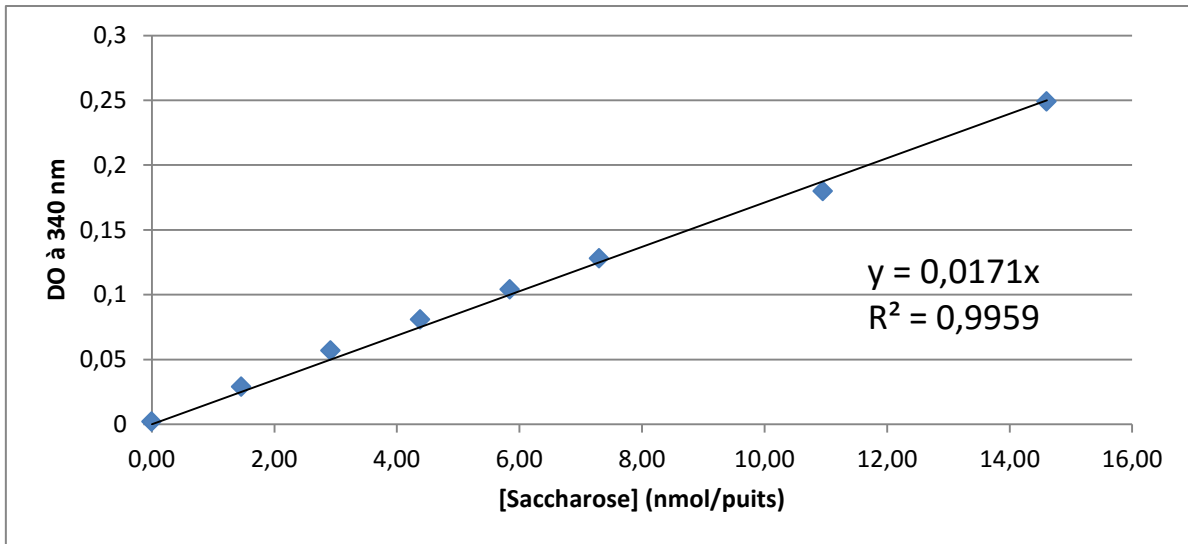


Figure 8 : Gamme étalon de saccharose – Concentration de saccharose en nmol / puits en fonction de la DO (340 nm)

Les résultats du dosage du glucose et du fructose sont présentés sur la figure 9. Des différences significatives sont observées pour les concentrations en glucose et fructose en fonction des différents stades de maturité ($K_{hi}^2 = 14,749$; $P = 0,002$). Ces résultats montrent que les fruits verts de juillet contiennent les plus faibles concentrations en glucose et en fructose, respectivement 38,5 et 189,2 nmol par mg de matière fraîche (MF). En comparaison, les fruits de septembre contiennent environ 8 fois plus de glucose, soit 317,9 nmol/mg(MF) et 4 fois plus de fructose, soit 762,5 nmol/mg(MF). Les fruits mûrs de septembre sont les plus riches en sucres réducteurs. Pour les fruits de novembre, nous observons une baisse du taux en glucose d'environ 31 % et une baisse d'environ 27 % du taux de fructose par rapport aux fruits de septembre (respectivement, 220,5 nmol/mg(MF) et 562,9 nmol/mg(MF)).

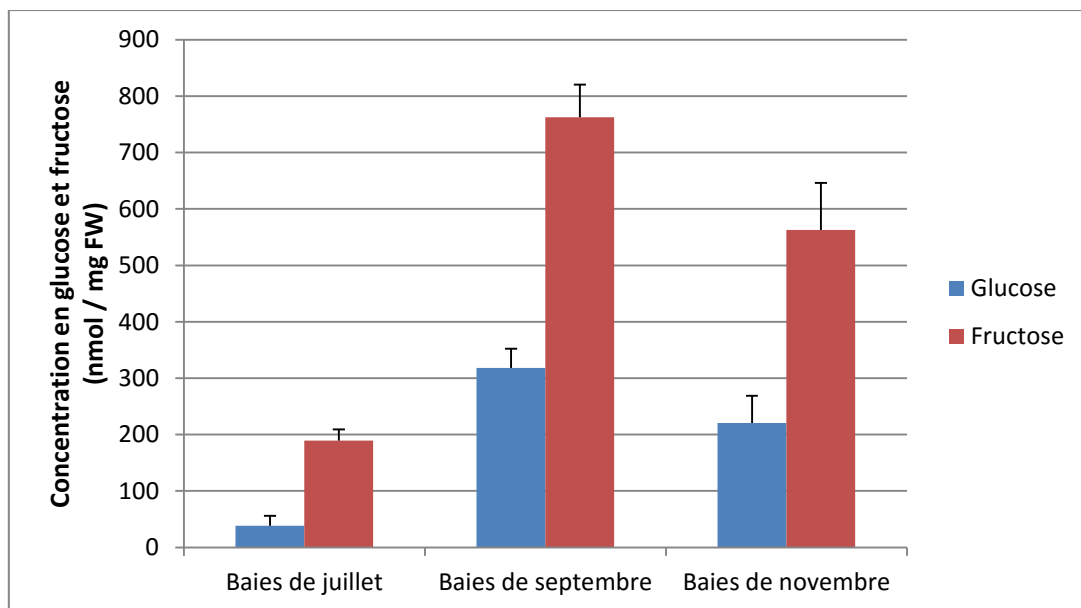


Figure 9 : Teneurs en glucose et en fructose en nmol / mg de matière fraîche en fonction du stade de maturité des fruits d'*Atropa belladonna* (Barres d'erreur = Ecart-type)

Les résultats obtenus pour le dosage du saccharose, non représentés graphiquement, indiquent que les fruits d'*Atropa belladonna* ne contiendraient pas de saccharose. Toutefois, nous pouvons émettre des réserves quant à ses résultats de dosage du saccharose. En effet, la très grande majorité des fruits contient du saccharose même en faible proportion. Il serait judicieux de réaliser un nouveau dosage du saccharose pour confirmer ou invalider ces résultats.

2.1.1.2. Résultats des dosages des acides aminés

Le dosage des acides aminés dans les fruits d'*Atropa belladonna* s'effectue à l'aide des gammes étalon de glutamine (Figure 10) et d'ammonium (Figure 11).

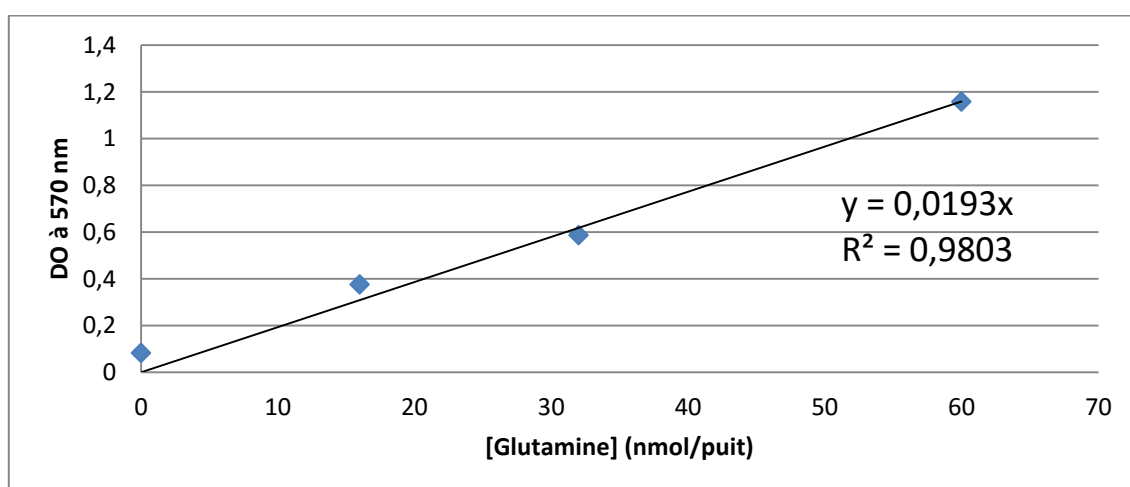


Figure 10 : Gamme étalon de glutamine – Concentration de glutamine en nmol / puit en fonction de la DO (570 nm)

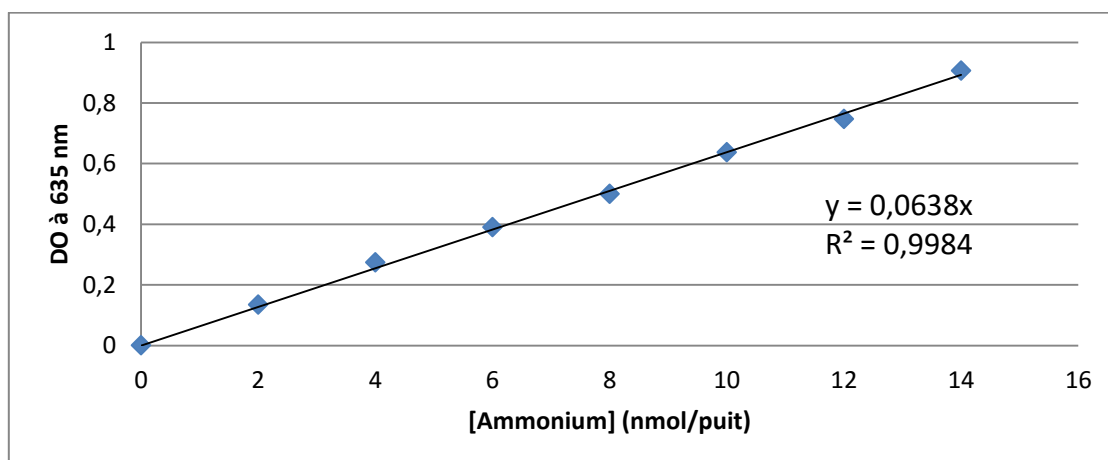


Figure 11 : Gamme étalon de d'ammonium – Concentration d'ammonium en nmol / puit en fonction de la DO (635 nm)

Après avoir dosé l'ensemble des fonctions NH₂ dans les extraits et retranché les fonctions NH₂ liées à l'ammonium, nous obtenons la teneur en acides aminés dans les fruits d'*Atropa belladonna* en fonction du stade de maturité (Figure 12).

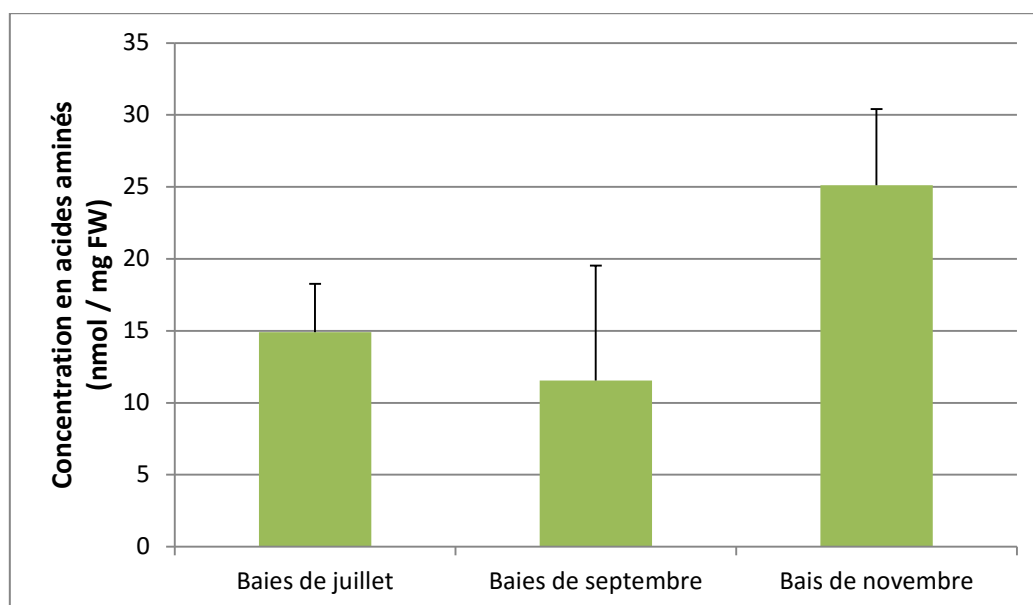


Figure 12 : Teneurs en acides aminés en nmol / mg de matière fraîche en fonction de stade de maturité des fruits d'*Atropa belladonna* (Barres d'erreur = Ecart-type)

Ces résultats montrent que les fruits de novembre sont ceux contenant le plus d'acides aminés avec 25,1 nmol/mg(MF). Les fruits verts de juillet et les fruits mûrs de septembre contiennent respectivement 14,9 et 11,6 nmol/mg(MF) d'acides aminés. Les fruits très mûrs de novembre contiennent significativement plus d'acides aminés que les fruits verts de juillet ($P = 0,017$) et les fruits mûrs de septembre ($P = 0,026$).

