



HAL
open science

Caractérisation des bactéries endosymbiotiques Wolbachia d'un auxiliaire de lutte biologique contre la mouche de l'olive *Psytalia lounsburyi*

Sylvie Warot, Marie-Claude Bon, Nicolas Ris

► **To cite this version:**

Sylvie Warot, Marie-Claude Bon, Nicolas Ris. Caractérisation des bactéries endosymbiotiques Wolbachia d'un auxiliaire de lutte biologique contre la mouche de l'olive *Psytalia lounsburyi*. Cahier des Techniques de l'INRA, 2013, 78 (1), pp.1. hal-04632475

HAL Id: hal-04632475

<https://hal.science/hal-04632475v1>

Submitted on 2 Jul 2024

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Caractérisation des bactéries endosymbiotiques *Wolbachia* d'un auxiliaire de lutte biologique contre la mouche de l'olive *Psytalia lounsburyi*

Sylvie Warot¹, Marie-Claude Bon², Nicolas Ris¹

Résumé. L'interaction entre un auxiliaire de lutte biologique, *Psytalia lounsburyi*, et une bactérie endosymbiotique, *Wolbachia*, est à l'étude. Cet article aborde trois volets complémentaires à des résultats déjà publiés ou en cours de valorisation: (i) la caractérisation moléculaire multi-locus des deux variants bactériens connus, (ii) la mise au point d'amorces spécifiques facilitant le diagnostic de routine ; (iii) l'étude de l'influence de certains paramètres méthodologiques (méthode d'extraction et conditions PCR) et de caractéristiques inhérentes au parasitoïde (âge, sexe, origine géographique).

Mots clés : amorces variants-spécifiques, caractérisation multi-locus, lutte biologique, *Psytalia lounsburyi*, *Wolbachia*

Introduction

Les bactéries du genre *Wolbachia* représentent l'un des groupes de bactéries parasites facultatifs les plus fréquents chez les Arthropodes (Hilgenboecker et al., 2008 ; Englestädter and Hurst, 2009). Les *Wolbachia* sont des alpha-proteobactéries et appartiennent au groupe des Rickettsies (Stouthamer et al., 1999). Ce sont des bactéries symbiotiques présentes dans le cytoplasme et héritées généralement de la mère par transmission verticale (*via* le cytoplasme de l'ovocyte) (Duron et al., 2007). Souvent, l'acquisition de ces symbiotes par l'hôte se traduit par des manipulations de sa reproduction telles que l'incompatibilité cytoplasmique³ ou la parthénogenèse thélytoque⁴ (Engelstädter et Hurst, 2009). La thématique des interactions Arthropodes-*Wolbachia* a connu un intérêt croissant au cours de ces trente

¹ UMR INRA-CNRS-UNSA 1355 RDLB (Recherche et Développement en Lutte Biologique), 400 Route des Chappes, BP 167, F- 06903 Sophia Antipolis cedex, France

² European Biological Control Laboratory, ARS-USDA
Campus International de Baillarguet, CS 90013, F-34988, Saint Gely-du-Fesc cedex, France

³ Incompatibilité cytoplasmique : l'incompatibilité cytoplasmique (IC) apparaît lors de croisements dans lesquels le mâle possède un variant non présent chez sa femelle. Suivant les cas, les œufs fécondés issus de ce croisement avortent ou se développent en mâles. L'IC agit alors comme une barrière post-zygotique entre individus ou populations ayant des statuts d'infection différents ce qui peut limiter la possibilité d'hybridation naturelle ou artificielle (Cheyppé et al. 2011).

⁴ Parthénogenèse thélytoque : la parthénogenèse thélytoque est la capacité pour une femelle de produire des filles en l'absence de fécondation par les mâles (souvent inexistantes ou rares).

dernières années. Ainsi, 8 puis 297 puis 1441 publications mentionnant le mot-clé « *Wolbachia* » ont-elles été identifiées par la base de données « Web of Science » pour les périodes successives [1981-1990], [1991-2000] et [2001-2010]. Sur cette période de trente ans, les études ont été axées pour une large part sur des organismes modèles tels que la drosophile (38% des publications recensées).

Les interactions Arthropodes-*Wolbachia* sont encore trop rarement prises en compte dans le domaine de l'entomologie appliquée. Entre 1981 et 2010, seulement 69 études associant explicitement *Wolbachia* et la lutte biologique⁵ ont été publiées (soit 4% de la littérature sur *Wolbachia*). Cette faible représentativité peut avoir plusieurs causes telles que (i) le retard global dans ce domaine en matière de caractérisation moléculaire des espèces étudiées (bioagresseurs ou auxiliaires), (ii) les courts pas de temps associés à ce type de recherches, (iv) des verrous techniques concernant l'élevage des organismes, (v) le manque d'outils disponibles (ex lignées stables avec des génotypes et des infections bien caractérisés), (vi) le manque d'intérêt pour cette question qui peut sembler *a priori* non prioritaire. Pourtant, la prise en compte de ces interactions dans le domaine de l'entomologie appliquée en général et plus particulièrement de la lutte biologique permet d'expliquer l'existence de barrières reproductives intra-spécifiques et donc de mieux délimiter une espèce d'une autre. L'identification des barrières reproductives⁶ induites par ces bactéries est également nécessaire avant d'envisager d'améliorer les performances d'un auxiliaire de lutte biologique, notamment par le croisement entre des souches d'origines géographiques différentes (Benvenuto et al., 2012a et 2012b).

