



HAL
open science

Élaboration d'outils de diagnostic morphologiques et moléculaires en vue d'identifier les charançons du colza et leurs hyménoptères parasitoïdes

Mélodie Ollivier

► **To cite this version:**

Mélodie Ollivier. Élaboration d'outils de diagnostic morphologiques et moléculaires en vue d'identifier les charançons du colza et leurs hyménoptères parasitoïdes. Sciences agricoles. 2016. dumas-01467993

HAL Id: dumas-01467993

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01467993>

Submitted on 15 Feb 2017

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.



Mémoire de stage

Présenté pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome,
option Inter-Etablissement Protection des Plantes et Environnement

Sur le thème

Elaboration d'outils de diagnostic morphologiques et
moléculaires en vue d'identifier les charançons du colza et
leurs hyménoptères parasitoïdes

Par
Mélodie OLLIVIER

Ecole de rattachement : Agrocampus-Ouest, centre de Rennes

Stage réalisé à : l'UMR CBGP
Avenue du Campus Agropolis,
34980 Montferrier-sur-Lez

Sous la Direction de :
Jean-Claude Streito

Soutenu le 28 septembre 2016 à Montpellier, devant le jury composé de :

Président: Marie-Stéphane Tixier
Membres: Anne Le Ralec
Frédéric Marion-Poll
Céline Robert



Résumé

Le colza oléagineux est la grande culture qui consomme le plus d'insecticides en France. Sept espèces de charançons, présentant une nuisibilité variable, et seize espèces de parasitoïdes constituent le cortège associé à cette culture. La lutte biologique par conservation est l'approche durable soutenue par le projet COLEOTOOL, comme alternative à la lutte chimique devenue inefficace sur certains ravageurs. La difficulté à identifier les charançons et leurs parasitoïdes et le manque de données récentes sur ces relations de parasitismes constitue la problématique à laquelle répondent le CBGP et Terres Inovia par l'élaboration d'outils de diagnostic morphologiques et moléculaires. Les spécimens collectés en France ont été identifiés morphologiquement et le gène de la cytochrome c oxydase 1 (CO1) du génome mitochondrial a été séquencé pour quelques individus des différentes espèces obtenues. L'inférence d'arbres phylogéniques par maximum de vraisemblance a permis d'étudier la congruence des résultats morphologiques et moléculaires. Une base de séquences de référence a ainsi été créée, contenant 108 séquences de charançons et 145 d'hyménoptères parasitoïdes de ces charançons. 10 de ces espèces ne présentaient jusqu'à présent aucune séquence dans les bases de données mondiales. Des systèmes d'identification interactifs ont aussi été conçus via le logiciel LUCID®. Grâce à ces outils Terres Inovia est en mesure d'analyser les échantillons issus d'un large réseau de parcelles pour étudier les variables favorables à la lutte biologique par conservation contre les charançons du colza en France.

Mots-clés : Colza, charançons, hyménoptères parasitoïdes, identification moléculaire, clé digitale

Abstract

Oilseed rape in France is the arable crop the most treated against pests. Seven species of weevils (*Ceutorhynchus sp.*, *Aulacobaris sp.* and *Melanobaris sp.*) are known to attack oilseed rape all along its biological cycle, but the expression of their pest potential differs among species. Sixteen parasitoids contribute to the natural regulation of these pests. Conservation biological control is the sustainable approach supported by the COLEOTOOL project, as an alternative to the use of insecticides. Indeed, the rape winter stem weevil (*C. piciparsis*) already started to develop resistance to pyrethroids in France. The lack of recent data about host/parasitoids interactions and the difficulty to identify weevils and their parasitoids constitute the issue that the CBGP and the agronomical institute Terres Inovia, must solve by the development of molecular and morphological identification tools. Terres Inovia directed the sampling campaign over nine collection sites in France. The specimens have been identified by taxonomists at the CBGP, and the cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) of the mitochondrial gene has been sequenced for some of the specimens of the species identified. Phylogenetic inference, using maximum likelihood, has been employed to delineate species and study the congruence of morphological and molecular data. Further observations of vouchers permitted to correct identification errors, even describe new species characters for close species. The sequences of 108 weevils have been validated. They mostly belong to the four species the most represented in samplings (*C. napi*, *C. obstrictus*, *C. pallidactylus* et *C. piciparsis*). 145 sequences of parasitoids hymenoptera have been validated, belonging to 12 different species. Among them, ten did not present any sequence accessible on global database. A reference collection of specimen accompanies the sequence database. Two digital polytomous keys has been created using LUCID software, dedicated to weevils and their parasitoids. They integrate a larger spectrum of species and characters newly reviewed. Thanks to these tools Terres Inovia will be able to analyse samples coming from a large network of plots in France, aiming at studying the favourable factors to conservation biological control of rape weevils.

Keywords: oilseed rape, weevils, parasitoids, molecular identification, digital key

AUTORISATION DE DIFFUSION DU MEMOIRE

1. Identification du rapport et de l'auteur

Nom et Prénom de l'auteur: Ollivier Mélodie

Titre du mémoire : Elaboration d'outils de diagnostic morphologiques et moléculaires en vue d'identifier les charançons du colza et leurs parasitoïdes.

Ecole d'inscription : Agrocampus Ouest, Centre de Rennes

2. Autorisation de diffusion par l'Auteur

Par la présente, je déclare être titulaire du droit d'auteur pour le mémoire mentionné ci-dessus. J'autorise sans limitation de temps la Bibliothèque à diffuser ce mémoire dans un format électronique adapté et à effectuer toutes éventuelles modifications techniques nécessaires à une amélioration de la diffusion (modification du format) Si ce mémoire est confidentiel, la confidentialité sera respectée dans les mêmes conditions pour les exemplaires électroniques que pour les exemplaires papiers.

Signature de l'Auteur:

X



Date: 07 / 09 / 2016

3. Autorisation de diffusion par le Maître de stage

J'autorise par la présente l'auteur à diffuser le mémoire mentionné ci-dessus:

Intranet	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON	Prêt	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON
Internet	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON	Prêt entre bibliothèques	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON
Après une période de confidentialité	<input type="radio"/> OUI	<input checked="" type="radio"/> NON	Résumé diffusable	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON
	Durée:				
Consultation en bibliothèque	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON	Reproduction	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON

Signature du Maître de stage:

X



Date: 08/09/2016

4. Autorisation de diffusion par le Tuteur

J'autorise par la présente l'auteur à diffuser le mémoire mentionné ci-dessus:

Intranet	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON	Prêt	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON
Internet	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON	Prêt entre bibliothèques	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON
Après une période de confidentialité	<input type="radio"/> OUI	<input checked="" type="radio"/> NON	Résumé diffusable	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON
	Durée:				
Consultation en bibliothèque	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON	Reproduction	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON

Signature du tuteur enseignant:

X  Tarek Skibane Tixier

Date: 08/09/2016

CONCLUSIONS:

Confidentialité absolue: OUI

Durée exigée:

NON

Le Responsable de l'Option PPE

Remerciements

Je souhaiterais remercier Jean-Claude Streito, m'ayant proposé ce stage, pluridisciplinaire et enrichissant, et m'ayant fait confiance quant à l'aboutissement des différentes missions confiées. Merci de m'avoir permis de travailler dans un laboratoire de qualité comme le CBGP, où j'ai grandement apprécié de pouvoir disposer de matériel performants, de m'émerveiller devant les collections d'insectes, et d'effectuer quelques sorties à l'extérieur. Enfin, Merci pour son soutien dans les moments de doutes et de questionnements et les relectures avisées du mémoire de stage.

De même, merci à Céline Robert, qui lors de son accueil sur Paris m'avait annoncé les premières lignes du projet et qui a été très réceptive à nos échanges email par la suite. J'espère que le travail effectué correspond à ses attentes et que ces outils participeront, comme on le souhaite, au développement de mesures de lutte durables.

Merci à Marie-Stéphane Tixier, pour ses conseils et son soutien au cours de la rédaction de ce mémoire. Elle a su me recadrer et répondre à mes questions avec précision lorsque j'en avais besoin.

Merci à Jean-Yves et Astrid pour leur patience et leur disponibilités lorsque j'avais besoin d'être guidées pour appréhender des disciplines et logiciels qui m'étaient jusqu'à présent très mal connus. Merci d'avoir pris le temps de partager vos connaissances du vaste monde de la biologie moléculaire.

Merci à Gérard, pour ses leçons sur les hyménoptères parasitoïdes, concernant à la fois la théorie relative à ce groupe mais aussi ses connaissances plus pratiques lors du montage de ces petites bestioles sur les paillettes. Avec un calme sans faille et une grande précision il a su me transmettre implicitement les grands préceptes du taxonomiste : patience, rigueur et passion.

Merci à Julien, qui a lui aussi été d'une aide précieuse par le prêt de quelques spécimens de charançons provenant de sa collections personnelle, par le partage de son savoir sur ce large groupe, et par ses conseils et son soutien.

Merci à Éric pour sa bonne humeur et son attentive relecture des fiches pédagogiques. J'ai apprécié de collaborer avec lui sur ce projet, et je suis certaine qu'il saura continuer à valoriser le travail qui a été effectué.

Merci à Gwenaëlle, qui a eu la patience de me montrer comment traiter les données moléculaires à travers de multiples logiciels.

Enfin, Merci à tous les amis du CBGP que j'ai eu la chance de rencontrer, avec qui j'ai pu faire des pauses déjeuner décontractées et pleines d'humour (et heureusement qu'elles étaient là !), et qui ont su aussi garder leur sérieux lorsqu'il s'agissait de me faire part de leur conseils et commentaires. Merci Oriane, Leyli, Christophe, Antoine, Robin, Ghais, Allan, Simon, Nico, Clémentine et Benjamin.

Table des matières

Introduction	13
Première partie : Etat de l'art	15
1. Système de culture : le colza oléagineux	15
1.1. Production et filières.....	15
1.2. Biologie et agronomie	15
2. Ravageurs et auxiliaires du colza oléagineux.....	17
2.1. Arthropodes, principale contrainte à la production de colza	17
2.2. Hyménoptères parasitoïdes, une richesse spécifique au service de l'agriculture ..	21
3. Identification d'espèces, entre morphologie et biologie moléculaire	25
3.1. Identification classique par la morphologie.....	25
3.2. Identification par biologie moléculaire.....	27
4. Objectifs de l'étude	31
Deuxième partie : Matériel et Méthodes	33
1. Echantillonnage	33
2. Identification morphologique et élaboration d'une collection de référence	33
3. Identification moléculaire et validation des taxons	35
3.1. Séquençage du gène CO1	35
3.2. Traitements des données et inférence d'arbres phylogéniques.....	37
3.3. Validation de séquences et délimitation d'espèces.....	39
4. Analyse des données faunistiques	39
5. Création des clés digitales et diffusion des outils.....	39
5.1. Choix de caractères pertinents	39
5.2. Réalisation des clichés et intégration des illustrations	41
5.3. Diffusion de l'outil	41
6. Conception de fiches pédagogiques	43
Troisième partie : Résultats et discussion	43
1. Identification des charançons du colza et de leurs hyménoptères parasitoïdes	43
1.1. Identification morphologique	43
1.2. Identification moléculaire.....	45
1.3. Validation des séquences.....	51
1.4. Analyse faunistique	53
2. Développement des outils d'identification	55
2.1. Clés d'identification digitales.....	55
2.2. Fiche pédagogiques	59
3. Perspectives	61
Conclusion	61
Références bibliographiques	63

Liste des figures

Figure 1 : Surface (ha) dédiée à la production de colza oléagineux par département français. (Agrest Statistique Agricole Annuelle, 2013)	14
Figure 2 : Charançons du colza et dégâts occasionnés par les larves : a) <i>Ceutorhynchus picitarsis</i> , aspect buissonnant du pied de colza, pontes ; b) <i>Ceutorhynchus napi</i> , éclatement et distorsion des tiges, larves ; c) <i>Ceutorhynchus obstrictus</i> , larve dans une silique. Photos Terres Inovia et M. Ollivier	18
Figure 3 : Altération des tiges causée par les pontes de <i>Ceutorhynchus napi</i> . Photo Terres Inovia.....	18
Figure 4 : Synthèses des interventions chimiques au cours du cycle cultural du colza, au regard des cycles biologiques des principaux charançons ravageurs. 1) <i>Ceutorhynchus picitarsis</i> . 2) <i>C. napi</i> . 3) <i>C. pallidactylus</i> . 4) <i>C. obstrictus</i> . 5) <i>Aulacobaris coeruleus</i>	20
Figure 5 : Indice de Fréquence de Traitement (IFT) insecticide en grande culture. IFT insecticide moyen = 0,6. IFT insecticide colza = 2,5. (Agrest Statistique Agricole Annuelle, 2011) ..	20
Figure 6 : Distribution des différences entre paires de séquences selon le modèle ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery). Un gap se place entre les séquences peu divergentes, traduisant la variabilité intraspécifique et entre les séquences très divergentes montrant une plus grande variabilité entre les espèces. (Puillandre <i>et al.</i> , 2012)	30
Figure 7 : Localisation des parcelles de colza échantillonnées par Terres Inovia entre 2014 et 2016.....	32
Figure 8 : Détail des deux PCR réalisées sur le gène CO1. 1) Amplification du fragment ciblé. 2) Ajout des adaptateurs Illumina et indexation de l'échantillon. (Adapté de A. Cruaud)	34
Figure 9 : Représentation de la zone de recouvrement permettant d'obtenir une bonne reconstitution du gène cible par séquençage Illumina. (Adapté de A. Cruaud)	34
Figure 10 : Etapes de poolages après amplification permettant de constituer l'échantillon à séquençer. (Adapté de P. Cruaud, 2015)	34
Figure 11 : Groupement des caractères permettant leur organisation selon la morphologie de l'insecte. (D'après la clé des hyménoptères parasitoïdes).....	40
Figure 12 : Illustrations des groupes de caractères, caractères ou états de caractères. (D'après la clé des hyménoptères parasitoïdes)	40
Figure 13 : Exemple de polymorphisme sexuel chez <i>Mesopolobus morys</i> . Caractère : flagelle antennaire. Etat de caractère : court (flagellomères transverses, plus larges que longs, de façon plus évidente chez la femelle que chez le mâle.). Par opposition à un flagelle antennaire allongé. (D'après la clé des hyménoptères parasitoïdes)	40
Figure 14 : Phylogramme des relations entre huit espèces de <i>Ceutorhynchus</i> obtenu par Maximum de Vraisemblance à partir des gènes mitochondriaux (CO1). Les supports des nœuds sont indiqués par les valeurs de bootstrap > 70%.	44
Figure 15 : Phylogramme des relations entre neuf espèces de <i>Ceutorhynchus</i> (séquences BOLD incluses) obtenu par Maximum de Vraisemblance à partir des gènes mitochondriaux (CO1). Les supports des nœuds sont indiqués par les valeurs de bootstrap > 70%. En orange : les séquences supposées être des pseudogènes.	46
Figure 16 : Phylogramme des relations entre hyménoptères parasitoïdes obtenu par Maximum de Vraisemblance à partir des gènes mitochondriaux (CO1). Les supports des nœuds sont indiqués par les valeurs de bootstrap > 70%. En vert : variabilité génétique possiblement liée à l'origine géographique.	48
Figure 17 : Recadrage du phylogramme des hyménoptères parasitoïdes autour des 5 groupes de Tersilochinae. (gène CO1, inférence par maximum de vraisemblance et bootstrap > 70%).....	50

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taxonomie des charançons du colza et synthèse des principales synonymies rencontrées en regard de leurs noms vernaculaires. * liste non exhaustive. Se référer au "Catalogue of Ceutorhynchinea of the world, with a key to genera" de E. Collonelli (2004) pour les Ceutorhynchinae et au "Catalogue of Palearctic coleoptera, vol. 7" de Alonso-Zarazaga (2011) pour les Baridinae.	16
Tableau 2 : Hyménoptères parasitoïdes associés aux charançons ravageurs du colza. Hôtes présentés : <i>A. coerulescens</i> , <i>M. laticollis</i> , <i>C. assimilis</i> , <i>C. napi</i> , <i>C. obstructus</i> , <i>C. pallidactylus</i> , <i>Meligethes</i> spp., <i>Phylliodes</i> spp.	22
Tableau 3 : Espèces pour lesquelles l'observation de spécimens de référence a été nécessaire.	32
Tableau 4 : Clés d'identification.	32
Tableau 5 : Amorces de la PCR 1 et cycle PCR associés. (D'après le protocole de P. Cruaud, 2015).	34
Tableau 6 : Champs renseignés dans les fiches synthèses des charançons et hyménoptères parasitoïdes consultables sur Artemis.	42
Tableau 7 : Distances intraspécifiques (diagonale) et interspécifique (sous la diagonale) minimum et maximum, extraites de la matrice des distances (modèle Kimura2-p) calculées pour les Tersilochinae à partir du gène CO1.	50
Tableau 8 : Séquences validées composant la base de données de référence du projet COLEOTOOL.	52

Liste des annexes

Annexe 1 : Stades végétatifs repères chez le colza d'hiver (Pilorgé <i>et al.</i> , 1997).	69
Annexe 2 : Séquences de <i>Ceutorhynchus</i> extraites de BOLD (Extrémité 5' du gène CO1, 658bp).	70
Annexe 3 : Matrices des caractères renseignées chez les charançons du colza dans LUCIDbuilder®.	71
Annexe 4 : Matrices des caractères renseignées chez les hyménoptères parasitoïdes des charançons du colza dans LUCIDbuilder®.	72

Introduction

La production de colza en France n'a cessé de croître ces dernières années, essentiellement du fait du déploiement des biocarburants. Cette culture est soumise à des attaques de nombreux ravageurs ; son IFT insecticide (2,5 en 2012) est le plus élevé en grandes cultures (Agréste 2014). Les espèces les plus nuisibles appartiennent à la famille des Curculionidae (Coléoptère). Morphologiquement très proches, elles ont des biologies différentes et chacune est inféodée à un organe de la plante. De plus, leurs dégâts n'impliquent pas systématiquement une intervention phytosanitaire. Les charançons les plus nuisibles sont : *Ceutorhynchus picipitarsis* Gyllenhal, *C. napi* Gyllenhal et *C. obstrictus* (Marsham). Les autres espèces *C. pallidactylus* (Marsham), *C. assimilis* (Paykull), *Aulacobaris coeruleascens* Scopoli et *Melanobaris laticollis* Marsham n'entraînent que des dommages mineurs, souvent contrebalancés par les facultés compensatoires du colza. Une identification fiable des insectes à l'espèce est primordiale avant d'envisager toute intervention. Les pyrèthrinoides sont les principaux insecticides utilisés depuis de nombreuses années. De façon prévisible, des cas de résistance ont récemment été observés chez *C. picipitarsis* (Robert et al., 2016). Il devient donc nécessaire de développer d'autres mesures de lutte, plus durables et plus respectueuses des Hommes et de l'environnement. La lutte biologique par conservation, considérée comme la stratégie la moins coûteuse et la moins susceptible de perturber l'équilibre du milieu est l'alternative soutenue aujourd'hui par le projet COLEOTOOL.

Initié en 2014, COLEOTOOL est un projet CASDAR impliquant Terres Inovia et l'UMR CBGP. En s'appuyant sur les travaux de Jourdeuil (1961), qui réalisa un inventaire des parasitoïdes antagonistes des coléoptères phytophages du colza, COLEOTOOL a pour objectifs (i) de développer des outils d'identification innovants et (ii) d'actualiser les connaissances de ces complexes d'espèces pour à terme caractériser l'impact du contexte paysager et des pratiques culturales sur les interactions charançons/parasitoïdes. Les missions du CBGP sont : (i) la détermination des espèces de Curculionidae du colza et de leurs hyménoptères parasitoïdes, (ii) le développement d'outils de diagnostic de ces mêmes espèces pour une future autonomie de Terres Inovia. Deux types d'outils d'identifications seront proposés : des clés interactives illustrées, l'une dédiée aux Curculionidae du colza et l'autre aux hyménoptères parasitoïdes. Étant donné les difficultés liées à l'identification morphologique (espèces cryptiques, stades pré-imaginaux), le séquençage des spécimens identifiés est également réalisé pour valider les identifications morphologiques et constituer une base de données de séquences valides (barcode moléculaire) spécifique au projet.

Mes missions durant ces 6 mois de stage ont consisté à : (i) Identifier morphologiquement une partie des spécimens collectés sur le colza (ii) Réaliser la base de données de référence comprenant les séquences du gène COI et (iii) Élaborer des clés d'identification polytomiques interactives établies sur la base de caractères pertinents pour la discrimination d'espèces proches.

En premier lieu, ce rapport apporte des connaissances sur le système de culture et les complexes d'espèces associées, ainsi que les avantages et limites des outils d'identification morphologique et moléculaire. Il présente ensuite les méthodes ayant permis de répondre aux objectifs et les résultats obtenus en les confrontant à la bibliographie. Enfin, les éventuelles pistes d'amélioration et les perspectives envisagées à la suite de ce projet sont énoncées.

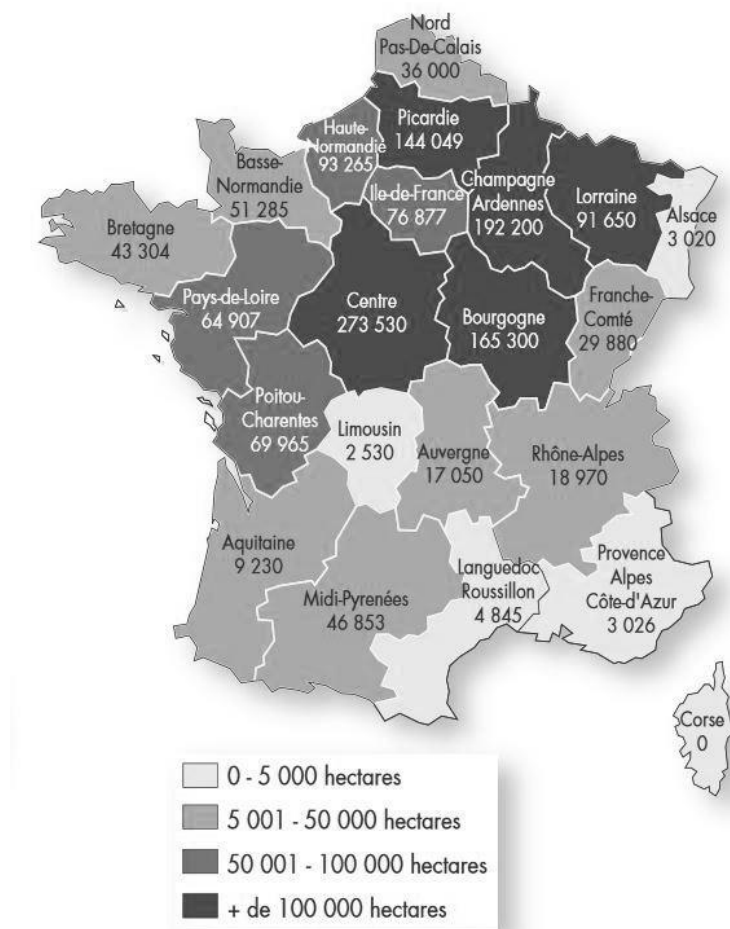


Figure 1 : Surface (ha) dédiée à la production de colza oléagineux par département français. (Agrest Statistique Agricole Annuelle, 2013)

Première partie : Etat de l'art

1. SYSTEME DE CULTURE : LE COLZA OLEAGINEUX

1.1. PRODUCTION ET FILIERES

La production mondiale de colza s'estime à 70,9 Millions de tonnes (FAOstat), et représente en Europe la production majeure à hauteur de 20,5 Mt en 2013 (PROLEA, 2014). Sur le territoire français une surface de 1 500 000 ha est dédiée à sa production, chiffre en progression depuis les années 2000, qui place la France comme le 5^{ème} pays producteur mondial (5,5 Mt) (FAOstat). La culture du colza se concentre sur la moitié nord de la France et quelques départements du sud-ouest. Comme le présente la figure 1, les régions Centre, Champagne-Ardenne, Bourgogne et Picardie se partagent plus de 50% des surfaces nationales (Agreste Statistique Agricole Annuelle 2013).

Le colza est principalement cultivé pour la production d'huile dont la moitié du volume, en France, est utilisée sous forme de biocarburant (Bozbas, 2008; Carré & Pouzet, 2014). L'augmentation de la production européenne, estimée à 27% depuis 2005, est d'ailleurs directement liée au déploiement des biodiesels. Également alimentaire, l'huile de colza représentait, en 2014, 61% de la consommation française en huile végétale. En conséquence la production de tourteaux, destinés à l'alimentation animale, est passée de 675 000 tonnes en 2001 à plus de 2 millions de tonnes en 2014 (PROLEA, 2014).

1.2. BIOLOGIE ET AGRONOMIE

Le colza appartient à la famille des Brassicaceae. Elle est caractérisée par la production de glucosinolates (Radojicic *et al.*, 2008) qui assureraient un rôle défensif contre les ravageurs herbivores généralistes (Giamoustaris & Mithen, 1995; Martin & Müller, 2007) tout en pouvant constituer des composés volatils attractifs pour des espèces spécialistes et certains des ennemis naturels associés aux ravageurs, tels que les parasitoïdes (Read *et al.*, 1970).

Le colza oléagineux, *Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg, est une espèce amphidiploïde issue de l'hybridation spontanée de *Brassica rapa* (Navet) et *Brassica oleracea* (Chou) lors de laquelle il a reçu l'ensemble des chromosomes diploïdes des deux génomes parentaux (Snowdon *et al.*, 2002). Il se reproduit généralement par autofécondation bien qu'un taux de 10 à 30% d'allofécondation ait été observé (Rakow & Woods, 1987). Au regard de la gestion des ravageurs, les repousses de colza colonisant la culture suivante ou les bordures de parcelle (Pessel *et al.*, 2001), sont des plantes hôtes qui participent au maintien et à la propagation des nuisibles mais constituent aussi des plantes relais pour les auxiliaires (Pickett & Bugg, 1998). De même, les Brassicaceae spontanées comme la ravenelle, la sanve, la capselle bourse-à-pasteur (Jourdeuil, 1960), sont des habitats refuges secondaires que les complexes d'espèces inféodées au colza colonisent également.

Le colza d'hiver est semé à l'automne, entre fin août à début septembre dans le Nord et l'Est de la France et de fin septembre à début octobre dans le Sud-Ouest (Poulain & Barloy, 2012). Il lève les semaines qui suivent, traverse l'hiver au stade rosette et poursuit sa croissance à travers différents stades végétatif présentés en annexe 1. (Pilorgé *et al.*, 1997). Les stades de sensibilité critiques vis-à-vis des ravageurs se situent : (i) en début d'hiver (formation de la rosette), (ii) à la sortie de l'hiver (reprise végétative et l'élongation des tiges), (iii) en début d'été (élaboration du rendement : remplissage des gousses et formation des graines) (Pilorgé *et al.*, 1997).

Tableau 1 : Taxonomie des charançons du colza et synthèse des principales synonymies rencontrées en regard de leurs noms vernaculaires.

* liste non exhaustive. Se référer au "Catalogue of Ceutorhynchinea of the world, with a key to genera" de E. Collonelli (2004) pour les Ceutorhynchinae et au "Catalogue of Palearctic coleoptera, vol. 7" de Alonso-Zarazaga (2011) pour les Baridinae.