Des analyses complémentaires, non réalisées dans le cadre de cette étude, permettraient de d'identifier les acides aminés présents dans les fruits d'*Atropa belladonna*. Il serait intéressant de voir si la composition en acides aminés fluctue en fonction du stade de maturité des fruits.

2.1.2. Profils en métabolites secondaires

2.1.2.1. Résultats obtenus par CCM

La chromatographie sur couche mince (CCM) permet d'obtenir un premier résultat sur les profils des métabolites secondaires des extraits des baies d'*Atropa belladonna* en fonction du stade de maturité (Figure 13).

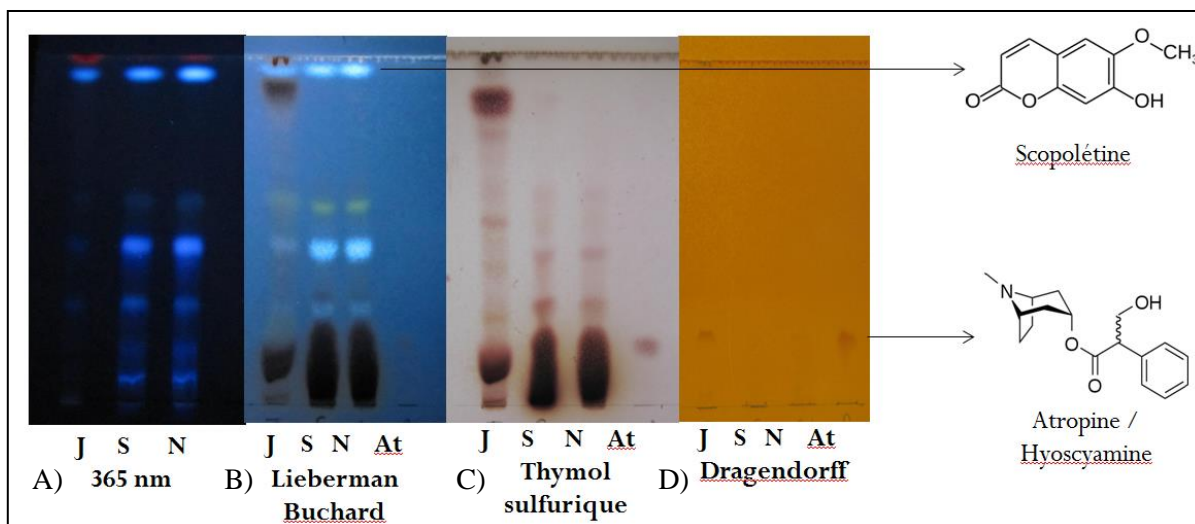


Figure 13 : Analyse comparative des chromatogrammes obtenus par CCM de 3µL d'extraits de (J) baies collectées en juillet, (S) baies collectées en septembre et (N) baies collectées en novembre. At = dépôt d'atropine (5µL d'une solution à 1g/L).

Les chromatogrammes montrent des différences notables entre les profils en métabolites secondaires des fruits en fonction de leur stade de maturité, après révélation sous lampe UV à 365nm et pour les différents réactifs testés : Dragendorff, Lieberman et Buchard, Thymol sulfurique. Le profil en métabolites secondaires des extraits de baies vertes de juillet est visiblement très différent des profils des extraits des baies mûres de septembre et très mûres de novembre. Les profils des extraits de baies de septembre et de novembre quant à eux semblent proches.

L'utilisation du révélateur de Dragendorff spécifique des alcaloïdes permet de mettre en évidence la présence d'un alcaloïde majoritaire dans les fruits de juillet. La comparaison avec un témoin déposé à une quantité connue permet de penser qu'il s'agit bien d'atropine ($R_f = 0,19$) (Figure 13 D). Pour les baies de mûres de septembre et très mûres de novembre, le révélateur ne permet de détecter la présence d'atropine. Ceci indique que les fruits mûrs et très mûrs ne contiennent pas d'atropine ou contiennent une quantité d'atropine bien inférieure aux fruits verts, trop faible pour être révélée avec le Dragendorff.

Les deux autres révélateurs utilisés contiennent de l'acide sulfurique et mettent en évidence les composés comportant des motifs glucidiques dans leurs structures (Figure 13 B, C). La même différence entre les stades de maturation est confirmée et on peut également observer que les métabolites qui sont formés au cours de la maturation sont des produits qui migrent peu dans le système d'élution ce qui confirme leur nature polaire caractéristique de la présence de sucres dans leur structure.

On observe sur la figure 13 (A et B) la présence en front de solvant d'un produit dont la concentration semble augmenter au cours de la maturation des fruits ($R_f = 0,96$). A ce premier stade d'observation, il n'a pas été possible de déterminer la nature chimique de cette substance. Cependant, compte tenu de sa révélation à 365 nm, il était possible de penser à un composé phénolique. La LC-MS a permis de mettre en évidence qu'il s'agissait de scopolétine (cf ci-dessous). La comparaison avec un témoin a été effectuée par CCM et nous avons pu constater qu'il s'agissait bien de scopolétine en utilisant un solvant de polarité moins élevée ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90/10).

La CCM permet d'avoir une vue générale des métabolites présents dans les extraits. Elle permet de confirmer la teneur importante en atropine dans les fruits de juillet et d'orienter le choix des conditions d'analyse par LC-MS.

2.1.2.2. Résultats obtenus par LC-MS

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) permet d'établir le profil en métabolites secondaires des extraits de fruits d'*A. belladonna* en fonction de leur stade de maturité (Figure 14).

On constate comme précédemment en CCM une différence importante des profils en fonction des stades. L'atropine et la scopolamine diminuent au cours de la maturation alors que la scopolétine augmente au cours du temps. On constate également que le composé de temps de rétention 10,87 min augmente en fonction du processus de maturation.

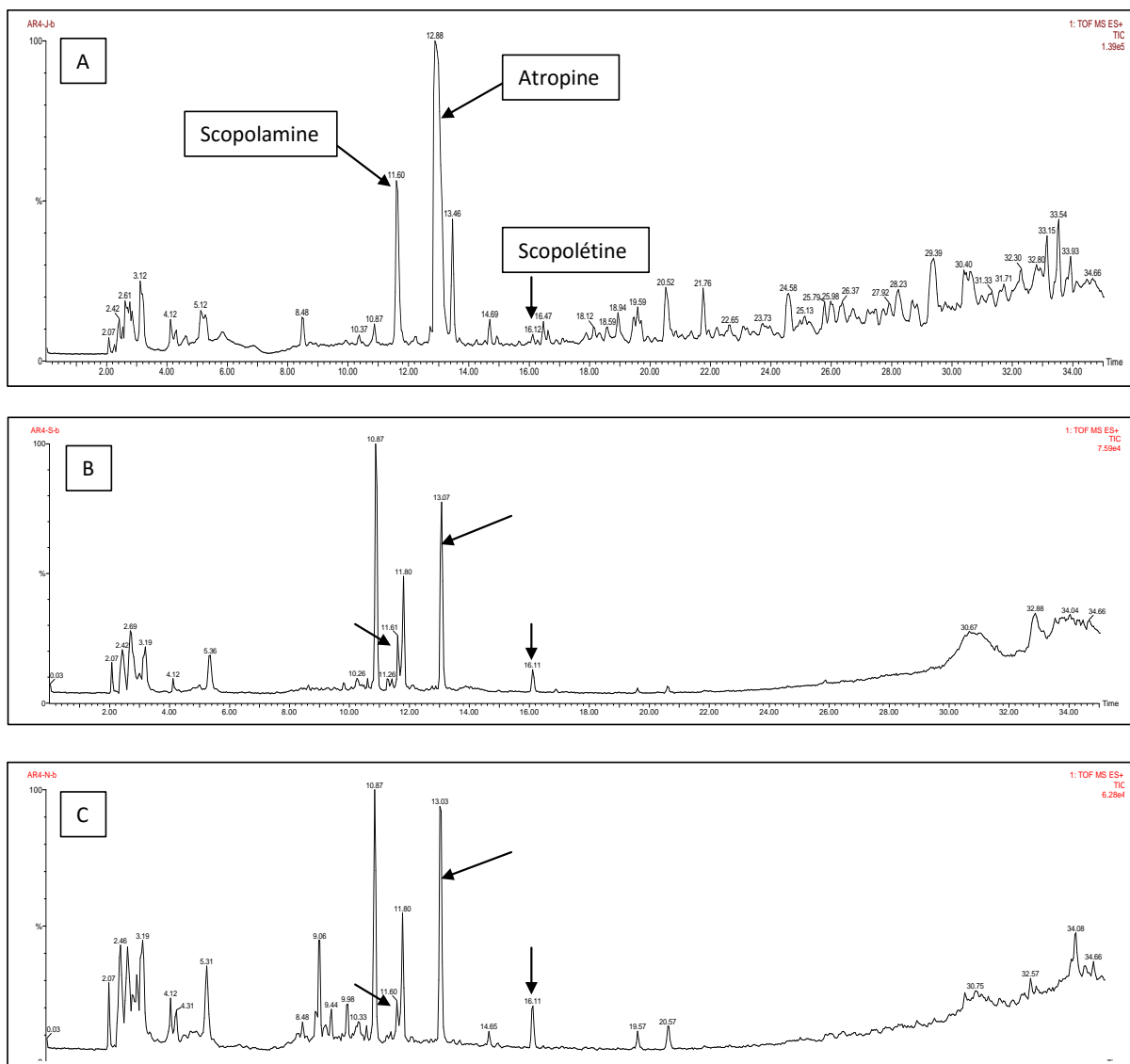


Figure 14 : Analyse comparative des chromatogrammes (TIC) obtenus par LC-MS (mode positif, tension de cône 50V) des extraits de (A) baies vertes collectées en juillet, (B) baies mûres collectées en septembre et (C) baies très mûres collectées en novembre.

De façon générale à ce stade, l'identification des molécules présentes dans les extraits est réalisée soit par comparaison des temps de rétention et des spectres de masse de témoins, soit par une analyse plus approfondie d'autres spectres de fragmentation (LC-MS/MS).

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés uniquement à l'identification des 3 composés indiqués sur le premier chromatogramme. Par exemple, dans le cas de l'atropine, nous avons comparé le temps de rétention du témoin et de son spectre de masse au produit majoritaire du chromatogramme issu des fruits de juillet (Figure 15).

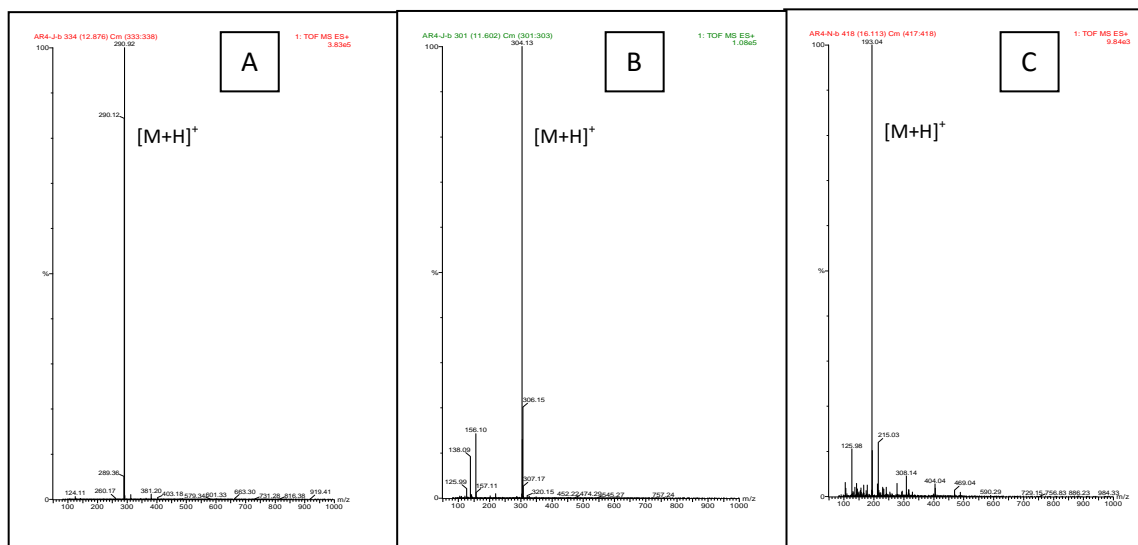


Figure 15 : Spectres de masse ESI en mode positif de A) l'atropine, B) la scopolamine et C) la scopolétine présentes dans les fruits d'*Atropa belladonna*.