Chez *Psytalia lounsburyi*, un auxiliaire potentiel de lutte biologique contre la mouche de l'olive, la présence d'au moins deux variants de *Wolbachia* a été récemment mise en évidence (Cheyppé-Buchmann et al., 2011). La prévalence de ces deux variants varie selon les populations de *P. lounsburyi*, et la fréquence des différents types d'infection évolue au cours du temps. Ces premiers résultats suggèrent que l'infection à *Wolbachia* pourrait limiter les possibilités d'hybridation intraspécifique entre des souches d'origine géographiques différentes voire entre individus d'une même souche. La présente étude qui vise à compléter les connaissances sur *Wolbachia* chez *P. lounsburyi* aborde plus particulièrement quatre points :

- la caractérisation de ces deux variants par la méthode dite de Multi-Locus Sequence Typing (MLST) qui repose sur le séquençage de plusieurs gènes (Baldo et al., 2006). Cette première

⁵ *Lutte biologique* : utilisation d'organismes vivants (ou de leurs produits) pour limiter les populations d'un organisme jugé nuisible et son impact sur des activités humaines (productions agricoles notamment).

⁶ *Barrières reproductives* : échec de la reproduction lié à des mécanismes intervenant avant la fécondation (barrières pré-zygotiques) ou après la fécondation (barrières post-zygotiques - cas de l'incompatibilité cytoplasmique).

partie du travail vise à compléter les résultats obtenus dans Cheyppé-Buchmann et al. (2011) et à caractériser les variants obtenus en suivant des standards internationaux.

- la mise au point d'un jeu d'amorces⁷ pour le gène *wsp* qui sont spécifiques de chacun des 2 variants de *Wolbachia*. Cette approche permettra par la suite de diagnostiquer rapidement et à moindre coût la présence des deux variants de *Wolbachia* et d'évaluer, au niveau populationnel, la fréquence des infections et leur évolution dans le temps ;
- l'étude de l'influence des conditions d'extraction d'ADN de l'hôte et de la polymérase sur la sensibilité du test de détection des variants. A partir de réactifs et protocoles déjà utilisés en routine au laboratoire, il s'agit plus précisément de proposer *in fine* la méthode la moins onéreuse ;
- l'étude de l'influence des facteurs comme l'âge de l'hôte, son sexe et origine géographique sur la méthode de détection du symbiote. Ce dernier volet vise non seulement à tester la robustesse de la méthode de diagnostic mais aussi à acquérir des données nouvelles sur l'interaction *Psytalia* – *Wolbachia*.

1. MATERIEL et METHODES

1.1. Matériel biologique : l'hôte

Plusieurs souches africaines de *P. lounsburyi* nous ont été cédées par le laboratoire Européen de Lutte Biologique (EBCL) basé à Montpellier. Deux d'entre elles sont plus précisément utilisées dans cette étude : une souche kenyane (Burguret) et une souche sud-africaine (Cheyppé-Buchmann et al., 2011). L'élevage de *P. lounsburyi* est réalisé sur un hôte de substitution, la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata*, que l'on peut produire facilement sur milieu artificiel (Thaon et al., 2009).

1.2. Caractérisation MLST des variants *Wolbachia* de l'hôte

Parmi les élevages du parasitoïde et expérimentations conduits entre 2008 et 2010, huit individus Kenyans et quatre Sud-Africains ont été identifiés comme supposés mono-infectés (cf §2.3). Leur ADN a été extrait grâce au kit « DNeasy Blood and Tissue » (Qiagen® ; kit N° 69504) en suivant les recommandations du fournisseur et élué dans un volume final de 100µL.

Comme préconisé par Baldo et al. (2006), six gènes ont été retenus à savoir *ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA*, et *wsp*. Les différents amplicons ont été générés en utilisant des conditions standard d'amplification par 2.5 unités de *Taq* DNA polymérase Qbiogene EPTQA025 pour un volume réactionnel de 50µL (ADN génomique non dilué 5µL, MgCl₂ 1.5mM, dNTPs

⁷ Amorces : courtes séquences d'ARN ou d'ADN, complémentaires du début d'une matrice d'ADN, servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire de cette dernière par une ADN polymérase.

0.2mM, amorces 1µM). La première dénaturation se fait à 95°C pendant 5 min, suivie de 30 cycles de 3 étapes (30 s à 95°C ; 1 min à une température d'hybridation gènes-dépendants – cf **Tableau 1** ; 72°C à 1min) puis une phase terminale d'élongation à 72°C pendant 10 min.