ORDRE	Famille	Sous-famille	Genre	Espèce	Principaux synonymes*	Nom vernaculaire Fr.	Nom vernaculaire Ang.
COLEOPTERE							
Curculionidae							
Baridinae							
<i>Aulacobaris</i>							
				<i>A. coerulescens</i> Scopoli, 1763	<i>Baris coerulescens</i> (Scopoli 1793) <i>Curculio Chalybeus</i> Gmelin, 1790	Baris des crucifères	Baris weevil
<i>Melanobaris</i>							
				<i>M. laticollis</i> (Marsham, 1802)	<i>Curculio laticollis</i> Marsham, 1802 <i>Baris laticollis</i> (Marsham, 1802) <i>Curculio absinthii</i> Panzer, 1794 <i>Curculio atriplicis</i> Fabricius, 1776 <i>Curculio glabra</i> Herbst, 1784 <i>Curculio nitens</i> Fabricius, 1792 <i>Baris picina</i> Germar, 1824 <i>Baris subtarsalis</i> Rey, 1895	Baris des crucifères	Baris weevil
Ceutorhynchinae							
<i>Ceutorhynchus</i>							
				<i>C. assimilis</i> (Paykull, 1792)	<i>Curculio assimilis</i> Paykull, 1792 <i>Curculio alauda</i> Fabricius, 1792 <i>Curculio pleurostigma</i> Marsham, 1802	Charançon gallicole, charançon galliforme	Turnip gall weevil
				<i>C. napi</i> Gyllenhal, 1837	<i>Rhynchaenus assimilis</i> Olivier, 1807 <i>Ceuthorhynchus napi</i> Gyllenhal, 1837	Charançon de la tige du colza, gros charançon de la tige	Rape stem weevil
				<i>C. obstrictus</i> (Marsham, 1802)	<i>Curculio nigrostriatus</i> Goeze, 1777 <i>Curculio nopobrassicae</i> Bjerkander, 1780 <i>Curculio floriger</i> Fourcroy, 1785 <i>Curculio subglobosus</i> Gmelin, 1790 <i>Ceuthorhynchus floralis</i> Olivier, 1791 <i>Curculio assimilis</i> Fabricius, 1792 <i>Curculio alauda</i> Herbst, 1745 <i>Curculio obstrictus</i> Marsham, 1802 <i>Ceuthorhynchus assimilis</i> var. <i>minor</i> Favre, 1890	Charançon des siliques	Charançon des siliques
				<i>C. pallidactylus</i> (Marsham, 1802)	<i>Curculio quadridens</i> Panzer, 1795 <i>Ceuthorhynchus annulipes</i> Hoffmann, 1933 <i>Ceuthorhynchus seriesetosus</i> Dietz, 1896	Charançon de la tige du chou	Cabbage stem weevil
				<i>C. picitarsis</i> Gyllenhal, 1837	<i>Ceuthorhynchus tarsalis</i> Boheman, 1845 <i>Ceuthorhynchus picitarsis</i> Gyllenhal, 1837 <i>Ceuthorhynchus scutellaris</i> Brullé, 1832	Charançon du bourgeon terminal	Rape winter stem weevil

2. RAVAGEURS ET AUXILIAIRES DU COLZA OLEAGINEUX

2.1. ARTHROPODES, PRINCIPALE CONTRAINTE A LA PRODUCTION DE COLZA

2.1.1. Les coléoptères représentant majeurs des ravageurs du colza

Les attaques d'arthropodes se succèdent tout au long du cycle végétatif, généralement une spécificité vis-à-vis de l'organe est observée (Jourdeuil, 1960). Parmi les ravageurs du colza sont cités, essentiellement, des hémiptères (le puceron cendré du chou *Brevicoryne brassicae* L. et le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* Sulzer), des diptères (la mouche du chou, *Delia radicum* L. et la cécidomyie des siliques *Dasneura brassicae* Winn.) et des hyménoptères (la tenthrède de la rave *Athalia rosea* L.) cependant les espèces les plus nuisibles sont des coléoptères (CETIOM, 2010). Les méligèthes, *Meligethes* spp. (Nitidulidae) perforent les boutons floraux pour se nourrir du pollen ou pour y pondre entraînant l'avortement des boutons. Les adultes de l'altise du colza, *Psylliodes chrysocephala* L. (Chrysomelidae), se nourrissent des feuilles induisant un stress à la plante, alors que les larves consomment l'intérieur du tissu végétal. Occasionnellement, les larves « fil de fer » des taupins (Elateridae), peuvent s'attaquer aux graines en cours de germination ou au système racinaire (CETIOM, 2010). Les Curculionidae représentent la famille la plus menaçante avec 7 espèces appartenant aux sous-familles des Ceutorhynchinae et Baridinae (Jourdeuil, 1960).

2.1.2. Les Ceutorhynchinae, un groupe à la taxonomie controversée

D'après Colonnelli (2004), les Ceutorhynchinae (Coléoptère, Curculionidae) comptent plus de 1316 espèces dans le monde dont la plupart sont des phytophages ayant une importance économique considérable. La sous-famille des Ceutorhynchinae se divise en quatre tribus, *Amalini*, *Ceutorhynchini*, *Phytobiini*, *Scleropterini* (Löbl & Smetana, 2013), bien que cette organisation soit encore débattue (Colonnelli, 1984). Le genre *Ceutorhynchus* compte à lui seul 384 espèces dans le monde (Colonnelli, 2005) dont 86 en France (Tronquet, 2014).

Une confusion taxonomique majeure fut entretenue durant plusieurs dizaines d'années, par les systématiciens et agronomes concernant les charançons *C. assimilis* (Paykull) et *C. pleurostigma* (Marsham). Hoffmann, lors de la rédaction de la faune de France des Curculionidae en 1950, décrit d'ailleurs le charançon gallicole sous le nom de *C. pleurostigma* (Marsham) et le charançon des siliques sous celui de *C. assimilis* (Paykull) entretenant ainsi l'ambiguïté. Bien plus tard, Colonnelli (1993) examina les spécimens types ayant servi à leur description et rétablit alors les véritables noms de ces espèces : *C. assimilis* (Paykull) doit être nommé *C. obstrictus* (Marsham) pour désigner le charançon des siliques, et *C. pleurostigma* (Marsham) est un synonyme de *C. assimilis* (Paykull) : le charançon gallicole du chou. En 2006, une pétition favorable à la conservation de *C. assimilis* (Paykull) pour le charançon des siliques fut initiée mais la Commission Internationale de la Nomenclature Zoologique trancha et *C. obstrictus* (Marsham) reste aujourd'hui le nom approprié (ICZN, 2007). Le tableau 1 montre les sept charançons rencontrés sur colza. Parmi eux, seuls *C. picitarsis*, *C. napi* et *C. obstrictus* présentent réellement un risque pour la production.

2.1.3. C. picitarsis, C. napi et C. obstrictus, biologie et dégâts associés

Les charançons sont des insectes holométaboles dont le cycle biologique se divise en 4 états : œuf-larve-nymphe-adulte. Les œufs sont déposés au niveau de l'organe végétatif qu'ils affectionnent, dans un trou préalablement creusé à l'aide du rostre (Juran, 2011). *C. picitarsis* est le plus précoce des charançons du colza. Il colonise les parcelles en début d'automne puis pond au niveau des pétioles, alors que *C. napi* ne sort de diapause qu'en fin d'hiver de façon coordonnée avec la reprise végétative (Acta, 1999). Conditionnés par la température (Leurin, 1995), les cycles biologiques du ravageur et du colza sont synchronisés.

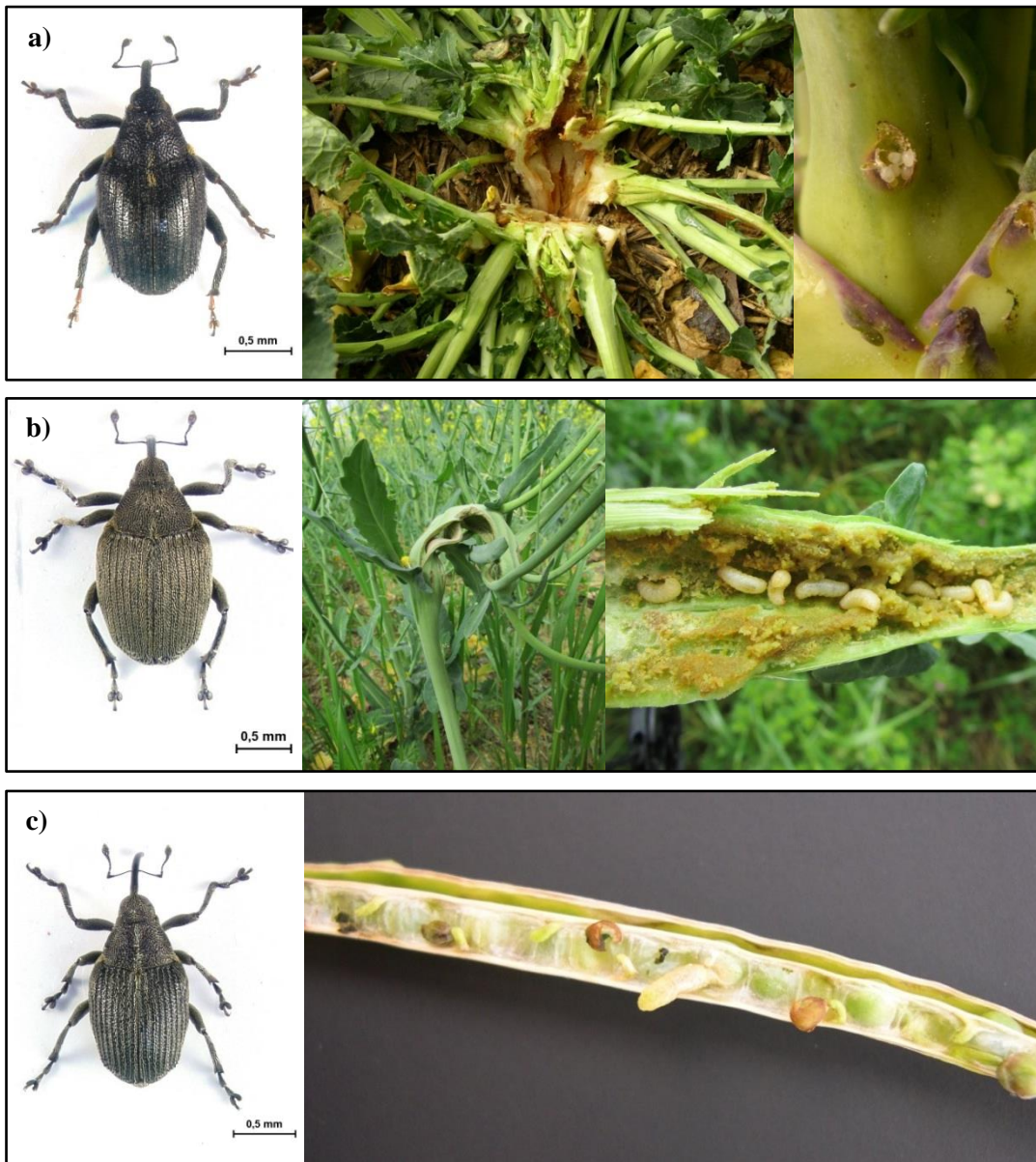


Figure 2 : Charançons du colza et dégâts occasionnés par les larves : a) *Ceutorhynchus picitarsis*, aspect buissonnant du pied de colza, pontes ; b) *Ceutorhynchus napi*, éclatement et distorsion des tiges, larves ; c) *Ceutorhynchus obstrictus*, larve dans une silique.
 Photos Terres Inovia et M. Ollivier



Figure 3 : Altération des tiges causée par les pontes de *Ceutorhynchus napi*.
 Photo Terres Inovia

Le nombre d'œufs est très variable selon l'espèce. Par exemple, les femelles de *C. obstrictus* ne déposent généralement qu'un œuf, bien que 2 ou 3 femelles puissent pondre dans une même silique. La fécondité des femelles est d'autant plus élevée que la période de floraison est longue et le nombre de silique élevé (Lerin, 1991). Chez *C. napi*, le nombre d'œufs par femelle peut s'élever à 100, celle-ci ayant une préférence notable pour les tiges supérieures à 11 mm de diamètre (Dechert & Ulber, 2004).

Durant plusieurs semaines, les larves, blanches et apodes, consomment les tissus végétatifs. Les larves de *C. picitarsis* migrent des pétioles vers le cœur de la rosette, provoquant des distorsions de la tige. Lorsque le bourgeon terminal est touché, la plante compense par la formation de rejets latéraux lui donnant un aspect buissonnant (figure 2a). *C. pallidactylus* et *C. napi*, partagent la même niche écologique : la tige de la plante, mais *C. napi* est le premier à s'y installer. La consommation des tissus provoque éclatements et déformations des tiges (figure 2b). Malgré la faculté de compensation du colza, pour un taux de plantes attaquées par *C. napi* supérieur à 80%, ceci combiné à des attaques de méligèthes, les pertes de rendement s'élèvent à 20% (Lerin & Rivault, 1988). Les dégâts occasionnés par les larves de *C. obstrictus* sont minimes, à hauteur d'une à cinq graines consommées par larve (Alford 2003) (figure 2c). Néanmoins, les trous de pontes constituent une entrée pour les cécidomyies dont les larves, introduites en plus grand nombre, sont dévastatrices. Introduit en Amérique du Nord en 1995 (Dossdall *et al.*, 2001 ; Carcamo *et al.*, 2001), *C. obstrictus* fait aujourd'hui l'objet de nombreuses tentatives de lutte biologique classique (Gibson *et al.*, 2006).

Au terme de la vie larvaire, les larves de *Ceutorhynchus* quittent la plante au niveau de l'insertion d'un pétiole et se nymphosent sous la surface du sol à l'intérieur d'un cocon de terre (Bonnemaison, 1962 ; Jourdeuil, 1963). Les adultes émergent rapidement et se nourrissent sur les feuilles ou siliques avant d'entrer en diapause hivernale. Seul *C. napi* perdure dans sa coque, dans la parcelle, durant l'hiver. De manière générale, les piqûres d'alimentation des adultes ne provoquent que des blessures superficielles. Cependant, les altérations des tiges causées par les pontes (figure 3) et la présence de larve, prédisposent la plante aux attaques de pathogènes secondaires comme *Phoma lingam* (Krause *et al.*, 2006).

Les autres espèces de charançons du colza sont peu menaçantes et ne font pas l'objet de lutte. Par exemple, le cycle larvaire de *A. coerulescens* s'étend au-delà de la récolte et n'affecte que peu le développement du colza (Pilorgé *et al.*, 1997). La figure 4 présente une synthèse des cycles biologiques de ces espèces. Étant donné les biologies bien distinctes de ces espèces, l'institut Terres Inovia souhaiterait une mise à jour des informations (taxonomie, morphologie, biologie) relatives à chacune par l'intermédiaire de fiches illustrées et accessibles en ligne, ceci afin de mieux raisonner la lutte et uniquement autour des espèces menaçantes. De plus, une identification fiable et précoce étant indispensable avant d'envisager toutes mesures, des outils de diagnostic adaptés doivent être développés pour une identification des charançons au stade larvaire.

2.1.4. Un besoin d'alternatives face à des mesures de lutte qui s'essoufflent

Le colza oléagineux est la grande culture qui reçoit le plus de traitements insecticides avec un IFT (Indice de Fréquence de Traitements) de 2,5 en 2011 (Agreste 2014) (figure 5). Les cuvettes jaunes positionnées à hauteur du couvert sont utilisées comme indicateur de pression des ravageurs et permettent le suivi des invasions (Juran, 2011). Le seuil de nuisibilité établi pour *C. obstrictus* est de un individu pour deux plantes alors que face à *C. napi*, la nuisibilité potentielle est telle que seule sa présence constitue un seuil d'intervention (Pilorgé *et al.*, 1997). Pour lutter contre *C. napi*, *C. obstrictus* et *C. picitarsis*, les trois espèces réellement nuisibles, un peu plus d'une vingtaine de matières actives sont disponibles sur le marché (seize pyréthrinoïdes de synthèse, un produit associant néonicotinoïdes et pyréthrinoïdes, trois organophosphorés et deux produits associant organophosphorés et pyréthrinoïdes) (Terres Inovia 2016).

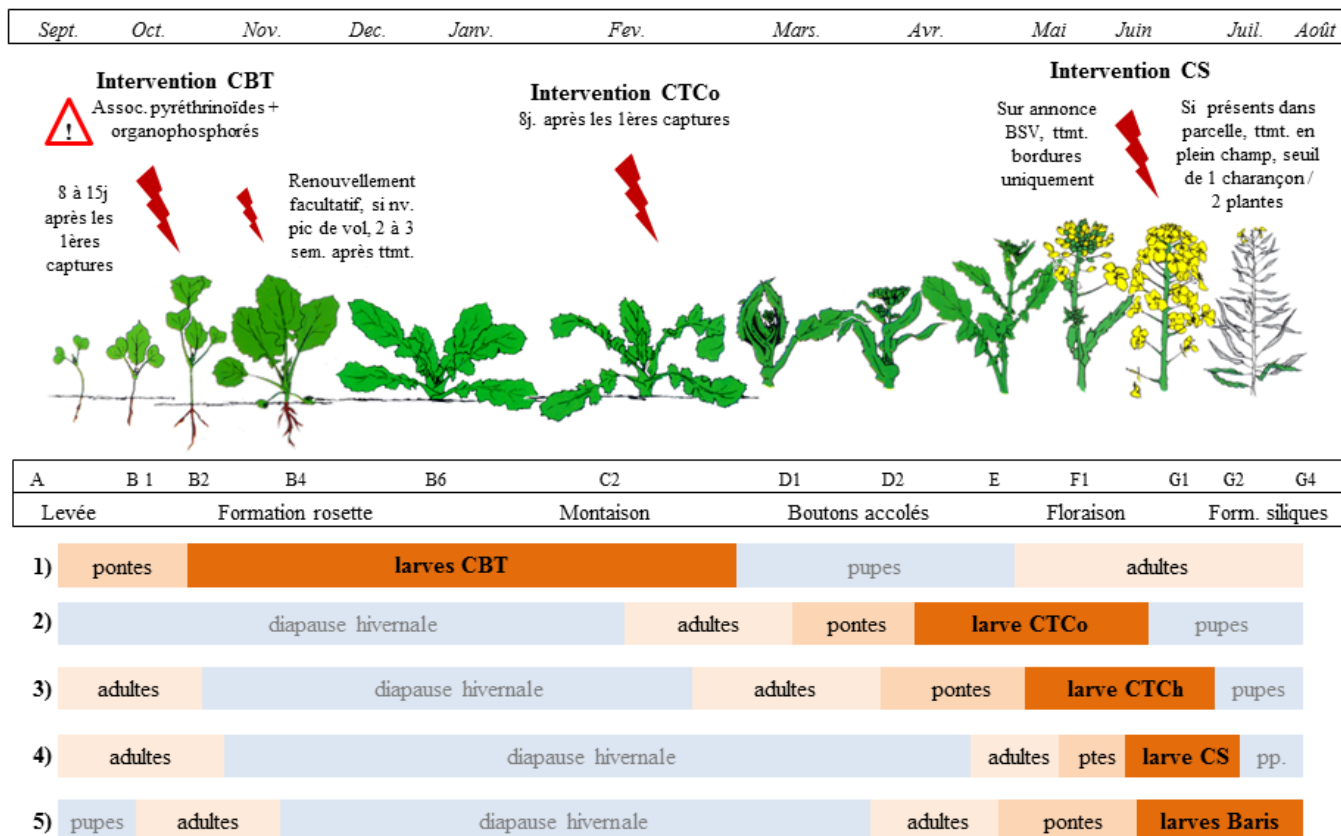


Figure 4 : Synthèses des interventions chimiques au cours du cycle cultural du colza, au regard des cycles biologiques des principaux charançons ravageurs.
 1) *Ceutorhynchus picipitarsis*. 2) *C. napi*. 3) *C. pallidactylus*. 4) *C. obstructus*. 5) *Aulacobaris coerulea*

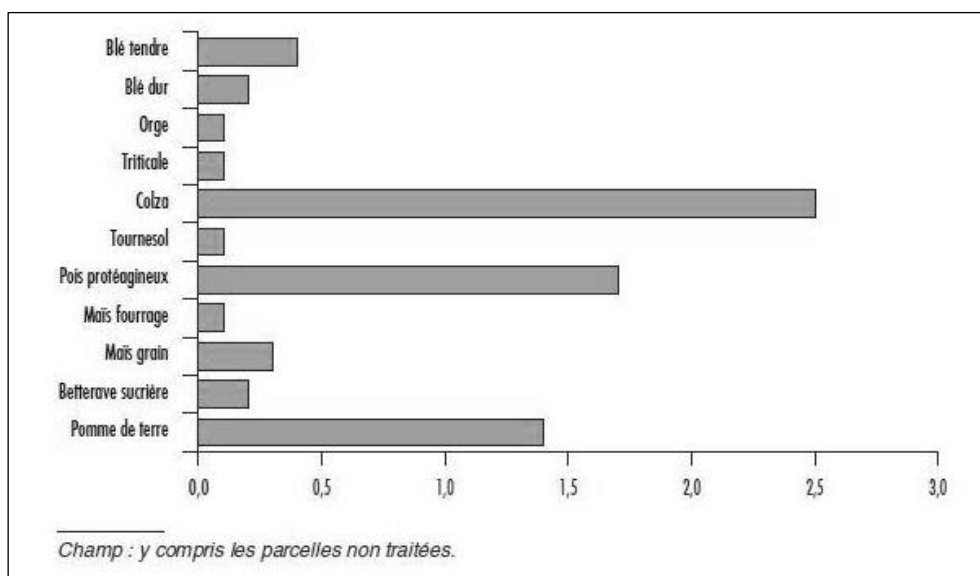


Figure 5 : Indice de Fréquence de Traitement (IFT) insecticide en grande culture.
 IFT insecticide moyen = 0,6. IFT insecticide colza = 2,5.
 (Agrest Statistique Agricole Annuelle, 2011)

Les produits utilisés contre les charançons sont également ceux employés contre les méligèthes, espèces connues pour leur résistance aux pyréthrinoides (Ballanger *et al.*, 2003). De façon prévisible, le monitoring exercé par Terres Inovia a récemment mis en évidence les premiers cas de résistance dite « kdr » de la part des charançons du bourgeon terminal, dans la région Centre, l'Yonne, l'Aube, et le Sud-Ouest de la Marne. Il s'agit d'une résistance par mutation de cible induisant une réduction de la sensibilité aux pyréthrinoides (Robert *et al.*, 2016). Les possibilités d'alternances se faisant de plus en plus restreintes, pérenniser l'utilisation des produits de synthèse s'avère difficile. La figure 4 présente une synthèse des traitements appliqués sur colza au cours du cycle cultural.

Les alternatives se tournent alors vers les stratégies de protection intégrée (Valantin-Morison, 2012). Le décalage des dates de semis est un des leviers qui favorise la désynchronisation entre les stades de sensibilité du colza et le cycle biologique du ravageur (Dosdall *et al.*, 1999; Dosdall & Stevenson, 2005). Le labour perturbe le cycle des insectes au moment de la diapause, en particulier lorsqu'ils la réalisent dans la parcelle (*C. napi*). Le travail superficiel du sol et le semi-direct, qui participe à l'enrichissement du sol en matière organique et à sa modification structurale, encouragerait l'installation d'auxiliaires du type carabes ou staphylins (Holland, 2004). Enfin, l'atténuation de l'impact des ravageurs sur la culture est rendue possible par la gestion de la fertilisation azotée et le choix variétal (Valantin-Morison, 2012). Ces deux facteurs conditionnent l'aptitude de la plante à compenser les dégâts dus aux phytophages (Williams & Free, 1979). Eickermann *et al.* (2011) proposent alors un cultivar plus tolérant aux charançons de la tige du chou. Ces pratiques dont l'efficacité est partielle doivent être raisonnées en harmonie les unes avec les autres (Médiène *et al.*, 2011). La stratégie abordée prioritairement dans cette étude concerne la régulation naturelle des charançons du colza par les hyménoptères parasitoïdes. Elle est présentée comme une alternative à la lutte chimique prometteuse en raison du large complexe d'espèces antagonistes de ces ravageurs.

2.2. HYMENOPTERES PARASITOÏDES, UNE RICHESSE SPECIFIQUE AU SERVICE DE L'AGRICULTURE

2.2.1. Biologie générale des hyménoptères parasitoïdes

Les parasitoïdes sont des organismes qui vivent à l'état larvaire à l'intérieur ou sur leur hôte, bénéficiant ainsi de ressources nutritives, et entraînent finalement la mort de l'hôte. Les larves sont donc parasites alors que les adultes mènent une vie libre. Différents stades de l'hôte peuvent être attaqués : l'œuf (il s'agit alors de parasites oophages), la larve, la nymphe ou l'adulte. L'hôte est affecté de différentes manières suivant le type de développement du parasitoïde. Les femelles des organismes à stratégie de vie koinobionte pondent dans l'hôte quand celui-ci est au stade embryonnaire ou au début de stade larvaire. L'hôte est maintenu en vie et se développe normalement tout au long du cycle larvaire, le parasitoïde ne s'attaquant à lui qu'à partir de la prénymphe. Ces parasitoïdes sont généralement endoparasites ovo- ou larvo-mynphaux et le plus souvent spécialistes. A l'inverse, les organismes idiobiontes pondent en fin de cycle larvaire, le développement de leur larve débutant immédiatement ou peu après la ponte. Les idiobiontes sont en majorité ectoparasitoïdes et très souvent généralistes.

La recherche de l'hôte par la femelle s'opère en deux étapes, d'abord c'est la plante qui est localisée par des indices sensoriels (visuels ou olfactifs), puis c'est l'hôte à l'intérieur même de la plante. Les indicateurs chimiques émis par la plante sont appelés synomones, ils sont reconnus par les parasitoïdes et induisent une réponse à la fois favorable pour le receveur et l'émetteur (Williams & Cook, 2010). Le nature et la volatilité des synomones semblent varier selon l'organe de la plante infecté, orientant le parasitoïde vers son hôte. Les indices sont aussi visuels et tactiles. Par exemple, la femelle détecte l'emplacement de la larve dans une tige en plaçant ses antennes à la surface de la tige, pointant son ovipositeur à proximité des tissus végétaux colonisés. Une fois la larve détectée, elle traverse la paroi végétale de son ovipositeur et laisse un ou plusieurs (superparasitisme) œufs dans l'hôte (Alford, 2003).