Ceci nous permet d'affirmer sans ambiguïté que le produit majoritaire est bien l'atropine. Nous avons procédé de la même façon pour la scopolétine et la scopolamine. La présence de la scopolétine n'est, à notre connaissance, pas décrite chez *A. belladonna*. Nous n'avons pu détecter par CCM la scopolamine qui est pourtant décrit comme alcaloïde présent chez la plante. Ceci s'explique, sans doute, en raison des trop faibles quantités présentes (non évaluées quantitativement pour le moment).

Les chromatogrammes présentés ci-dessus correspondent à une série d'extraction. A ce stade de l'analyse quantitative, nous avons constaté que les profils obtenus pour cette série étaient représentatifs des 6 séries de fruits que nous avons étudiées et ceci pour chaque stade de maturité.

Afin de doser l'atropine et la scopolétine dans les différents extraits de fruits d'*A. belladonna*, une gamme étalon d'atropine (2 - 1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 mg/mL) et une gamme étalon de scopolétine (1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 mg/mL) sont réalisées (Figures 16 et 17). Les aires ont été mesurées à partir des chromatogrammes obtenus par détection UV.

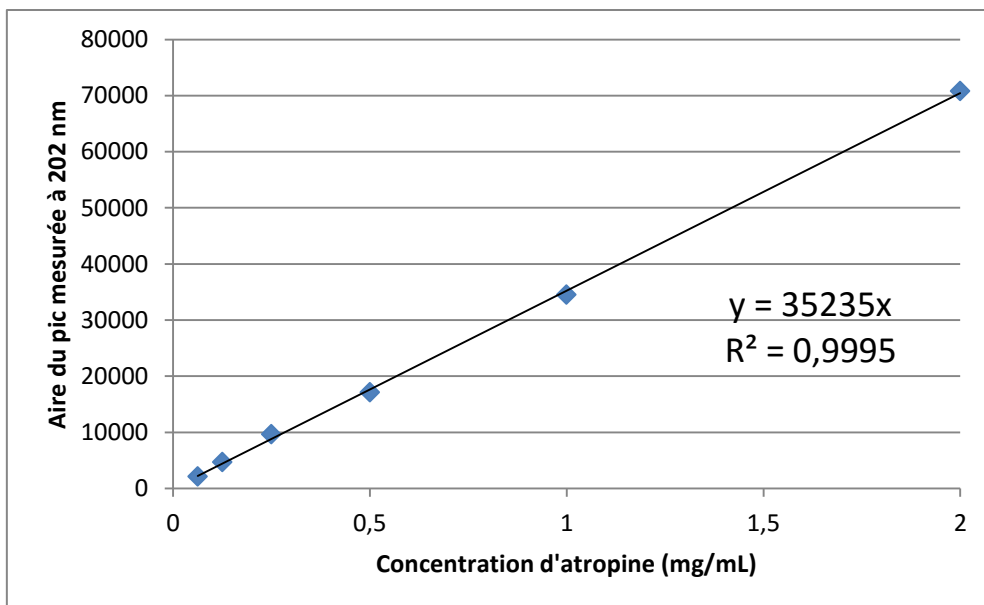


Figure 16 : Gamme étalon d'atropine – Concentration d'atropine en fonction de l'aire à 202nm

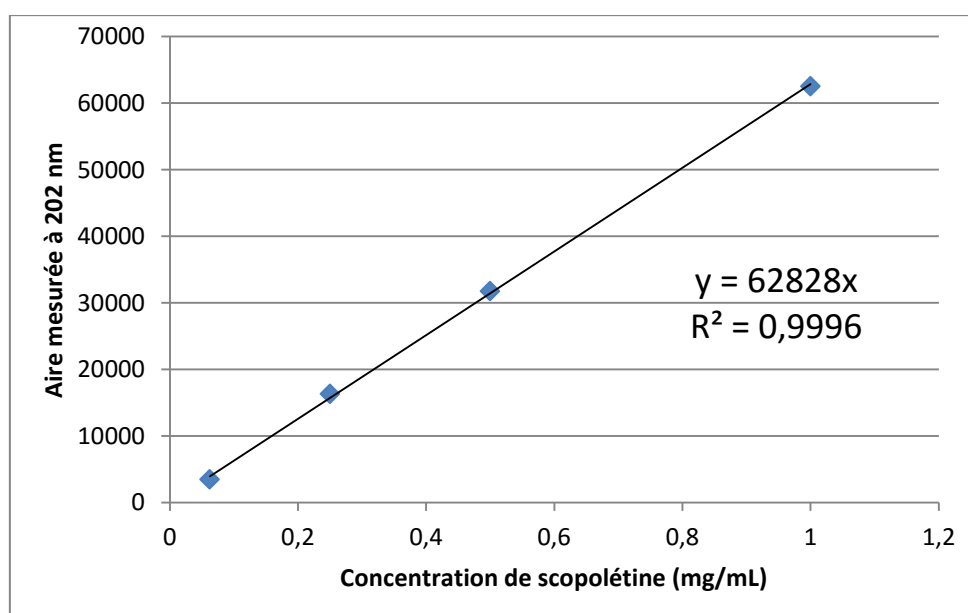


Figure 17 : Gamme étalon de scopolétine – Concentration de scopolétine en fonction de l'aire à 202nm

A partir de ces courbes, nous avons pu calculer les teneurs de ces métabolites pour 100 g de matière fraîche de fruits aux différents stades afin de pouvoir effectuer des comparaisons (Figure 18).

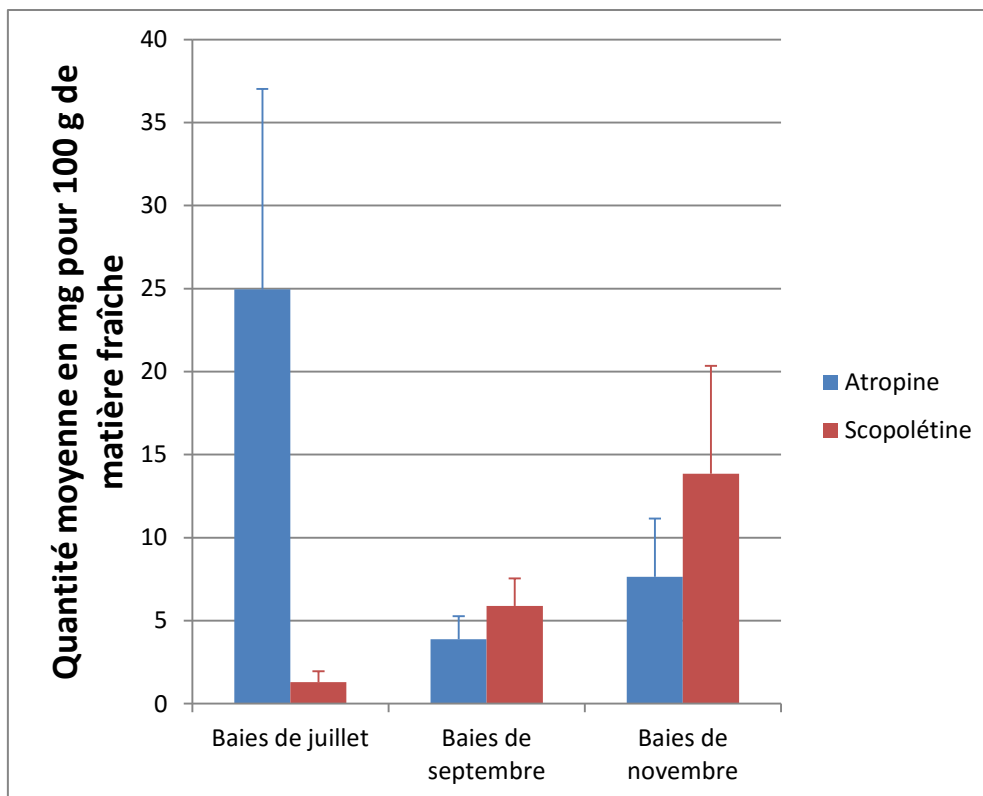


Figure 18 : Quantité moyenne d'atropine et de scopolétine en mg pour 100 g de matière fraîche en fonction du stade de maturité des fruits d'*Atropa belladonna* (Barres d'erreur = Ecart-type)

Le dosage de l'atropine dans les fruits d'*A. belladonna* montrent que les fruits verts contiennent en moyenne 24,50 mg d'atropine pour 100 g de matière fraîche. Cette quantité est bien supérieure à celles contenues dans les fruits mûrs et très mûrs, respectivement 3,88 mg et 7,64 mg en moyenne pour 100 g de matière fraîche. La concentration en atropine dans les fruits est significativement différente pour les trois stades de maturité ($K_{hi^2} = 12,772$; $P = 0,002$).

Le dosage de la scopolétine dans les fruits d'*A. belladonna* montrent que les fruits verts contiennent la plus faible concentration en scopolétine, en moyenne 1,29 mg pour 100 g de matière fraîche. Les fruits mûrs en contiennent en moyenne 5,88 mg de scopolétine pour 100 g de matière fraîche tandis que les fruits très mûrs possèdent la plus forte concentration en scopolétine avec en moyenne 13,84 mg pour 100 g de matière fraîche. La concentration en atropine dans les fruits est significativement différente pour les trois stades de maturité ($K_{hi^2} = 14,363$; $P = 0,001$). Ce dosage permet de mettre en évidence la présence de scopolétine dans les extraits pour les trois stades de maturité. La scopolétine, également appelée scopolétole, de formule brute $C_{10}H_{12}O_4$, est un composé phénolique de la famille des coumarines. Dans la nature, cette molécule est notamment présente chez *Scopolia japonica*, une plante de la famille des Solanacées connue également sous le nom de Belladone japonaise.

2.2. Taux de survie et durée de développement des Drosophiles

2.2.1. Survie des Drosophiles

La survie des Drosophiles est mesurée pour les 40 répétitions en fonction de la souche et du stade de maturité des fruits d'*Atropa belladonna* (Figure 19).

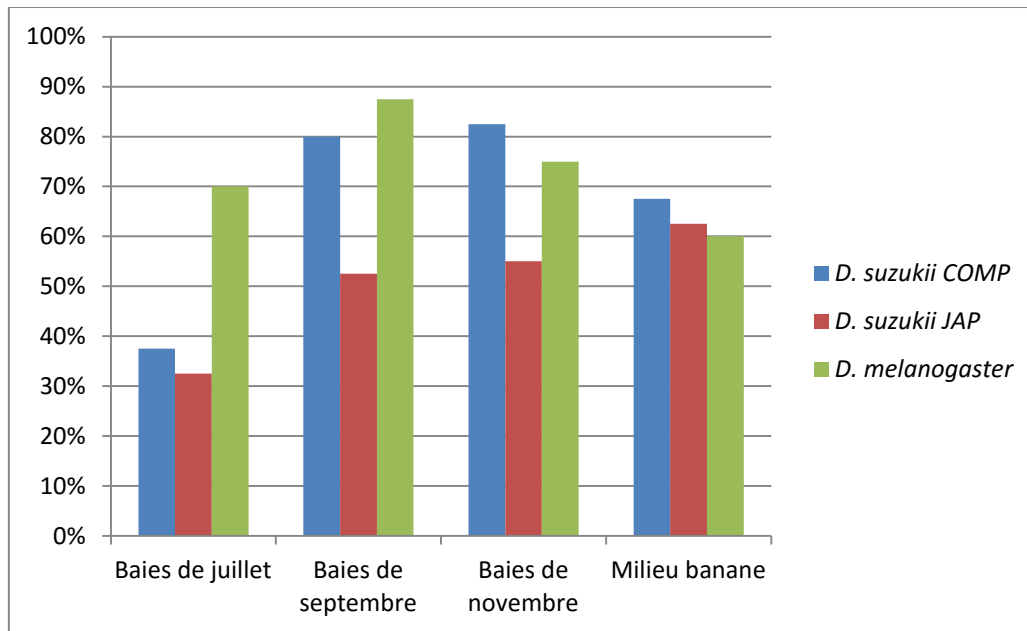


Figure 19 : Taux de survie de *D. sukukii COMP*, *D. sukukii JAP* et *D. melanogaster* en fonction du stade de maturité des fruits d'*Atropa belladonna*

Sur les fruits de juillet, la souche française et la souche japonaise de *D. sukukii* possèdent les taux de survie les plus faibles, respectivement 38 et 33 % de survie sur les 40 individus testés. Pour *Drosophila melanogaster*, 70 % des individus survivent sur les fruits verts de juillet. La survie de *D. melanogaster* est significativement différente de celle de *D. sukukii COMP* ($\text{Khi}^2 = 8,498$; $P = 0,0036$) et *D. sukukii JAP* ($\text{Khi}^2 = 11,257$; $P = 0,0008$). Avec 53% de survie sur les fruits mûrs de septembre, *D. sukukii JAP* survit significativement moins que *D. sukukii COMP* ($\text{Khi}^2 = 6,765$; $P = 0,0093$) et *D. melanogaster* ($\text{Khi}^2 = 11,667$; $P = 0,0006$) qui atteignent quant à elles plus de 80 % de survie. La souche française de *D. sukukii* est celle qui présente le meilleur taux de survie sur les fruits de novembre avec 83% de survie, tandis que la souche japonaise présente un taux de survie de 55%, significativement plus faible ($\text{Khi}^2 = 7,04$; $P = 0,008$) que la souche française. Sur le milieu banane, *D. sukukii COMP*, *D. sukukii JAP* et *D. melanogaster* présentent des taux de survie respectivement de 68, 63 et 60 %. Sur ce milieu, *D. sukukii COMP* survit significativement mieux que *D. sukukii JAP* ($\text{Khi}^2 = 7,04$; $P = 0,008$).