Les amplicons sont ensuite purifiés sur colonne Qiaquick PCR purification kit (Qiagen® ; kit N° 28104) et stockés 24 h à 4°C au maximum avant l'étape de ligation. L'amplicon est inséré dans le vecteur 2.1 suivant le protocole « TA cloning kits K2000-01 ». Le produit de ligation [amplicon-vecteur] est ensuite inséré dans des bactéries chimio compétentes « E.Cloni 10G » (Euromedex 60107-1) en suivant strictement le protocole du kit. Ces bactéries transformées sont ensuite testées par PCR avec les mêmes couples d'amorces que celles utilisées pour l'amplification des gènes (**Tableau 1**). Les clones ayant intégré l'amplicon, donc positifs à la PCR sont séquencés par la technologie Sanger (3730XL®, Applied Biosystems® chez Genoscreen à Lille).

1.3. Dessin d'amorces variant-spécifiques

Les amorces variant-spécifiques ont été dessinées sur le gène *wsp* amplifié par les amorces *wsp-F* et *wsp-R* (**Tableau 1**) en utilisant des conditions standard d'amplification de la *Taq* polymérase Qiagen (volume réactionnel 25µL, ADN génomique 1µL, MgCl₂ 1.5mM, dNTPs 0.2mM, *Taq* pol 0,5U). La première dénaturation se fait à 94°C pendant 2 min, suivie de 37 cycles de 3 étapes (30 s à 94°C ; 45 s à 60°C; 72°C à 1,5min) puis une phase terminale d'élongation à 72°C pendant 7 min. Les produits PCR sont séquencés sur un séquenceur automatique ABI3100 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) au CNRS-IPMC (Sophia-Antipolis, France).

Tableau 1. Liste des amorces MLST et leur séquence, séquences des amorces, taille du fragment attendue et température d'hybridation utilisée pour la PCR

| | Désignation | Séquence (5'-3') | Taille | Temp hybridation |
|--------------|------------------|---|--------|------------------|
| <i>Fbp A</i> | fbpA_F fbpA_R | GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT CCRCCAGARAAAAYYACTATTC | 429pb | 59°C |
| <i>wsp</i> | wsp_F wsp_R | TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC AAAAATTAACGCTACTCCA | 610pb | 60°C |
| <i>FtsZ</i> | ftsZ_F ftsZ_R | TTGCAGAGCTTGGACTTGAA CATATCTCCGCCACCAGTAA | 400pb | 60°C |
| <i>CoxA</i> | coxA_F coxA_R | TTGGRGCRATYAACTTTATAG CTAAAGACTTTKACRCCAGT | 402pb | 54°C |
| <i>HcpA</i> | hcpA_F hcpA_R | GAAATARCAGTTGCTGCAAA GAAAGTYRAGCAAGYTCTG | 444pb | 53°C |
| <i>Gat B</i> | gatB_F gatB_R | GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA | 369pb | 53°C |

Les critères pour le dessin des amorces recherchées sont :

- une bonne spécificité. Les amorces doivent s'hybrider spécifiquement et uniquement à la région *wsp* d'un seul des deux variants de *Wolbachia* sans amplification parasite.
- une bonne reproductibilité des résultats et leur robustesse par rapport à des variations de pratiques de laboratoire ou d'utilisateurs ;
- la capacité de « multiplexer » ces amorces en une seule PCR ce qui revient à mettre les amorces dans un même mélange réactionnel, sans antagonisme pour la PCR ;
- l'existence d'un polymorphisme de taille des amplicons *wsp* permettant de différencier facilement les deux variants sur simple gel d'agarose.

Pour cela, nous avons choisi de conserver l'amorce généraliste (*wsp*-F) comme amorce sens et de définir deux amorces anti-sens spécifiques.

Les alignements des séquences obtenues de *wsp* ont donc été réalisés avec le logiciel BioEdit version 7.0.9.0, grâce à l'outil ClustalW alignement. Le regroupement de séquences identiques a permis d'obtenir des séquences dites « consensus » à partir desquelles les deux amorces anti-sens ont été définies d'abord manuellement puis avec le logiciel Primer3 v0.4.0, avec pour contrainte une température d'hybridation voisine de 58°C +/- 2°C (estimation par Tm calculator⁸).

1.4. Influences des conditions d'extraction de l'ADN de l'hôte et de la polymérase sur la sensibilité du test de détection des variants

Les deux étapes critiques pour l'amplification d'un gène sont l'extraction d'ADN et la PCR. Elles ont été étudiées simultanément :

- la méthode d'extraction de l'ADN génomique avec deux kits différents
 - « *DNeasy blood and tissue* » (Qiagen kit N° 69504)

Cette méthode est utilisée sur un large spectre d'organismes. L'ADN est relativement exempt de contaminants et d'inhibiteurs d'enzyme. Ce kit permet à une seule personne d'extraire une cinquantaine d'échantillons en 5 h.