Tableau 2 : Hyménoptères parasitoïdes associés aux charançons ravageurs du colza.
Hôtes présentés : *A. coeruleascens*, *M. laticollis*, *C. assimilis*, *C. napi*, *C. obstructus*,
C. pallidactylus, *Meligethes* spp., *Phyllodes* spp

ORDRE	Superfamille	Famille	Genre	Espèce	Hôtes								Références	
HYMÉNOPTÈRE					<i>A. coeruleascens</i>	<i>M. laticollis</i>	<i>C. assimilis</i>	<i>C. napi</i>	<i>C. obstructus</i>	<i>C. pallidactylus</i>	<i>C. picitarsis</i>	<i>Meligethes</i> sp.	<i>Phyllodes</i> sp.	
Ichneumonoidea														
Ichneumonidae														
<i>Aneulid</i>														
				<i>A. melanaria</i> (Holmgren)			X	X			X	X	Aubert & Jourdheuil, 1958 ; Jourdheuil, 1960	
<i>Tersilochus</i>														
				<i>T. obscurator</i> (Aubert)					X				Alford, 2003 ; Barari, 2005	
				<i>T. stenocari</i> Gregor						X			Aubert & Jourdheuil, 1958	
				<i>T. fulvipes</i> (Gravenhorst)			X	X					Aubert & Jourdheuil, 1958 ; Jourdheuil, 1960	
Brachonidae														
<i>Diospilus</i>														
				<i>D. capito</i> (Nees)			X	X	X	X	X	X	Jourdheuil, 1960 ; Williams, 2010	
				<i>D. oleraceus</i> Haliday			X	X	X	X	X	X	Jourdheuil, 1960 ; Williams, 2010	
<i>Microctonus</i>														
				<i>M. melanopus</i> Ruthe			X	X	X	X		X	Jourdheuil, 1960 ; Chen & van Achterberg, 1997 ; Williams, 2010	
Chalcidoidea														
Eulophidae														
<i>Necremnus</i>														
				<i>N. tidius</i> (Walker)			?	?					Gibson <i>et al.</i> , 2005 ; Gebiola <i>et al.</i> , 2015	
Mymaridae														
<i>Anaphes</i>														
				<i>A. declinatus</i> (Soyka)				X					Jourdheuil, 1960	
Pteromalidae														
<i>Mesopolobus</i>														
				<i>M. morys</i> (Walker)				X					Gibson <i>et al.</i> , 2006a ; Kuhlmann <i>et al.</i> , 2006 ; Williams, 2010	
<i>Stenomalina</i>														
				<i>S. gracilis</i> (Walker)			X	X					Klukowski & Kelm, 2000 ; Gibson <i>et al.</i> , 2006a ; Williams, 2010	
<i>Trichomalus</i>														
				<i>T. lucidus</i> (Walker)				X				X	Alford, 2003 ; Gibson <i>et al.</i> , 2006b	
				<i>T. perfectus</i> (Walker)				X					Jourdheuil, 1960 ; Williams, 2010 ; Ferguson <i>et al.</i> , 2000 ; Gibson <i>et al.</i> , 2006a ; Kuhlmann <i>et al.</i> , 2006	
Eupelmidae														
<i>Eupelmus</i>														
				<i>E. messene</i> Walker			X						Fusu, en cours de publication	
				<i>E. vesicularis</i> (Retzius)				X					Alford, 2003 ; Fusu, en cours de publi.	
Eurytomidae														
<i>Eurytoma</i>														
				<i>E. curculionum</i> Mayr		X		X					Fisher, 1965 ; Alford, 2003	

2.2.2. Hyménoptères parasitoïdes de charançons du colza

Le plus gros travail de description des communautés d'hyménoptères parasitoïdes associés aux ravageurs du colza, en France, a été réalisé par Jourdheuil, en 1960. Les ouvrages d'Alford (2003) et Williams (Williams, 2010) ont eux aussi largement contribué à la diffusion des connaissances sur ce sujet à une échelle européenne voire mondiale. Le tableau 2 synthétise les relations hôtes/parasitoïdes en jeu dans cette étude.

Tous ces parasitoïdes sont solitaires et les larves vivent dans la cavité principale de leur hôte (Jourdheuil, 1961). Les parasitoïdes du genre *Tersilochus* sont endoparasitoïdes larvaires, koinobiontes et univoltins. Après émergence, ils effectuent une diapause hivernale à l'intérieur même du cocon de terre initialement fabriqué par le charançon. Aubert et Jourdheuil (1958) ont montré que le taux de parasitisme de *T. fulvipes* sur *C. napi* et *C. pallidactylus* en culture de colza du bassin parisien oscillait entre 73% et 95%, et que celui de *T. stenocari* Gregor avoisinait 70% en 1956 sur *C. picitarsis*. L'efficacité de régulation de *T. fulvipes* (Gravenhorst) est aussi démontrée en Allemagne et Autriche (Ulber 2000, Kraus & Kromp 2002). *Aneucelis melanaria* (Holmgren), *Diospilus capito* (Nees) et *D. oleraceus* Haliday sont des endoparasitoïdes larvaires, koinobiontes, polyvoltins (Aubert, 1958 ; Jourdheuil, 1961). Les espèces univoltines sont très spécifiques de l'hôte alors que les espèces polyvoltines effectuent des alternances d'hôtes saisonnières. Leur fécondité potentielle est donc élevée. *Microctonus melanopus* Ruthe est l'unique espèce connue pour s'attaquer aux charançons adultes. Sa fécondité est faible mais son développement larvaire très rapide ce qui lui permet d'attaquer directement les charançons nouvellement sortis en juillet. Une troisième génération peut émerger en août (Jourdheuil, 1961). Il est donc très efficace face au charançon des siliques, avec un taux de parasitisme atteignant 70% aux États-Unis (Harmon & McCaffrey, 1997). En Europe, il parasite 40 à 50% des adultes de *C. pallidactylus* et *C. assimilis* (Jourdheuil, 1960). Les Pteromalidae, sont des ectoparasitoïdes larvaires probablement polyvoltins généralement plus spécifiques de leur hôte. Plusieurs études rapportent les résultats obtenus par lutte biologique classique au Canada envers *C. obstrictus* à l'aide des Pteromalidae (Chalcidoidea) introduits d'Europe : *Trichomalus perfectus* (Walker), *Mesopolobus morys* (Walker) et *Stenomalina gracilis* (Walker) (Ferguson *et al.*, 2000; Gibson *et al.*, 2006; Gillespie *et al.*, 2006). En Europe, *T. perfectus* est largement distribué et parviendrait à parasiter 70% des larves de charançon des siliques (Murchie *et al.*, 1999). *Anaphes declinatus* est l'une des rares espèces s'attaquant aux œufs, mais en raison de son apparition tardive, seule une faible proportion de charançons des siliques est parasitée (Jourdheuil, 1961). Peu documentés, *Eupelmus vesicularis* (Retzius), *E. messene* Walker et *Eurytoma curculionum* Mayr seraient des parasitoïdes de *C. obstrictus* (Ulber *et al.*, 2010 ; Fusu, en cours de publication). L'efficacité de régulation de ces espèces varie cependant suivant les conditions environnementales et les pratiques agricoles.

2.2.3. Facteurs d'influence du taux de parasitisme

Les mesures de protection intégrée précédemment citées peuvent ne pas convenir à la biologie des parasitoïdes. Le travail du sol par le labour peut réduire jusqu'à 50% le taux d'émergence l'année suivante sur certains Tersilochinae dont la diapause s'effectue dans le cocon de l'hôte. La herse rotative a un effet plus modéré mais l'implantation de jachère reste la stratégie recommandée pour favoriser les populations (Nilsson, 2010). Certains mélanges culturels sont défavorables, l'association colza-blé diminuerait le taux de parasitisme (Hummel *et al.*, 2010). Indéniablement, l'usage des insecticides, en particulier les pyréthriinoïdes, met en péril la survie des parasitoïdes. Une des stratégies de gestion intégrée visant à favoriser la présence de *T. perfectus* serait de raisonner les périodes d'application de produits phytosanitaires pour éviter d'intervenir durant sa période de colonisation dans la culture, soit trois semaines après l'arrivée de *C. obstrictus* (Alford *et al.*, 1996).

Enfin, la compréhension des comportements et phénomènes chimiques en jeux lors de la localisation des parcelles et des ravageurs par les parasitoïdes est nécessaire pour mettre en place des pratiques de gestions intégrées comme la lutte biologique par conservation (Williams & Cook, 2010). Par exemple, le positionnement des cultures dans une rotation doit être réfléchi en considérant l'effet du vent sur la direction des composés volatils émis par la plante, de manière à diriger plus facilement les parasitoïdes en diapause dans l'ancienne parcelle vers la culture en développement. Les stratégies de push-pull sont aussi développées en considérant les indicateurs sensoriels qui peuvent être répulsifs ou attractifs pour l'insecte selon la plante considérée. Semé en mélange au colza ou en pourtour de parcelle, le navet (*Brassica rapa*) réduirait la présence de ravageurs sur le colza par attraction des parasitoïdes, (Cook et al., 2007). La diversité des hyménoptères parasitoïdes observée soutient l'intérêt de développer la lutte biologique par conservation, mais certaines espèces constituent un frein aux études trophiques car leur taxonomie est mal établie.

2.2.4. *Tersilochus* sp. et *Necremnus* sp., des groupes à la taxonomie instable

Pour certains groupes l'identification des espèces par la morphologie est très délicate, voire impossible, en raison de leur proximité. *Tersilochus microgaster* (Szepligeti) et *T. obscurator* (Aubert) sont deux espèces morphologiquement très proches que Barari *et al.* (2005) semblent être parvenus à différencier par une étude intégrative. Les caractères continus discriminant ces deux espèces concernent l'ovipositeur et le revêtement du mésopleure (partie latérale du thorax). Malgré un chevauchement des valeurs entre espèces pour quelques individus, les données moléculaires (gène CO1) et écologiques (hôtes différents) confirmeraient l'existence de deux espèces distinctes. De même, *Necremnus tidius* Walker, longtemps déterminé comme parasitoïde de *C. obstrictus*, fait l'objet d'une diversité cryptique étudiée par une approche taxonomique intégrative (Gebiola et al., 2015). En confrontant les données moléculaires obtenues à partir de plusieurs gènes (mitochondrial : CO1, et nucléaires : 28SD2 et ITS2) et certains caractères morphologiques inédits, il apparaîtrait que le groupe *N. tidius* constitue un complexe de cinq espèces proches. Les données passées relatives à cette espèce ne sont donc plus valides et nécessiteraient d'être actualisées.

Malgré le potentiel du cortège parasitaire antagoniste aux charançons du colza, l'étude des relations trophiques et des facteurs influençant les taux de parasitisme peut être fortement compromise. En effet, l'identification des parasitoïdes ne peut se faire sans l'intervention d'entomologistes spécialistes, voire exige une approche intégrative pour certains complexes d'espèces. Afin de permettre aux instituts techniques, d'actualiser les données faunistiques et de déterminer les variables paysagères et agricoles les plus favorables ; une actualisation taxonomique et un développement d'outils de diagnostic sont nécessaires en amont.

3. IDENTIFICATION D'ESPECES, ENTRE MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

3.1. IDENTIFICATION CLASSIQUE PAR LA MORPHOLOGIE

La taxonomie classique repose sur l'observation de caractères morphologiques diagnostiques pour différencier les espèces. Elle est applicable à la majorité des êtres-vivants et demande peu de moyens, mais nécessite une maîtrise de l'anatomie et une connaissance du groupe étudié. Cependant cette procédure ne permet pas de distinguer les espèces dont la morphologie ne diffère pas de manière évidente (espèces cryptiques) (Bickford *et al.*, 2007) ou, au contraire, risquent de différencier deux espèces là où il s'agit seulement de variation intra-spécifique (Elias & Condamine, 2014).

3.1.1. *Limites et carences des clés dichotomiques*

Idéalement, un outil d'identification correctement établi devrait permettre à son utilisateur d'aboutir à l'assignation d'un nom d'espèce quel que soit son niveau d'expertise (Bruni *et al.*, 2012). Or, les clés d'identification disponibles pour identifier les charançons et les hyménoptères parasitoïdes sont des clés dichotomiques qui reposent sur un vocabulaire complexe spécifique du

groupe taxonomique et de l'auteur, que seuls les taxonomistes spécialistes, malheureusement de moins en moins nombreux, sont aptes à utiliser. Ces outils sont chronophages, et demandent l'observation ordonnée d'une suite de caractères. Si l'un d'entre eux est inaccessible ou inobservable l'identification peut ne pas aboutir. De plus, ces clés ne concernent souvent que le stade imaginal de l'insecte. Cette procédure n'est pas réellement adaptée aux instituts agronomiques, au sein desquels l'identification serait réalisée par des biologistes non entomologistes et sans collection de référence.

3.1.2. Ressources disponibles face aux difficultés

Les clés d'identification polytomiques et interactives, peuvent surmonter certains de ces inconvénients. Construites à partir d'une matrice de caractères renseignée pour chaque espèce, ce type de clé offre à l'utilisateur le choix du critère qu'il souhaite ou est capable d'observer. De plus, les logiciels disponibles, tels que LUCID®, possèdent des fonctions permettant d'organiser les caractères par degré de pertinence, incitant à choisir prioritairement les caractères discriminant un grand nombre d'espèces à la fois. Les clés digitales peuvent inclure des données biologiques (espèces hôtes des parasitoïdes), écologiques ou géographiques, habituellement limitées dans un document imprimé (Bruni *et al.*, 2012). Le numérique apporte des possibilités nouvelles avec l'illustration systématique des caractères proposés clarifiant d'importantes ambiguïtés. Publiée sur le net, ces clés interactives proposeraient une interface plus intuitive et facile d'accès.

3.2. IDENTIFICATION PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE

L'identification par des outils moléculaires est une approche complémentaire, qui peut combler certaines faiblesses de l'identification morphologique (stade de l'insecte, données d'échantillonnage massives, espèces cryptiques) en exploitant la variabilité génétique existant entre espèces.

3.2.1. Méthodes de diagnostic RFLP-PCR

L'une des premières techniques de différenciation d'espèces repose sur l'analyse du polymorphisme entre différents fragments d'ADN digérés par des enzymes de restriction (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism), et préalablement amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) (Wolf *et al.*, 1999). Chaque enzyme, possédant un site de reconnaissance spécifique, sectionne l'ADN à un endroit donné. Grâce à la petite taille des sites de restriction (entre 4 et 6 bp), cette méthode est particulièrement sensible aux modifications nucléotidiques et révèle le polymorphisme du gène cible (Pereira *et al.*, 2008). Elle permet de distinguer deux espèces qui présenteraient des variations au niveau du site de restriction. La migration sur gel des fragments d'ADN, les sépare selon leur poids moléculaire pour obtenir des profils multibandes spécifiques de l'espèce. Cette méthode ne requiert pas de matériel expérimental sophistiqué et peut être utilisée en routine (Ratcliffé *et al.*, 2003). Par exemple, Monti *et al.* (2005) sont parvenus à distinguer des espèces cryptiques du genre *Encarsia*, parasitoïde de l'aleurode. Cependant, elle peut conduire à des identifications erronées lorsqu'une mutation se présente au niveau d'un site de restriction, et présente un risque de faux négatif dans les cas d'inhibition de l'enzyme.

3.2.2. Identification par barcoding moléculaire

Le concept développé par Hebert *et al.* (2003a) propose l'identification d'espèces à partir d'un marqueur unique, nommé barcode, constitué d'une séquence d'environ 650 bp correspondant à l'extrémité 5' du gène de la cytochrome c oxydase 1 du génome mitochondrial. Il est communément employé en lutte biologique comme outil de diagnostic moléculaire pour l'identification des arthropodes (Gariépy *et al.*, 2007) car il présente de nombreux avantages : bonne conservation à travers les ordres et les familles le rendant facilement amplifiable par des amorces universelles, de multiples copies dans les cellules permettant un bon taux d'amplification même sur du matériel dégradé, un taux de mutation relativement élevé et globalement adapté à la distinction entre espèces, même proches, et l'absence d'introns (Galtier *et al.*, 2009).

Le barcoding permet l'assignation d'un nom d'espèce à des spécimens non identifiés mais aussi la découverte de nouvelles espèces (Schindel & Miller, 2005). Ceci repose sur l'hypothèse que la variabilité intraspécifique du gène étudié est inférieure à la variabilité de ce gène entre différentes espèces (Pereira *et al.*, 2008), hypothèse qui peut être discutée voire invalidée (voir 3.2.4.).

Pour pallier à la raréfaction des taxonomistes, le barcoding est devenu un outil de choix fiable et rapide, accessible aux non-spécialistes (Frézal & Leblois, 2008). Il est pertinent dans la mise place de processus itératifs entre études morphologiques et moléculaires lorsqu'il s'agit d'apporter des précisions sur les caractères dans les complexes d'espèces (Page *et al.*, 2005). L'avantage majeur dans le cadre de ce projet est l'identification des stades immatures (Caterino & Tishechkin, 2006), et l'affranchissement de l'élevage des hôtes pour l'étude des relations trophiques hôtes/parasitoïdes.

Cependant, les méthodes de barcoding peuvent être aussi source d'erreurs. Par exemple, elles peuvent surestimer le nombre d'espèces identifiées en raison de la présence des pseudogènes (NUMTs). Ces copies d'ADN mitochondrial non codantes ont été incorporées au génome nucléaire et se trouvent elles aussi amplifiées par les amorces universelles (Song *et al.*, 2008), ayant subi des mutations elles peuvent être interprétées par erreur comme des espèces différentes. De plus, il est admis que les arthropodes hébergent des organismes symbiontes à l'origine de transmission d'ADN ou remplacement de mitochondries (Hurst *et al.*, 1999), ce qui peut conduire également à des erreurs d'interprétation. Enfin, des structurations géographiques peuvent apparaître dans le cas de populations isolées et viendraient biaiser la délimitation des espèces (Hebert *et al.*, 2003), des populations étant ainsi identifiées comme des espèces différentes. La délimitation entre distances intra et interspécifiques est de plus difficile à établir, car dépendante des taxons étudiés. Le seuil établi de 3% initialement par (Hebert *et al.*, 2003) n'est donc pas universel et des erreurs d'assignations peuvent exister si cette valeur limite entre variation intra- et interspécifique n'est pas correctement connue. Généralement, le séquençage multi-locus est indispensable (DeSalle *et al.*, 2005) pour éliminer les incohérences et établir une base de séquences valides et suffisamment représentatives de la diversité spécifique. Au-delà des artéfacts génétiques, l'identification initiale des taxons renseignée sur les bases de données mondiales n'est pas toujours fiable. Par la création d'une base de séquences dédiée, le projet COLEOTOOL s'affranchit des éventuelles erreurs existant dans les bases mondiales (BOLD, GenBank) et assure la fiabilité des barcodes proposés, validés un à un.

3.2.3. Apport des nouvelles méthodes de séquençage

L'apparition des NGS (Next-Generation Sequencing) présente de nombreux avantages et rend, entre autres, possible l'identification de mélanges d'espèces dans un même échantillon par metabarcoding (Gibson *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2012), ce qui dans le cas du présent projet permettrait non seulement l'analyse de contenu de pièges mais aussi une estimation directe des taux de parasitismes et une identification des espèces parasitoïdes (en particulier pour les stades immatures de charançons attaqués par des endoparasitoïdes). Rapides et économiquement appropriées (Shokralla *et al.*, 2015), ces technologies sont cependant très sensibles aux contaminations et à divers artéfacts. Notamment, la création de chimères par recombinaison de séquences non apparentées peut surestimer la richesse spécifique d'un échantillon (Fonseca *et al.*, 2012). Il en va alors du travail du bioinformaticien, qui par un contrôle qualité des séquences doit être en mesure de détecter ces anomalies (Coissac *et al.*, 2012).

3.2.4. Traitement des données de barcoding

L'identification d'un taxon par barcoding moléculaire est basée sur la comparaison des séquences ADN afin de quantifier les divergences entre individus et espèces. Pour cela, il existe des méthodes de reconstruction et des méthodes de délimitation.

L'inférence d'arbres basée ou non sur des modèles évolutifs permet de grouper dans un cluster commun les mêmes espèces. Cette inférence est basée sur le concept monophylétique de l'espèce.

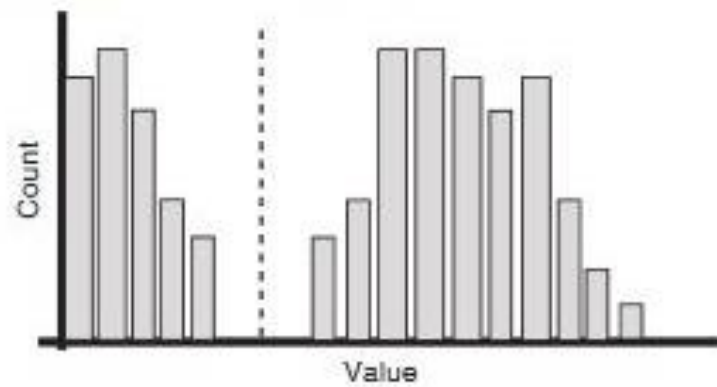


Figure 6 : Distribution des différences entre paires de séquences selon le modèle ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery). Un gap se place entre les séquences peu divergentes, traduisant la variabilité intraspécifique et entre les séquences très divergentes montrant une plus grande variabilité entre les espèces. (Puillandre et al., 2012)

Il s'avère qu'aucune des méthodes utilisées [Neighbor-Joining (NJ), Maximum de Vraisemblance (MV), Maximum de Parcimonie (MP) et approche bayésienne] n'est réellement infaillible. Le NJ se base sur les distances. Il est rapide mais aussi le moins performant pour délimiter les espèces (Little, 2011). Le MP et le MV tiennent compte de l'histoire évolutive des taxons et s'approchent davantage de la réalité mais le MV requiert alors une grosse puissance de calcul. Cependant, pour l'étude d'espèces proches ces modèles proposent des topologies comparables. D'autres méthodes, comme ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery), BIN (Barcode Index Number) (Ratnasingham & Hebert, 2013), TCS (programme informatique) (Clement *et al.*, 2000) se basent sur les distances génétiques (nombre de paires de bases différentes entre deux séquences) pour déterminer le nombre d'OTU (Operational Taxonomic Units) au sein du jeu de données. La méthode statistique ABGD (Puillandre *et al.*, 2012) propose de séparer des espèces putatives sur la base d'un *gap* au sein des distances entre paires de séquences (figure 6) pour s'affranchir d'un seuil universel. Dans ce cas, le gap (correspondant au seuil) est défini en fonction du jeu de données étudié. En effet, l'usage seul du seuil de divergence est très critiqué du fait de sa variabilité entre les groupes (Puillandre *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Chez les Lycaenidae (Lepidoptera) dont la biologie différencie pourtant bien les espèces proches, Wiemers & Fiedler (2007) observent un chevauchement de 18% entre les divergences intra- et interspécifiques portées par le gène CO1. Cependant, Collins & Cruickshank (2012) rapportent que les méthodes qui reposent directement sur la matrice de distance génétique et non sur des modèles évolutifs entraîneraient moins d'erreurs d'interprétation. Ces éléments montrent donc encore les difficultés analytiques pour l'assignation d'une séquence à une identification. Enfin, la méthode CAOS, de moins en moins utilisée, analyse les séquences nucléotidiques en les considérant comme des chaînes de caractères moléculaires (Sarkar *et al.*, 2002). D'après DeSalle *et al.* (2005) cette méthode est plus robuste que l'inférence d'arbres phylogénétiques quand ceux-ci se basent sur un unique marqueur induisant une phylogénie erronée. Globalement, la précision de ces méthodes dépend de la variabilité au sein du groupe (Austerlitz *et al.*, 2009) et de l'âge des espèces, les espèces établies récemment étant plus difficile à délimiter (Dupuis *et al.*, 2012; Kekkonen *et al.*, 2015).

Bien que complexes à traiter et source d'erreurs, les approches moléculaires doivent être perçues comme complémentaires de la taxonomie traditionnelle (DeSalle *et al.*, 2005). L'intégration de donnée multi-locus (Fujita *et al.*, 2012) et le recours à plusieurs modèles de calcul, croisés aux données écologiques et morphologiques fourniraient des résultats plus robustes. C'est ce sur quoi repose la taxonomie intégrative (Schlick-Steiner *et al.*, 2010) qui réconcilie les partisans des différentes approches en intégrant des caractères de différentes natures constituant un faisceau de preuves solides lorsqu'elles convergent vers une même conclusion.

4. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Pour répondre à l'apparition de résistance aux pesticides chez certaines espèces de charançons du colza, et face aux problèmes environnementaux posés par l'utilisation de ces produits, le développement de techniques de lutte alternatives dont fait partie la lutte biologique est indispensable. Les complexes d'espèces nuisibles et auxiliaires sont cependant difficiles à identifier, ce qui constitue un verrou à l'étude de leurs interactions. L'objectif était alors de clarifier les ambiguïtés pouvant exister pour certains complexes d'espèces afin de fournir des outils de reconnaissance fiables et utilisables en routine à destination de Terres Inovia à la fois morphologiques et moléculaires pour les espèces de ravageurs et leurs parasitoïdes.

Des clés polytomiques ont été conçues pour répondre aux besoins des praticiens de terrain des instituts agricoles et la diffusion des outils via les bases du CBGP (Arthemis) et de l'INRA (E-phytia) doit permettre de les rendre plus facilement accessibles, et participera à l'actualisation des connaissances de ces groupes par l'intermédiaire de fiches pédagogiques.

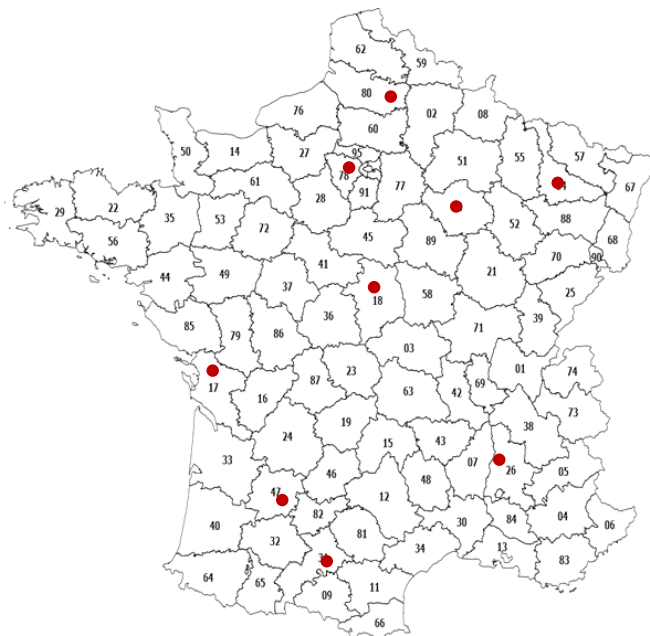


Figure 7 : Localisation des parcelles de colza échantillonnées par Terres Inovia entre 2014 et 2016.

Tableau 3 : Espèces pour lesquelles l'observation de spécimens de référence a été nécessaire.

Espèce	Description	Conditions d'observation	Centre de conservation	Date d'observation	Observateurs
<i>Ceutorhynchus assimilis</i> <i>Ceutorhynchus napi</i> <i>Ceutorhynchus obstructus</i> <i>Ceutorhynchus pallidactylus</i> <i>Ceutorhynchus picitarsis</i> <i>Aulacobaris coerulescens</i> <i>Melanobaris laticollis</i> <i>Aulacobaris chlorizans</i> <i>Aulacobaris cuprirostris</i>	A. Hoffmann, 1954	Salle visiteur du MNHN de Paris	MNHN de Paris	15/02/2016	M. Ollivier
<i>Phradis morionellus</i> <i>Aneuclis incidens</i> <i>Aneuclis melanaria</i> <i>Tersilochus heteroceris</i> <i>Tersilochus fulvipes</i> <i>Tersilochus stenocari</i> <i>Tersilochus obscurator</i>	J. F. Aubert, 1958	Laboratoire du CBGP	Musée zoologique de Lausanne	04/2016 – 09/2016	M. Ollivier G. Delvare

Tableau 4 : Clés d'identification utilisées dans le cadre du projet COLOETOOL

Nom de la clé	Référence
Faune de France des Curculionidae	Hoffmann, 1954
Nouvelle description et biologie de quelques Ichneumonides appartenant aux genres <i>Aneuclis</i> Forst., <i>Isurgus</i> Forst. et <i>Thersilochus</i> Holm.	Aubert & Jourdeuil, 1958
The genera of Ichneumonidae	Townes, 1971
Illustrated key to West-palaearctic genera of Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea)	Boucek & Rasplus, 1991
Key parasitoids of the pests of oilseed rape in Europe: a guide to their identification	Ferguson et al, 2010
Clés de détermination des superfamilles et principales familles d'hyménoptères du monde	G. Delvare, en cours de publication

Deuxième partie : Matériel et Méthodes

1. ECHANTILLONNAGE

Une campagne d'échantillonnage, dont Terres Inovia a eu la responsabilité, a été effectuée afin d'actualiser les données relatives à ces complexes d'espèces. Le projet CASDAR COLEOTOOL ayant été initié en janvier 2014, les collectes ont été réalisées à la fin de l'hiver, au printemps, en été et à l'automne des années 2014 et 2015, ainsi qu'au printemps 2016. Ces trois périodes d'échantillonnage tiennent compte de la biologie des ravageurs et de leurs ennemis naturels. Ainsi, la première période de collecte a débuté le 26 janvier 2014 et s'est terminée le 12 décembre 2014. La deuxième période de collecte a eu lieu du 28 janvier 2015 au 11 décembre 2015, et la dernière du 4 janvier 2016 au 22 avril 2016. Les parcelles prospectées sont représentatives des principales zones de production du colza. Il s'agit de parcelles situées en périphérie des stations Terres Inovia (TI) de Mons (80), Grignon (78), Subdray (18), Surgères (17), Troyes (10), Nancy (54), Etoiles-sur-Rhône (26), Agen (47), et Bazièges (31) (Figure 7).