Pour les trois souches de Drosophiles testées, le taux de survie sur les fruits verts de juillet est significativement différent du taux de survie sur les fruits mûrs de septembre et très mûrs de novembre. Sur les fruits verts, *D. melanogaster*, *D. sukukii COMP* et *JAP* survivent

significativement moins que sur les fruits mûrs et très mûrs. Les résultats de ce test statistique sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 6).

Tableau 6 : Comparaisons du taux de survie entre stade de maturité des fruits pour les trois souches de Drosophiles, résultats du test du Khi^2 ($\alpha = 5\%$)

	Comparaison : Juillet / Septembre		Comparaison : Juillet / Novembre	
	Khi^2	P-valeur	Khi^2	P-valeur
<i>D. suzukii</i> COMP	19,791	< 0,0001	17,231	0,0002
<i>D. suzukii</i> JAP	15,18	0,0005	13,584	0,0011
<i>D. melanogaster</i>	23,829	< 0,0001	24,609	< 0,0001

Quelle que soit l'espèce ou la souche de Drosophile, il n'y a aucune différence significative de la survie entre les fruits de septembre et les fruits de novembre.

2.2.2. Durées de développement des Drosophiles

La durée de développement correspond à la période entre la ponte des œufs sur la lame de ponte et l'émergence des Drosophiles. Les durées de développement sont classées en trois classes : émergence à 14 jours et moins, émergence entre 15 et 17 jours et enfin émergence à 18 jours et plus (Figure 20).

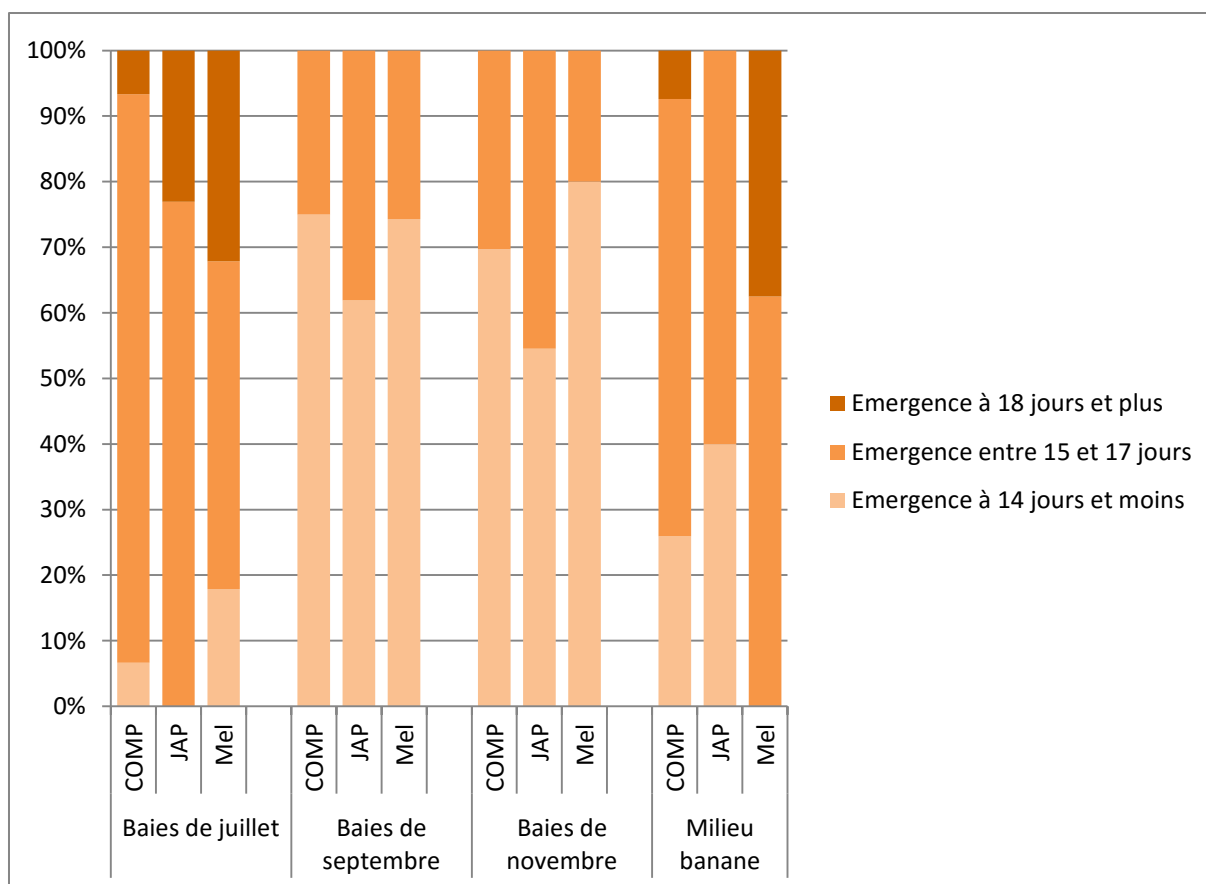


Figure 20 : Durées de développement (à 20°C) de *D. sukukii* COMP, *D. sukukii* JAP et *D. melanogaster* en fonction du stade de maturité des fruits d'*A belladonna* (COMP = *D. sukukii* COMP ; JAP = *D. sukukii* JAP ; Mel = *D. melanogaster*)

Ces résultats nous montrent que la totalité des émergences se produit avant 18 jours pour les fruits mûrs de septembre et très mûrs de novembre et ce quelle que soit la souche de *Drosophila* testée. Le développement sur les fruits verts de juillet est plus long et peut excéder 18 jours. La différence de durée de développement entre *D. sukukii* COMP et *D. sukukii* JAP est à la limite de la significativité pour les fruits de juillet ($Khi^2 = 5,694$; $P = 0,058$). La souche française se développerait plus rapidement que la souche japonaise sur les fruits verts. Pour la souche française *D. sukukii* COMP, les larves se développent significativement plus rapidement sur les fruits de septembre ($Khi^2 = 14,907$; $P = 0,0001$) et sur les fruits de novembre ($Khi^2 = 16,875$; $P < 0,0001$) que sur les fruits de juillet. Concernant la souche japonaise, *D. sukukii* JAP, le développement sur les fruits de septembre serait plus rapide que sur les fruits de juillet, la différence est à la limite de la significativité ($Khi^2 = 3,66$; $P = 0,0557$). Les larves de *D. melanogaster* se développent significativement plus rapidement sur les fruits de novembre que sur les fruits de juillet ($Khi^2 = 4,114$; $P = 0,0425$). Sur le milieu banane, *D. melanogaster* se développe significativement plus lentement que *D. sukukii* COMP ($Khi^2 = 11,591$; $P = 0,003$) et *D. sukukii* JAP ($Khi^2 = 18,988$; $P < 0,0001$).

C. Discussion

Les techniques utilisées pour l'analyse du contenu en métabolites secondaires des fruits d'*Atropa belladonna* nous ont permis d'obtenir des empreintes métaboliques pour les trois stades de maturation et également de quantifier l'alcaloïde majoritairement décrit chez la plante. Il faut noter que ces techniques ne permettent pas de différencier l'atropine et l'hyoscyamine. Le terme « atropine » utilisé dans le mémoire pour décrire nos travaux représente le mélange des deux composés.

La quantification passe par une méthode d'extraction efficace. Dans le cas des alcaloïdes, il est possible de profiter de leur caractère basique pour les extraire de façon ciblée d'un extrait végétal (Bruneton, 2005), ce qui conduit à des extraits moins riches en autres métabolites et donc à des déterminations quantitatives plus aisées. Ce protocole très couramment utilisé présente l'inconvénient de faire intervenir trois étapes et de cibler les alcaloïdes, deux éléments qui étaient limitant dans notre cas. Nous avons envisagé l'extraction par le méthanol qui est un solvant polaire largement utilisé en phytochimie pour la récupération d'une large gamme de métabolites (Bruneton, 2005) après avoir vérifié l'efficacité de ce mode d'extraction des alcaloïdes tropaniques par ce solvant dans la littérature (Waksmundzka-Hajnos, 2010). Compte-tenu de la différence importante de constitution entre les tissus des différents stades de maturité des fruits, un broyage efficace du mélange pulpe et peau a été effectué. Nous avons ensuite réalisé une extraction assistée par ultrasons. Les ultrasons permettent d'accélérer l'extraction et permettent d'obtenir en quelques minutes des rendements nécessitant plusieurs heures par des protocoles conventionnels (Brusotti, 2014).

L'évaluation de la teneur en atropine a été réalisée sur une première série d'extraction pour comparer aux valeurs obtenues au cours d'un travail antérieur réalisé par Fabrice Lamy (2013) lors de la mise en œuvre du protocole d'extraction spécifique (Tableau 7).

Tableau 7 : Concentration moyenne en atropine contenue dans 100 g de matière fraîche (MF) pour le mélange peau-chair et pour les graines des fruits d'*Atropa belladonna* de novembre (Lamy, 2013)

	Peau + Chair	Graines
Concentration en Atropine	11,0 mg / 100 g MF	294,5 mg / 100 g MF

Cette comparaison a permis de valider notre protocole d'extraction. Par ailleurs, pour les fruits de novembre, ces résultats combinés permettent de calculer une teneur totale moyenne en atropine dans les baies d'environ 300 mg/ 100 g MF soit une teneur de 0,3 %. Cette valeur est proche des valeurs décrites dans la littérature qui sont de l'ordre de 0,6 % sans information sur la maturité (Bruneton, 2005 ; Hammiche, *et al.*, 2013).

Au cours de la maturation du fruit, le contenu en éléments chimiques change. Chez certaines Solanacées telles que *Solanum nigrum*, une diminution de la concentration en alcaloïdes peut être observée au cours de la maturation des fruits (Elsadig, *et al.*, 1997). Parmi ces changements, deux nous intéressent particulièrement pour leur effet potentiel sur la capacité d'infestation des Drosophiles. Le premier correspond à l'évolution de la quantité et de la qualité de la nourriture, notamment influencée par le contenu en composés primaires (sucres, acides aminés, etc.). Le deuxième changement important correspond à l'évolution de la toxicité des fruits, c'est-à-dire à l'évolution du contenu en métabolites secondaires dont les alcaloïdes et plus particulièrement l'atropine pour *A. belladonna*. Nos résultats montrent qu'au cours de la maturation des fruits d'*Atropa belladonna*, d'importants écarts sont observés entre les fruits verts collectés en juillet d'une part et les fruits mûrs et très mûrs collectés en septembre et novembre d'autre part. L'analyse approfondie des différents métabolites secondaires présents dans les extraits est actuellement en cours et des expériences complémentaires de LC-MS/MS sont nécessaires pour une identification fiable de ces derniers. Néanmoins, il est possible de constater à ce stade d'analyse, que les pics de temps de rétention 10,87 min et 11,80 min détectés sur les chromatogrammes des fruits de septembre et novembre présentent des masses molaires de 452,2 g/mol et 614,2 g/mol respectivement. Ces masses molaires pourraient correspondre à l'atropine mono et di-glycosylée. Les résultats montrent que la concentration en atropine diminue fortement entre les fruits non mûres et les fruits mûres. Nous observons une baisse de près de 85 % de la teneur moyenne en atropine entre les fruits verts collectés en juillet et les fruits mûrs collectés en septembre.

Par ailleurs, l'augmentation de la concentration moyenne en atropine observée entre les fruits de septembre et les fruits de novembre pourrait s'expliquer par une concentration des composés chimiques du fruit liée à une perte d'eau dans les fruits proches de la sénescence. En effet, en s'intéressant aux masses fraîches obtenues après dissection des fruits, nous pouvons voir qu'il existe des différences importantes entre stades de maturité. Les fruits de novembre ont une masse fraîche moyenne plus faible que les fruits de septembre (Figure 22).