- « *Prep Gem insect* » (Zygem)

Cette méthode permet à une seule personne d'extraire l'ADN génomique d'insectes plus rapidement et en plus grand nombre (plusieurs centaines en 5 h), et à un coût moindre que la méthode A. A titre indicatif, une extraction Zygem est quatre fois moins chère qu'une extraction Qiagen.

- La nature et l'origine commerciale de la DNA-polymérase :
 - la *Dna pol EPTQA025* (Qbiogen) : cette DNA-polymérase est une enzyme que nous utilisons régulièrement dans le laboratoire, car fiable et relativement peu onéreuse. Elle nous permet actuellement d'amplifier des gènes différents (Cytochrome oxydase I, ITS2, 28S) sur différentes familles d'insectes sans trop de problèmes ;

⁸ <http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>

- la *Type-it microsat* (Qiagen ; N°206241): cette DNA-polymérase est une enzyme spécialement conçue pour des PCR multiplex. Elle se présente sous forme de mastermix ; son utilisation est pratique et rapide mais reste à volume égal quatre fois plus onéreuse que la première.

Six individus ont été extraits par chacune des méthodes. Chacune des 12 extractions a été testée en PCR multiplex (cf. §2.3 et §3.2) avec l'une ou l'autre des 2 *Taq* polymérases. Le résultat des amplifications a été visualisé après électrophorèse de 30 min à 100 volts sur gel d'agarose 2%. La taille des amplicons, respectivement *ftsZ* (435bp), *wsp-Type I* (131bp), *wsp-Type II* (251bp) est mesurée en comparaison avec le marqueur de taille DNA marker de 50 à 2500bp de Lonza.

1.5. Influence de l'âge, du sexe et de l'origine géographique de l'hôte sur la détection des variants

Pour chacune des deux souches de *P. lounsburyi* (Afrique du Sud et Kenya), une cinquantaine de femelles et autant de mâles ont été prélevés dans les élevages (émergence étalée du 01 au 17/09/2010). Pour chaque souche et chaque sexe, 24 adultes ont été prélevés dès leur émergence puis congelés à -20°C. Vingt quatre autres ont été placés ensemble dans des boîtes cylindriques avec du miel et de l'eau, soumis à ce régime pendant 21 jours puis congelés à -20°C. L'ADN de tous les échantillons est extrait le même jour grâce au kit Qiagen. Tous les ADN sont ensuite testés par la PCR « multiplex » présentée précédemment (cf. conditions § 2.3. et § 3.2). Le résultat des amplifications a été visualisé après électrophorèse avec les mêmes conditions que précédemment (cf. § 2.4).

L'influence des trois facteurs (âge, sexe et origine) est ensuite testée. Pour cela, un modèle linéaire généralisé est ajusté prenant en considérant ces trois facteurs comme variables explicatives et la proportion d'individus non infectés comme variable à expliquer. Une analyse de déviance est ensuite réalisée. L'ensemble du traitement est réalisé à l'aide du logiciel gratuit R (<http://cran.r-project.org/>).

2. Résultats et Discussion

2.1. Caractérisation par MLST d'individus mono-infectés

Au total, 373 clones ont été obtenus pour l'ensemble des six loci dont 354 (soit 95%) ont été séquencés avec succès dans le but d'obtenir cinq clones par individus et par locus. Le taux de succès varie de 100% pour des amplicons des gènes *fbpA*, *ftsZ*, *coxA* et *wsp*, à 90% pour ceux correspondant à *gatB* et *hcpA*. Les 61 séquences obtenues sur le gène *ftsZ* sont quasiment toutes identiques. Pour les cinq autres loci, on observe une structuration en deux groupes (cf. **Figure 1** pour *wsp* ; données non présentées pour les autres gènes) : (i) l'un (environ 30% des clones) regroupe des séquences très semblables à celles d'un variant de *Wolbachia* observé chez *Ephestia kuehniellia*. Il correspond au « Type I » défini dans Cheyppé-Buchmann et al. (2011) ; (ii) l'autre regroupe des séquences très semblables à celles d'un variant de *Wolbachia* observé chez *Drosophila melanogaster*. Il correspond au « Type II » défini dans ce même article.