Afin de récupérer une plus grande diversité d'espèces de charançons et d'hyménoptères parasitoïdes, les échantillonnages ont été réalisés à la fois au sein de la parcelle de colza mais également aux abords, sur les brassicacées sauvages. En complément des points de collectes mis en place par Terra Inovia, le CBGP a effectué des piégeages occasionnels lors de prospections terrain relatives à des projets annexes, en périphérie de Montpellier (Nîmes).

L'échantillonnage a été effectué selon deux méthodes :

(i) L'élevage des spécimens au laboratoire à partir du prélèvement d'organes infectés de la plante, permet le suivi des émergences et l'assurance des bonnes relations entre espèces d'hôtes et de parasitoïdes. Les œufs et les larves de charançons ont été prélevés et mis en élevage. Un passage au froid fut parfois nécessaire pour simuler la diapause hivernale. Après émergence les spécimens obtenus, charançons ou hyménoptères parasitoïdes, ont été récupérés en tenant compte de l'organe végétal qu'ils avaient infesté.

(ii) Le piégeage de masse en parcelle et aux abords, par l'intermédiaire de pièges type assiettes jaunes, tentes malaises, ou par fauchage, fut mis en place afin de pallier à l'éventuel échec d'élevage des spécimens.

Les spécimens ont été transférés dans l'alcool à 96% et envoyés au CBGP pour identification. Un tableur Excel accompagne les tubes d'échantillonnages, il spécifie pour chaque échantillon : le code de l'échantillon, le lieu de prélèvement de l'échantillon (pays, département, lieu-dit, coordonnées GPS), la plante hôte et l'organe prélevé ou le piège utilisé, le collecteur et la date de récolte.

2. IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE ET ELABORATION D'UNE COLLECTION DE REFERENCE

L'ouvrage d'Hoffmann sur les Curculionidae, datant de 1954, est la référence pour identifier les charançons de France. Une mission au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris a été effectuée afin d'étudier la collection de référence ayant servi à rédiger cet ouvrage. Pour les hyménoptères, l'observation des spécimens du muséum de Lausanne a aussi été nécessaire lors du travail d'identification. Le tableau 3 présente les espèces qui ont fait l'objet de ces vérifications. L'identification des spécimens s'est ensuite appuyée sur les clés de détermination et ouvrages présentés par le tableau 4, mais également sur les informations disponibles dans les bases : Fauna Europea (base de données zoologique européenne), Taxapad (Yu *et al.*, 2012) (base dédiée aux Ichneumonoidea), Universal Chalcidoidea Database (base de données du Muséum de Londres spécifique des Chalcidoidea) et Curculio Institute (centralisant les études sur les Curculionidae de l'Ouest Paléarctique). Enfin, des spécimens des collections du CBGP (collection Guardet et collection Phalip) ont été sélectionnés pour s'y référer durant le travail d'identification.

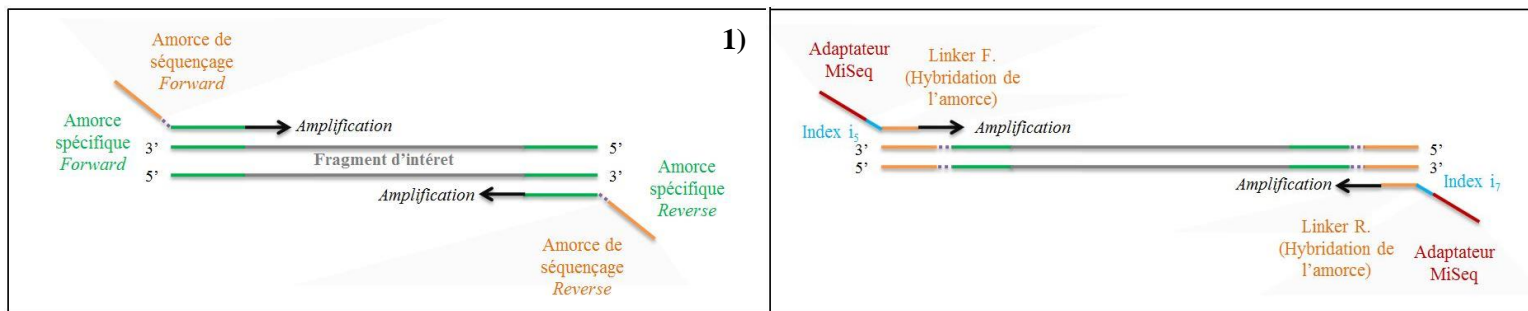


Figure 8 : Détail des deux PCR réalisées sur le gène CO1. 1) Amplification du fragment ciblé. 2) Ajout des adaptateurs Illumina et indexation de l'échantillon. (Adapté de A. Cruaud)

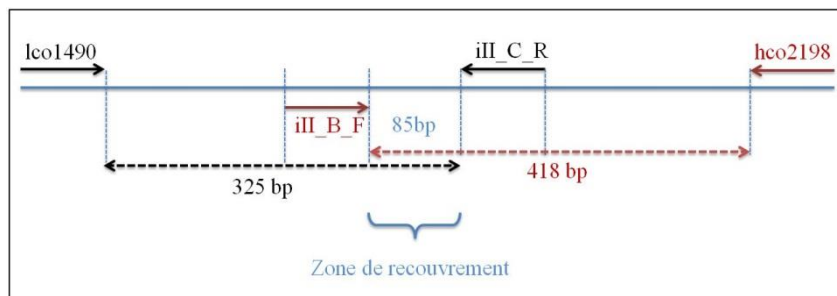


Figure 9 : Représentation de la zone de recouvrement permettant d'obtenir une bonne reconstitution du gène cible par séquençage Illumina. (Adapté de A. Cruaud)

Tableau 5 : Amorces de la PCR 1 et cycle PCR associés. (D'après le protocole de P. Cruaud, 2015)

Nom du primer	Fragment	Référence	Séquence de 5' en 3'	Cycle PCR
Lco11490	FC	(Folmer et al., 1994)	GGTCAACAATCATAAAGATATTGG	95°C 15min ; 35* (94°C 40s, 48°C 60s ; 72°C 30s) ; 72°C 5min
iII_C_R		(Shokralla et al., 2015)	GGIGGRTAIAICIGTTCAICC	
iII_B_F	BR	(Shokralla et al., 2015)	CCIGAYATRGCITYCCICG	95°C 15 min ; 35* (94°C 40s, 46°C 60s ; 72°C 30s) ; 72°C 5min
Hco2198		(Folmer et al., 1994)	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	

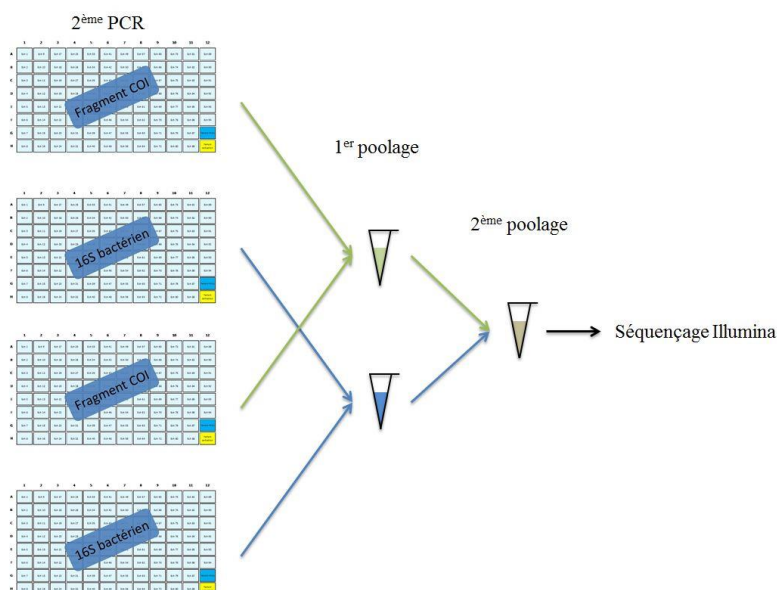


Figure 10 : Etapes de poolages après amplification permettant de constituer l'échantillon à séquençer. (Adapté de P. Cruaud, 2015)

Les échantillons d'élevage (603 échantillons sur 771) ont été identifiés en priorité car plus informatifs pour l'étude. Une partie des échantillons a été traitée avant mon arrivée, entre 2014 et mars 2016, par les entomologistes du CBGP : Gérard Delvare, spécialiste des hyménoptères parasitoïdes, Eric Pierre, Jean Claude Streito et Christian Cocquempot pour l'identification des Curculionidae. J'ai ensuite pris en charge les échantillons restants (environ 37%), aidée des ouvrages cités et d'une rapide formation aux hyménoptères parasitoïdes par G. Delvare. L'identification a parfois nécessité l'observation des caractères mâles et femelles par dissection.

Une fois les identifications morphologiques effectuées, un tableur Excel comprenant les informations suivantes a été établi : ordre, famille, genre et espèce du(des) spécimen(s), identificateur, date d'identification, nombre de mâles et de femelles de l'espèce dans le tube.

Des collections de spécimens ont été réalisées, à destination de Terres Inovia et du CBGP. Pour les espèces les plus abondantes, 4 individus par espèces, 2 mâles et 2 femelles, ont été mis en collection.

3. IDENTIFICATION MOLECULAIRE ET VALIDATION DES TAXONS

3.1. SEQUENÇAGE DU GENE CO1

Pour déterminer au mieux la variabilité intraspécifique tout en prenant en compte les aspects coûts et temps, au moins 10 spécimens pour les espèces abondantes et l'ensemble des individus des espèces rarement échantillonnées ou douteuses au niveau de leur identification, ont été séquencées. Les 10 spécimens ont été choisis en tenant compte de l'éventuelle variabilité génétique liée à la répartition géographique des espèces considérées. Le fragment de l'extrémité 5' du gène CO1, correspondant au barcode universel défini par le Consortium for Barcode of Life (Hebert *et al.*, 2003) a été utilisé.

Afin de soulager G. Genson, technicienne en biologie moléculaire, dans ses manipulations, je suis intervenue dans les opérations d'extraction et d'amplification ADN des échantillons de séquençage. Le protocole suivi a été élaboré par Perrine Cruaud (2015). L'extraction ADN a été réalisée sur plaque d'extraction QIAGEN de 96 puits, à l'aide du kit (DNeasy Blood and Tissue Kit). Sur la plaque ont été laissés 2 puits vides pour les contrôles négatifs d'extraction puis d'amplification. Le séquençage a été réalisé par NGS (Next Generation Sequencing) et la technologie Illumina.

L'amplification du gène cible avant séquençage a requis deux PCR (Figure 8). La première a permis l'amplification du gène, à l'aide d'amorces spécifiques du gène d'intérêt. La deuxième PCR a permis l'indexation des échantillons, et ainsi la réassignation des séquences obtenues à leur échantillon d'origine. Les amorces de la deuxième PCR comportent alors (de 5' en 3') un adaptateur MiSeq permettant la fixation des amplicons à la plaque de séquençage, un index de 8 nucléotides, et une partie de l'amorce de séquençage pour hybridation aux amplicons de la première PCR. Le gène d'intérêt CO1 s'étend sur 658bp, cependant la technologie de séquençage haut débit ne peut s'appliquer que sur des amplicons de 350bp maximum. Le gène a donc été amplifié en deux fragments (fragment BR de 325 bp et fragment FC de 418 bp), grâce à l'élaboration d'amorces spécifiques de régions internes du gène. Une région de recouvrement de 85bp aide lors du traitement de séquences à reconstituer le gène dans son ensemble (Figure 9). Les amorces PCR utilisées sont renseignées dans le tableau 6. Après chaque PCR, une électrophorèse sur gel d'agarose (migration de 20min à 100V sur gel à 1.5% d'agarose) a permis de vérifier l'amplification du gène cible.

La préparation des échantillons pour le séquençage est divisée en deux étapes (figure 10). Les NGS permettant le traitement de nombreux échantillons, les gènes (certains mitochondriaux, d'autres nucléaires) de 776 spécimens ont été séquencés dans un même run (dont environ 300 spécimens COLEOTOOL). La première étape a donc consisté à rassembler tous les échantillons d'un même gène. Après, purification, (kit PCR Clean-up Gel extraction), et quantification des produits PCR par PCR Q (kit KAPA Library Quantification) les échantillons ont été regroupés une seconde fois.

Ainsi les différents sous-pools ont été rassemblés en un échantillon unique. Suivant le nombre d'amplicons estimés par PCR Q, les volumes ont été prélevés en respectant une proportion équivalente d'amplicons pour chaque gène dans le dernier pool. La *Library* ainsi constituée a pu être envoyée à la plateforme de séquençage.

Dans le cas la technologie Illumina (Illumina, 2016), le séquençage a débuté par l'hybridation des amplicons sur la cellule, recouverte d'oligonucléotides complémentaires des adaptateurs. Le fragment se courbe ensuite de façon à s'hybrider aux deux extrémités et il est amplifié (« bridge amplification »). Le brin « forward » et le brin « reverse » se dénaturent et l'opération est répétée. Une multitude de copies est ainsi obtenue pour chaque fragment. Chaque nucléotide étant marqué par fluorescence, l'excitation laser provoque un signal optique correspondant à la base en cours d'incorporation à la séquence complémentaire. La longueur d'onde et l'intensité du signal caractérisent le nucléotide. Le nombre de cycle détermine la longueur de la séquence obtenue. Ces séquences sont plus ou moins courtes et contiennent des régions similaires qui permettent de reconstituer le gène dans son intégralité. Le nombre de séquences caractérisant une région donnée du gène détermine la profondeur de séquençage alors que la proportion du gène couvert par le séquençage définit la couverture.

3.2. TRAITEMENTS DES DONNEES ET INFERENCE D'ARBRES PHYLOGENIQUES

Préalablement à l'inférence d'arbres phylogéniques, un contrôle qualité des données brutes a été réalisé grâce au pipeline bioinformatique, élaboré par Astrid Cruaud. Les fragments BR et FC ont été traités séparément et assemblés seulement en fin de traitement. Afin d'éviter la conservation des chimères (recombinaisons de fragments non apparentés) dans le jeu de données, les amorces situées de part et d'autre de la séquence ont été vérifiées, puis retirées pour ne conserver que le gène d'intérêt. Les séquences inférieures à 200 bp ont ensuite été supprimées. Pour chaque spécimen une multitude de séquences a été obtenue. Les séquences parfaitement identiques ont été regroupées, et comparées les unes aux autres pour former des groupes (appelés « swarm ») dont les séquences divergent au maximum d'une paire de bases. Ceux contenant moins de 10 séquences ont été retirés. Enfin, les séquences contenant des gaps non multiples de 3 (non codants) ont été éliminées. La dernière étape de traitement bioinformatique concerne la reconstitution du gène complet à partir des deux fragments.

Les séquences complètes ont été alignées grâce au programme MUSLCE, dans le logiciel Geneious® et traduit selon le code génétique mitochondrial des invertébrés. L'identification du cadre de lecture a permis la recherche des codons stops (indicateurs de pseudogènes) non détectés par le contrôle qualité, et ces séquences ont été supprimées. Une observation méticuleuse des séquences a permis de déceler les plus aberrantes (variation de nombreux nucléotides). Lesquelles ont été comparées aux séquences de la base GenBank par BLAST et éliminées si elles ne concernent pas les groupes étudiés (contaminations par symbiotes ou dues aux manipulations). Quelques séquences obtenues par séquençage SANGER au début du projet COLEOTOOL ont été ajoutées au jeu de données et alignées suivant le même mode opératoire.

Les phylogénies ont été reconstruites sous CIPRES Science Gateway V. 3.3® (portail informatique d'inférence phylogénétique) (Miller et al., 2010). Le modèle RAXML-HPC2 on XSEDE (basé sur le modèle de substitution GTRGAMMA) a été utilisé en raison de ses performances et de la cohérence des résultats obtenus chez les arthropodes (Astrid Cruaud com. pers.). Le logiciel recherche l'arbre dont la topologie est la plus vraisemblable étant donné les séquences étudiées et le modèle d'évolution. La robustesse des nœuds de l'arbre a été évaluée par bootstrap. Cette technique consiste à estimer la proportion d'arbres obtenus présentant une même topologie alors qu'ils sont issus d'un ré-échantillonnage à partir du jeu de données initial (Pattengale et al., 2010). 500 itérations ont été réalisées pour chaque topologie. Les clusters ont été considérés bien soutenus pour une valeur de bootstrap supérieure à 70%.

Les groupes externes permettant l'enracinement de l'arbre ont été choisis en fonction des résultats de séquençage et seront présentés en troisième partie. L'annotation de l'arbre (identifiant de l'échantillon d'origine, nom de taxon putatif et origine géographique) et l'affichage des bootstrap et de l'échelle a été réalisé avec le logiciel TreeDyn®.

3.3. VALIDATION DE SEQUENCES ET DELIMITATION D'ESPECES

Selon la topologie de l'arbre inféré, un retour à l'observation du voucher a été nécessaire pour certains spécimens dont l'identification morphologique est contradictoire aux données moléculaires. Quelques séquences des mêmes taxons provenant de BOLD ont été ajoutées au jeu de données avant d'inférer un second arbre selon les mêmes paramètres. Dans l'hypothèse où elles sont correctement identifiées sur BOLD, ces séquences viennent soutenir nos identifications et valider nos séquences. Étant donné la disponibilité des données sur les groupes étudiés, l'ajout de séquences BOLD n'a été possible que pour les charançons du colza.

La méthode ABGD (Puillandre *et al.*, 2012) a été utilisée, via le lien <http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/> pour confirmer le nombre d'espèces ou discuter les éventuelles espèces cryptiques mises en évidence par l'inférence phylogénique. Elle permet de séparer les espèces hypothétiques sur base d'un *gap* au sein des distances entre paires de séquences qui est défini en fonction du jeu de données étudié.

Enfin, dans le cas d'espèces difficiles à délimiter, une matrice des distances a été construite avec le modèle de Kimura à deux paramètres, qui assume que les transitions surviennent avec une fréquence plus élevée que les transversions comme c'est le cas pour l'ADN mitochondrial. La matrice a permis le calcul des valeurs de divergences génétiques inter et intraspécifiques aidant à résoudre certains cas complexes. Dans ce cas également, la comparaison des vouchers aux spécimens de collection de référence a été nécessaire, notamment chez les Tersilochinae.

4. ANALYSE DES DONNEES FAUNISTIQUES

Les noms des espèces obtenus par identification morphologique ont été comparés aux résultats des analyses moléculaires afin de conduire à la validation des taxons et des séquences. Un pourcentage d'erreur a pu être calculé entre les identifications morphologiques et les identifications moléculaires. En tenant compte de ce taux d'erreur, une liste des espèces présentes dans les parcelles prospectées a été dressée et analysée. Ceci en vue d'actualiser les connaissances sur ces complexes dans les agrosystèmes cultivés.

5. CREATION DES CLES DIGITALES ET DIFFUSION DES OUTILS

5.1. CHOIX DE CARACTERES PERTINENTS

Le choix des caractères discriminant les espèces au sein du groupe de charançons ravageurs du colza et du groupe d'hyménoptères parasitoïdes dépend des résultats morphologiques et moléculaires ayant permis de valider les taxons. Les caractères retenus seront présentés et discutés dans la troisième partie de ce rapport. Les caractères communs à l'ordre ne sont pas mentionnés comme caractères discriminants de la clé mais sont énoncés en préambule de son lancement. En revanche, certains caractères de la famille sont des caractères conditionnels au déploiement du reste de la clé. (Ex : pour identifier les charançons du colza, il est nécessaire de commencer par préciser si la tête est prolongée d'un rostre ou non et si les antennes de l'insecte observé sont coudées ou linéaires.) Cette mesure évite qu'une identification aboutisse alors qu'il s'agirait d'un taxon extérieur au groupe étudié mais présentant les mêmes caractéristiques pour les caractères observés. Le choix des caractères discriminant les espèces repose sur les clés de détermination présentées dans le tableau 4, mais également sur des observations à la loupe binoculaire permettant de déterminer des caractères inédits pour les espèces cryptiques mises en évidence par la topologie de l'arbre phylogénétique ou les espèces difficiles à distinguer malgré les caractères existants.

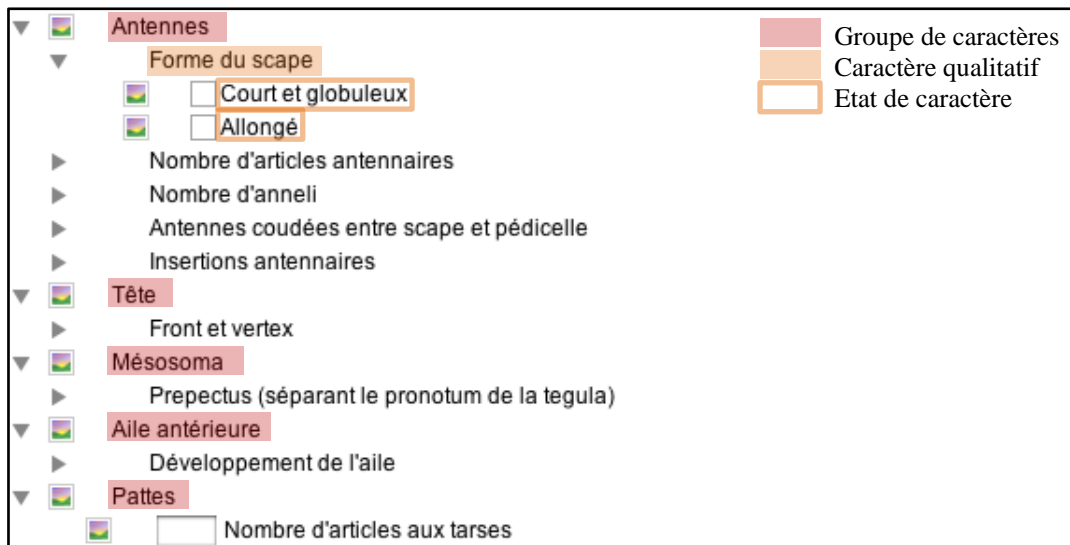


Figure 11 : Groupement des caractères permettant leur organisation selon la morphologie de l'insecte. (D'après la clé des hyménoptères parasitoïdes)

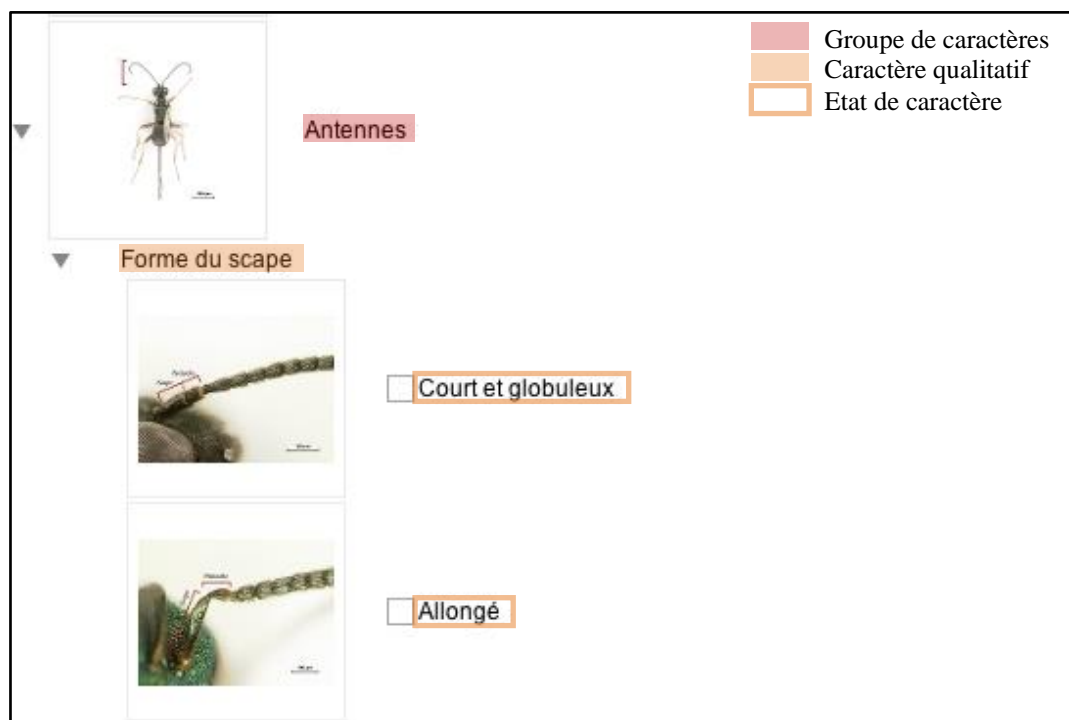


Figure 12 : Illustrations des groupes de caractères, caractères ou états de caractères. (D'après la clé des hyménoptères parasitoïdes)

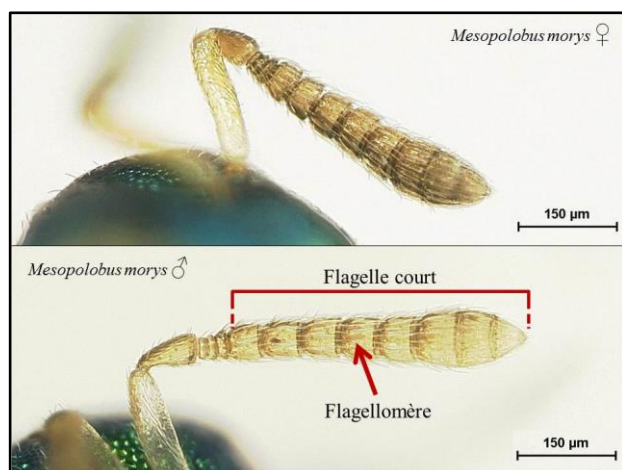


Figure 13 : Exemple de polymorphisme sexuel chez *Mesopolobus morys*.
 Caractère : flagelle antennaire.
 Etat de caractère : court (flagellomères transverses, plus larges que longs, de façon plus évidente chez la femelle que chez le mâle.). Par opposition à un flagelle antennaire allongé. (D'après la clé des hyménoptères parasitoïdes)

LUCID® est le logiciel retenu pour la création d'une clé digitale polytomique. Celle-ci présente l'avantage majeur de laisser le choix à l'utilisateur du caractère qu'il peut ou souhaite observer et permet d'intégrer des informations biologiques comme l'espèce hôte pour les parasitoïdes. À un stade avancé de la détermination, une fonction de LUCID indique le(les) caractère(s) à observer qui est(sont) le(les) plus directs pour distinguer les 2 ou 3 espèces restantes.