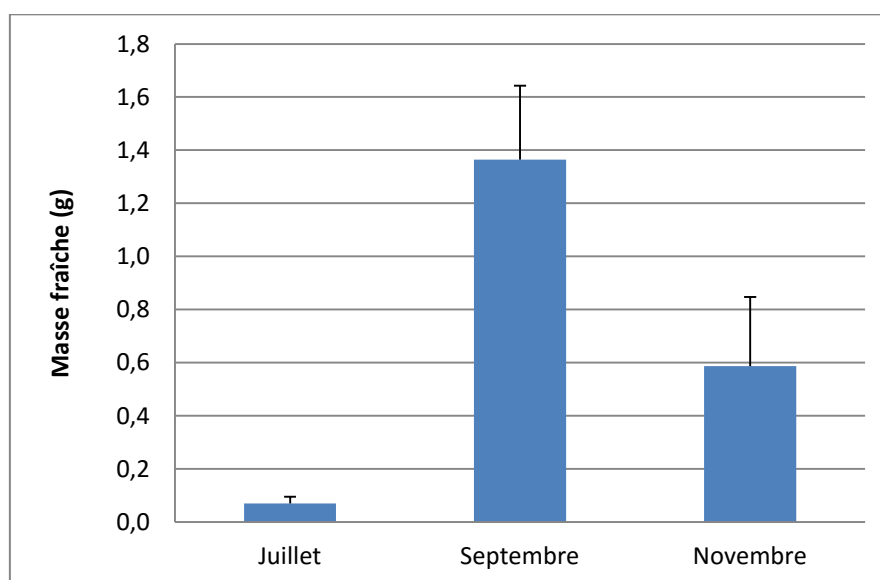


Figure 22 : Masse fraîche moyenne obtenue après dissection des fruits en fonction du stade de maturité (Barres d'erreur = Ecart-type)

L'atropine dans les fruits les rend très toxiques ce qui a pour fonction de protéger les fruits comme peuvent le faire d'autres alcaloïdes (Heldt, 2005). La forte concentration en atropine dans les fruits verts pourrait expliquer la faible survie des larves sur les fruits de juillet et la durée de développement longue. Les effets de la molécule isolée d'atropine sur le développement des larves de *D. suzukii* ont d'ailleurs été mis en évidence au sein du laboratoire BIPE en 2013 par Fabrice Lamy (Figure 23).

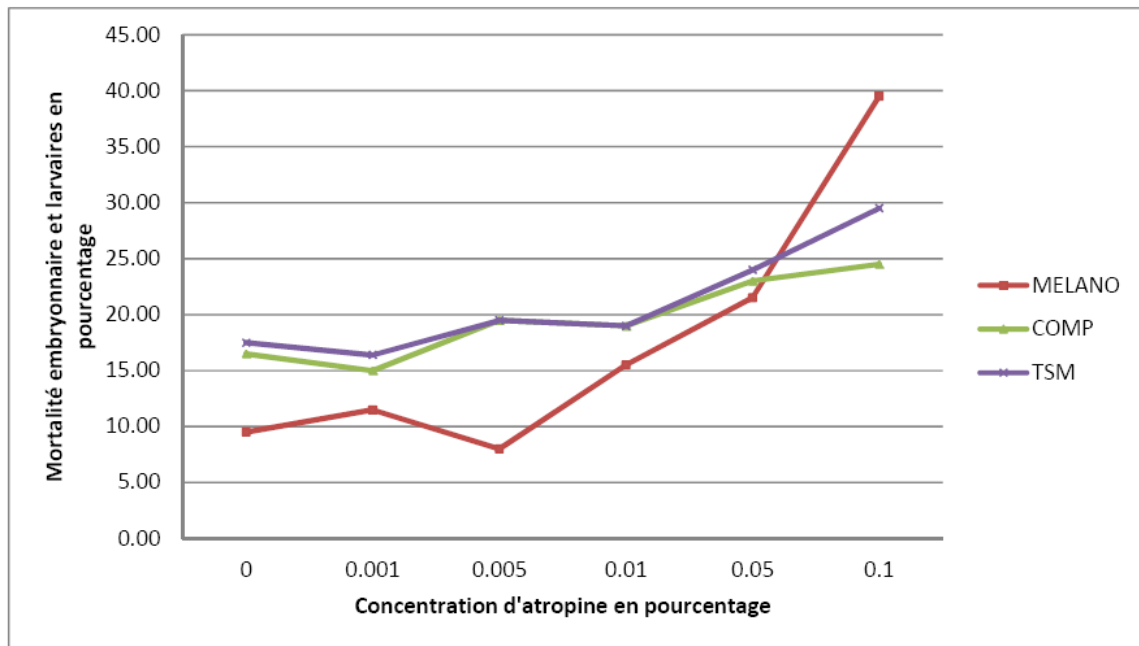


Figure 23 : Pourcentage de mortalité aux stades embryonnaire et larvaire de *D. suzukii* COMP (= COMP), *D. suzukii* JAP (= TSM) et *D. melanogaster* (= MELANO) élevés sur des milieux standard banane contenant différentes concentrations d'atropine en pourcentage massique (Lamy, 2013)

Pour cette expérience, les Drosophiles étaient élevées sur milieu banane implémenté avec une quantité contrôlée d'atropine. Les résultats sont cohérents avec les taux de survie obtenus dans notre étude. Pour des concentrations en atropine inférieures à 0,05 %, la mortalité plus faible de *D. melanogaster* indiquerait qu'elle possède un arsenal enzymatique de détoxification plus efficace que *D. suzukii*, ce qui ne serait pas étonnant de la part d'une espèce généraliste qui doit être apte à coloniser une grande variété de substrats contenant une palette de molécules toxiques diversifiée.

La deuxième molécule dosée dans les fruits d'*Atropa belladonna* est la scopolétine qui tire son nom de la plante chez laquelle elle a été décrite : la Belladone japonaise *Scopolia japonica*. Ce composé phénolique appartenant à la famille des coumarines. La scopolétine est une molécule connue pour assurer une protection contre les agents pathogènes grâce à ses propriétés antifongiques et antioxydantes (Carpinella, *et al.*, 2005 ; Lee, *et al.*, 2013). Après un blessure ou une infestation, il a été montré que la concentration en scopolétine augmente

(Ben-Yehoshua, *et al.*, 2008). Nos résultats montrent que la concentration en scopolétine augmente au cours de la maturation des fruits.

La toxicité des fruits verts les protège des insectes phytophages et des prélèvements trop précoces des zoochores, c'est-à-dire des animaux permettant la dispersion des graines.

Une des questions centrales de l'écologie des invasions s'attache à se demander si les populations d'une espèce dans son aire exotique possèdent des traits d'histoire de vie et des performances plus importantes que celles de son aire d'origine. Ainsi, dans cette étude nous nous sommes posés la question de savoir si la souche française de *D. suzukii* était plus performante que la souche japonaise sur *Atropa belladonna*. Les résultats montrent que sur les baies vertes, la souche française de *D. suzukii* capturée en forêt de Compiègne ne semble pas présenter d'adaptation particulière par rapport à la souche japonaise de *D. suzukii*. Cependant, sur les baies mûres de septembre et très mûres de novembre, un meilleur développement pouvant s'apparenter à une meilleure adaptation de *D. suzukii* COMP par rapport à *D. suzukii* JAP est observé. Au cours des générations, les individus de la souche de Compiègne pourraient avoir été sélectionnés par les filtres environnementaux locaux, ce qui expliquerait ces nouvelles performances et/ou éventuelles adaptations.

Au Japon, les souches locales sont soumises aux prédateurs et parasitoïdes locaux. En Europe, il existe peu d'ennemis naturels pour *D. suzukii* (Chabert *et al.*, 2012). Selon certaines théories de l'invasion biologique (Blossey & Nötzold, 1995), *D. suzukii* pourrait ainsi ne plus être sélectionnée sur ses mécanismes de défense contre ses ennemis. Cette énergie disponible pourrait alors être réinvestie dans d'autres fonctions notamment dans les performances reproductives, l'augmentation des valeurs des traits d'histoire de vie telles que les dimensions des ailes. Compte tenu du manque de bibliographie sur l'utilisation de plantes hôtes sauvages par *D. suzukii*, il est difficile de savoir si la Drosophile peut être en présence de fruits similaires à *A. belladonna* au Japon. Cependant, il apparaît dans la littérature que *Scopolia japonica*, une autre Solanacée présente au Japon, synthétisent des alcaloïdes au niveau des racines parmi lesquels la scopolamine et l'hyoscyamine (Mano, *et al.*, 1986). Toutefois, à ce jour aucune étude n'a montré que *D. suzukii* utilise cette plante comme hôte.

La comparaison des résultats entre la souche française de *D. suzukii* et *D. melanogaster* amène à se poser une autre question chère à l'écologie des invasions : une espèce exotique prend-elle les ressources utilisées par les espèces locales installées depuis de nombreuses générations ? Les résultats montrent que *D. melanogaster* peut consommer des fruits d'*A. belladonna* quel que soit le stade de maturité. En outre, *D. melanogaster* survit et se développe même mieux que la souche *D. suzukii* COMP. Ces observations sont étonnantes car *D. melanogaster* n'a jamais été observée dans la nature sur les fruits non mûres d'*Atropa belladonna*. Ceci confirme que *D. melanogaster* est une espèce très généraliste capable d'utiliser un nombre de substrat très diversifié. Cette espèce de Drosophile est connue pour posséder un arsenal de molécules telles que les cytochromes P450 capables de processus de détoxification (Foglema, 1999). Ceci pourrait expliquer son aptitude à se développer sur les fruits de Belladone en conditions de laboratoire. Cependant, alors que *D. melanogaster* peut consommer les fruits verts d'un point de vue physiologique, cette Drosophile ne peut pas percer la cuticule des fruits car elle ne possède pas l'ovipositeur dentelé propre à *D. suzukii*. Cette hypothèse semble être confirmée par une manipulation préliminaire, non présentée dans ce mémoire, qui a été mise en place au cours du stage pour tester la capacité de *D. melanogaster* à se développer sur des fruits verts d'*Atropa belladonna* fraîchement collectés. Toutefois, au vu de nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en cas de blessures sur

le fruit par exemple causés par des chocs ou des intempéries, *D. melanogaster* pourrait se développer sur les fruits d'*Atropa belladonna*. Comparé à *D. melanogaster*, *D. suzukii* semble un peu moins performante mais peut accéder à l'intérieur du fruit non mature grâce aux particularités de son ovipositeur.

Ainsi, malgré une performance de *D. suzukii* limitée sur fruits verts, l'utilisation d'*Atropa belladonna* comme plante hôte par cette Drosophile lui conférerait un certain nombre d'avantages. Parmi ceux-ci, l'utilisation des fruits de Belladone par *D. suzukii* lui permettrait de bénéficier d'une niche écologique peu utilisée. Un compromis serait alors à trouver entre le risque pour les larves de mourir par intoxication et le bénéfice d'échapper à la compétition.

Concernant nos conditions expérimentales pour les mesures des taux de survie et des durées de développement, il est à noter que pour des raisons techniques (absence de fruits disponibles dans la nature durant la période de stage), les fruits utilisés pour les infestations ont été conservés au congélateur à -80°C après leur récolte en 2013. Par conséquent, la décongélation a pu abîmer les fruits et influencer par la suite la survie et le développement des larves de Drosophiles. Sur milieu « Banane », nos résultats ont montré que la durée de développement de *D. melanogaster* était significativement plus longue que les deux souches de *D. suzukii*. Nous avons également montré que *D. melanogaster* survit significativement moins bien que la souche française de *D. suzukii* sur le milieu « Banane ». Toutefois, ces résultats sont à nuancer compte-tenu des conditions d'élevage de *D. melanogaster* en laboratoire. En effet, les deux souches de *D. suzukii* sont élevées sur milieu « Banane », le même milieu utilisé pour nos expériences d'infestations contrôlées tandis que *D. melanogaster* est élevée sur un autre milieu, le milieu « Fermenté ». Le changement de milieu lors des expériences d'infestations contrôlées a pu influencer la survie et le développement de *D. melanogaster*. En outre, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'élevage des souches de *D. suzukii* sur milieu « Banane » depuis plusieurs années a conduit à la sélection des individus se développant le mieux sur ce milieu.