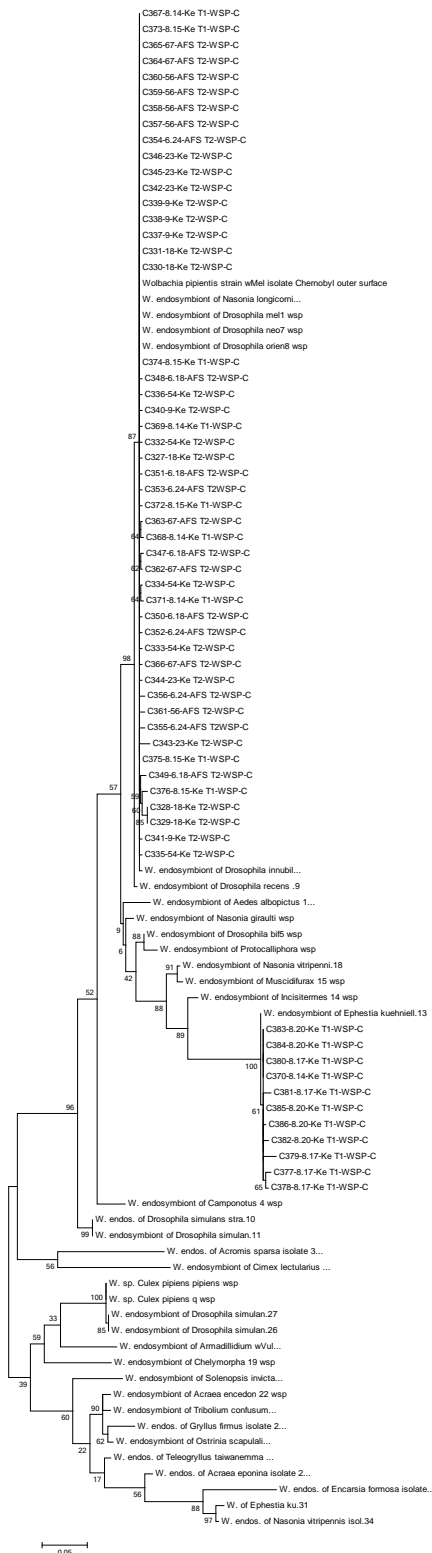


Figure 1. Phylogramme de Wolbachia à partir des séquences wsp

L'analyse a été conduite avec le logiciel MEGA5 en utilisant la technique du Maximum de Vraisemblance et le modèle d'évolution (Tamura-Nei). Après exclusion des gaps et des données manquantes, 351 positions étaient disponibles.

Concernant la distribution des deux « Types » selon les individus et loci (cf. **Tableau 2**), deux points importants sont à noter. Dix des 12 individus supposés mono-infectés appartiennent au même type, et ce, quel que soit le locus considéré. Seuls, les individus Kenyans (8.14 et 8.15) présentent le Type I pour les 4 loci (*coxA*, *fbpA*, *gatB*, *hcpA*) et le Type II pour le locus *wsp*.

Deux hypothèses peuvent expliquer ce dernier résultat. Selon la première, les deux individus 8.14 et 8.15 seraient en fait bi-infectés pour une prévalence du Type II plus faible. Ceci expliquerait son absence de détection sur gel d'agarose et une faible probabilité de pouvoir le cloner sans augmenter considérablement le nombre de clone à séquencer par gène et individu. La sur-expression du Type II par rapport au Type I pour le seul locus *wsp* serait alors la conséquence d'artefacts « techniques » lors de son amplification.

La seconde hypothèse qui n'exclut pas la première, repose sur l'existence de recombinaison entre variants de *Wolbachia*. Une bactérie de Type I aurait pu alors acquérir une portion d'ADN incluant la portion amplifiée de *wsp* d'une bactérie de Type II. De tels phénomènes ont déjà été suggérés ou mis en évidence dans d'autres études (Jiggins et al., 2001, Werren and Bartos, 2001).

Tableau 2. Représentativité des deux variants en fonction des individus et des gènes

| Individu | Variant Type I | | | | | Variant Type II | | | | |
|----------------|----------------|-------------|-------------|-------------|------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | <i>coxA</i> | <i>fbpA</i> | <i>gatB</i> | <i>hcpA</i> | <i>wsp</i> | <i>coxA</i> | <i>fbpA</i> | <i>gatB</i> | <i>hcpA</i> | <i>wsp</i> |
| Kenya | | | | | | | | | | |
| 8.14 | 6 | 4 | 5 | 5 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 4 |
| 8.15 | 4 | 5 | 3 | 4 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 5 |
| 8.17 | 1 | 5 | 6 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8.20 | 5 | 5 | 9 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 3 | 5 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 8 | 5 |
| 54 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 3 | 2 | 5 |
| Afrique du Sud | | | | | | | | | | |
| 6.18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 6.24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 5 | 6 | 5 | 5 |
| 56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 | 5 | 6 | 5 |
| 67 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 5 | 5 | 3 | 5 |

Sont indiqués :

- en rouge, les cas de polymorphisme au niveau individuel
- en prune et en gras, l'inversion de type observé sur *wsp* par rapport aux autres gènes.

Ces résultats liés aux différences de prévalence des deux types au sein d'un même individu mettent en évidence la nécessité de développer des approches quantitatives (PCR quantitative, pyroséquençage) quant à une détection plus sensible des variants. Ces approches sont déjà développées dans le cadre d'étude sur des « modèles » d'interactions *Wolbachia*-Insectes. Leur utilisation dans le cadre de recherches très appliquées pose toutefois des questions de « coûts » (investissement financier et humain) – « bénéfiques » ainsi que de faisabilité (notamment par rapport à des échéances courtes). De plus, l'hypothèse de possibles recombinaisons entre variants de *Wolbachia* chez *Psytalia lounsburyi* incite à garder une certaine prudence non seulement sur la détermination des statuts d'infections classiquement établis sur la seule base du seul marqueur *wsp* ainsi que sur l'inférence des (in)compatibilités cytoplasmiques entre des individus ayant des statuts d'infection différents (Cheyppé-Buchmann et al., en préparation). Comprendre les relations de compatibilités entre les variants impliquent en effet la réalisation de croisements entre des souches ayant des statuts d'infection précisément définis et stables dans le temps.

2.2. Dessin des amorces et tests en « multiplex »

Pour chaque variant, une séquence consensus *wsp* a été obtenue puis alignée grâce au logiciel ClustalW. La **Figure 2** représente schématiquement les ressemblances ou divergences nucléotidiques entre ces deux séquences. Après exploration visuelle de l'alignement, le choix a été fait de conserver l'amorce généraliste *wsp*-F comme amorce sens mais de définir deux amorces « Anti-sens » spécifiques de chaque variant de la façon suivante :

- *Wsp* Type I – R (5' – AGTYGTATCAGTATCCGCAG – 3') qui correspond à une zone d'insertion de 14 nucléotides dans le consensus réalisé à partir de séquences de Type I (cf. § précédent). La taille du fragment amplifié est estimée à 131pb ;
- *Wsp* Type II – R (5' – TCAAATGTTTCATCTTTAACATC – 3') qui correspond à une zone de divergence de 14 nucléotides entre les deux consensus. La taille du fragment amplifié est estimée à 251pb ;

L'efficacité de ces amorces a ensuite été confirmée en simplex. Il est intéressant de noter qu'aucune des deux amorces « Anti-sens » ainsi définies manuellement ne l'avait été par le Primer3 ($T_m=58^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$; autres paramètres laissés par défaut).

La PCR multiplex du gène *ftsZ* et du gène *wsp* (à l'aide de *wspF*, *wspR-TI* et *wspR-TII*) à l'aide de la *Taq Dna pol* (Qbiogene) a nécessité des mises au point. La concentration des amorces *ftsZ*-F et R et de l'amorce *wsp* type I-R a été diminuée de moitié par rapport aux autres amorces afin d'homogénéiser l'intensité des signaux de fluorescence correspondant à chacun des amplicons. D'autres essais (notamment sur la température d'hybridation et la concentration d'ADN génomique) ont permis de diminuer les amplifications non-spécifiques.



Figure 2. Représentation schématique des similitudes et différences entre les deux variants observés sur le gène *wsp*

Code couleur utilisé :

- gris : nucléotides identiques
- jaune et vert : nucléotides spécifiques d'un variant
- blanc : délétion

Comme le montre la **Figure 3**, les tests réalisés mettent clairement en évidence la supériorité du kit d'extraction Qiagen par rapport à celui de Zygem. Les signaux d'amplification obtenus avec les ADN extraits par Zygem sont en effet beaucoup plus faibles ou diffus, et ce, quelle que soit la polymérase utilisée. Concernant la comparaison entre les deux polymérases après amplification par le kit Qiagen, les diagnostics sont les mêmes pour les six individus. Les amplifications par la polymérase « Dna Pol » (Qbiogen) génèrent toutefois des signaux aspécifiques faibles qui peuvent être confondus avec ceux attendus pour les variants. Ceci est particulièrement visible pour le témoin mono-infecté par le variant de Type I (colonne 14) et le témoin non-infecté (colonne 16). A noter que le statut d'infection de ces deux individus (de même que les deux autres témoins) avait été préalablement vérifié plus de 5 fois indépendamment auparavant. Ces résultats soulignent l'importance de standardiser ces méthodes de détection et la combinaison de *Type it microsat* et kit « DNeasy blood and tissue » (Qiagen) a été retenue par la suite.

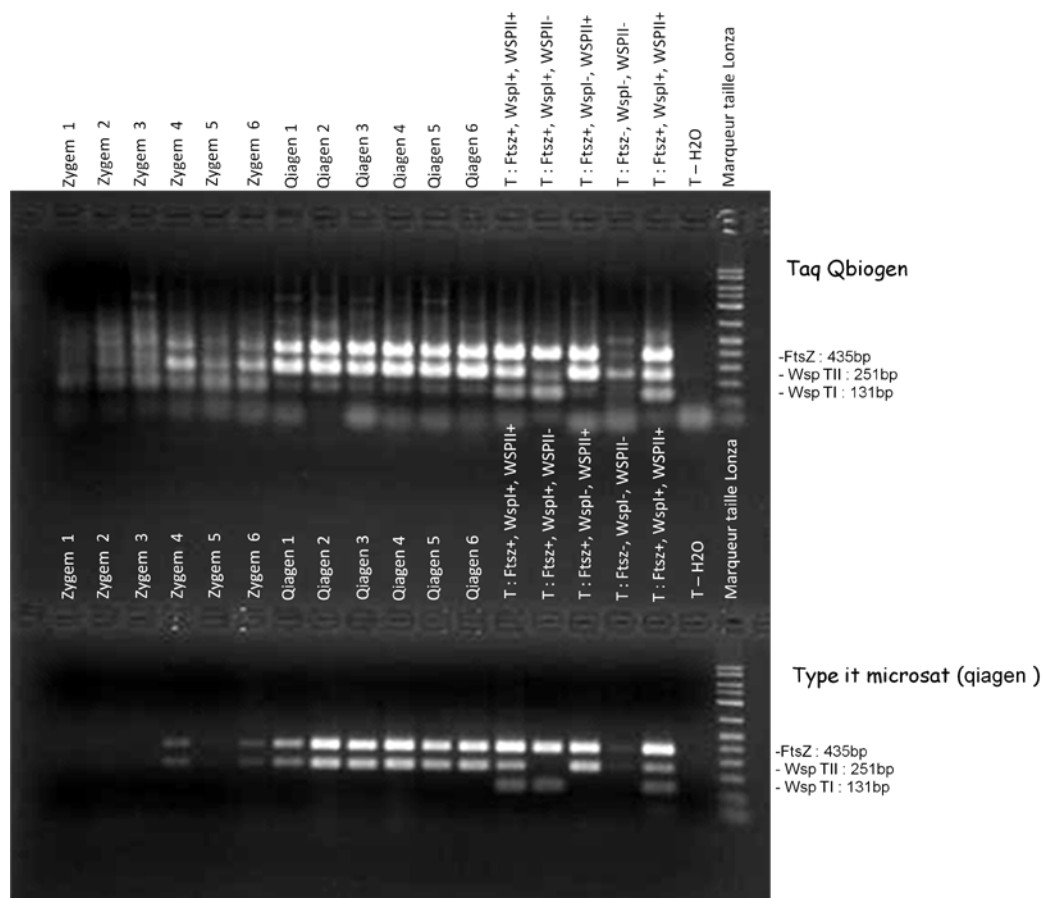


Figure 3. Comparaison sur gel d'agarose des profils PCR multiplex obtenus à partir d'individus, infectés ou non, en fonction des deux méthodes d'extraction et des deux ADN polymérases (cf §2.3 et §3.2).

A noter que les contrastes et la luminosité ont été exagérément retravaillés *a posteriori* pour l'édition de l'image.

Ces mises au point ont d'ores et déjà permis de définir un outil rapide et peu cher pour un diagnostic de base chez *P. lounsburyi* de deux types de variants *wsp* de *Wolbachia*. Cet outil permet d'envisager des approches populationnelles du parasitoïde, tant dans les populations naturelles que d'élevage au laboratoire. L'approche de typage développée pour *wsp* pourrait être aussi envisagée pour *fbpA* et *hcpA* par exemple. Du fait des priorités et contraintes liées au programme lutte biologique, cet axe de recherche n'est actuellement pas une priorité bien que documenter, au niveau populationnel, la ségrégation des « variants » pour différents marqueurs permettrait de tester l'hypothèse de la recombinaison entre les variants de *Wolbachia*.

2.3. Influence de l'âge, du sexe et de l'origine géographique de l'hôte sur l'infection

Au total 186 individus ont été typés avec la méthode PCR multiplex (cf §2.3 et §3.2).

D'une façon globale, on constate tout d'abord que, dans la quasi-totalité des cas (sauf 1), l'amplification de *ftsZ* est systématiquement associée à celle d'un des deux variants *wsp*. Ceci suggère que la majorité des individus infectés le sont par ces deux variants seuls. Toutefois, la présence d'un autre variant non détecté jusqu'à présent car très rare dans ces populations ou en concentration faible n'est pas à écarter. (cf 3.1.).

Trois résultats majeurs ont été obtenus (**Tableau 3**).

Tout d'abord, on observe que le taux d'infection chez les mâles (13% d'individus non infectés) et chez les femelles (6%), ne sont pas statistiquement différents ($\chi^2_{1df} = 3,26$; $p=0,07$).

De plus, l'âge des individus ne semble pas influencer le taux d'infection ($\chi^2_{1df} = 1,39$; $p=0,24$). Ce résultat est intéressant dans la mesure où il suggère que des individus adultes peuvent être comparés les uns aux autres malgré des âges physiologiques différents, une situation fréquemment rencontrée lors des tests de routine.

Enfin, aucune différence du statut d'infection entre les origines géographiques n'a été observée ($\chi^2_{1df} = 1,85$; $p=0,17$). Très curieusement, le variant de Type I n'a jamais été observé dans ces échantillons alors qu'il était fixé dans les populations kényanes testées dans Cheyppé-Buchmann et al., 2011. Cette « absence » pourrait s'expliquer par (i) un biais d'échantillonnage qui aurait conduit à ne conserver que des individus mono-infectés dans la lignée kényane, (ii) un réel processus d'« élimination » du Type I de la lignée kényane. Un tel scénario serait théoriquement envisageable notamment si la transmission verticale de ce variant est insuffisante et/ou que son impact sur l'hôte est globalement défavorable (Vautrin et al., 2006).

Cette observation nous incite actuellement à retracer plus précisément l'histoire de l'infection *Wolbachia* dans les élevages de *P. lounsburyi* depuis leur mise en place ainsi que dans les lignées récemment constituées à partir d'individus récoltés sur le terrain (H. Mathé-Hubert, comm. pers.).

Tableau 3. Infection de *P. lounsburyi* par *Wolbachia* en fonction de l'âge, du sexe et de l'origine géographique

A – Femelles

| | | Statuts d'infection | | | | | |
|----|-----------|---------------------|-----|----|------|--------|------------------|
| | | nb | NI | TI | TII | TI+TII | <i>ftsZ</i> seul |
| AF | Emergence | n=22 | 14% | 0 | 86% | 0 | 0 |
| | 21 jours | n=24 | 8% | 0 | 92% | 0 | 0 |
| KE | Emergence | n=23 | 0 | 0 | 100% | 0 | 0 |
| | 21 jours | n=24 | 0 | 0 | 100% | 0 | 0 |

B – Mâles

| | | Statut d'infection | | | | | |
|----|-----------|--------------------|-----|----|------|--------|------------------|
| | | nb | NI | TI | TII | TI+TII | <i>ftsZ</i> seul |
| AF | Emergence | n=22 | 0 | 0 | 100% | 0 | 0 |
| | 21 jours | n=24 | 25% | 0 | 71% | 0 | 4% |
| KE | Emergence | n=23 | 13% | 0 | 87% | 0 | 0 |
| | 21 jours | n=24 | 13% | 0 | 88% | 0 | 0 |

« AF » et « KE » font référence à l'origine géographique des individus, respectivement Afrique du Sud et Kenya. La colonne « nb » indique le nombre d'individus testés pour chaque modalité. « Emergence » et « 21 jours » font référence à l'âge des individus (cf §25).

La signification des colonnes associées au statut d'infection est la suivante : NI : Non Infecté ; TI : infection par le Type I seulement ; TII : infection par le Type II seulement ; TI+TII : bi-infection ; *FtsZ* seul : amplification de *ftsZ* en l'absence de TI ou TII.

Remerciements

Le travail expérimental présenté a été effectué dans le cadre du programme ANR 2007-2011 BioInv4I coordonné par T. Guillemaud. La rédaction de ce manuscrit a été initiée dans le cadre de la Formation « Techniques de communication écrite » (Inra-PACA et Skema Business School).

Références bibliographiques

Baldo L, Hotopp JCD, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MCJ, Tettelin H, Werren JH (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol* **72** : 7098-7110.

S. Warot, M.C. Bon, N. Ris

Benvenuto C, Cheyppé-Buchmann S, Bermond G, Ris N, Fauvergue X (2012a) Intraspecific hybridization, life history strategies and potential invasion success in a parasitoid wasp. *Evol Ecol*, doi 10.1007/s10682-011-9553-z.

Benvenuto C, Tabone E, Vercken E, Sorbier N, Colombel E, Fauvergue X, Ris N (2012b) Intraspecific variability in the parasitoid wasp *Trichogramma chilonis*: can we predict the outcome of hybridization? *Evol Appl* **5** : 498-510.

Cheyppé-Buchmann S, Bon MC, Warot-Fricaux S, Jones W, Malausa T, Fauvergue X, Ris N (2011) Molecular characterization of *Psytalia lounsburyi*, a candidate biocontrol agent of the olive fruit fly, and its *Wolbachia* symbionts as a pre-requisite for future intraspecific hybridization. *Biocontrol* **56** : 713-724.

Duron O, Fort P, Weill M (2007) Influence of aging on cytoplasmic incompatibility, sperm modification and *Wolbachia* density in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity* **98** : 368-374.

Engelstadter J, Hurst DD (2009) The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **40** : 127-149.

Engelstadter J, Telschow A (2009) Cytoplasmic incompatibility and host population structure. *Heredity* **103** : 196–207.

Hilgenboeker K, Hammerstain P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis on current data. *FEMS Microbiol Lett* **281** : 215-220.

Jiggins FM, Schulenburg JHGVD, Hurst GDD, Majerus MEN (2001) Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. *Proc Roy Soc Lond, B* **268** : 1423-1427.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD (1999) *Wolbachia pipientis* : microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* **53** : 71-102.

Thaon M., Blanchet A., Ris N (2009) Contribution à l'optimisation de l'élevage du parasitoïde *Psytalia lounsburyi*. *Cah Tech Inra n°66* : 21-31.

Vautrin E, Charles S, Genieys S, Vavre F (2007) Evolution and invasion dynamics of multiple infections with *Wolbachia* investigated using matrix based models. *J Theor Biol* **245**, 197-209.

Werren J H., Bartos JD (2001) Recombination in *Wolbachia*. *Curr Biol* **11** : 431-435.