L'implémentation des caractères dans l'outil de construction de clé LUCIDbuilder® donne lieu à une matrice, qui a nécessité le renseignement de l'intégralité des états de caractères pour chaque espèce, nuancée par la possibilité de scorer les états de caractères. Ex : Un hyménoptère Pteromalidae, ne possédant pas d'aile antérieure à nervation développée, sera scoré « non observé » pour l'état de caractère « présence de la nervure 2m-cu ». Une fois la liste des caractères établie pour toutes les espèces considérées, une observation exhaustive a été effectuée sur chaque individu. Dans l'éventualité d'un polymorphisme sexuel, mâle et femelle de chaque espèce ont été évalués. Le groupement des caractères a permis l'élaboration d'une clé adaptée à la morphologie de l'insecte, respectant du haut vers le bas, la hiérarchie tête-thorax-abdomen (figure 11).

5.2. REALISATION DES CLICHES ET INTEGRATION DES ILLUSTRATIONS

Les clichés ont été réalisés à partir des spécimens collectés pendant le projet COLEOTOOL, des spécimens provenant des collections du CBGP, des collections personnelles de J. Haran et de G. Delvare et des collections du muséum de Lausanne. Le plateau technique d'imagerie du CBGP dispose du système Entovision® pour l'acquisition et le traitement d'images numériques. Les photographies multiplans ont été réalisées à partir d'un microscope Leica Z16 APO A (grossissement optique x0.5 à x2) surmonté d'une caméra JVC tri CCD (grossissement numérique x0.5 à x50), reliés à un ordinateur. Les logiciels Cartograph® (assemblage de piles multifocales) et Archimed® (post-traitement et annotations) de chez *Microvision Instruments* ont été employés de manière complémentaire, afin d'obtenir les clichés définitifs et de figurer les traits d'échelle. Un post-traitement sous Photoshop® et PowerPoint® a permis la correction des contrastes, l'ajout de légendes et d'indications fléchées pour la mise en évidence des organes à observer.

Les illustrations ainsi obtenues ont été intégrées à la clé, pour une rapide visualisation du caractère à évaluer (figure 12). Si un caractère présente un degré de variabilité chez une même espèce (polymorphisme sexuel) l'illustration associée met en évidence les différents cas possibles de ce polymorphisme sur une même image (exemple figure 13).

5.3. DIFFUSION DE L'OUTIL

L'extraction de la clé via LUCIDbuilder® donne accès à un dossier comprenant : les éléments constitutifs de la clé, le module LUCIDplayer® pour son utilisation, et une page html dédiée à son ouverture. En raison d'une mise à jour de JAVA, une modification du fichier Applet de LUCIDplayer®, a été nécessaire afin que la nouvelle version de JAVA soit correctement utilisée par le module de LUCIDplayer®.

Un serveur web a été ouvert sur le site du CBGP pour l'hébergement de la clé en ligne. Le site est actuellement en cours de configuration et permettra un accès gratuit à la clé. Cependant son lancement nécessite la configuration de Java® par l'ajout d'une exception aux pages sécurisées. La procédure pour permettre à la clé de s'exécuter est accessible via le lien ci-dessous :

http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/wikis/parcinfo/doku.php?id=faites_le_vous-meme:application:application_metier:lucid

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

Tableau 6 : Champs renseignés dans les fiches synthèses des charançons et hyménoptères parasitoïdes consultables sur Arthemis.

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

6. CONCEPTION DE FICHES PEDAGOGIQUES

Lors du comité de pilotage du 11 mai 2016, réunissant les acteurs du projet, la liste des espèces et des champs à aborder dans les fiches a été définie. Synthétiques et complètes, elles développent pour chaque espèce de charançons et parasitoïdes les points présentés par le tableau 6. Les descriptions morphologiques (diagnoses) proviennent d'une extraction de la matrice des caractères, fournies par le logiciel LUCIDbuilder®. Elles ont été traduites en anglais, vérifiées et complétées par observation des spécimens avant leur intégration dans les fiches. Les illustrations concernant les habitus des spécimens ont été réalisées à partir du matériel disponible au CBGP (voir partie 5.2.). Elles rendent immédiatement visibles les caractères majeurs discernant les genres, voire les espèces. Trois sorties sur le terrain, dans l'Hérault et le Tarn, ont été réalisées les 12 avril, 28 avril et 10 mai 2016 afin d'observer et photographier les dégâts provoqués par les larves de charançons à cette période. Terres Inovia a également contribué à l'apport d'illustration des symptômes.

Ces fiches ont été mises en ligne via deux plateformes :

- Arthemis, qui regroupe l'ensemble des espèces de charançons et hyménoptères parasitoïdes et où les fiches sont rédigées en anglais.
- E-phytia, qui présente les ravageurs uniquement par des fiches en français.

Sur ces fiches devraient figurer également les liens vers les clés d'identification digitales. De plus, Arthemis contient les barcodes de références interrogeables par Blast.

Troisième partie : Résultats et discussion

1. IDENTIFICATION DES CHARANÇONS DU COLZA ET DE LEURS HYMENOPTERES PARASITOÏDES

1.1. IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE

1.1.1. Identification morphologique des charançons du colza

Sur 771 échantillons reçus au CBGP, 603 sont des échantillons d'élevage, dont 518 ont été soumis à identification. Sur les trois années de campagne, 5 des 7 espèces de charançons nuisibles au colza ont été collectés et identifiés sur des critères morphologiques : *Aulacobaris coerulescens* (31 individus), *Ceutorhynchus napi* (216 individus), *C. obstrictus* (642 individus), *C. pallidactylus* (602 individus) et *C. picitarsis* (603 individus) ; soit un total de 2094 charançons. Aucun *Melanobaris laticollis*, ni de *C. assimilis* (charançon gallicole) n'ont a priori été récupérés. Le tri de quelques échantillons de piégeage a permis de récupérer des exemplaires complémentaires de *A. coerulescens* (262 individus), *C. napi* (214 individus), *C. obstrictus* (492 individus), *C. pallidactylus* (41 individus), *C. picitarsis* (25 individus) et *C. typhae* (5 individus) mais aucune des espèces manquantes n'a été trouvées. *C. typhae* a été choisi pour séquençage en plus des 5 espèces nuisibles obtenues d'élevage pour que la base de données de référence recouvre un maximum de charançons inféodés au colza susceptibles de se retrouver dans les pièges.

1.1.2. Identification morphologique des hyménoptères parasitoïdes

De même, environ 800 parasitoïdes, ont été déterminées morphologiquement (parfois seulement jusqu'au genre). Parmi eux des parasitoïdes de charançons : *Anaphes* sp. (1 individu), *Tersilochus* sp. (68 individus), *T. obscurator* (300 individus), *Diospilus* sp. (2 individus), *Diospilus capito* (8 individus), *D. oleraceus* (2 individus), *Necremnus hippia* (3 individus), *Mesopolobus morys* (27 individus), *Stenomalina gracilis* (11 individus), *Trichomalus* sp. (1 individu) et *T. perfectus* (17 individus) ; et d'autres parasitoïdes a priori non émergents de charançons : *Phradis* sp. (2 individus), *T. caudata* (355 individus), *Ompahle clypealis* (2 individus) et *Aprostocetus* sp. (4 individus). Aucun spécimen de *Trichomalus lucidus*, *Microctonus melanopus*, *Eupelmus vesicularis* ou *Eurytoma curculionum* n'ont a priori été rencontrés, mais d'autres exemplaires du genre *Anaphes* (3 individus) ont été récupérés des échantillons de piégeage. Toutes les espèces obtenues ont été séquencées.

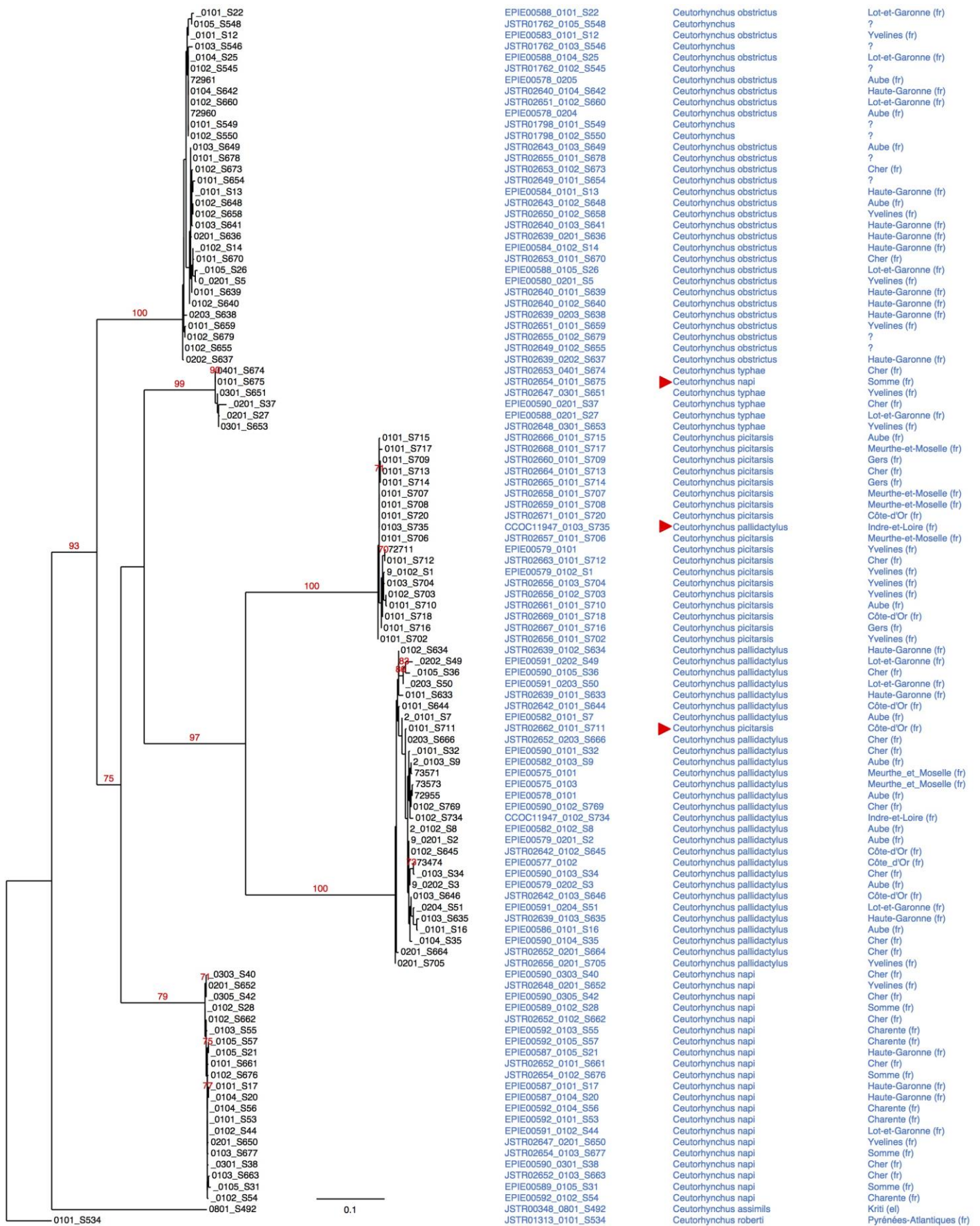


Figure 14 : Phylogramme des relations entre huit espèces de *Ceutorhynchus* obtenu par Maximum de Vraisemblance à partir des gènes mitochondriaux (CO1). Les supports des nœuds sont indiqués par les valeurs de bootstrap > 70%.

1.2. IDENTIFICATION MOLECULAIRE

1.2.1. Identification moléculaire des charançons du colza

1.2.1.1. **Contrôle qualité des séquences**

Le gène CO1 de 131 charançons du projet COLEOTOOL a été séquencé, mais 98 séquences complètes ont pu être obtenues après traitement bio-informatique des séquences NGS. 7 séquences obtenues par séquençage SANGER de spécimens COLEOTOOL ont été ajoutées au jeu de données. De plus, des séquences de spécimens extérieurs au projet ont été utilisées pour compléter le jeu de données : des *Ceutorhynchus* spp. d'origines géographiques variées, un *C. assimilis* provenant de Crête et un *C. roberti* provenant des Pyrénées. Ce dernier appartient à un groupe également inféodé aux Brassicacées mais vit sur l'alliaire officinale (Gerber *et al.*, 2012) ce qui en fait un bon groupe externe. Seules 3 séquences d'*A. coerulescens* ont été obtenues. Les résultats de PCR négatifs suggèrent que les amorces utilisées n'ont pas pu s'hybrider aux extrémités du gène cible. Il est probable que des mutations de la zone d'amorçage aient empêché l'amplification. Nos analyses se concentrent alors uniquement sur les *Ceutorhynchus*, bien qu'il soit possible de travailler seulement sur un des fragments BR ou FC des *A. coerulescens*, les séquences complètes n'ayant pu être obtenues.

L'alignement des séquences de *Ceutorhynchus* sous Geneious® a mis en évidence quelques séquences très divergentes du reste du jeu de données. Elles ont donc été comparées par BLAST aux séquences de GenBank. Il s'agit de diverses contaminations certainement dues aux manipulations pendant la préparation des échantillons car elles correspondent à des séquences de Coccinellidae, Chrysomelidae (Coleoptera), Sciaridae (Diptera) ou nématodes. 7 séquences ont ainsi été retirées du jeu de données. Aucun codon stop n'a été rencontré dans les séquences restantes. Elles ont donc été utilisées pour inférer des arbres phylogénétiques par maximum de vraisemblance.

1.2.1.2. **Inférence d'arbres phylogénétiques et analyse des séquences**

Un premier arbre (figure 14) a été obtenu. Les clades formés sont bien différenciés et tous soutenus à plus de 70%, cette topologie a donc été répétée de façon très majoritaire et donne confiance en la structuration des groupes. Le premier correspond aux individus de *C. obstrictus*, les 5 spécimens non identifiés à l'espèce présents dans ce groupe peuvent être considérés comme des *C. obstrictus* également. Le second groupe présente une anomalie pour la séquence JSTR02654_0101_**S615**, identifiée comme *C. napi*, qui se groupe avec des séquences appartenant à *C. typhae*. Un retour à l'observation du voucher, confirme que *C. napi* a bien été séquencé, mais la consultation du plan de plaque d'extraction nous informe que ces deux puits sont situés l'un à côté de l'autre, il s'agirait donc d'une contamination. La séquence ne peut être utilisée comme référence et sera retirée. Le cluster suivant rassemble des séquences de *C. picitarsis*. Un retour à l'observation du spécimen CCOC11947_0103_**S735** indique une erreur d'identification et qu'il s'agit bien d'un *C. picitarsis*. La séquence est conservée, l'identification du voucher est corrigée. La même erreur apparaît dans le groupe de *C. pallidactylus* et a été corrigée par retour à la morphologie (JSTR002662_0101_**S711**). Enfin, les séquences obtenues pour *C. napi* forment un groupe homogène.

Après correction des identifications, un second arbre est inféré en ajoutant au jeu de données au moins 2 séquences provenant de BOLD pour chacune des espèces, ainsi que 4 séquences de *C. gallorhenanus*, particulièrement proche morphologiquement de *C. obstrictus* (Laffin *et al.*, 2005). Les séquences utilisées et leur référence sont présentées en annexe.

La figure 15 présente la topologie obtenue. Les séquences provenant de BOLD se regroupent au sein des espèces qui leur correspondent ce qui d'une part soutient nos identifications et d'autres part rassure sur la qualité des données renseignées dans la base pour ce groupe d'espèces.

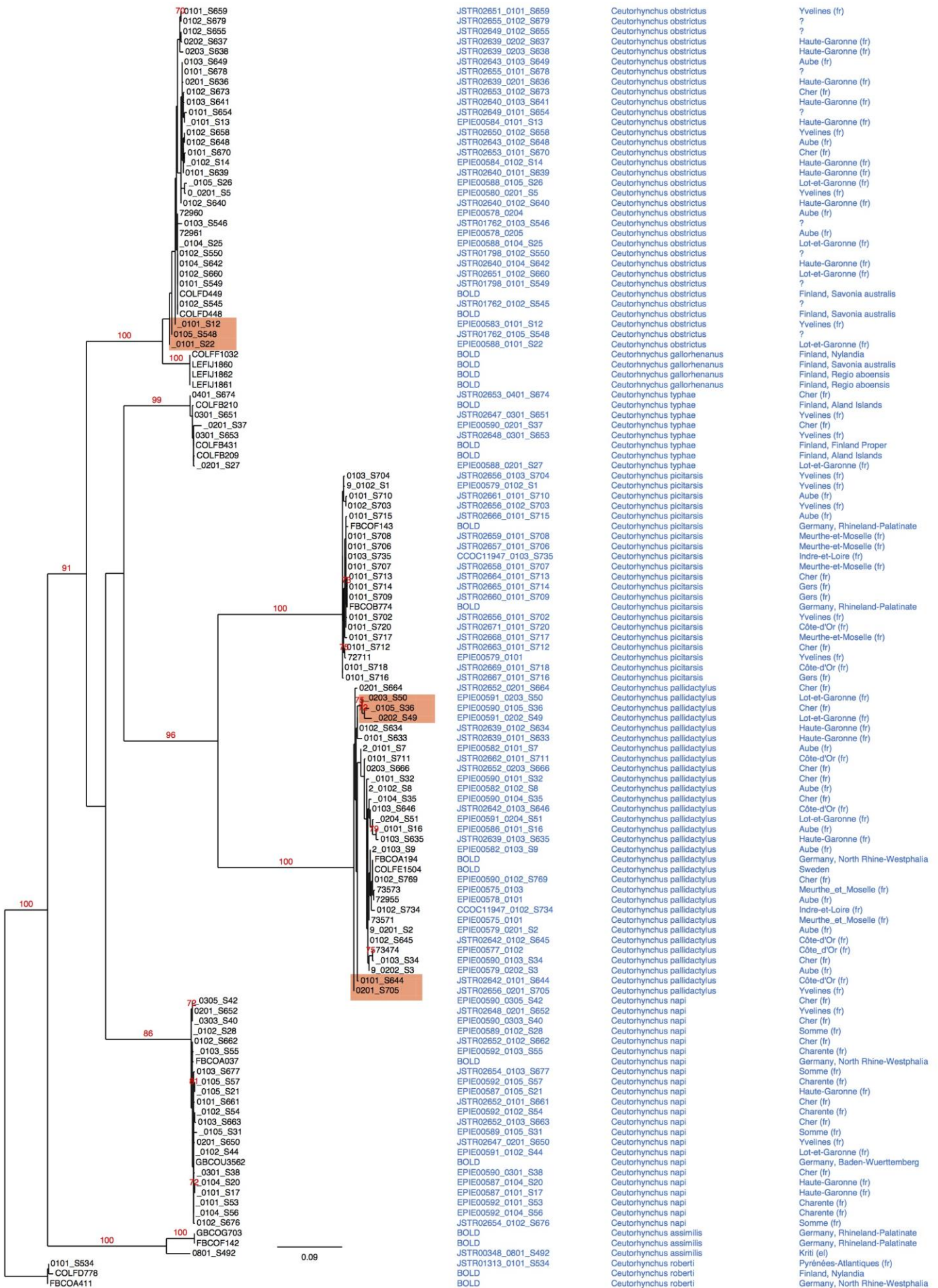


Figure 15 : Phylogramme des relations entre neuf espèces de *Ceutorhynchus* (séquences BOLD incluses) obtenu par Maximum de Vraisemblance à partir des gènes mitochondriaux (COI). Les supports des nœuds sont indiqués par les valeurs de bootstrap > 70%. En orange : les séquences supposées être des pseudogènes.

Collins et Cruickshank (2012) ont montré que 53% des clusters identifiés sur BOLD par des projets externes possède plus d'un nom d'espèce associée, rendant l'identification à l'espèce très ambiguë, parfois fausse. En revanche ce groupe, dont l'impact économique est important, présente des séquences validées par plusieurs organismes de recherche. Les séquences de *C. gallorhenanus* forment un nouveau cluster, bien soutenu, qui met en évidence le caractère monophylétique de *C. obstrictus* et *C. gallorhenanus*, déjà observé par Laffin *et al.* (2005). Ces séquences permettent aussi de confirmer l'identification correcte des spécimens *C. obstrictus* et de valider les séquences comme barcodes de référence de cette espèce, tout comme les 4 autres espèces : *C. typhae*, *C. picitarsis*, *C. pallidactylus* et *C. napi*.

Une variabilité se dessine cependant parmi les séquences de *C. obstrictus* et *C. pallidactylus* qui ne semble pas liée à l'origine géographique des spécimens mais peut marquer une variabilité intraspécifique de l'espèce à proprement parler. Une autre hypothèse expliquant l'origine de cette variabilité intraspécifique concerne les éventuelles erreurs dues à la méthode de séquençage NGS (Dohm *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2016) (génération de multiples fragments contenant des erreurs, manque de certitudes sur les bases situées aux extrémités de la séquences car profondeur de séquençage plus faible) qui ne peuvent être déterminées avec précision. Contrairement au séquençage SANGER, aucun retour sur le chromatogramme n'est possible. Enfin, le détachement marqué de certaines séquences (S22, S548, S22, S50, S36, S49, S644 et S705) peut aussi être interprété comme un phénomène pseudogénération. Les pseudogènes ou NUMTs (nuclear mitochondrial DNA), sont des copies d'ADN mitochondrial incorporées au génome nucléaire. Une fois dans le noyau, ils perdent leur fonctionnalité et accumulent des mutations, avec un taux cependant moins élevé que celui du génome mitochondrial (Leite, 2012). De plus, la teneur en bases nucléotidiques G et C du génome nucléaire étant supérieure à celle du génome mitochondrial (Mooers & Holmes, 2000; Zheng *et al.*, 2007), on peut supposer que les pseudogènes mitochondriaux présenteraient une teneur en GC plus élevée du fait de leur intégration au noyau. C'est ce qui a été mis en évidence pour la séquence (EPIE591_0202_S49) dont la teneur est anormalement élevée comparativement au reste du groupe ($GC\text{-}content_{S49} = 33,4\%$ et $GC\text{-}content_{moyen} = 31,5 \pm 0,55\%$). Cette séquence probablement issue d'un pseudogène, reste cependant utilisable dans la base de données de référence car elle permet tout de même une identification non ambiguë du taxon.

Les séquences des espèces citées constituent donc de bonnes références. Concernant *C. assimilis*, la seule séquence récupérée et constitutive du jeu de données initial montre une certaine distance par rapport aux séquences issues de BOLD pour cette espèce. La longueur de branche (qui caractérise le nombre de changements évolutifs) entre *C. assimilis* S492 et les deux séquences BOLD, est comparable à la longueur de branche qui sépare *C. obstrictus* de *C. gallorhenanus* (espèces que la méthode ABGD place dans un même groupe, mais qui présentent des caractères morphologiques subtiles au niveau des squamules de la suture élytrale permettant leur différenciation (com. pers. J. Haran)). Différentes hypothèses expliquent cette variation entre les séquences de *C. assimilis*. Il peut d'abord s'agir d'une erreur d'identification. Le spécimen de Crête a été identifié par J. Haran, spécialiste des Curculionidae. Les spécimens de BOLD ont été séquencés dans le cadre d'un projet de Barcoding visant les coléoptères Européens (Hendrich *et al.*, 2015), mais on ne connaît ni l'identificateur, ni avec quelle certitude a été effectuée l'identification des *Ceutorhynchus* (Curculionidae). De plus, aucune vérification des vouchers de BOLD n'est possible, ce qui souligne une des limites des bases de données mondiales. Il pourrait s'agir d'une variabilité intraspécifique due à l'origine géographique des spécimens, l'un provenant de Crête, les deux autres d'Allemagne. Mais en raison du faible nombre de spécimens disponibles aucune confirmation ne peut être donnée (Bergsten *et al.*, 2012). La dernière hypothèse sur la variabilité de ces séquences met en jeu les amorces utilisées pour le séquençage.

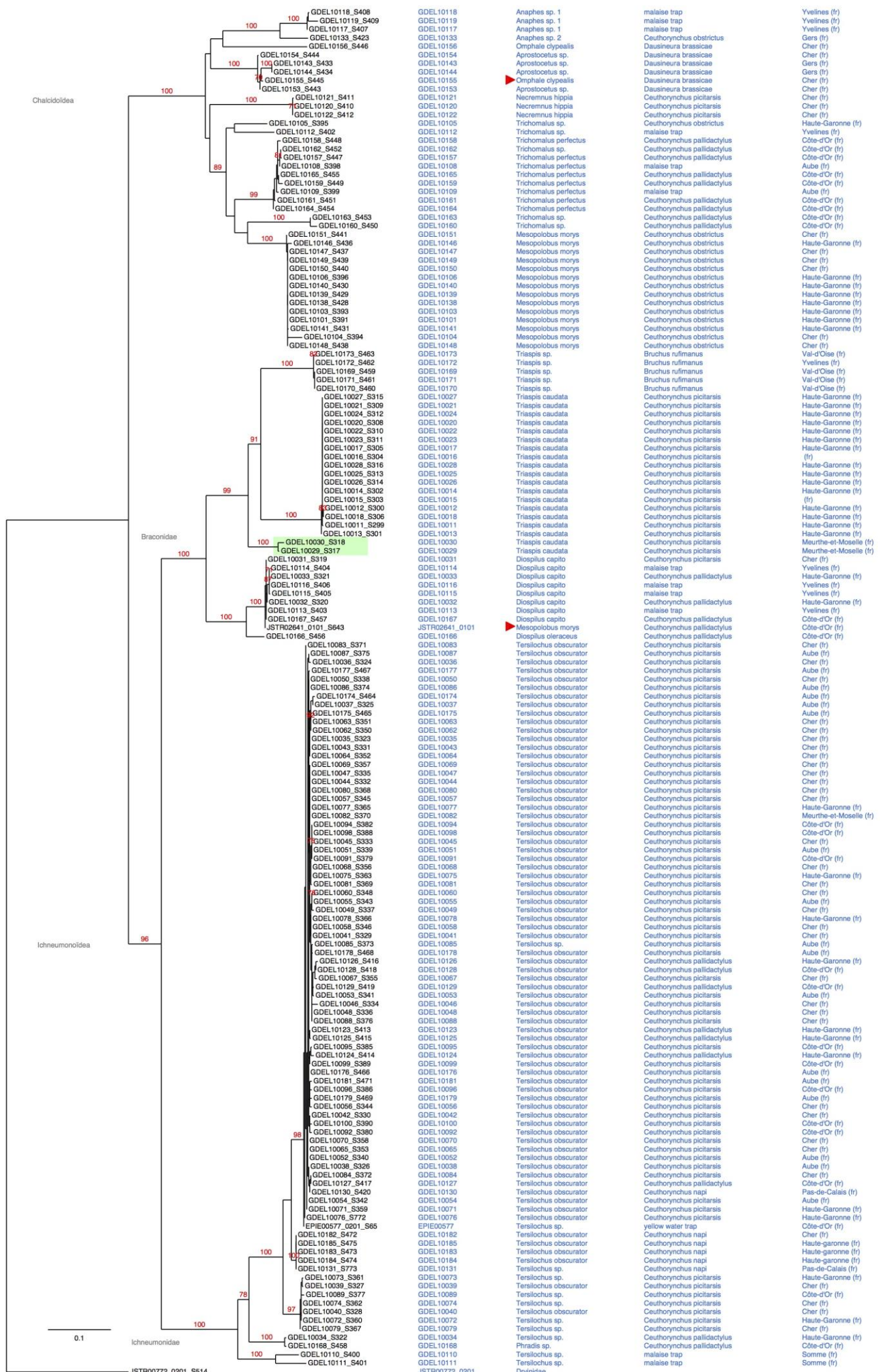


Figure 16 : Phylogramme des relations entre hyménoptères parasitoïdes obtenu par Maximum de Vraisemblance à partir des gènes mitochondriaux (CO1). Les supports des nœuds sont indiqués par les valeurs de bootstrap > 70%. En vert : variabilité génétique possiblement liée à l'origine géographique.