Plusieurs ennemis naturels de *D. suzukii* ont pu être identifiés sur son aire de répartition naturelle. En particulier l'hyménoptère *Ganaspis xanthopoda* qui semble être une espèce spécialiste de *D. suzukii* et montre de bons taux de parasitisme sur les larves en développement dans les fruits en maturation (Cini, *et al.*, 2012). Toutefois, son efficacité est remise en question suite à la mise en évidence par certains auteurs d'un phénomène de coévolution entre *G. xanthopoda* et *D. suzukii* en Asie (Kacsoh & Schlenke, 2012 ; Kasuya, 2013). D'autres hyménoptères seraient capables de se développer sur les larves tels que *Leptopilina japonica*, *Asobara tabida* et *Asobara japonica*. Cependant, ces parasitoïdes ne sont pas spécialistes de *D. suzukii* et peuvent se développer uniquement sur les larves dans les fruits en décomposition ou tombés au sol (Mitsui, *et al.*, 2007 ; Ideo, *et al.*, 2008 ; Mitsui & Kamura, 2010 ; Novković, *et al.*, 2011 ; Kasuya, *et al.*, 2013). Deux parasitoïdes de pupes sont identifiés comme ennemis naturels de *D. suzukii* au Japon : *Trichopria cf drosophilae* et *Pachycrepoideus vindemmiae* (Cini, *et al.*, 2012 ; Rossi Staccioni, *et al.*, 2013). En France, des recensements dans la vallée du Rhône ont pu mettre en évidence la présence des parasitoïdes *Asobara tabida*, *Leptopilina boulardi* et *Leptopilina heterotoma* ainsi que deux parasitoïdes de pupes, *Pachycrepoideus vindemmiae* et *Trichopria cf drosophilae* (Fleury, *et al.*, 2009). Une étude réalisée en 2012 par Chabert et collaborateurs semble montrer que seuls les parasitoïdes pupaux français peuvent se développer avec succès sur *D. suzukii*.

En Europe, *D. suzukii* bénéficie donc d'une réduction de la pression des parasitoïdes qui régulaient ses populations dans son aire d'origine et profite alors d'un avantage pour sa naturalisation et son expansion (Parker, *et al.*, 2013 ; Poyet, *et al.*, 2014). En outre, des études préliminaires réalisées au sein du laboratoire semblent montrer que la consommation par les larves de *Drosophila* d'un milieu complétement en atropine leur conférerait une meilleure résistance aux parasitoïdes (Poyet, 2014). Ainsi, l'utilisation des baies vertes d'*Atropa belladonna* par *D. suzukii* pourrait également lui conférer l'avantage d'une meilleure résistance à ses ennemis naturels.

Conclusion et perspectives

Drosophila suzukii est une préoccupation majeure pour la filière fruitière dans les zones où elle a été accidentellement introduite. Depuis son arrivée en Europe en 2008 et en France en 2009, son expansion est rapide. Ceci s'explique notamment par la grande polyphagie de *D. suzukii* ainsi que par sa forte fécondité, la faible pression de ses prédateurs dans les zones d'invasion et sa capacité à se développer sur des fruits en cours de maturation. Cependant, la biologie de *D. suzukii* reste peu connue. La gamme d'hôtes sauvages lui permettant de se maintenir en absence de cultures est peu étudiée. Toutefois, des travaux réalisés au sein du laboratoire BIPE ont mis en évidence l'utilisation des fruits d'*Atropa belladonna* par *D. suzukii*.

Les résultats présentés dans ce mémoire mettent en évidence les changements biochimiques des fruits d'*Atropa belladonna* au cours du processus de maturation. Les teneurs en sucres réducteurs, glucose et fructose, augmentent jusqu'à l'optimum de maturité des fruits puis diminuent lorsque le fruit approche de la sénescence. Les fruits en fin de maturation contiennent une plus forte concentration en acides aminés. Concernant les métabolites secondaires, les fruits verts contiennent la plus forte concentration en atropine avec 0,025 % en moyenne. Les fruits mûrs contiennent une concentration en atropine beaucoup plus faible. Les résultats ont également montré l'augmentation de la teneur en scopolétine dans les fruits au cours de la maturation. Les résultats des chromatogrammes obtenus par LC-MS feront l'objet d'analyses plus approfondies. Ces analyses permettront de déterminer l'ensemble des molécules présentes dans les fruits d'*A. belladonna* en fonction de leur stade de maturité.

Cette étude montre que le stade de maturité des fruits d'*Atropa belladonna* a une influence sur la survie et la durée de développement des souches française et japonaise de *Drosophila suzukii* et de *D. melanogaster*. La souche française de *Drosophila suzukii* capturée en forêt de Compiègne présente de meilleurs taux de survie et des durées de développement plus courtes que la souche japonaise. Cette meilleure performance pourrait mettre en évidence une éventuelle adaptation de la souche envahissante lui permettant de mieux se développer sur les fruits toxiques de Belladone. Nos résultats mettent en évidence la capacité de *D. melanogaster* à se développer sur les fruits d'*A. belladonna*, dont les fruits verts. Cette observation surprenante montre que *D. melanogaster* semble posséder les ressources physiologiques nécessaires pour se développer sur les fruits verts riches en atropine. Cependant, *D. melanogaster* ne possède pas les caractéristiques morphologiques suffisantes pour lui permettre d'infester des fruits sains.

Drosophila suzukii est donc capable de se développer sur les fruits toxiques d'*Atropa belladonna*, une niche écologique peu utilisée jusqu'ici, ce qui lui conférerait un avantage par rapport aux autres espèces de Drosophiles. Toutefois, certains points restent à étudier. En effet, le devenir de l'atropine chez *Drosophila suzukii* après l'ingestion reste inconnu, de même que les raisons pour lesquelles l'atropine n'est pas toxique pour cette Drosophile. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existerait des mécanismes de détoxification de l'atropine chez *D. suzukii* ou encore, des mécanismes de séquestration de l'atropine. Enfin, il serait intéressant de mesurer les conséquences de l'utilisation par *D. suzukii* de telles plantes hôtes sur le troisième niveau trophique.

Au plan fondamental, ce travail permet d'illustrer de nouveaux exemples de mécanismes et facteurs qui peuvent conditionner le succès d'une invasion biologique. Au plan appliqué, les perspectives qui découlent de cette étude pourraient apporter des éléments de réponse aux questions relatives à la gestion de ce nouveau ravageur des cultures.

Bibliographie

- Abe F., *et al.* (2001). Sequestration of phenanthroindolizidine alkaloids by an sclepiadaceae-feeding danaid butterfly, *Ideopsis similis*. *Phytochemistry*, 56(7), pp. 697-701.
- Allendorf F. W., Lundquist L. L. (2003). Introduction: Population Biology, Evolution and Control of Invasive Species. *Conservation Biology*, 17(1), pp. 24–30.
- Amin ud Din M., Mazhar K., Haque S., Ahmed M. (2005). A preliminary report on *Drosophila* fauna of Islamabad (Capital, Pakistan). *Drosophila Information Service*, 88, pp. 6-7.
- Aniszewski T. (2007). Alkaloids - Secrets of Life. Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. 1st éd., Elsevier Science, Amsterdam, 334 p
- Ashtiania F. & Sefidkonb F. (2011). Tropane alkaloids of *Atropa belladonna* L. and *Atropa acuminata* Royle ex Miners plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(29), pp. 6515-6522.
- Baroffio C. & Fisher S. (2011). New threat to orchards and berry plants: the cherry fruit fly. *UFA-Revue*, 11, pp. 46-47.
- Beers E. H., *et al.* (2011). Developing *Drosophila suzukii* management programs for sweet cherry in the Western US. *Pest Management Science*, 67, pp. 1386-1395.
- Ben-Yehoshua S., *et al.* (2008). Involvement of limonene hydroperoxides formed after oil gland injury in the induction of defense response against *Penicillium digitatum* in lemon fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 1889-1895.
- Berthelot M. (1859). Répertoire de chimie pure appliquée. 1, Société Chimique de Paris, 254 p.
- Blossey B. & Nötzold R. (1995). Evolution of increased competitive ability in invasive non indigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology*, 83, pp.887-889.
- Bolda M. P., *et al.* (2010). Spotted Wing *Drosophila*: Potential economic impact of a newly established pest. Update, University of California. *Giannini Foundation*, 13(3), pp. 5-8.
- Bruck D. J., *et al.* (2011). Laboratory and field comparisons of insecticides to reduce infestation of *Drosophila suzukii* in berry crops : Spotted Wing *Drosophila*. *Pest management science*, 67(11), pp. 1375-1385.
- Bruneton J. (2005). Plantes toxiques – Végétaux dangereux pour l’Homme et les animaux. 3 éd., Editions médicales internationales, Paris, 632 p.

- Brusotti G., *et al.* (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, pp.218-228.
- Calabria G. ,*et al.* (2012). First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. *Journal of Applied Entomology*, 136, pp. 139-147.
- Carlton J. T. & Geller J. B. (1993). Ecological roulette: the global transport of non-indigenous marine organisms. *Science*, 261(5117), p. 78–82.
- Carpinella M. C., Ferrayoli C. G. & Palacios S. M. (2005). Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 2922-2927.
- Chabert S., *et al.* (2012). Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. *Biological Control*, 63, p. 40–47.
- Christen P. (2000). Tropane alkaloids: old drugs used in modern medicine. *Studies in Natural Products Chemistry*, 22, pp. 717-749.
- Chung Y. J. (1955). Collection of wild *Drosophila* on Quelpart Island, Korea. *Drosophila Information Service*, 29, p. 111.
- Cini A., Ioriatti C., Anfora G. (2012). A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *Bulletin of Insectology*, 65(1), pp. 149-160.
- Elsadig A. E., Alia S., Roddick A. A. & Roddick J. G. (1997). Changes in the steroidal alkaloid solasodine during development of *Solanum nigrum* and *Solanum incanum*. *Phytochemistry*, 46, pp. 489-494.
- Fattorusso E. & Taglialatela-Scafati O. (2008). Modern Alkaloids - Structure, Isolation, Synthesis and Biology. Wiley-VCH, Weinheim, 689 p
- Ffrench-Constant R. H. & Roush R. T. (1991). Gene mapping and cross-resistance in cyclodiene insecticide-resistant *Drosophila melanogaster* (Mg.). *Genetical Research*, 57, pp. 17-21.
- Fleury F., *et al.*(2009). Ecology and life history evolution of frugivorous *Drosophila* parasitoids. *Advances in parasitology*, 70(9), pp. 3-44.
- Foglema J.C. (1999). Response of *Drosophila melanogaster* to selection for P450-mediated resistance to isoquinoline alkaloids. *Chemico-Biological Interactions*, 125, pp.93-105.
- Franco A. M. (2013). *Drosophila suzukii* chegou a Portugal com ataque à framboesa. Sanidae. Pequenos Frutos.
- Georgiev V., *et al.* (2013). Plant in vitro systems as sources of tropane alkaloids. In: Natural Products – Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolic and Terpenes, Springer, Berlin, pp.173-211.

- Goodhue R. E., *et al.* (2011). Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and raspberries: economic analysis of potential revenue losses and control costs. *Pest Management Science*, 67, pp. 1396-1402.
- Goullé J., *et al.* (2004). Botanique, chimie et toxicology des solanacées hallucinogens : Belladone, datura, jusquiame, mandragore. *Annales de Toxicologie Analytique*, 16, n° 1, pp. 22-35.
- Grassi A., *et al.* (2012). *Drosophila (Sophophora) suzukii* (Matsumura), new pest of soft fruits in Trentino (North-Italy) and in Europe. *IOBC/wprs Bulletin*, 70, pp. 121-128.
- Haack R. A., Herard F., Sun J., Turgeon J. J. (2010). Managing Invasive Populations of Asian Longhorned Beetle and Citrus Longhorned Beetle: A Worldwide Perspective. *Annual Review of Entomology*, 55, pp. 521-546.
- Hammiche V., *et al.* (2013). Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Springer-Verlag France, Paris, 409 p.
- Hartmann T., *et al.* (2005). Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(5), pp. 391-411.
- Hartmann T., *et al.* (1999). Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adults and larvae of chrysomelid leaf beetles. *Journal of Insect Physiology*, 45(12), pp. 1085-1095.
- Hauser M. (2011). A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in the continental United states, with remarks on their identification. *Pest Management Science*, 67, pp. 1352-1357.
- Haviland D. R. & Beers E. H. (2012). Chemical control programs for *Drosophila suzukii* that comply with international limitations on pesticide residues of exported sweet cherries. *Journal of Integrated Pest Management*, 3(2), pp. 1-6.
- Heldt H. W. (2005). Plant Biochemistry. 3 éd., Elsevier science, Amsterdam.
- Ideo S., *et al.* (2008). Host range of *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoids of drosophilid flies. *Entomological Science*, 11(1), pp. 1-6.
- Kacsoh B. Z. & Schlenke T. A. (2012). High hemocyte load is associated with increased resistance against parasitoids in *Drosophila suzukii*, a relative of *D. melanogaster*. *PLoS ONE*, Volume 7 (4): e34721.
- Kang Y. S. & Moon K. W. (1968). Drosophilid fauna of six regions near the demilitarized zone in Korea. *Korean Journal of Zoology*, 11, pp. 65-68.
- Kanzawa T. (1936). Studies on *Drosophila suzukii* Mats. *Review of Applied Entomology*, 24, p. 315.