Hendrich *et al.* (2015) ont employé des amorces universelles (Folmer *et al.*, 1994) modifiées qui peuvent avoir amplifié des pseudogènes, porteurs de mutations, pour lesquels ils auraient une meilleure affinité comparativement aux gènes mitochondriaux. La première démarche à adopter reste le retour à l'observation du voucher, qui est impossible dans ce cas.

Dans l'ensemble, le gène CO1 est fiable pour la délimitation d'espèces du genre *Ceutorhynchus* inféodés au colza, car ces espèces ne semblent pas échanger leurs mitochondries. De plus, la méthode ABGD soutient l'existence de ces différentes espèces (hors-mis le groupe commun formé de *C. obstrictus* et *C. gallorhenanus* pourtant morphologiquement discernables).

1.2.2. Identification moléculaire des hyménoptères parasitoïdes

1.2.2.1. Contrôle qualité des séquences

176 hyménoptères parasitoïdes obtenus dans le cadre du projet COLETOOL ont été séquencés et 158 séquences complètes du gène CO1 ont été obtenues. Une séquence d'hyménoptère Dryinidae a été utilisée comme outgroup. Il s'agit aussi d'un parasitoïde mais il s'attaque à des groupes très différents des charançons du colza (cicadelles).

Suite à l'alignement sous Geneious®, une séquence a dû être retirée (blast pour une amibe) mais aucune n'a présenté de codons stop. Elles ont donc toutes été conservées pour les inférences phylogénétiques.

1.2.2.2. Inférence d'arbres phylogénétiques et analyse des séquences

L'arbre obtenu (figure 16) présente à la fois des espèces bien délimitées dont les séquences peuvent être validées rapidement et d'autres pour lesquelles la délimitation est très ambiguë et nécessite des démarches complémentaires.

Le regroupement des séquences de spécimens du genre *Anaphes* non identifiés à l'espèce concordent avec les identifications morphologiques effectuées antérieurement, à savoir la présence de 2 espèces différentes du même genre (identifiées *Anaphes sp. 1* et *Anaphes sp. 2*). La séquence GDEL10156_S546 d'*Omphale clypealis* semble correctement placée alors que la deuxième, GDEL10155_S545 figure dans un cluster qui lui est étranger. La vérification du plan de plaque conduit à déterminer qu'il s'agit d'une contamination étant donnée la proximité des puits d'extraction. Affranchies de cette erreur, les séquences d'*Asprostecetus sp.* constituent un groupe homogène. De même, les clusters de séquences appartenant à *Necremnus hippia*, *Trichomalus perfectus* (validation de S452 sous ce nom d'espèce), *Mesopolobus morys*, *Diospilus capito* (après retrait de la séquence contaminée JSTR02641_0101_S643) et *Diospilus oleraceus* constituent des groupes d'espèces bien délimités. *Triaspis caudata*, semble présenter une variabilité d'origine géographique, les spécimens de Meurthe-et-Moselle se trouvant groupés séparément. Un jeu de séquences plus fourni serait nécessaire pour confirmer cette hypothèse (Bergsten *et al.*, 2012).

Les groupes ambigus concernent les 4 séquences de *Trichomalus sp.* qui forment deux couples distincts probablement non liés à leur origine géographique. Un retour au voucher serait alors nécessaire. De même pour les Tersilochinae (espèces du genre *Tersilochus* et *Phradis*) 5 cluster semblent se dresser même si la délimitation n'est pas franche. Le groupe de loin le plus important se constituerait de *T. obscurator* alors que le suivant, ayant pour hôte à priori *C. napi* pourrait être une autre espèce. Cependant, cette donnée biologique ne peut pas constituer une preuve infaillible car l'hôte du parasitoïde a seulement été déduit de l'organe végétal duquel il provient mais n'a pas été identifié directement. Un taux d'erreur (9.5%) a d'ailleurs été calculé entre l'espèce de charançon visée durant la collecte d'échantillons et l'espèce réellement émergente identifiée. La délimitation d'éventuelles espèces nécessite d'autres approches et le retour au voucher.

Sans procéder à une analyse phylogénique poussée, qui nécessiterait l'usage de plusieurs marqueurs moléculaire, la topologie de l'arbre dans son ensemble semble cohérente et les clades sont bien soutenus.

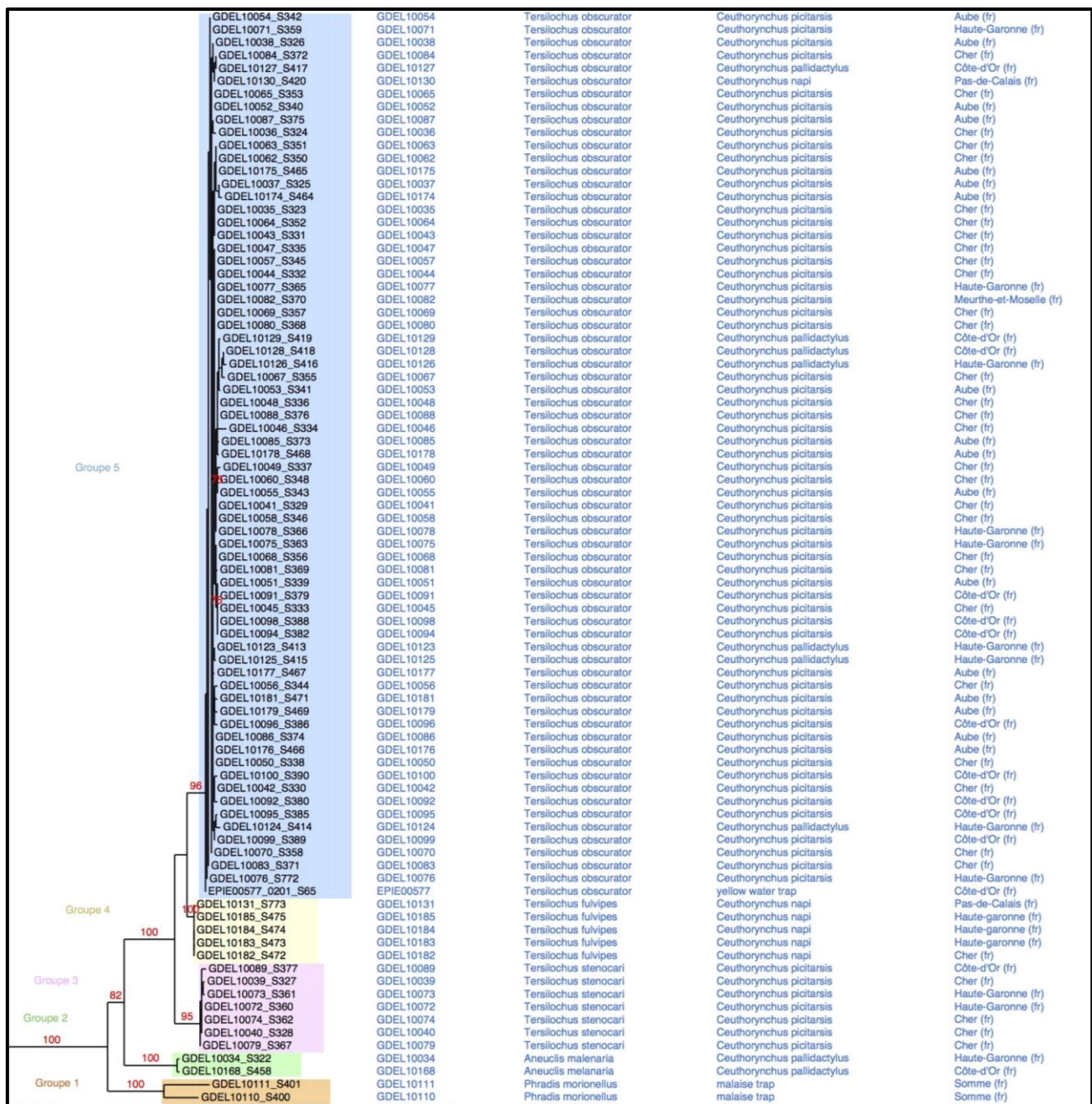


Figure 17 : Recadrage du phylogramme des hyménoptères parasitoïdes autour des 5 groupes de Tersilochinae. (gène CO1, inférence par maximum de vraisemblance et bootstrap > 70%)

Tableau 7 : Distances intraspécifiques (diagonale) et interspécifique (sous la diagonale) minimum et maximum, extraites de la matrice des distances (modèle Kimura2-p) calculées pour les Tersilochinae à partir du gène CO1

Nb. d'ind.	Groupes d'espèces	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5	hôtes supposés	ABGD
2	Groupe 1	0,071					piège malaise	Grp. 1
2	Groupe 2	0,126- 0,128	0,005				<i>C. pallidactylus</i>	Grp. 2
7	Groupe 3	0,131- 0,141	0,108- 0,113	0,000- 0,006			<i>C. picitarsis</i>	Grp. 3
5	Groupe 4	0,135- 0,146	0,095	0,040- 0,045	0,000		<i>C. napi</i>	
67	Groupe 5	0,128- 0,152	0,102- 0,117	0,054- 0,073	0,027- 0,042	0,000- 0,022	<i>C. pallidactylus</i> + <i>C. picitarsis</i>	

La superfamille des Chalcidoidea, en haut de l'arbre, se sépare bien des Ichneumonoidea, eux-mêmes divisés en deux familles qui correspondent aux Ichneumonidae et Braconidae. Au sein des Chalcidoidea la phylogénie des espèces n'est cependant pas respectée. Les Eulophidae constituent ici un groupe polyphylétiques dont certaines espèces forment un clade commun avec des Pteromalidae et d'autres avec des Mymaridae, alors que c'est un groupe monophylétique bien supporté (Munro *et al.*, 2011). Les résultats obtenus à partir du gène CO1 montrent ici les limites associées au génome mitochondrial.

1.2.2.3. Délimitation d'espèces chez les Tersilochinae

L'arbre inféré par maximum de vraisemblance semble indiquer la présence de 5 groupes différents chez les Tersilochinae (figure 17). A contrario, la méthode ABGD n'en souligne que 3, regroupant en une même espèce le couple S401/S400, puis une seconde correspondant au couple S458/S322, alors que la troisième espèce se constituerait de tous les *Tersilochus sp.* et *T. obscurator* restants (y compris les 5 spécimens semblant liés à l'hôte *C. napi*). La construction d'une matrice des distances (modèle Kimura à 2 paramètres) a permis d'étudier précisément les distances inter- et intraspécifiques qui séparent ces espèces putatives (tableau 7). Il s'agirait bien de 5 espèces différentes en raison du non chevauchement des variabilités intraspécifiques et interspécifiques, bien que 3 d'entre elles soient extrêmement proches puisque le groupe 4 et le groupe 5 divergent seulement de 2,7 à 4,2%, et les groupes 3 et 4 de 4,0 à 4,5%. Le groupe 1 au contraire présente une variabilité intraspécifique élevée.

Un retour aux vouchers a aussi été effectué afin de déterminer d'éventuelles différences morphologiques allant dans le sens de ces résultats. Aubert & Jourdheuil (1958) ont, en particulier, mis en avant des variations au niveau de l'ornementation des propodeum de 4 espèces de *Tersilochus*. Les spécimens de la collection Aubert, prêtée par le muséum de Lausanne, ont donc été comparés aux spécimens séquencés. Les 5 groupes d'espèces ont ainsi pu être déterminés : le groupe 1 correspond à *Phradis morionellus*, le groupe 2 à *Aneuclis melanaria*, le groupe 3 à *Tersilochus stenocari*, le groupe 4 à *T. fulvipes* et le groupe 5 à *T. obscurator*. C'est notamment l'apex de l'ovipositeur, le propodeum et le nombre d'articles antennaires qui ont permis de les identifier. Les deux spécimens de *P. morionellus* montrent une certaine variabilité des caractères morphologiques expliquant la divergence observée précédemment. L'utilisation d'autres marqueurs moléculaires, du type nucléaire, aurait pu permettre d'apporter des preuves supplémentaires à l'existence de ces 5 espèces.

1.2.2.4. Délimitation d'espèces du genre *Trichomalus*

A ce stade du projet les spécimens n'ont pas encore été ré-observés et aucune information supplémentaire ne peut être fournie. Cependant, la démarche qui va être suivie pour tenter de séparer ces espèces est comparable à celle adoptée pour les *Tersilochus* et va nécessiter le retour aux vouchers pour appuyer ou réfuter l'hypothèse de différentes espèces par l'observation de caractères morphologiques discriminants et autres indices biologiques.

1.3. VALIDATION DES SEQUENCES

Chez les *Ceutorhynchus* du colza, les identifications morphologiques effectuées par des taxonomistes connaisseurs des groupes concordent à 98% avec les groupes formés sur la base du gène CO1. Ce gène est fiable pour délimiter les espèces de ce groupe. Pour les parasitoïdes des charançons du colza, le séquençage du gène CO1 a permis la validation des identifications pour une majorité d'espèces mais a surtout mis en évidence l'existence de complexes d'espèces très proches (chez les Tersilochinae et les *Trichomalus sp.*). Si l'observation du voucher et l'emploi d'autres méthodes de délimitations d'espèces ne suffisent pas à déterminer les espèces du genre *Trichomalus*, le séquençage d'un autre gène (nucléaire) peut permettre d'étayer l'hypothèse de ces différentes espèces. A ce jour, la base du projet COLEOTOOL compte 108 séquences de charançons valides et 147 séquences d'hyménoptères parasitoïdes (tableau 8).

Tableau 8 : Séquences validées composant la base de données de référence du projet COLEOTOOL

Espèces	Nombre de séquences validées	Séquences nouvelles pour l'espèce
<i>Ceutorhynchus obstrictus</i>	32	Non
<i>Ceutorhynchus typhae</i>	5	Non
<i>Ceutorhynchus picitarsis</i>	19	Non
<i>Ceutorhynchus pallidactylus</i>	29	Non
<i>Ceutorhynchus napi</i>	21	Non
<i>Ceutorhynchus assimilis</i>	1	Non
<i>Ceutorhynchus roberti</i>	1	Non
Sous total charançons	108	0
<i>Anaphes sp. 1</i>	3	Non
<i>Anaphes sp. 2</i>	1	Non
<i>Necremnus hippia</i>	3	Oui
<i>Trichomalus perfectus</i>	9	Oui
<i>Mesopolobus morys</i>	15	Oui
<i>Triaspis caudata</i>	19	Oui
<i>Diospilus capito</i>	8	Oui
<i>Diospilus oleraceus</i>	1	Oui
<i>Tersilochus obscurator</i>	67	Oui
<i>Tersilochus fulvipes</i>	5	Oui
<i>Tersilochus stenocari</i>	7	Oui
<i>Aneuclis melanaria</i>	2	Oui
<i>Phradis morionellus</i>	2	Oui
Sous total parasitoïdes	147	11
Total	255	11 espèces

11 espèces ne présentaient jusqu'à présent aucune séquence dans les bases de données mondiales. L'outil d'identification proposé est fiable et robuste par les différentes approches qui ont permis la validation des espèces et par l'abondance de séquences qui recouvre les espèces les plus communes, rendant ainsi compte de la variabilité intraspécifique.

1.4. ANALYSE FAUNISTIQUE

Par confrontation des résultats morphologiques aux résultats moléculaires un taux d'erreur de 2% a été calculé chez les charançons du colza. Ce pourcentage est négligeable et nous permet d'analyser les résultats faunistiques relatif à ce groupe. Dans les échantillons issus d'élevage, *C. obstructus*, *C. pallidactylus* et *C. picitarsis* sont les plus abondants (30,6% ; 28,7% ; 28,7% des charançons récupérés, respectivement). Il s'agit de deux des trois espèces faisant l'objet de lutte sur colza dont l'une (*C. picitarsis*) est connue pour sa résistance aux pyréthriinoïdes. La troisième espèce, *C. napi*, représente 10% des charançons présents sur le colza. 70% des charançons collectés menacent réellement le rendement de la culture, ce qui montre la nécessité de développer des méthodes de lutte mais informe également que le comptage de larves sans les identifier conduit, dans 3 cas sur 10, à des interventions chimiques non justifiées. *A. coerulea* est peu représenté dans les échantillons d'élevage (1%) mais il a été retrouvé dans les pièges (pièges malaises, pièges jaunes, fauchage) dans et en bordure de parcelles, à hauteur de 25%. De même, *C. napi* et *C. obstructus* ont été capturés massivement (20% et 47.5% respectivement) ce qui semble révéler un environnement paysager favorable à leur présence. Connaissant le large panel de Brassicaceae hôtes de ces espèces, leur gestion devra tenir compte des éventuelles plantes relais situées aux abords des parcelles. Durant ces trois années de collecte aucun spécimen de *Aulacobaris laticollis* et *Ceutorhynchus assimilis* n'a été rencontré. Les larves se développent pourtant dans les plantes entre mai et juin et entre décembre et avril, respectivement (Pilorgé *et al.*, 1997), période qu'ont couvertes les campagnes d'échantillonnages; ce qui suppose un problème vis-à-vis des techniques d'échantillonnage pour ces espèces ou qu'elles n'étaient pas présentes dans les parcelles prospectées.

En raison des incohérences entre identifications morphologiques et moléculaires, qui ont finalement permis de déterminer la présence d'espèces supplémentaires, l'analyse faunistiques des hyménoptères parasitoïdes est uniquement qualitative. De plus les relations hôtes/parasitoïdes supposées doivent être considérées avec un taux d'erreur de 9.5% sur le charançon ciblé (étant donné les incohérences entre l'espèce visée par Terres Inovia lors de la collecte et le taxon émergeant réellement identifié par le CBGP). Cinq espèces de Tersilochinae ont été capturées : *Aneuclis melanaria*, *Phradis morionellus*, *Tersilochus obscurator*, *T. stenocari* et *T. fulvipes*. *A. melanaria* a émergé a priori de *C. pallidactylus*, mais Aubert et Jourdheuil (1958) la décrivent comme une espèce polyvoltines qui se développe alternativement sur *C. assimilis* et *C. obstructus*. *Phradis morionellus*, est parasitoïde de Méligèthes mais sa présence est justifiable car il a été capturé au piège Malaise. Les trois espèces de *Tersilochus* rencontrées, sont chacune spécifique d'un hôte (*C. pallidactylus*, *C. picitarsis* et *C. napi*). *T. fulvipes*, le plus grand des *Tersilochus* du colza, avait déjà été observé dans le bassin parisien comme parasitoïde de *C. napi* en 1956 avec un taux de parasitisme élevé (entre 73 et 95%) (Aubert & Jourdheuil, 1958). Occasionnellement, *T. fulvipes* parasiterait *C. pallidactylus* mais les spécimens émergeants seraient alors de taille plus réduite, s'adaptant à la morphologie de leur hôte (Jourdheuil, 1960). *Diospilus capito* et *D. oleraceus* parasitoïdes polyvoltins s'attaquant à tous les *Ceutorhynchus* du colza (Williams, 2010), ont été collectés provenant a priori d'hôtes variés. *Necremnus hippia* a été obtenu a priori de *C. picitarsis*, donnée biologique jusqu'ici non démontrée, en revanche elle est connue comme parasitoïde de *C. typhae* (Gebiola *et al.*, 2015). Deux espèces du genre *Anaphes* ont été capturées au piège Malaise. L'une d'entre elle pourrait être *Anaphes declinatus* que Jourdheuil (1960) avait décrit comme parasitoïde oophage de *C. obstructus*.

Mais aucune vérification des types n'ayant été faite les informations sur cette espèce sont encore invalides. *Mesopolobus morys* a priori obtenu de *C. obstrictus* est en accord avec la bibliographie. *Trichomalus perfectus*, pourtant très étudié car faisant l'objet d'introduction en lutte biologique classique contre *C. obstrictus* (Ferguson et al., 2000), semble étonnamment avoir émergé de *C. pallidactylus*. Enfin, *Triaspis caudata* obtenu de *C. picitarsis* serait une nouvelle espèce appartenant au cortège parasitaire des Charançons du colza, car elle n'a jamais été citée auparavant (ni sous un nom synonyme). A contrario, *Microctonus melanopus*, seul parasitoïde de charançons adultes, *Eupelmus messene*, *E. vesicularis* et *Eurytoma curculionum* n'ont pas été rencontrés durant les trois années de campagne. *Omphyale clypealis* et *Aprostocetus sp.* ont été obtenus de cécidomyies et ne font donc pas parti du cortège associé aux charançons. Ainsi, 10 des 16 espèces parasitoïdes du colza déjà observées lors des précédentes campagnes ont été identifiées et 1 espèce supplémentaire a été obtenue.

Une analyse plus poussée de ces données permettrait d'évaluer les variations d'abondance et de richesse spécifique entre les différentes zones géographiques prospectées. De plus, sur la base de nouvelles collectes, l'outil moléculaire établi devrait permettre de répondre aux questionnements latents concernant les relations hôtes/parasitoïdes, et de calculer avec rigueur les taux de parasitisme associés, tout en tenant compte des variables paysagères et des pratiques culturales.

2. DEVELOPPEMENT DES OUTILS D'IDENTIFICATION

2.1. CLES D'IDENTIFICATION DIGITALES

2.1.1. Clé d'identification des charançons du colza

Les résultats d'identifications ont conduit à introduire huit espèces dans la clé digitale : *Ceutorhynchus napi*, *C. pallidactylus*, *C. assimilis*, *C. typhae*, *C. obstrictus* (Ceutorhynchinae), *Aulacobaris coerulescens* et *Melanobaris laticollis* (Baridinae). *C. typhae* a été ajoutée aux 7 espèces écrites comme nuisibles sur colza car elle s'est trouvée collectée dans les pièges. Bien que sa nuisibilité soit nulle, il est important qu'elle soit identifiée correctement.

19 caractères morphologiques ont été utilisés pour séparer ces 8 espèces au stade imaginal (Annexe 3). Ils sont en partie présentés et discutés ci-dessous, des plus généraux aux plus spécifiques.

- Caractères qualitatifs spécifiques aux Curculionidae : « *tête prolongée par un rostre* » et « *antennes coudées entre scape et funicule* ». Ces caractères conditionnent l'accès aux critères suivants afin d'éviter de débiter une identification sur des coléoptères ravageurs du colza extérieurs aux charançons (mélégèthes et altises).
- Caractère quantitatif spécifique aux Curculionidae : « *Nombre d'articles au funicule antennaire* ». Ce caractère continu permet de distinguer *C. typhae* (6 articles) des autres espèces (7 articles) (Hoffmann, 1954), et en particulier de *C. obstrictus* avec lequel il partage tous les autres caractères.
- Caractères qualitatifs distinctifs entre Baridinae et Ceutorhynchinae : « *Ratio longueur sur largeur du corps supérieure ou inférieure à 2* », « *Revêtement du corps glabre ou pubescent* », « *Présence ou absence de paquets de squamules dans l'angle thoraco-élytral* » et « *Présence ou absence d'une épine apicale sur le tibia antérieur* ». Le renseignement d'un seul de ces caractères, suffit à déterminer s'il s'agit d'un Baridinae ou d'un Ceutorhynchinae, mais les autres caractères restent affichés. Si deux d'entre eux sont renseignés de façons incohérentes, l'identification ne peut aboutir.
- Caractères qualitatifs partagés par certains Baridinae et Ceutorhynchinae : « *Corps à reflet métalliques/brillants ou mats* », « *Longueur du corps supérieur ou inférieur à 3,5mm* », « *Ongles dentés ou simples* » et « *Tarses roux ou noirs* ». La longueur du corps des spécimens a été transformée en un caractère discret par manque de temps mais une mesure exacte de plusieurs

spécimens serait nécessaire pour établir un caractère continu fiable et précis (Tixier, 2012). Pour tenir compte de la variabilité pour ce caractère chez *C. napi*, une nuance a été apportée en notant le caractère « *Longueur inférieure à 3,5mm* » comme rarement observée. La couleur des tarsi est un caractère aisément observable et discerne la moitié des espèces mais il a le désavantage de varier chez des spécimens immatures.

- Caractères qualitatifs spécifiques aux *Ceutorhynchus* : « *Revêtement des élytres appliqué ou dressé* », « *Revêtement constitué uniquement de soies ou squamules ou d'un mélange des deux* », « *Squamules ordonnées en rangées de deux ou non* », « *Squamules ordonnées en rangées de trois ou non* » et « *Tâche scutellaire bien marquée ou non* ». Le revêtement élytral rassemble les caractères les plus pertinents pour distinguer ces *Ceutorhynchus*.

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

Les pistes d'amélioration concernent la mesure des tailles de plusieurs spécimens de chaque espèce afin de mieux appréhender la variabilité intra et interspécifique pour ce caractère et l'ajout de *C. gallorhenanus*, espèce proche de *C. obstrictus*, dans l'éventualité où il se trouverait piégé sur colza. Cependant, la clé est utilisable dans l'état et permettrait à des praticiens terrain, qui disposent d'une loupe binoculaire, d'identifier facilement les charançons capturés en parcelle de colza.

Une clé d'identification digitale des larves a été envisagée en raison des différences morphologiques existantes au niveau de leur capsule céphalique. La clé dichotomique des larves présentées par Alford (2003) se base sur l'écologie de la larve (partie de la plante dont elle se nourrit durant une période donnée) et la taille du corps, alors que certaines larves sont connues pour partager une même niche écologique (Dechert and Ulber, 2004) et leur taille varie selon le stade larvaire. En revanche, plusieurs auteurs ont mis en évidence des différences de forme de l'air frontale entre les Baridinae et les Ceutorhynchinae (Leurin, 1995 ; Joudheuil, 1963) et le nombre et la position des soies sur la capsule céphalique chez les *Ceutorhynchus* sont des caractères pertinents pour leur différenciations (Doss, 1952 ; Juran *et al.*, 2011). Aucune clé n'a finalement été développée par manque de spécimens de *C. assimilis* et *M. laticollis* et à cause de l'hétérogénéité des stades larvaires des spécimens envoyés par Terre Inovia, qui ne permet pas toujours l'observation des soies. Cependant, l'outil moléculaire est en mesure d'identifier les larves des espèces collectées au cours du projet.

2.1.2. Clé d'identification des parasitoïdes de charançons

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

38 caractères, dont 36 morphologiques et 2 biologiques ont été utilisés pour séparer ces 18 espèces au stade imaginal. Une partie des caractères est présentée ci-après mais les matrices sont consultables en annexe.

- Caractères qualitatifs discriminant les Ichneumonoidea des Chalcidoidea : « Corps à reflets métalliques ou non », « Scape court et globuleux ou allongé », « Nombre d'articles antennaires supérieur ou inférieur à 16 », « Antennes coudées ou non entre scape et pédicelle », « Prepectus présent ou absent sur le mésosoma », « Aile antérieure présentant plus ou moins de 4 cellules fermées », « Cellule costale de l'aire antérieure présente ou absente », « 1 ou 2 éperons apicaux sur le mésotibia », « ovipositeur dépassant nettement ou à peine du gaster ». Les caractères alaires et antennaires sont très différenciés entre ces deux superfamilles. Le renseignement de ces caractères donne progressivement accès à ceux distinguant les genres et espèces.
- Caractères qualitatifs discriminant les Ichneumonidae des Braconidae : « Nervure 2m-cu de l'aile antérieure présente ou absente », « Cellule submarginale 1 et discoïdale 1 fusionnées ou séparées ». Ce dernier présente une exception chez *M. melanopus* pour qui les cellules sont fusionnées.
- Caractère quantitatif spécifiques aux Chalcidoidea : « Nombre d'articles au funicule ». La formule antennaire (nb anelli/nb art. funicule/nb art. clava) se détermine relativement facilement et est efficace pour discerner les espèces par sa variabilité.
- Caractère discriminant *Diospilus capito* de *D. oleraceus* : « Propodéum fortement ou faiblement aréolé voir lisse ». Le caractère proposé par Ferguson *et al.* (2010) (ornementation du premier tergite abdominal) n'a pas fonctionné sur nos spécimens, il s'agit donc d'un caractère nouveau défini suite à la comparaison des spécimens.
- Caractères spécifiques à *Anaphes sp.* : « Taille inférieure à Imm », « Insertions antennaires largement séparées », « Front et vertex pourvus de sutures formant un H ». Cet ensemble détermine *Anaphes sp.* comme une espèce à part facilement identifiable.
- Les caractères biologiques « Hôtes du parasitoïdes » et « Stade parasité » sont pertinents chez les espèces très proches du genre *Tersilochus*. La distinction entre *T. microgaster* et *T. obscurator* se fait uniquement à partir de son hôte, puisque les caractères proposés par Barari *et al.* (2005) (longueur du fourreau de l'ovipositeur comparativement au premier tergite abdominal et proportion de recouvrement du sternaulus, zone à granulation plus grossière traversant le mésopleure) n'ont pas permis de les distinguer correctement.

L'amélioration de cette clé nécessiterait la révision et l'ajout de quelques caractères afin d'intégrer les espèces nouvellement découvertes. En particulier chez les Tersilochinae c'est l'ornementation de l'apex de l'ovipositeur et sa longueur qui ont permis de séparer *A. melanaria*, *P. morionellus*, et les 3 espèces de *Tersilochus*. Sur l'apex de l'ovipositeur sont visibles, de façon variable, une dépression ou encoche plus ou moins marquée du côté ventral et des petites dents fines du côté ventral. Le nombre d'articles antennaires varie également entre les 3 *Tersilochus*. Enfin, le sternaulus, est plus ou moins marqué, voire absent, selon les espèces. Les précisions morphologiques effectuées suite aux identifications morphologiques et moléculaires seront donc intégrées à cette clé polytomique.

2.2. FICHE PEDAGOGIQUES

Sur Athémis, 7 fiches pédagogiques en anglais sont en cours de diffusion pour les charançons, correspondant aux 7 espèces nuisibles ; et 19 fiches pour les parasitoïdes, correspondant aux 18 espèces de la clé d'identification (dont *Aneuclis melanaria* et *Phradis morionellus* sont présentées à l'espèce) auxquelles s'ajoute *T. stenocari*. La consultation s'effectue via le lien <http://arthemisdb.supagro.inra.fr/> (cliquer sur l'onglet Search, puis entrer le nom du taxon, ex. « *Ceutorhynchus picitarsis* »). Le lien vers les clés d'identification figurera bientôt sur ces fiches également.

Sur E-phytia, les informations relatives à 6 espèces de charançons sont en cours de mise à jour (les *Ceutorhynchus* et *A. coeruleascens*) et accessibles via le lien <http://ephytia.inra.fr/fr/Home/index>.

3. PERSPECTIVES

Le projet CASDAR COLEOTOOL devrait bénéficier d'une prolongation sur 6 mois à partir de décembre 2016. Ce délai supplémentaire va permettre à l'équipe du CBGP de poursuivre l'enrichissement de la base de données moléculaires. Le tri des échantillons de piégeage restants sera nécessaire pour éventuellement récupérer les spécimens non obtenus d'élevage à ce jour (*C. assimilis*, *M. laticollis*, *M. melanopus*, *E. messene*, *E. vesicularis* et *E. curculionum*). Les quelques séquences de *A. coerulescens* obtenues pourront être intégrées aux prochaines analyses.

Par un retour aux vouchers, les spécimens de *Trichomalus* spp. qui semblent appartenir à des espèces distinctes, vont être ré-observés et comparés les uns aux autres pour identifier les caractères morphologiques les différenciant. Le séquençage de marqueurs moléculaires autres que le gène mitochondrial pourrait être envisagé si la distinction est implicite et les espèces cryptiques.

La clé polytomique digitale des parasitoïdes sera mise à jour afin d'y introduire les caractères morphologiques nouvellement observés chez les Tersilochinae et les espèces de *Trichomalus* spp. suivant les conclusions établies. Les clichés réalisés sur les charançons du colza, et les fiches descriptives associées (morphologie, biologie, dégâts, ...) pourraient être réutilisées et permettre le développement d'une application smartphone de reconnaissance des ravageurs du colza, en collaboration avec l'UMR de L'INRA de Bordeaux développeur de ces applications. Les clés digitales, les fiches pédagogiques et cette application seront destinées aux praticiens terrains pour le suivi et la détermination de ces ravageurs au champ.

Terres Inovia bénéficiera bientôt d'outils moléculaires adaptés à la génération de données massives, pour des études à grandes échelles. Le test du protocole de séquençage NGS, assisté du programme bioinformatique et de la base de séquences de référence, constitue la dernière action du projet CASDAR. Ainsi Terres Inovia pourra étudier les relations trophiques hôtes/parasitoïdes et calculer les taux de parasitismes associés. A terme les outils permettront de comparer différents contextes paysagers et pratiques culturales afin de déterminer les conditions favorables à la régulation naturelle des charançons du colza par leurs hyménoptères parasitoïdes antagonistes.

Conclusion

Les identifications morphologiques des charançons du colza effectués par plusieurs taxonomistes concordent avec les résultats moléculaires obtenus suite au séquençage du gène CO1. Ce marqueur fournit des résultats cohérents pour ce groupe d'insectes. Chez les hyménoptères parasitoïdes, il a pu mettre en évidence des groupements initialement non identifiés morphologiquement. Malgré la controverse autour de l'utilisation de ce gène chez certaines familles, il s'est révélé fiable pour les deux groupes d'insectes car les différenciations suggérées ont été soutenues par l'observation de caractères discriminants. La base de séquences ainsi créée est robuste car elle repose sur le séquençage de plusieurs spécimens d'origine géographique variées et couvre une part de la variabilité caractérisant ces espèces en France. Par comparaison aux bases de données déjà existantes, elle contient des séquences supplémentaires de charançons du colza pour plusieurs localités françaises et des séquences de dix espèces d'hyménoptères parasitoïdes de charançons qui étaient jusqu'alors non séquencés ou non valides. Elle permet aussi, contrairement aux bases mondiales, d'accéder aux vouchers séquencés pour les ré-observer. Les clés digitales polytomiques sont utilisables par un plus large public. Elles permettent l'identification des espèces sur la base de caractères validés, parfois inédits qui sont le consensus des données morphologiques, biologiques et moléculaires. La mise en place d'outil de diagnostic nécessite en amont un lourd travail de validation, mais il ouvre à Terres Inovia de nouvelles perspectives avec le traitement d'échantillons issus d'un large réseau de parcelles pour étudier les variables favorables à la lutte biologique par conservation contre les charançons du colza en France.

Références bibliographiques

- Agreste, 2014. Enquêtes Pratiques culturelles 2011 Principaux résultats. Agreste Les Dossiers N°21. Juillet 2014. 70p
- Alford, D.V. (Ed.), 2003. Biocontrol of oilseed rape pests. Blackwell Science, Oxford.
- Alford, D., V., K. F. A. Walters, I. H. Williams & A. K. Murchie, 1996. A commercially viable low-cost strategy for the management of seed weevil populations on winter oilseed rape in the UK. In: Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases, Brighton, UK, British Crop Protection Council, Farnham, pp. 609–614.
- Al-Shehbaz, I.A., 2012. A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon* 61, 931–954.
- Aubert JF, Jourdheuil P, 1958. Nouvelle description et biologie de quelques ichneumonides appartenent aux genres *Aneucelis* Först. *Isugrus* Först. Et *Tersilochus* Holm. *Revue de pathologie végétale et d'entomologie agricole de France*. 37 : 175-193.
- Austerlitz, F., David, O., Schaeffer, B., Bleakley, K., Olteanu, M., Leblois, R., Veuille, M., Laredo, C., 2009. DNA barcode analysis: a comparison of phylogenetic and statistical classification methods. *BMC Bioinformatics* 10, S10. doi:10.1186/1471-2105-10-S14-S10
- Bailleul, D., Ollier, S., Lecomte, J., 2016. Genetic Diversity of Oilseed Rape Fields and Feral Populations in the Context of Coexistence with GM Crops. *PLOS ONE* 11, e0158403. doi:10.1371/journal.pone.0158403
- Barari, H., Ferguson, A.W., Piper, R.W., Smith, E., Quicke, D.L.J., Williams, I.H., 2005. The separation of two hymenopteran parasitoids, *Tersilochus obscurator* and *Tersilochus microgaster* (Ichneumonidae), of stem-mining pests of winter oilseed rape using DNA, morphometric and ecological data. *Bull. Entomol. Res.* 95. doi:10.1079/BER2005360
- Bergsten, J., Bilton, D.T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M.T., Balke, M., Hendrich, L., Geijer, J., Herrmann, J., Foster, G.N., Ribera, I., Nilsson, A.N., Barraclough, T.G., Vogler, A.P., 2012. The Effect of Geographical Scale of Sampling on DNA Barcoding. *Syst. Biol.* 61, 851–869. doi:10.1093/sysbio/sys037
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22, 148–155. doi:10.1016/j.tree.2006.11.004
- Boucek, Z., Rasplus, J. Y., 1991. Illustrated key to West-Palaearctic genera of Pteromalidae, Hymenoptera, Chalcidoidea. Paris, FRA : INRA, 140 p. <http://prodinra.inra.fr/record/93334>
- Bozbas, K., 2008. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 12, 542–552. doi:10.1016/j.rser.2005.06.001
- Bruni, I., De Mattia, F., Martellos, S., Galimberti, A., Savadori, P., Casiraghi, M., Nimis, P.L., Labra, M., 2012. DNA Barcoding as an Effective Tool in Improving a Digital Plant Identification System: A Case Study for the Area of Mt. Valerio, Trieste (NE Italy). *PLoS ONE* 7, e43256. doi:10.1371/journal.pone.0043256
- Carré, P., Pouzet, A., 2014. Rapeseed market, worldwide and in Europe. *OCL* 21, D102. doi:10.1051/ocl/2013054
- Caterino, M.S., Tishechkin, A.K., 2006. DNA identification and morphological description of the first confirmed larvae of Hetaeriinae (Coleoptera: Histeridae): Larvae of hetaeriine Histeridae. *Syst. Entomol.* 31, 405–418. doi:10.1111/j.1365-3113.2006.00338.x
- Centre technique des oléagineux et du chanvre industriel (France), 2010. Les insectes du colza: altises des crucifères, altise d'hiver, baris des crucifères, cecidomyie des siliques... CETIOM, Thivernal-Grignon.
- Coissac, E., Riaz, T., Puillandre, N., 2012. Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals: BIOINFORMATIC FOR DNA METABARCODING. *Mol. Ecol.* 21, 1834–1847. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05550.x
- Colonnelli, E., 2004. Catalogue of Ceutorhynchinae of the world: with a key to genera (Insecta: Coleoptera: Curculionidae). Argania Editio, Barcelona.

- Cook, S.M., Khan, Z.R., Pickett, J.A., 2007. The Use of Push-Pull Strategies in Integrated Pest Management. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 375–400. doi:10.1146/annurev.ento.52.110405.091407
- Dechert, G., Ulber, B., 2004. Interactions between the stem-mining weevils *Ceutorhynchus napi* Gyll. and *Ceutorhynchus pallidactylus* (Marsh.) (Coleoptera: Curculionidae) in oilseed rape. *Agric. For. Entomol.* 6, 193–198. doi:10.1111/j.1461-9555.2004.00220.x
- Delvare G, 2015. Reconnaissance des auxiliaires (hyménoptères parasitoïdes) en vue de leur utilisation en lutte biologique et intégrée. Document multigraphié, CIRAD ET SUPAGRO, 170 p.
- DeSalle, R., Egan, M.G., Siddall, M., 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 1905–1916. doi:10.1098/rstb.2005.1722
- Dohm, J.C., Lottaz, C., Borodina, T., Himmelbauer, H., 2008. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 36, e105–e105. doi:10.1093/nar/gkn425
- Dosdall, L.M., Dolinski, M.G., Cowle, N.T., Conway, P.M., 1999. The effect of tillage regime, row spacing, and seeding rate on feeding damage by flea beetles, *Phyllotreta* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae), in canola in central Alberta, Canada. *Crop Prot.* 18, 217–224. doi:10.1016/S0261-2194(99)00019-8
- Dosdall, L.M., Stevenson, F.C., 2005. Managing Flea Beetles (spp.) (Coleoptera: Chrysomelidae) in Canola with Seeding Date, Plant Density, and Seed Treatment. *Agron. J.* 97, 1570. doi:10.2134/agronj2005.0097
- Dosse G , 1952. Zur biologie und Morphologie des schwarzen Triebrüsslers *Ceuthorrhynchus picitarsis* Gyll., mit differentialdiagnostischen Angaben zur Unterscheidung der Larven von *Ceuthorrhynchus napi* Gyll. *C. quadridens* Panz und *C. Picitarsis* Gyll. *Z Angew Entomol* 34:303–312.
- Dupuis, J.R., Roe, A.D., Sperling, F.A.H., 2012. Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough. *Mol. Ecol.* 21, 4422–4436. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05642.x
- Eickermann, M., Ulber, B., Vidal, S., 2011. Resynthesized lines and cultivars of *Brassica napus* L. provide sources of resistance to the cabbage stem weevil (*Ceutorhynchus pallidactylus* (Mrsh.)). *Bull. Entomol. Res.* 101, 287–294. doi:10.1017/S0007485310000489
- Elias & Condamine, 2014 Découverte et analyse de la biodiversité : les moyens actuels Mémoires de la SEF, n° 9, 2014 : 23-39.
- Feng, S., Lo, C.-C., Li, P.-E., Chain, P.S.G., 2016. ADEPT, a dynamic next generation sequencing data error-detection program with trimming. *BMC Bioinformatics* 17. doi:10.1186/s12859-016-0967-z
- Ferguson, A.W., Klukowski, Z., Walczak, B., Perry, J.N., Muggleston, M.A., Clark, S.J., Williams, I.H., 2000. The spatio-temporal distribution of adult *Ceutorhynchus assimilis* in a crop of winter oilseed rape in relation to the distribution of their larvae and that of the parasitoid *Trichomalus perfectus*. *Entomol. Exp. Appl.* 95, 161–171. doi:10.1046/j.1570-7458.2000.00654.x
- Ferguson, A.W., Williams, I.H., Castle, L.M., Skellern, M., 2010. Key Parasitoids of the Pests of Oilseed Rape in Europe: A Guide to Their Identification, in: Williams, I.H. (Ed.), *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 77–114.
- Fisher, 1965. A contribution to the biology of *Eurytoma curculionum* Mayr (Hym., Eurytomidae) *Entomophaga*, 10 (4), 1965, 317-318.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- Fonseca, V.G., Nichols, B., Lallias, D., Quince, C., Carvalho, G.R., Power, D.M., Creer, S., 2012. Sample richness and genetic diversity as drivers of chimera formation in nSSU metagenetic analyses. *Nucleic Acids Res.* 40, e66–e66. doi:10.1093/nar/gks002
- Frézal, L., Leblois, R., 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infect. Genet. Evol.* 8, 727–736. doi:10.1016/j.meegid.2008.05.005

- Fujita, M.K., Leaché, A.D., Burbrink, F.T., McGuire, J.A., Moritz, C., 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 27, 480–488. doi:10.1016/j.tree.2012.04.012
- Galtier, N., Nabholz, B., GléMin, S., Hurst, G.D.D., 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecol.* 18, 4541–4550. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x
- Gariepy, T.D., Kuhlmann, U., Gillott, C., Erlandson, M., 2007. Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of Arthropods. *J. Appl. Entomol.* 131, 225–240. doi:10.1111/j.1439-0418.2007.01145.x
- Gebiola, M., Bernardo, U., Ribes, A., Gibson, G.A.P., 2015. An integrative study of *Necremnus Thomson* (Hymenoptera: Eulophidae) associated with invasive pests in Europe and North America: taxonomic and ecological implications. *Zool. J. Linn. Soc.* 173. doi:10.1111/zoj.12210
- Gerber, E., Hinz, H.L., Blossey, B., Bacher, S., 2012. Two Shoot-Miners, *Ceutorhynchus alliariae* and *Ceutorhynchus roberti*, Sharing the Same Fundamental Niche on Garlic Mustard. *Environ. Entomol.* 41, 1086–1096. doi:10.1603/EN11335
- Giamoustaris, A., Mithen, R., 1995. The effect of modifying the glucosinolate content of leaves of oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) on its interaction with specialist and generalist pests. *Ann. Appl. Biol.* 126, 347–363. doi:10.1111/j.1744-7348.1995.tb05371.x
- Gibson, G.A.P., Gates, M.W., Buntin, G.D., 2006a. Parasitoids (Hymenoptera: Chalcidoidea) of the Cabbage Seedpod Weevil (Coleoptera: Curculionidae) in Georgia, USA. ResearchGate 15.
- Gibson, G.A.P., Gillespie, D.R., Dossall, L., 2006b. The species of Chalcidoidea (Hymenoptera) introduced to North America for biological control of the cabbage seedpod weevil, and the first recovery of *Stenomalina gracilis* (Chalcidoidea: Pteromalidae). *Can. Entomol.* 138, 285–291. doi:10.4039/n05-110
- Gibson, J., Shokralla, S., Porter, T.M., King, I., van Konynenburg, S., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Hajibabaei, M., 2014. Simultaneous assessment of the macrobiome and microbiome in a bulk sample of tropical arthropods through DNA metasytematics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 8007–8012. doi:10.1073/pnas.1406468111
- Gillespie, D.R., Mason, P.G., Dossall, L.M., Bouchard, P., Gibson, G.A.P., 2006. Importance of long-term research in classical biological control: an analytical review of a release against the cabbage seedpod weevil in North America. *J. Appl. Entomol.* 130, 401–409. doi:10.1111/j.1439-0418.2006.01085.x
- Harmon BL, McCaffrey JP (1997) Parasitism of adult *Ceutorhynchus assimilis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Microctonus melanopus* (Hymenoptera: Braconidae) in northern Idaho and eastern Washington. *J Agr Entomol* 14: 55–59
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270, 313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218
- Hendrich, L., Morinière, J., Haszprunar, G., Hebert, P.D.N., Hausmann, A., Köhler, F., Balke, M., 2015. A comprehensive DNA barcode database for Central European beetles with a focus on Germany: adding more than 3500 identified species to BOLD. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 795–818. doi:10.1111/1755-0998.12354
- Hoffmann, A. (1954) Coléoptères Curculionides (Deuxième Partie). *Faune de France*, 59, Éd. Paul Lechevalier, Paris : 487-1208.
- Holland, J.M., 2004. The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agric. Ecosyst. Environ.* 103, 1–25. doi:10.1016/j.agee.2003.12.018
- Hummel, J.D., Dossall, L.M., Clayton, G.W., Harker, K.N., O'Donovan, J.T., 2010. Responses of the parasitoids of *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae) to the vegetational diversity of intercrops. *Biol. Control* 55, 151–158. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.08.004
- Hurst, G.D.D., Jiggins, F.M., Hinrich Graf von der Schulenburg, J., Bertrand, D., West, S.A., Goriacheva, I.I., Zakharov, I.A., Werren, J.H., Stouthamer, R., Majerus, M.E.N., 1999. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 266, 735–740. doi:10.1098/rspb.1999.0698

- Ivan J, Tanja G C, Dinka G, 2011. Rape Stem Weevil (*Ceutorhynchus napi* Gyll. 1837) and Cabbage Stem Weevil (*Ceutorhynchus pallidactylus* Marsh. 1802) (Coleoptera: Curculionidae) – Important Oilseed Rape Pests. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol 76, No 2 (2011)
- Jourdheuil, P., 1961. Influence de quelques facteurs écologiques sur les fluctuations de population d'une biocénose parasitaire: étude relative à quelques Hyménoptères (Ophioninae, Diopsilinae, Euphorinae) parasites de divers Coléoptères inféodés aux Crucifères. Institut national de la recherche agronomique, Paris.
- Jourdheuil, P., 1963. *Ceutorrhynchini* : 1006-1070. In : Balachowsky, A. S. (ed.) : *Traité d'Entomologie appliquée à l'Agriculture. Coléoptères. Tome I, Second volume*, Masson et Cie Éditeurs, Paris : 567-1391
- Kekkonen, M., Mutanen, M., Kaila, L., Nieminen, M., Hebert, P.D.N., 2015. Delineating Species with DNA Barcodes: A Case of Taxon Dependent Method Performance in Moths. *PLOS ONE* 10, e0122481. doi:10.1371/journal.pone.0122481
- Klukowski Z, Kelm M, 2000. *Stenomalina gracilis* (Walker), a new parasitoid reared from *Ceutorhynchus napi* Gyll. in Poland. *IOBC/wprs Bulletin* 23 (6), 135–8.
- Kuhlmann, U., Mason, P.G., Hinz, H.L., Blossey, B., De Clerck-Floate, R.A., Dosdall, L.M., McCaffrey, J.P., Schwarzlaender, M., Olfert, O., Brodeur, J., Gassmann, A., McClay, A.S., Wiedenmann, R.N., 2006. Avoiding conflicts between insect and weed biological control: selection of non-target species to assess host specificity of cabbage seedpod weevil parasitoids. *J. Appl. Entomol.* 130, 129–141. doi:10.1111/j.1439-0418.2006.01040.x
- Krause U., Koopmann B., Ulber B., 2006. Impact of rape stem weevil, *Ceutorhynchus napi*, on the early stem infections of oilseed rape by *Phoma lingam*. *IOBC WPRS Bulletin* 29, 323–328.
- Kraus P, Kromp B, 2002. Parasitization rates of the oilseed rape pests *Ceutorhynchus napi*, *Ceutorhynchus pallidactylus* (Coleoptera, Curculionidae) and *Meligethes aeneus* (Coleoptera, Nitidulidae) by Ichneumonids in several localities of eastern Austria. *IOBC/WPRS Bull* 25:117–122
- Laffin, R.D., Dosdall, L.M., Sperling, F.A.H., 2005. Population structure and phylogenetic relationships of *Ceutorhynchus neglectus* (Coleoptera: Curculionidae). *Can. Entomol.* 137, 672–684. doi:10.4039/n05-046
- Lancashire, P.D., Bleiholder, H., Boom, T.V.D., Langeldedeke, P., Stauss, R., Weber, E., Witzemberger, A., 1991. A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Ann. Appl. Biol.* 119, 561–601. doi:10.1111/j.1744-7348.1991.tb04895.x
- Leite, L.A.R., 2012. Mitochondrial pseudogenes in insect DNA barcoding: differing points of view on the same issue. *Biota Neotropica* 12, 301–308. doi:10.1590/S1676-06032012000300029
- Lerin, J., 1991. Influence de la phenologie de la plante hôte sur la reproduction de *Ceutorhynchus assimilis* Payk. *J. Appl. Entomol.* 111, 303–310. doi:10.1111/j.1439-0418.1991.tb00327.x
- Lerin 1995, baris des crucifères : critère de détermination des larves et biologie *Bulletin de la société entomo de Fr*, 1003 aout, 315-324
- Little, D.P., 2011. DNA Barcode Sequence Identification Incorporating Taxonomic Hierarchy and within Taxon Variability. *PLoS ONE* 6, e20552. doi:10.1371/journal.pone.0020552
- Löbl, I., Smetana, A. (Eds.), 2013. *Curculionoidea II, Catalogue of Palaearctic Coleoptera*. Brill, Leiden.
- Martin, N., Müller, C., 2007. Induction of plant responses by a sequestering insect: Relationship of glucosinolate concentration and myrosinase activity. *Basic Appl. Ecol.* 8, 13–25. doi:10.1016/j.baae.2006.02.001
- Médiène, S., Valantin-Morison, M., Sarthou, J.-P., de Tourdonnet, S., Gosme, M., Bertrand, M., Roger-Estrade, J., Aubertot, J.-N., Rusch, A., Motisi, N., Pelosi, C., Doré, T., 2011. Agroecosystem management and biotic interactions: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 31, 491–514. doi:10.1007/s13593-011-0009-1
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *IEEE*, pp. 1–8. doi:10.1109/GCE.2010.5676129
- Monti, M.M., Nappo, A.G., Giorgini, M., 2005. Molecular characterization of closely related species in the parasitic genus *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene. *Bull. Entomol. Res.* 95, 401–408.

- Moore, A.Ø., Holmes, E.C., 2000. The evolution of base composition and phylogenetic inference. *Trends Ecol. Evol.* 15, 365–369. doi:10.1016/S0169-5347(00)01934-0
- Munro, J.B., Heraty, J.M., Burks, R.A., Hawks, D., Mottern, J., Cruaud, A., Rasplus, J.-Y., Jansta, P., 2011. A Molecular Phylogeny of the Chalcidoidea (Hymenoptera). *PLoS ONE* 6, e27023. doi:10.1371/journal.pone.0027023
- Murchie, A., Williams, I.H. & Perry, J. *BioControl* (1999) Edge distributions of *Ceutorhynchus assimilis* and its parasitoid *Trichomalus perfectus* in a crop of winter oilseed rape (*Brassica napus*) 44: 379. doi:10.1023/A:1009997917947
- Nilsson, C., 2010. Impact of Soil Tillage on Parasitoids of Oilseed Rape Pests, in: Williams, I.H. (Ed.), *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 305–311.
- Nilsson, C., 2009. Impact of ploughing on emergence of pollen beetle parasitoids after hibernation. *Z. Für Angew. Entomol.* 100, 302–308. doi:10.1111/j.1439-0418.1985.tb02783.x
- Page, T.J., Choy, S.C., Hughes, J.M., 2005. The taxonomic feedback loop: symbiosis of morphology and molecules. *Biol. Lett.* 1, 139–142. doi:10.1098/rsbl.2005.0298
- Pattengale, N.D., Alipour, M., Bininda-Emonds, O.R.P., Moret, B.M.E., Stamatakis, A., 2010. How Many Bootstrap Replicates Are Necessary? *J. Comput. Biol.* 17, 337–354. doi:10.1089/cmb.2009.0179
- Pereira, F., Carneiro, J., Amorim, A., 2008. Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 2, 187–199.
- Pessel, D., Lecomte, J., Emeriau, V., Krouti, M., Messean, A., Gouyon, P.H., 2001. Persistence of oilseed rape (*Brassica napus* L.) outside of cultivated fields. *Theor. Appl. Genet.* 102, 841–846. doi:10.1007/s001220100583
- Pickett, C.H., Bugg, R.L. (Eds.), 1998. *Enhancing biological control: habitat management to promote natural enemies of agricultural pests*. University of California Press, Berkeley.
- Poulain, D., Barloy, J., 2012. *Reconnaître facilement les champs: découvrir, repérer, identifier, connaître*. Delachaux et Niestlé, Paris.
- PROLEA, 2014. *Statistiques des oléagineux et protéagineux, Huiles et protéines végétales 2013-2014*. <http://www.terresoleopro.com/sites/default/files/mediabox/files/statistiques-terres-oleopro-2013-2014.pdf>
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G., 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation: ABGD, AUTOMATIC BARCODE GAP DISCOVERY. *Mol. Ecol.* 21, 1864–1877. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x
- Rakow, G., Woods, D.L., 1987. OUTCROSSING IN RAPE AND MUSTARD UNDER SASKATCHEWAN PRAIRIE CONDITIONS. *Can. J. Plant Sci.* 67, 147–151. doi:10.4141/cjps87-017
- Ratcliffe, S.T., Webb, D.W., Weinzievr, R.A., Robertson, H.M., 2003. PCR-RFLP identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae)--a generally applicable method. *J. Forensic Sci.* 48, 783–785.
- Read, D.P., Feeny, P.P., Root, R.B., 1970. HABITAT SELECTION BY THE APHID PARASITE *DIAERETIELLA RAPAE* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) AND HYPERPARASITE *CHARIPS BRASSICAE* (HYMENOPTERA: CYNIPIDAE). *Can. Entomol.* 102, 1567–1578. doi:10.4039/Ent1021567-12
- Robert, C., Ruck, L., Leflon, M., 2016. Ravageurs du colza: la France rattrapée par les résistances. *Perspectives Agric.* 434, 36–39.
- Sarkar, I.N., Planet, P.J., Bael, T.E., Stanley, S.E., Siddall, M., DeSalle, R., Figurski, D.H., 2002. Characteristic attributes in cancer microarrays. *J. Biomed. Inform.* 35, 111–122.
- Schindel, D.E., Miller, S.E., 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature* 435, 17–17. doi:10.1038/435017b
- Schlick-Steiner, B.C., Steiner, F.M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., Crozier, R.H., 2010. Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 421–438. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085432
- Shokralla, S., Porter, T.M., Gibson, J.F., Dobosz, R., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Golding, G.B., Hajibabaei, M., 2015. Massively parallel multiplex DNA sequencing for specimen identification using an Illumina MiSeq platform. *Sci. Rep.* 5, 9687. doi:10.1038/srep09687

- Snowdon, R.J., Friedrich, T., Friedt, W., Köhler, W., 2002. Identifying the chromosomes of the A- and C-genome diploid *Brassica* species *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea* in their amphidiploid *B. napus*. *Theor. Appl. Genet.* 104, 533–538. doi:10.1007/s00122-001-0787-y
- Song, H., Buhay, J.E., Whiting, M.F., Crandall, K.A., 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 13486–13491. doi:10.1073/pnas.0803076105
- Terres Inovia 2016, « Terres Inovia, Guide de Culture Colza 2016. », Thivernal-Grignon, mai 2016. 48p.
- Tixier, M.-S., 2012. Statistical approaches to assess intraspecific variations of morphological continuous characters: the case study of the family Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata). *Cladistics* 28, 489–502. doi:10.1111/j.1096-0031.2012.00394.x
- Tronquet M., 2014 (coord.) – Catalogue des coléoptères de France -Supplément au Tome XXIII – R.A.R.E. – Mai 2014 ISSN : 1288-5509. – 1052 p.
- Ulber, B., Williams, I.H., Klukowski, Z., Luik, A., Nilsson, C., 2010. Parasitoids of Oilseed Rape Pests in Europe: Key Species for Conservation Biocontrol, in: Williams, I.H. (Ed.), *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 45–76.
- Valantin-Morison, M., 2012. Comment favoriser la régulation biologique des insectes de l'échelle de la parcelle à celle du paysage agricole, pour aboutir à des stratégies de protection intégrée sur le colza d'hiver ? *Ol. Corps Gras Lipides* 19, 169–183. doi:10.1051/ocl.2012.0455
- Wiemers, M., Fiedler, K., 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Front. Zool.* 4, 8. doi:10.1186/1742-9994-4-8
- Williams, I.H. (Ed.), 2010. *Biocontrol-based integrated management of oilseed rape pests*. Springer, Dordrecht.
- Williams, I.H., Cook, S.M., 2010. Crop Location by Oilseed Rape Pests and Host Location by Their Parasitoids, in: Williams, I.H. (Ed.), *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 215–244.
- Williams, I.H., Free, J.B., 1979. Compensation of oil-seed rape (*Brassica napus* L.) plants after damage to their buds and pods. *J. Agric. Sci.* 92, 53. doi:10.1017/S0021859600060494
- Wolf, C., Rentsch, J., Hübner, P., 1999. PCR–RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1350–1355. doi:10.1021/jf9808426
- Yu, D.W., Ji, Y., Emerson, B.C., Wang, X., Ye, C., Yang, C., Ding, Z., 2012. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring: Biodiversity soup. *Methods Ecol. Evol.* 3, 613–623. doi:10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x
- Yu D. S., Achterberg C. van, Horstmann K. Taxapad 2012, Ichneumonoidea 2011. Database on flash-drive. www.taxapad.com
- Zhang, A.-B., Muster, C., Liang, H.-B., Zhu, C.-D., Crozier, R., Wan, P., Feng, J., Ward, R.D., 2012. A fuzzy-set-theory-based approach to analyse species membership in DNA barcoding: SPECIES MEMBERSHIP IN DNA BARCODING. *Mol. Ecol.* 21, 1848–1863. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05235.x
- Zheng, D., Frankish, A., Baertsch, R., Kapranov, P., Reymond, A., Choo, S.W., Lu, Y., Denoeud, F., Antonarakis, S.E., Snyder, M., Ruan, Y., Wei, C.-L., Gingeras, T.R., Guigo, R., Harrow, J., Gerstein, M.B., 2007. Pseudogenes in the ENCODE regions: Consensus annotation, analysis of transcription, and evolution. *Genome Res.* 17, 839–851. doi:10.1101/gr.5586307

ANNEXE 1 : STADES VEGETATIFS REPERES CHEZ LE COLZA D'HIVER (Pilorgé *et al.*, 1997) :

- **A** est le **stade cotylédonnaire**, seuls les deux cotylédons sont visibles
- **B** correspond à la **formation de la rosette** durant l'hiver, il n'y a pas de tiges ni d'entre-nœud entre les pétioles des feuilles. Les stades intermédiaires B1, B2 [...] B10 font référence au nombre de feuilles vraies déployées dans la rosette.
- Au printemps, le stade **C** marque la **montaison**, c'est-à-dire la reprise de la végétation et l'apparition de la tige.
- **D** caractérise le **stade de boutons accolés**. Ils sont d'abord recouverts par les feuilles puis l'inflorescence se dégage. La plante mesure alors plus de 20 cm entre la base de la rosette et les boutons floraux.
- **E** fait référence au **stade de boutons séparés** durant lequel les pédoncules floraux s'allongent.
- **F** marque la **floraison** avec l'ouverture progressive de l'intégralité des fleurs, jaunes, de la hampe florale.
- **G** correspond à la période de **formation des siliques**, de la chute des premiers pétales, en passant par la croissance des siliques et leur passage du vert au brun, jusqu'à la coloration des graines qui deviendront noirs à maturité (Alford, 2003).

Selon le système BBHC, visant à uniformiser la description des stades de développement, un stade est atteint lorsque 50% des plantes sont à ce stade (Lancashire *et al.*, 1991).

**ANNEXE 2 : SEQUENCES DE *CEUTORHYNCHUS* EXTRAITES DE BOLD
(EXTREMITE 5' DU GENE CO1, 658BP)**

Espèces	Identifiant séquence	Origine géographique	Référence
<i>Ceutorhynchus napi</i>	FBCOA037_10	Germany, North Rhine Westphalia	(Hendrich <i>et al.</i> , 2015)
	GBCOU3562_13	Germany, Baden Wuerttemberg	
<i>Ceutorhynchus obstrictus</i>	COLFD448_12	Finland, Savonia australis	(Pentinsaari <i>et al.</i> , 2014)
	COLFD449_12	Finland, Savonia australis	(Pentinsaari <i>et al.</i> , 2014)
<i>Ceutorhynchus pallidactylus</i>	COLFE1504_13	Sweden	(Pentinsaari <i>et al.</i> , 2014)
	FBCOA194_10	Germany, Rhineland Palatinate	(Hendrich <i>et al.</i> , 2015)
<i>Ceutorhynchus picitarsis</i>	FBCOB774_10	Germany, Rhineland Palatinate	(Hendrich <i>et al.</i> , 2015)
	FBCOF143_12	Germany, Rhineland Palatinate	
<i>Ceutorhynchus typhae</i>	COLFB210_12	Finland, Aland Islands	(Pentinsaari <i>et al.</i> , 2014)
	COLFB209_12	Finland, Aland Islands	(Pentinsaari <i>et al.</i> , 2014)
<i>Ceutorhynchus assimilis</i>	GBCOG703-13	Germany, Rhineland Palatinate	(Hendrich <i>et al.</i> , 2015)
	FBCOF142_12	Germany, Rhineland Palatinate	(Hendrich <i>et al.</i> , 2015)
<i>Ceutorhynchus roberti</i>	FBCOA411_10	Germany, North Rhine Westphalia	
<i>Ceutorhynchus gallorhenanus</i>	COLFF1032-13	Finland, Nylandia	(Pentinsaari <i>et al.</i> , 2014)
	LEFIJ1860-13	Finland, Savonia australis	(Pentinsaari <i>et al.</i> , 2014)
	LEFIJ1861-13	Finland, Regio aboensis	(Pentinsaari <i>et al.</i> , 2014)
	LEFIJ1862-13	Finland, Regio aboensis	(Pentinsaari <i>et al.</i> , 2014)

ANNEXE 3 : MATRICES DES CARACTERES RENSEIGNEES CHEZ LES CHARANÇONS DU COLZA DANS LUCIDBUILDER®. a. *Aulacobaris coerulescens* b. *Melanobaris laticollis* c. *Ceutorhynchus pictararsis* d. *C. napi* e. *C. pallidactylus* f. *C. assimilis* g. *C. typhae* h. *C. obstrictus*. En vert : caractère rarement observé.

	a	b	c	d	e	f	g	h
▼ Tête								
Tête prolongée par un rostre	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tête non prolongée par un rostre								
▼ Antennes								
Antennes coudées entre scape et funicule	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Antennes non coudées entre scape et funicule								
Nombre d'articles au funicule antennaire	7	7	7	7	7	7	6	7
▼ Corps								
▼ Ratio longueur/largeur (Long. : de la base du rostre à l'apex des élytres. Larg. : la plus large section)								
Ratio long/larg inférieur à 2 (Forme trapue et ovale)			✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ratio long/larg supérieur à 2 (Forme oblong)	✓	✓						
▼ Revêtement								
Corps glabre	✓	✓						
Corps pubescent			✓	✓	✓	✓	✓	✓
▼ Reflet								
Corps à reflets métalliques ou brillants	✓	✓	✓			✓	✓	✓
Corps à reflets mats			✓	✓	✓	✓	✓	✓
▼ Couleur								
Corps vert/bleu métallique	✓							
Corps noir, gris ou brun		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
▼ Paquets de squamules dans l'angle thoraco-élytral								
Présence de paquets de squamules dans l'angle thoraco-élytral			✓	✓	✓	✓	✓	✓
Absence de paquets de squamules dans l'angle thoraco-élytral	✓	✓						
▼ Longueur (de l'extrémité de l'abdomen jusqu'au bout du rostre)								
Longueur généralement inférieure à 3.5 mm		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Longueur généralement supérieure à 3.5 mm	✓		✓					
▼ Pronotum								
Pronotum glabre à gros points serrés avec une ligne médiane lisse très nette	✓							
Pronotum glabre à fins points espacés sur le disque (centre) et plus serrés sur les bords latéraux		✓						
Pronotum orné de squamules (poils épais) à l'avant et à l'arrière du sillon médian			✓	✓	✓	✓	✓	✓
▼ Elytres								
▼ Aspect du revêtement								
Revêtement des élytres appliqué contre le tégument	■	■		✓		✓	✓	✓
Revêtement des élytres dressé, visible de profil	■	■	✓		✓			
▼ Revêtement constitué d'un mélange de soies (poils fins) et de squamules (poils épais en forme d'écaille)								
Oui, mélange de soies et de squamules	■	■		✓				
Non, uniquement des soies OU des squamules	■	■	✓	✓		✓	✓	✓
▼ Squamules (poils épais en forme d'écaille) blanches ordonnées, 2 rangées par interstries								
Oui, squamules en rangées de 2 par interstries	■	■					✓	✓
Non, squamules différemment ordonnées	■	■	✓	✓	✓	✓		
▼ Squamules (poils épais en forme d'écaille) blanches ordonnées, au moins 3 rangées par interstries								
Oui, squamules en rangées de 3 au minimum par interstries	■	■		✓				
Non, Squamules différemment ordonnées	■	■	✓		✓	✓	✓	✓
▼ Tâche scutellaire bien tranchée (amas de squamules au niveau du scutellum)								
Tâche scutellaire bien tranchée	■	■	✓		✓			
Tâche scutellaire absente ou non visible	■	■		✓		✓	✓	✓
▼ Pattes								
▼ Ongles								
Ongles dentés			✓	✓	✓	✓		
Ongles simples	✓	✓					✓	✓
▼ Couleur tarse (pour un spécimen mûre)								
Tarses noirs	✓	✓		✓		✓	✓	✓
Tarses roux			✓		✓			
▼ Sur le tibia antérieur, épine apicale dirigée vers l'intérieur								
Présence d'une épine apicale dirigée vers l'intérieur sur le tibia antérieur	✓	✓						
Absence d'une épine apicale dirigée vers l'intérieur sur le tibia antérieur			✓	✓	✓	✓	✓	✓
▼ Sur le fémur postérieur, fine épine noire sur la face inférieure								
Présence d'une épine noire sur le fémur postérieur, parfois cachée sous un amas de squamules			✓		✓	✓		
Absence ou invisibilité de l'épine du fémur postérieur	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓

ANNEXE 4 : MATRICES DES CARACTERES RENSEIGNEES CHEZ LES HYMENOPTERES PARASITOÏDES DES CHARANÇONS DU COLZA DANS LUCIDBUILDER®. a. *Aneucelis* sp. b. *Phradis* sp. c. *Tersilochus obscurator* d. *T. microgaster* e. *T. heterocerus* f. *T. fulvipes* g. *Triaspsis caudata* h. *Diospilus capito* i. *D. oleraceus* j. *Microctonus melanopus* k. *Mesopolobus morys* mâle l. *Mesopolobus morys* femelle m. *Trichomalus perfectus* n. *Stenomalina gracilis* o. *Necrmenus hippia* p. *Anaphes* sp. q. *Euplemus vesicularis* r. *Eupelmus messene* s. *Eurytoma curculionum*.

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s
▼ Corps à reflets métalliques																			
Oui													✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Non	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
▼ Taille du corps (du sommet de la tête à l'extrémité de l'abdomen)																			
Supérieure à 1 mm	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Inférieure à 1 mm																✓			
▼ Antennes																			
▼ Forme du scape																			
Court et globuleux	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓								
Allongé												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
▼ Nombre d'articles antennaires																			
Inférieur à 16												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Supérieur à 16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓								
Nombre d'articles au funicule (chez la femelle)												5	5	6	6	3	5/8	5/6	5/6
▼ Nombre d'anelli																			
0 ou 1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓	✓	✓	✓	✓
2														✓	✓				
3												✓	✓						
▼ Antennes coudées entre scape et pédicelle																			
Oui												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Non	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓								
▼ Insertions antennaires																			
Largement séparés (proches des yeux)																			✓
Etroitement séparés	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
▼ Taille relative du 2ème article du flagelle antennaire																			
Plus mince et plus court que le 3ème					✓														
Aussi large et plus long que le 3ème			✓	✓		✓													
▼ Forme du flagelle antennaire																			
Flagelle court et épais vers l'apex, avec les flagellomères transverses (plus larges que longs)												✓	✓						
Flagelle allongé et filiforme, avec les flagellomères au moins aussi longs que larges													✓	✓					
▼ Tête																			
▼ Front et vertex																			
Pourvus de sutures (formant un H)																			✓
Dépourvus de sutures	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
▼ Mésosoma																			
▼ Prepectus (séparant le pronotum de la tegula)																			
Présent												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Absent	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓								
▼ Stigmate mésothoracique																			
Visible à l'angle du prepectus												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Non visible																			✓
▼ Propodeum																			
▼ Nombre de carènes médiane en avant de l'aréole																			
1	✓																		
2		✓	✓	✓	✓	✓													
▼ Ornementation du propodéum																			
Faiblement aréolé, lisse par endroits										✓									
Fortement aréolé, granuleux											✓								
▼ Aile antérieure																			
▼ Développement de l'aile																			
Normalement développée, membraneuse et dépassant l'apex du métasoma	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Réduite à écaille																	✓	✓	
▼ Nombre de cellules fermées																			
Moins de 4												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4 ou plus	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓								
▼ Cellule costale																			
Présente mais ouverte sur l'extérieur												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Absente	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓								


ANNEXE 4 : SUITE a. *Aneuclis* sp. b. *Phradis* sp. c. *Tersilochus obscurator* d. *T. microgaster* e. *T. heterocerus* f. *T. fulvipes* g. *Triaspsis caudata* h. *Diospilus capito* i. *D. oleraceus* j. *Microctonus melanopus* k. *Mesopolobus morys* mâle l. *Mesopolobus morys* femelle m. *Trichomalus perfectus* n. *Stenomalina gracilis* o. *Necrmenus hippia* p. *Anaphes* sp. q. *Euplemus vesicularis* r. *Eupelmus messene* s. *Eurytoma curculionum*.

- ▼ Ptérostigma
 - Présent
 - Absent
- ▼ Nervure 2m-cu
 - Présente (parfois partiellement pigmentée)
 - Absente
- ▼ 2ème cellule submarginale
 - Présente
 - Absente
- ▼ Cellule subdiscoïdale
 - Ouverte
 - Fermée (un pli de l'aile peut donner l'impression d'une légère ouverture)
- ▼ Cellule submarginale 1 et discoïdale 1
 - Fusionnées
 - Séparées
- ▼ Position relative de 2m-cu par rapport à 1r-m (la division des nervures Rs et M)
 - Basale
 - Opposée ou apicale
- ▼ Base de l'aile
 - Pourvue d'une ligne de soies oblique dirigée vers l'apex
 - Dépourvue d'une telle ligne de soie
- ▼ Nervure marginale
 - Normale
 - Epaissie (chez le mâle)
- ▼ Aile postérieure
 - ▼ Forme générale
 - Normalement élargie
 - Etroite et frangée
- ▼ Pattes
 - Nombre d'articles aux tarsi
 - ▼ Nombre d'éperons apicaux des méso tibias
 - 1
 - 2
 - ▼ Forme de l'éperon apical des méso tibias
 - Long et fort
 - Fin
 - ▼ Pilosité de la hanche postérieure
 - Au moins avec quelques soies
 - Densément ciliée
- ▼ Métasoma
 - ▼ Premier article du métasoma
 - Aminci en pétiole
 - Non particulièrement aminci

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s
▼ Ptérostigma																			
Présent	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓									
Absent											✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓
▼ Nervure 2m-cu																			
Présente (parfois partiellement pigmentée)	✓	✓	✓	✓	✓	✓													
Absent							✓	✓	✓	✓									
▼ 2ème cellule submarginale																			
Présente									✓	✓									
Absent	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓									
▼ Cellule subdiscoïdale																			
Ouverte	✓										✓								
Fermée (un pli de l'aile peut donner l'impression d'une légère ouverture)		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										
▼ Cellule submarginale 1 et discoïdale 1																			
Fusionnées	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓									
Séparées							✓	✓	✓										
▼ Position relative de 2m-cu par rapport à 1r-m (la division des nervures Rs et M)																			
Basale		✓																	
Opposée ou apicale	✓		✓	✓	✓	✓													
▼ Base de l'aile																			
Pourvue d'une ligne de soies oblique dirigée vers l'apex																		✓	
Dépourvue d'une telle ligne de soie											✓	✓	✓	✓	✓				✓
▼ Nervure marginale																			
Normale													✓	✓	✓	✓			✓
Epaissie (chez le mâle)											✓								
▼ Aile postérieure																			
▼ Forme générale																			
Normalement élargie	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓
Etroite et frangée																	✓		
▼ Pattes																			
Nombre d'articles aux tarsi	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5
▼ Nombre d'éperons apicaux des méso tibias																			
1											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓									
▼ Forme de l'éperon apical des méso tibias																			
Long et fort																		✓	✓
Fin											✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓
▼ Pilosité de la hanche postérieure																			
Au moins avec quelques soies											✓	✓		✓	✓				✓
Densément ciliée												✓					✓	✓	
▼ Métasoma																			
▼ Premier article du métasoma																			
Aminci en pétiole	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓									✓
Non particulièrement aminci							✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

ANNEXE 4 : SUITE a. *Aneuclis* sp. b. *Phradis* sp. c. *Tersilochus obscurator* d. *T. microgaster* e. *T. heterocerus* f. *T. fulvipes* g. *Triaspsis caudata* h. *Diospilus capito* i. *D. oleraceus* j. *Microctonus melanopus* k. *Mesopolobus morys* mâle l. *Mesopolobus morys* femelle m. *Trichomalus perfectus* n. *Stenomalina gracilis* o. *Necrmenus hippia* p. *Anaphes* sp. q. *Euplemus vesicularis* r. *Eupelmus messene* s. *Eurytoma curculionum*.

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s	
▼ Fusion des segments du métasoma																				
Tous les segments fusionnés, formant une sorte de carapace, mais présentant 2 sillons transverses							✓													
Autre conformation, au moins certains segments séparés	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
▼ Pilosité à la base du gaster																				
Peu ou pas ciliée	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Très densément ciliée													✓							
▼ Ovipositeur																				
▼ Longueur																				
Dépassant nettement du gaster	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										
Dépassant à peine du gaster												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
▼ Ornementation de l'apex de l'ovipositeur (Ichneumonidae, Tersilochinae)																				
type 1	✓	✓																		
type 2						✓														
type 3					✓															
type 4			✓	✓																
▼ Hôte																				
Aulacobaris coerulescens (Baris des crucifères)																				
Ceutorhynchus assimilis (Charançon gallicole)	✓							✓	✓	✓					✓				✓	
Ceutorhynchus napi (Charançon de la tige du colza)						✓		✓	✓	✓					✓					
Ceutorhynchus obstrictus (Charançon des siliques)	✓							✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ceutorhynchus pallidactylus (Charançon de la tige du chou)			✓			✓		✓	✓	✓										
Ceutorhynchus picitarsis (Charançon du bourgeon terminal)								✓	✓	✓										
Melanobaris laticollis (Baris des crucifères)																				✓
Meligethes spp. (Mélégèthe du colza)	✓	✓			✓			✓	✓											
Psylliodes spp. (Altise des crucifères)	✓			✓				✓	✓	✓										
▼ Stade parasité																				
Oeuf																	✓			
Larve et nymphe	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Adulte											✓									

	Diplôme : Ingénieur agronome Spécialité : Protection des Plantes et Environnement Tuteur : Marie-Stéphane Tixier
Auteur : Mélodie Ollivier Date de naissance : 22/03/1992	Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP) Avenue du Campus Agropolis, 34980 Montferrier-sur-Lez
Nb de pages : 68 Annexes : 4	
Année de soutenance : 2016	Maître de stage : Jean-Claude Streito
Titre français : Elaboration d'outils de diagnostic morphologiques et moléculaires en vue d'identifier les charançons du colza et leurs hyménoptères parasitoïdes Titre anglais : Conception of morphologic and molecular diagnostic tools to identify oilseed rape weevils and their hymneopteran parasitoids	
<p>Le colza oléagineux est la grande culture qui consomme le plus d'insecticides en France. Sept espèces de charançons, présentant une nuisibilité variable, et seize espèces de parasitoïdes constituent le cortège associé à cette culture. La lutte biologique par conservation est l'approche durable soutenue par le projet COLEOTOOL, comme alternative à la lutte chimique devenue inefficace sur certains ravageurs. La difficulté à identifier les charançons et leurs parasitoïdes et le manque de données récentes sur ces relations de parasitismes constitue la problématique à laquelle répondent le CBGP et Terres Inovia par l'élaboration d'outils de diagnostic morphologiques et moléculaires. Les spécimens collectés en France ont été identifiés morphologiquement et le gène de la cytochrome c oxydase 1 (CO1) du génome mitochondrial a été séquencé pour quelques individus des différentes espèces obtenues. L'inférence d'arbres phylogéniques par maximum de vraisemblance a permis d'étudier la congruence des résultats morphologiques et moléculaires. Une base de séquences de référence a ainsi été créée, contenant 108 séquences de charançons et 145 d'hyménoptères parasitoïdes de ces charançons. 10 de ces espèces ne présentaient jusqu'à présent aucune séquence dans les bases de données mondiales. Des systèmes d'identification interactifs ont aussi été conçus via le logiciel LUCID®. Grâce à ces outils Terres Inovia est en mesure d'analyser les échantillons issus d'un large réseau de parcelles pour étudier les variables favorables à la lutte biologique par conservation contre les charançons du colza en France.</p> <p>Mots-clés : Colza, charançons, hyménoptères parasitoïdes, identification moléculaire, clé digitale</p>	
<p>Oilseed rape in France is the arable crop the most treated against pests. Seven species of weevils (<i>Ceutorhynchus sp.</i>, <i>Aulacobaris sp.</i> and <i>Melanobaris sp.</i>) are known to attack oilseed rape all along its biological cycle, but the expression of their pest potential differs among species. Sixteen parasitoids contribute to the natural regulation of these pests. Conservation biological control is the sustainable approach supported by the COLEOTOOL project, as an alternative to the use of insecticides. Indeed, the rape winter stem weevil (<i>C. pycitarsis</i>) already started to develop resistance to pyrethroids in France. The lack of recent data about host/parasitoids interactions and the difficulty to identify weevils and their parasitoids constitute the issue that the CBGP and the agronomical institute Terres Inovia, must solve by the development of molecular and morphological identification tools. Terres Inovia directed the sampling campaign over nine collection sites in France. The specimens have been identified by taxonomists at the CBGP, and the cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) of the mitochondrial gene has been sequenced for some of the specimens of the species identified. Phylogenetic inference, using maximum likelihood, has been employed to delineate species and study the congruence of morphological and molecular data. Further observations of vouchers permitted to correct identification errors, even describe new species characters for close species. The sequences of 108 weevils have been validated. They mostly belong to the four species the most represented in samplings (<i>C. napi</i>, <i>C. obstrictus</i>, <i>C. pallidactylus</i> et <i>C. pycitarsis</i>). 145 sequences of parasitoids hymenoptera have been validated, belonging to 12 different species. Among them, ten did not present any sequence accessible on global database. A reference collection of specimen accompanies the sequence database. Two digital polytomous keys has been created using LUCID software, dedicated to weevils and their parasitoids. They integrate a larger spectrum of species and characters newly reviewed. Thanks to these tools Terres Inovia will be able to analyse samples coming from a large network of plots in France, aiming at studying the favourable factors to conservation biological control of rape weevils.</p> <p>Keywords: oilseed rape, weevils, parasitoids, molecular identification, digital key</p>	