- Kanzawa T. (1939). Studies on *Drosophila suzukii* Mats. *Review of Applied Entomology*, 29, p. 622.
- Kasuya N., *et al.* (2013). Ecological, morphological and molecular studies on *Ganaspis* individuals (Hymenoptera: Figitidae) attacking *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Applied Entomology and Zoology*, 48(1), pp. 87-92.
- Kiss B., *et al.*, 2013. First record of spotted wing drosophila [*Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931)] in Hungary. *Növényvédelem*, 49(3), pp. 97-99.
- Kopp A. & True J. R. (2002). Phylogeny of the oriental *Drosophila melanogaster* species group: A multilocus reconstruction. *Systematic biology*, 51(5), pp. 786-805.
- Lamy F. (2013). L'atropine présente dans les baies sauvages d'*Atropa belladonna* : stress ou avantage pour *Drosophila suzukii* (Diptera : Drosophilidae) ? Mémoire Master Sciences - Technologie - Santé, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, 41 p.
- Lee J. C., *et al.* (2011). The susceptibility of small fruits and cherries to the spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii* : Spotted Wing Drosophila. *Pest management science*, 67(11), pp.1358-1367.
- Lee J. C., *et al.* (2012). Evaluation of Monitoring Traps for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in North America. *Journal of Economic Entomology*, 105(4), pp. 1350-1357.
- Lee S., *et al.* (2013). Scopoletin and scopolin isolated from *Artemisia iwayomogi* suppress differentiation of osteoclastic macrophage RAW 264.7 cells by scavenging reactive oxygen species. *Journal of Natural Products*, 76, pp. 615-620.
- Lethmayer C. (2011). Gefährliche Fliegen für Äpfel & Co. *Besseres Obst*, 12, pp. 4-5.
- Lin F. J., Tseng H. C. & Lee W. Y. (1977). A catalogue of the family Drosophilidae in Taiwan (Diptera). *Quarterly Journal of Taiwan Museum*, 30, pp. 345-372.
- Luckner M. (1972). Secondary Metabolism in Plants and Animals. Chapman and Hall, London, 404 p.
- Mack R. N., *et al.* (2000). Biotic invasions: Causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecological Applications*, 10(3), pp. 689-710.
- Mallet J. (1989). The evolution of insecticide resistance: Have the insects won? *Trends in Ecology & Evolution*, 4(11), pp. 336-340.
- Mano Y., *et al.* (1986). Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(11), pp. 2715-2722.
- Markow T. A. & O'Grady P. M. (2006). *Drosophila: A Guide to Species Identification and Use*. Academic Press, London, 247 p
- Matsumura S. (1931). *6000 illustrated insects of Japan-empire*. Tokyo: Tokohshoin.

- McKinney M. & Lockwood J. (1999). Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends in Ecology and Evolution*, 14, pp. 450-453.
- Milek T. E. X. (2008). First record of *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) in Croatia. *Glasiło Biljne Zaštite*, 11(5), pp. 377-382.
- Mitsui H., Beppu K. & Kimura M. T. (2010). Seasonal life cycles and resource uses of flower- and fruit-feeding drosophilid flies (Diptera: Drosophilidae) in central Japan. *Entomological Science*, 13, pp. 60-67.
- Mitsui H., Van Achterberg K., Nordlander G. & Kimura M. T. (2007). Geographical distributions and host associations of larval parasitoids of frugivorous Drosophilidae in Japan. *Journal of Natural History*, 41, pp.1731-1738.
- Mitsui H., Takahashi H. K. & Kimura M. T. (2006). Spatial distributions and clutch sizes of *Drosophila* species ovipositing on cherry fruits of different stages. *Population Ecology*, 48, pp.233-237.
- Mortelmans J., Casteels H. & Beliën T. (2012). *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): a pest species new to Belgium. *Belgian Journal of Zoology*, 142(2), pp. 143-146.
- Narberhaus I., Zintgraf V. & Dobler S. (2005). Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels – evidence for toxic and deterrent effects on phytophages and predators. *Chemoecology*, 15, p. 121–125.
- Nomano F. Y., Mitsui H. & Kimura M. T. (2014). Capacity of Japanese *Asobara* species (Hymenoptera; Braconidae) to parasitize a fruit pest *Drosophila suzukii* (Diptera; Drosophilidae). *Journal of Applied Entomology*, 139, pp. 105-113.
- Novković B., *et al.* (2011). Taxonomy and phylogeny of *Leptopilina* species (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) attacking frugivorous drosophilid flies in Japan, with description of three new species. *Entomological Science*, 14(3), pp. 333-346.
- Okada T. (1976). New distribution records of the Drosophilids in the oriental region. *Makunagi*, 8, pp. 1-8.
- Olson L. J. (2006). The economics of terrestrial invasive species: a review of the literature. *Agricultural and Resource Economics Review*, 35(1), pp. 178–194.
- Parker I. M. & Gilbert G. S. (2007). Do invasive species perform better in their new ranges? *Ecology*, 94(5), pp. 985-994.
- Parshad R. & Duggal K. K. (1965). Drosophilidae of Kashmir, India. *Drosophila Information Service*, pp. 40-44.
- Parshad R. & Paika I. J. (1965). Drosophilid survey of India II. Taxonomy and cytology of the subgenus *Sophophora* (*Drosophila*). *Research Bulletin of the Panjab University*, 15, pp. 225-252.

- Peng F. T. (1937). On some species of *Drosophila* from China. *Annotationes Zoologicae Japonenses*, 16, pp. 20-27.
- Pimentel D., Zuniga R., Morrison D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*, 52, pp. 273– 288.
- Powell J. R. (1997). *Progress and prospects in evolutionary biology: The Drosophila model*. Oxford University Press, New-York, 562 p
- Poyet M., Havars S., Prévost G., Chabrierie O., Doury G., Gibert P., Eslin P. (2013). Resistance of *Drosophila suzukii* to the larval parasitoids *Leptopilina heterotoma* and *Asobara japonica* is related to haemocyte load. *Physiological Entomology*, 38(1), pp. 45-53.
- Poyet M., Eslin P., Héraude M., Le Roux V., Prévost G., Gibert P., Chabrierie O. (2014). Invasive host for invasive pest; When the invasive Asiatic cherry fly (*D. suzukii*) meets the invasive American black cherry (*P. serotina*) in Europe. *Agricultural and Forest Entomology*. In press DOI: 10.1111/afe.12052.
- Poyet M. (2014). L'opportunité de niche favorise l'invasion de *Drosophila suzukii* en France. Doctorat Biologie Evolutive – Biologie des Populations – Ecophysiologie, Université Claude Bernard - LYON 1, Villeurbanne, 257 p.
- Raspi A., *et al.*(2011). Insects of the protected areas of the town of San Giuliano Terme (Insetti della aree protette del commune di San Giuliano Terme). Felici Editore: San Giuliano Terme, Pisa, Italy.
- Rita P. & Animesh D.K. (2011). An updated overview on *Atropa belladonna* L. *International Research Journal of Pharmacy*, 2(11), pp. 11-17.
- Roberts M. F. & Wink M. (1998). Alkaloids – Biochemistry, Ecological Functions and Medical Applications. Plenum Press, New-York, 482 p
- Roderick G. K. & Vernon P. (2009). Biological invasions. In: *Encyclopedia of Islands*. Gillespie R. G., Clague D. eds., University of California Press, Berkeley, pp. 475-480.
- Rodriguez C. F., Bécares E., Fernandez-Alaez M., Fernandez-Alaez, C. (2005). Loss of diversity and degradation of wetlands as a result of introducing exotic crayfish. *Biological Invasions*, 7, pp. 75–85.
- Rosen H. (1957). A modified ninhydrine colorimetric analysis for amino acids. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 67(1), pp. 1-266.
- Rossi Stacconi M. V., *et al.* (2013). First field records of *Pachycrepoides vindemiae* as a parasitoid of *Drosophila suzukii* in European and Oregon small fruits production areas. *Entomologia*, 1(1), pp. 11-16.
- Rouy G., *et al.* (1908). Flore de France tome X. Société des sciences naturelles de la Charente-Inférieure, Paris.

- Sasaki M. & Sato R. (1995). Bionomics of the cherry drosophila, *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae) in Fukushima prefecture (Japan). *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan*, 43, pp. 164-172.
- Sax A. K. & Gaines S. D. (2003). Species diversity: from global decreases to local increases. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(11), pp. 561-566.
- Sax D. F., *et al* (2007). Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(9), pp. 465-471.
- Schwaroch V. (2002). Phylogeny of a paradigm lineage: the *Drosophila melanogaster* species group (Diptera: Drosophilidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 76, pp. 21-37.
- Seljak G. (2011). Spotted wing drosophila – *Drosophila suzukii* (Matsumura). (Plodova vinska musica – *Drosophila suzukii* (Matsumura).) SAD, Revija za Sadjarstvo, Vinogradnistvo in Vinarstvo, 22(3), pp. 3.
- Sidorenko V. S. (1992). New and unrecorded species of Drosophilidae from Soviet Far East (Diptera, Brachycera). *Spixiana*, 15, pp.93-95.
- Sousa R., Morais P., Dias E., Antunes C. (2011). Biological invasions and ecosystem functioning: time to merge. *Biological Invasions*, 13, p. 1055–1058.
- Swoboda-Bhattarai K. & Burrack H. J. (2014). Influence of edible fruit coating on *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) oviposition and development. *International Journal of Pest Management*, 60, No. 4, pp. 279-286.
- Toda M. J. (1991). Drosophilidae (Diptera) in Myanmar (Burma) VII. The *Drosophila melanogaster* species-group, excepting the *D. montium* species-subgroup. *Oriental Insects*, 25, pp.69-94.
- Van Der Linde K., Houle D., Spicer G. S., Stepan S. J. (2010). A supermatrix-based molecular phylogeny of the family Drosophilidae. *Genetics Research*, 92(1), pp. 25-38.
- Walsh D., *et al.* (2011). *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. *Journal of Integrated Pest Management*, 1, pp. 1-7.
- Waksmundzka-Hajnos M. & Sherma J. (2010). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. CRC Press, 998 p
- Williamson M. H., Brown K. C. (1986). The Analysis and Modelling of British Invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 314(1167), pp. 505-522.
- Williamson M. & Fitter A. (1996). The varying success of invaders. *Ecology*, 77, pp. 1661-1666.

- Wink M. (1988). Plant-breeding - importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*, 75, pp. 225-233.
- Wink M. (1992). The Role of quinolizidine alkaloids in plant insect interactions. *Insect-Plant Interactions*, 4, pp. 133-169.
- Wink M. (1993). Allelochemical properties and the raison d'être of alkaloids. *Alkaloids: Chemistry and Biology*, 43, pp. 1-118.
- Wink M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, pp. 3-19.
- Wink M. & Mohamed G. (2003). Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: Mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the rbcL gene. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, p. 897–917.
- Woltz J. M., *et al.* (2014). Efficacy of commercially available predators, nematodes and fungal entomopathogens for augmentative control of *Drosophila suzukii*. *Journal of Applied Entomology*, pp. 1-12.

AGROCAMPUS
OUEST

CFR Angers

CFR Rennes



Année universitaire : 2014 - 2015

Spécialité :

Horticulture

Spécialisation (et option éventuelle) :

Gestion Durable du Végétal en horticulture
et aménagements paysagers

Mémoire de Fin d'Études

d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques,
agroalimentaires, horticoles et du paysage

de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques,
agroalimentaires, horticoles et du paysage

d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Atropa belladonna, une nouvelle plante hôte sauvage pour la mouche invasive *Drosophila suzukii*

Par : Agathe Roussel

ANNEXES

Soutenu à Angers, le 16 septembre 2015

Devant le jury composé de :

Président : Patrice CANNAVO

Autres membres du jury (Nom, Qualité)

Maître de stage : Sylvie BALTORA-ROSSET

Enseignant référent : Josiane LECORFF

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

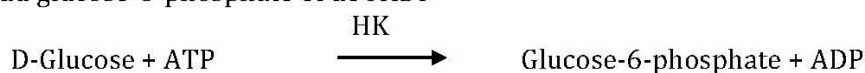
Dosages en microplaques
Kit Saccharose/D-Glucose/D-Fructose (R-Biopharm)

1/ Principes réactionnels :

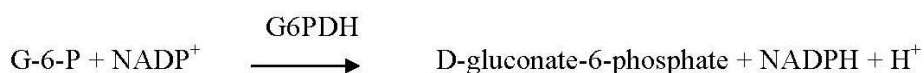
1.1/ Dosage du glucose (idem pour le glucose issu de l'hydrolyse de l'amidon)

Les réactions enzymatiques impliquées dans le dosage par le **kit Saccharose/D-Glucose/D-Fructose (R-Biopharm)** sont les suivantes :

A pH = 7,6, l'hexokinase (HK) catalyse la phosphorylation du D-glucose par l'ATP pour former du glucose-6-phosphate et de l'ADP



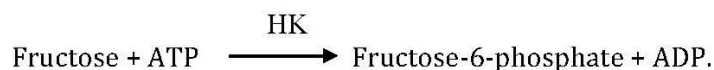
En présence de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), le glucose-6-phosphate formé est spécifiquement oxydé par le NADP en D-gluconate-6-phosphate en formant du NADPH.



La quantité de NADPH formé est directement proportionnelle à la quantité de D-glucose initialement présent dans l'extrait mesuré à 365 nm.

1.2/ Dosage du fructose

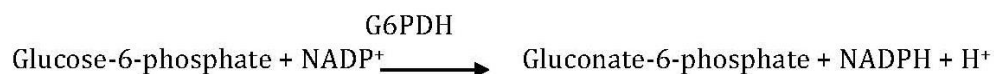
Comme pour le glucose, l'hexokinase catalyse la phosphorylation du fructose par l'adénosine-5'-triphosphate pour donner de l'adénosine-5'-diphosphate (ADP), du glucose-6-phosphate et du fructose-6-phosphate.



Ensuite, la phosphoglucose isomérase (PGI) permet la transformation du fructose-6-phosphate en glucose-6-phosphate :



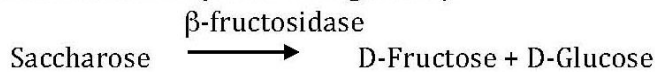
Par l'intermédiaire de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), le glucose-6-phosphate est oxydé en présence de nicotinamide adénine dinucléotide (NADP⁺) en gluconate-6-phosphate avec formation de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH).



La concentration en fructose correspond à la concentration en glucose issue de l'action combinée de l'hexokinase et de la PGI, à laquelle est retranchée la concentration en glucose initialement présent dans l'extrait.

1.3/ Principe pour le dosage du saccharose

Le saccharose peut être dosé après l'action d'une invertase (β -fructosidase) qui libère les sucres réducteurs (fructose et glucose).



2/ Détermination des teneurs en glucose, fructose et saccharose

Le protocole a été mis au point de manière à ce que les hydrolyses soient totales.

ATTENTION : les enzymes utilisés doivent être conservés à 4°C ou dans un bac de glace pendant toute la manipulation.

Teneur en glucose : Dans le cas du glucose, la mesure de l'absorbance à 340 nm donne directement la concentration en glucose initial de l'échantillon en se référant à la gamme étalon de glucose.

Teneur en fructose: La teneur en fructose de votre échantillon est calculée en retranchant l'absorbance à 340nm obtenue pour le glucose initial à l'absorbance à 340nm obtenue après action de la PGI. Cette nouvelle absorbance correspond à celle du fructose.

Teneur en saccharose : Pour cette détermination, on se réfère à la gamme étalon de glucose issu de l'hydrolyse du saccharose.

ATTENTION: la mesure de l'absorbance à 340nm après action de l'invertase et de la HK+G6PDH donne la concentration en glucose total, c'est-à-dire glucose initialement présent dans l'échantillon + celui issu de l'hydrolyse du saccharose. Après avoir calculer la [glucose issu de l'hydrolyse du saccharose], il faut donc retrancher la [glucose initial] pour avoir la [saccharose] réelle dans l'échantillon.

2.1/ Dosage du glucose

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 μ L	PE éch 1										
B	1 μ L	PE éch 1										
C	2 μ L	PE éch 1										
D	3 μ L											
E	4 μ L											
F	5 μ L											
G	7.5 μ L											
H	10 μ L											

- 1- Dans la colonne 1, faire la gamme étalon de glucose à 0,5g/L.
- 2- Dans les autres colonnes, mettre la prise d'essai de vos échantillons (entre 10 et 140µL).
- 3- Compléter à 140µL en eau distillée.
- 4- Ajouter 60µL de NADP-ATP.
- 5- Agiter 10 min à 30°C.
- 6- Faire une lecture DO1 à 340nm.
- 7- Ajouter 10µL d'HK-G6PDH diluée au 1/10^{ème} en eau stérile dans chaque puits.
- 8- Agiter 10 min.
- 9- Faire une lecture DO2 à 340nm

Calcul DO_{glucose} = DO2-DO1

2.2/ Dosage du fructose

Ce dosage fait suite au dosage du glucose sur la même plaque après la lecture de DO2.

- 1- Ajouter 10µL de PGI diluée au 1/10^{ème} en eau stérile.
- 2- Agiter 10 min à 30°C.
- 3- Faire une lecture DO3 à 340nm.

Calcul DO_{fructose} = DO3-DO2

2.1/ Dosage du saccharose

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0µL	PE éch 1										
B	1µL	PE éch 1										
C	2µL	PE éch 1										
D	3µL											
E	4µL											
F	5µL											
G	7.5µL											
H	10µl											

- 1- Dans la colonne 1, faire la gamme étalon de saccharose à 0,5g/L.
- 2- Dans les autres colonnes, mettre la prise d'essai de vos échantillons (entre 10 et 140µL).
- 3- Compléter à 140µL en eau distillée.
- 4- Ajouter 10µL d'invertase pure.
- 5- Agiter 20 min à 30°C.
- 6- Ajouter 60µL de NADP-ATP.
- 7- Faire une lecture DO1 à 340nm.
- 8- Ajouter 10µL d'HK-G6PDH diluée au 1/10^{ème} en eau stérile dans chaque puits.
- 9- Agiter 10 min à 30°C.
- 10- Faire une lecture DO2 à 340nm

Calcul DO_{saccharose total} = DO2-DO1

Annexe 2 : Protocoles de dosage des acides aminés (d'après Manuella Catterou)

ROSEN

Ce dosage titre toutes les fonctions NH₂, donc essentiellement les acides aminés et l'ammonium). Pour déterminer les teneurs en aa totaux, il faut soustraire les teneurs en ammonium.

Solutions stock à préparer

Solution 1 KCN 10mM : 6,5mg dans 10mL d'eau (à congeler dans tubes de 1,5ml)

Solution 2 Tp Acétate 2,6M : 54,25g Acétate Na Anhydre ou 90g Acétate Na 3 H₂O

70 mL H₂O

20 mL Acide acétique glacial

Ajuster le pH 5,3-5,4 avant d'atteindre 250mL

pH final 5,0-5,2 à conserver à 4°C.

Solutions pour une plaque

Tube A : Solution Cyanure/Acétate 120µL de solution 1 + 6mL de solution 2

Tube B : Solution Ninhydrine 3% : 180mg Ninhydrine (pesée aliquotée et à préparer juste avant)

+ 6mL d'ethylèneglycolmonoéthyléther (EGMEE)

Solution d'arrêt de la réaction 50mL : Isopropanol/H₂O 50-50 (v/v)

Solution gamme L glutamine à 4nmol/µL : 58,46mg dans 5mL à diluer au 1/20 en EDS (aliquoter dans tubes 1,5ml et à conserver à -20°C)

nmol	0	16	32	48	60	80
Gln (µL)	0	4	8	12	15	20
H ₂ O (µL)	100	96	92	88	85	80

Mettre 30µL d'extrait hydroalcoolique dans chaque puits (pour At 10 µL)

Mettre 70µL d'eau dans chaque puits

Mettre 50µL du mélange du tube A

Mettre 50µL du mélange du tube B

Mettre le couvercle de la plaque et agiter

Faire bouillir 15 mn exactement à 100°C

Ajouter 500µL du mélange isopropanol/eau

Agiter et remettre dans la glace

Prélever 200µL et les mettre dans la plaque ELISA & Lire la DO à 570nm

Modifié le 16 mai 2014 par Manuella CATTEROU

AMMONIUM

Solutions stock à préparer

Solution A: Phénolate de Na 0,33 M PH=13

5,6g de Phénolate de Na + 8mL NaOH 2M, qsp 100mL H₂O (aliquoter en tubes 15 ml et conserver à -20°C)

Solution B: Nitroprussiate de Na 0,01% (A préparer juste avant l'emploi)

Mettre 10mg dans 100mL H₂O (aliquoter la poudre et conserver à l'abri de la lumière et ajouter eau juste avant manip)

Eau de javel: Berlingot commercial à diluer (berlingot à conserver à 4°C pdt 1 semaine)

0,8mL d'eau de javel qsp 50mL H₂O

Gamme: 66 mg (NH₄)₂SO₄ (PM 132,1) dans 50 ml H₂O qsp i.e. 10Mm

Diluer la solution stock de 10Mm au 1/5 i.e. une gamme de 2nmol/μL (aliquoter en tubes de 1,5ml et à conserver à -20°C)

nmol	0	2	4	6	8	10	12	14
(NH ₄) ₂ SO ₄ (μL)	0	1	2	3	4	5	6	7
H ₂ O (μL)	20	19	18	17	16	15	14	13

Mettre 20 μL d'extrait hydroalcoolique (ou 10μL extrait et 10μL d'eau) dans chaque puits

Mettre 100μL de solution A et vortexer

Mettre 100μL de solution B et vortexer


Ajouter enfin 100μL d'eau de Javel diluée

Vortexer et attendre 40mn à l'abri de la lumière

Lire la DO à 635nm

Rq: pour At PE = 20 μL, pour Miscanthus PE = 20 μL

Modifié le 16 mai 2014 par Manuella CATTEROU

	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : Gestion Durable du Végétal en horticulture et aménagements paysagers Enseignant référent : Josiane Le Corff
Auteur(s) : Agathe Roussel Date de naissance* : 16 / 12 / 1990	Organisme d'accueil : Ecologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés (FRE 3498 CNRS-UPJV), Université de Picardie Jules Verne Adresse : 1 rue des Louvels, 80 037 Amiens Cedex 1
Nb pages : 51 Annexe(s) : 2	Maîtres de stage : Sylvie Baltora-Rosset, Olivier Chabrierie, Patrice Eslin
Année de soutenance : 2015	
Titre français : <i>Atropa belladonna</i> , une nouvelle plante hôte sauvage pour la mouche invasive <i>Drosophila suzukii</i> . Titre anglais : <i>Atropa belladonna</i> , a new wild host-plant for the invasive fly <i>Drosophila suzukii</i> .	
<p><i>Drosophila suzukii</i>, découverte au Japon en 1931, est devenue un des plus importants ravageurs de fruits frais depuis son introduction en Europe. Sa gamme de plantes hôtes sauvages est peu connue. Toutefois, <i>D. suzukii</i> est capable de se développer sur les baies toxiques d'<i>Atropa belladonna</i>, une plante riche en alcaloïdes. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle, comparée à la souche japonaise, la souche envahissante de <i>D. suzukii</i> pourrait être mieux adaptée à cette plante riche en composés toxiques. Dans un premier temps, la caractérisation biochimique des baies a été réalisée au cours de leur maturation. Les analyses du contenu en métabolites secondaires montrent que les baies vertes contiennent une concentration élevée en atropine, de l'ordre de 0,025 %. Parallèlement, l'étude porte sur le développement de trois souches de Drosophiles sur les baies d'<i>A. belladonna</i> à différents stades de maturité. La comparaison est réalisée entre 2 souches de <i>D. suzukii</i>, l'une originaire du Japon et l'autre d'origine française, et une souche de <i>D. melanogaster</i>. Les résultats montrent que le développement sur les baies vertes entraîne une diminution de la survie et une augmentation de la durée de développement pour les trois souches. Les différences de développement entre les deux souches de <i>D. suzukii</i> amènent à supposer l'existence d'une adaptation de la souche envahissante à <i>A. belladonna</i>. <i>D. suzukii</i> profiterait donc d'une niche écologique peu utilisée pouvant lui conférer plusieurs avantages.</p>	
<p>Discovered in Japan in 1931, <i>Drosophila suzukii</i> has recently become one of the most important pests of fruits. The wild hosts of <i>D. suzukii</i> remain poorly known. However, it has been shown to be able to feed on toxic berries of <i>Atropa belladonna</i>. We investigated the hypothesis of an adaptation of the invasive species <i>D. suzukii</i> on this plant. First, we studied the biochemical characterization of berries along the ripening process. The results of analyses on secondary metabolites showed that unripe berries had a high atropine concentration (0.025%). At the same time, we investigated the development of three strains of <i>Drosophila</i> on <i>A. belladonna</i> berries at different maturity stages. The comparison was performed between two strains of <i>D. suzukii</i>, one Japanese and one French, and one strain of <i>D. melanogaster</i>. For flies developing on unripe berries, our results showed a decrease of larval survival and an increase of the development time for all three strains. The differences observed between both strains of <i>D. suzukii</i> during development tend to show a possible adaptation of the invasive strain to <i>A. belladonna</i>. <i>D. suzukii</i> could then take advantage of a poorly used ecological niche that would confer several advantages to this pest.</p>	
Mots-clés : drosophile, ravageur, espèce invasive, Belladone, alcaloïdes. Key Words: drosophila, pest, invasive species, deadly nightshade, alkaloids.	

* *Elément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires*