



L'écologie moléculaire

L'intégration du moléculaire en entomologie, futilité ou panacée?

par Annie-Ève Gagnon

Qu'est-ce que l'écologie moléculaire?

L'apparition des techniques de biologie moléculaire a rapidement contribué à des avancées majeures dans plusieurs domaines comme la génétique et la médecine. Son intégration s'est cependant fait attendre dans d'autres domaines comme l'écologie. Le lien entre une séquence génomique et l'interaction entre deux organismes apparaît d'emblée fort éloigné. Aussi, l'utilisation de techniques moléculaires dans un domaine où l'observation directe est reine peut sembler superflue. Néanmoins, les avancées fulgurantes réalisées dans cette discipline ont permis d'intégrer la biologie moléculaire à l'écologie et de mettre en évidence de nouvelles avenues de recherche. Cet ajout aux approches classiques a dès lors modifié l'étude de plusieurs sujets comme la génétique évolutive, la génétique des populations, l'écologie comportementale, la biologie de conservation, l'identification de spécimens et le développement d'organismes génétiquement modifiés. Concrètement, l'approche moléculaire permet d'étudier certains phénomènes en milieu naturel sans avoir recours à des systèmes artificiels (études sur plats de Pétri, en chambre de croissance ou en cage d'exclusion). Par exemple, le suivi des descendants d'un couple donné au sein d'une population est maintenant possible grâce à une simple analyse génétique. Cette particularité fournit des opportunités nouvelles et complémentaires aux écologistes en leur permettant de formuler des hypothèses autrefois impossibles à tester avec les techniques traditionnelles. L'écologie moléculaire permet donc d'explorer un système déjà connu avec un tout nouveau niveau de résolution. En entomologie, les principales applications sont l'identification des espèces, l'identification des sexes, la phylogénie, l'écologie comportementale et l'écologie des populations et des communautés. Ces applications contribuent considérablement à l'augmentation des connaissances fondamentales en entomologie et à l'amélioration des programmes de lutte biologique.

Les approches moléculaires utilisées en entomologie

Initialement, les marqueurs protéiques, particulièrement les allozymes, constituaient les principaux types de marqueurs utilisés en entomologie (Loxdale et den Hollander 1989). Plus récemment, plusieurs de ceux-ci ont été surpassés par le développement de techniques moléculaires à base d'ADN (RFLP, minisatellites, microsatellites,

amorces PCR). Tous ont leurs avantages et leurs inconvénients selon le type d'étude menée et l'espèce étudiée. Le tableau 1 présente les principales techniques utilisées en biologie moléculaire en y décrivant le principe et les utilités de chacune.

L'identification des sexes

La connaissance du sexe d'un individu est une donnée fondamentale pour la taxonomie, les études de population et les programmes de conservation de la diversité génétique d'une espèce. En lutte biologique, l'identification des sexes s'avère d'autant plus utile lorsque l'espèce est utilisée dans un programme d'augmentation ou de stérilisation des insectes (Beebe et Rowe 2004). Afin d'assurer une progéniture continue avec une diversité génétique optimale menant à l'augmentation des populations, il est important de conserver un ratio mâle:femelle équilibré ou biaisé en faveur des femelles. Dans le cas de la technique de stérilisation des insectes, seulement les mâles sont utilisés. Il faut donc savoir reconnaître le sexe de l'insecte en question et il n'est pas toujours aisé de réaliser cette tâche lorsque l'insecte est de petite taille, que les sexes sont cryptiques ou qu'il s'agit d'un stade immature. À l'aide de marqueurs moléculaires, il est possible de mettre en évidence certains gènes spécifiques au sexe. Chez les mammifères, un gène lié au sexe (*SRY*) se retrouve chez toutes les espèces et est très bien conservé, ce qui permet son utilisation générale (Griffiths et Tiwari 1993). Par contre, chez les insectes, aucun gène commun lié au sexe n'a été conservé au fil de l'évolution. Il faut donc, pour chaque espèce étudiée, trouver une séquence d'ADN spécifique afin de développer un nouveau marqueur moléculaire pour chacun des sexes. Par exemple, le développement d'une méthode moléculaire pour distinguer les sexes chez *Ceratitis capitata*, une mouche à fruit, a été possible grâce à l'utilisation d'amorces PCR de la région ITS-1 (Douglas *et al.* 2004).

L'identification des espèces

La première apparition de la biologie moléculaire dans le monde écologique s'est manifestée par le besoin d'identifier les espèces. Depuis, c'est l'une des applications les plus courantes et les plus utilisées en écologie moléculaire. Ceci s'explique par la difficulté d'identification des espèces, surtout lorsque nous sommes en présence d'espèces jumelles, d'hybrides ou de stades larvaires dont la

Tableau 1. Description des principales techniques utilisées en écologie moléculaire

	Technique	Principe	Variabilité	Avantages (+) Inconvénients (-)	Domaines d'application
Protéines	Allozyme	Séparation des variants protéiques selon leur mobilité face à un champ électrique	Interspécifique	(+) Peu cher, prend peu de temps (-) Méthode destructive, ne détecte pas les mutations silencieuses, méthodes de conservation plus complexe	Phylogénie, taxonomie, génétique des populations
	RFLP (restriction fragment length polymorphism)	Utilisation d'enzymes de restriction	Intraspécifique	(+) Grande précision (-) Méthode destructive, utilisation d'étiquettes radioactives, cher et fastidieux	Génétique des populations, analyses parentales, cartographie chromosomique
ADN	Minisatellite (empreinte d'ADN)	Séquence-clé répétée plusieurs fois selon l'individu	Différenciation à l'individu	(+) Grande précision, méthodes de conservation moins complexes (-) Peu utile pour l'identification d'espèces	Étude des populations, analyses parentales
	Microsatellite (empreinte d'ADN multi-locus)	Séquence simple (di-, tri- ou tétra- nucléotides) répétée plusieurs fois	Différenciation à l'individu	(+) Grande précision, méthodes de conservation moins complexes (-) Impossible d'associer une bande particulière à un locus spécifique	Étude des populations, écologie comportementale, diversité génétique
	Amorces PCR (polymerase chain reaction)	2 amorces pour amplifier une région cible de l'ADN	Différenciation à l'individu	(+) Méthode non destructive, nécessite une faible quantité de matériel organique (-) Présence élevée de faux négatifs	ADN ancien, écologie des populations, écologie comportementale, phylogénie, taxonomie, etc.

Sources : Beebee et Rowe 2004; Hoy 2003; Loxdale et Lushai 1998; Sunnucks 2000.

morphologie est semblable (Pinto *et al.* 1992). Les deux types de marqueurs les plus couramment utilisés pour ce type d'analyse correspondent aux régions ribosomales (ITS) ou mitochondriales (COI) (Erlandson et Gariepy 2005) des organismes à l'étude. L'utilisation de ces régions se justifie par la forte différenciation entre les espèces, le grand nombre de copies par cellule et leur présence dans tous les tissus. Ce genre d'étude s'avère d'une grande utilité lorsque certaines espèces ayant un impact considérable se confondent avec d'autres espèces morphologiquement semblables. Par exemple, des études menées sur des moustiques vecteurs de la malaria (Curtis 2002) ont permis d'identifier certaines espèces ayant un plus grand potentiel de transmission du parasite et d'augmenter l'efficacité du programme de lutte.

Dernièrement, un ambitieux projet d'identification microgénomique des espèces animales a été lancé par le chercheur canadien Paul Hebert (Hebert *et al.* 2003). Ce projet

visait l'élaboration d'amorces d'ADN basées sur le gène mitochondrial COI, spécifique à chaque espèce, afin d'identifier chacun des animaux de la planète (Wade 2004). Alors que ce concept est largement accepté par les taxonomistes concernant les groupes à caractères morphologiques plus difficilement reconnaissables, tels les virus, les bactéries et les protistes, il est plus difficilement reçu à propos des organismes supérieurs. Ce projet, surnommé « code-barre », vise principalement à construire un système universel de bio-identification. Celui-ci ouvrirait la porte à de nouvelles applications comme la mise sur pied d'un système d'identification frontalier afin de reconnaître l'origine et le statut mondial d'une espèce (invasive, ravageur, etc.). Il permettrait aussi une meilleure gestion de la diversité des espèces. Toutefois, la technique nécessite quelques mises au point afin de palier à la variabilité génétique au sein d'une espèce, pouvant être causée par sa distribution géographique, la présence d'hybrides et plusieurs autres facteurs.

Malgré tout, cette technique peut dès maintenant être utilisée conjointement à l'observation morphologique afin de confirmer l'identification des spécimens.

L'utilisation des méthodes moléculaires afin d'identifier un organisme peut aussi s'avérer avantageuse lorsqu'un individu est difficilement accessible. Notons par exemple l'identification de parasites, virus, bactéries ou autres organismes vivants à l'intérieur d'un insecte, de larves de parasitoïdes se nourrissant de celui-ci, ou tout simplement de proies contenues dans le tractus digestif des prédateurs. Les marqueurs moléculaires à base d'ADN sont très efficaces pour ce genre d'étude puisque qu'une infime quantité d'ADN peut aisément être détectée, et ce, même en présence d'ADN hétérospecific. Certaines bactéries, dont celles du genre *Wolbachia*, ont ainsi été étudiées en utilisant des marqueurs moléculaires afin de déterminer leur distribution chez leur hôte (Hoshizaki et Shimada 1995). De même, la présence de larves de parasitoïdes a facilement pu être décelée chez plusieurs organismes tels les mouches domestiques (Ratcliffe *et al.* 2002), les pucerons (Persad *et al.* 2004; Weathersbee III *et al.* 2004) et les coléoptères (Aebi *et al.* 2004). D'autre part, la détermination précise du régime alimentaire d'un insecte, information indispensable pour l'étude des interactions trophiques et intraguildes au sein d'une communauté, s'avère particulièrement difficile chez les ennemis naturels. Certains ont recours à l'examen du contenu gastrique suite à la dissection de l'insecte afin d'identifier les fragments de proies restants. D'autres, plus patients, observeront directement le comportement alimentaire d'un insecte en milieu naturel, mais la plupart sont petits, cryptiques ou se nourrissent de nuit, ce qui complique un peu les choses.

Par ailleurs, la fréquence de certaines interactions, comme la rencontre d'un prédateur et d'une proie, peut être très faible. Les marqueurs moléculaires représentent ici des outils de grande importance qui permettent de démontrer certaines interactions de façon simple avec un nouvel angle de vue par rapport aux méthodes conventionnelles (Zaidi *et al.* 1999; Symondson 2002). Plusieurs études utilisant cette technique ont permis de caractériser les principales proies consommées par un prédateur (Chen *et al.* 2000) ou, à l'inverse, les nombreux prédateurs utilisant une même proie (Hoogendoorn et Heimpel 2002). Celles-ci ont donc permis de démystifier et de quantifier les interactions existant réellement au sein d'un réseau trophique. Pertinemment, des études sur les interactions intraguildes au sein d'une communauté pourraient aisément mener à une meilleure compréhension des raisons qui entraînent ce type de comportement inusité. Par exemple, des études récentes, basées sur l'analyse génétique du contenu gastrique de coccinelles, ont permis de mettre en évidence la prédation intraguildes mutuelle entre les quatre principales espèces présentes dans les cultures de soya au Québec (Gagnon, Heimpel

et Brodeur, non publié). Grâce à cette étude, il sera possible d'évaluer les conditions favorisant la prédation intraguildes, d'identifier l'espèce présentant le taux de prédation le plus élevé, de déterminer les préférences alimentaires de chaque prédateur et le stade larvaire le plus vorace chez ces coccinelles.

Phylogénie

Le développement de marqueurs moléculaires pour l'identification des espèces a aussi mené à une réévaluation des origines de celles-ci. L'identification moléculaire est une façon indirecte d'observer les liens phylogéniques entre les espèces puisque le degré de divergence entre deux espèces fournit un indice quant au moment où elles se sont différenciées. L'hypothèse de l'horloge moléculaire sous-entend que les molécules évoluent de manière linéaire en fonction du temps (Hoy 2003). Par conséquent, il est possible de calculer la période écoulée depuis le dernier moment où deux espèces ont partagé un même ancêtre. Une étude menée par Moran et ses collaborateurs (1993) a permis, grâce à la divergence moléculaire, de déterminer le moment où des bactéries endosymbiotiques ont colonisé leur hôte, en l'occurrence des pucerons. L'association entre ces deux organismes daterait de 160 à 280 millions d'années!

L'écologie comportementale

Au cours de l'évolution, la sélection naturelle a mené à l'apparition de certains traits chez une espèce donnée, lui conférant certains avantages. Génétiquement, cette adaptation se traduit par la modification de certaines séquences nucléotidiques. Il est donc parfois possible d'associer la présence d'un gène à un comportement donné. Par le passé, des expériences de croisement sélectif étaient utilisées pour évaluer l'héritabilité d'un trait. Depuis l'avènement de l'écologie moléculaire, l'habileté d'identifier, de cloner et de séquencer des gènes spécifiques a permis de simplifier ces études. Le développement de ce domaine est essentiellement dû à l'étude intensive de *Drosophila melanogaster*, un modèle connu de tous en génétique. L'analyse génomique de ce diptère a grandement contribué à l'étude de certains phénomènes comme le rôle de l'horloge photopériodique, l'apprentissage, les comportements de cour et le sommeil (Hoy 2003).

L'écologie des populations

La diversité génétique d'une population est représentative de sa richesse structurale. Ainsi, une faible diversité traduit l'absence de flux génique ou un faible taux de migration. La taille des populations d'une espèce peut varier énormément selon la proximité d'autres populations et du flux migratoire entre celles-ci. L'utilisation de marqueurs moléculaires, principalement les microsatellites, a permis de mieux comprendre les structures des populations en observant le succès reproducteur d'un individu (Scott et Williams 1994) ou les liens de parenté entre sous-

populations. Des chercheurs français ont utilisé cette technique afin de mesurer la proximité génétique des abeilles faisant partie d'un même essaim. Ils ont pu démontrer que l'intensité de la polyandrie avait un impact sur la diversité génétique (Franck *et al.* 2000). Cette méthode permet donc d'observer comment la variation génétique se répartit au sein d'une espèce selon l'intensité des forces évolutives agissant sur les individus composant les populations. Par conséquent, cette technique permet d'élucider les déterminismes évolutifs de la structuration génétique. Par ailleurs, ces connaissances s'appliquent à la conservation et à la gestion des espèces en optimisant l'exploitation ou en prévoyant les conséquences des perturbations de l'habitat.

Conclusion

Les approches moléculaires offrent sans nul doute des opportunités nouvelles afin d'évaluer des hypothèses qui ne pouvaient autrefois être abordées. L'écologie moléculaire devrait être considérée comme une approche complémentaire aux approches traditionnelles en matière d'études écologiques et non comme une simple expansion de la biologie moléculaire. Même si l'apparition des techniques de biologie moléculaire en entomologie date déjà de quelques décennies, ses applications, encore récemment, se limitaient à quelques domaines spécifiques comme la taxonomie et la phylogénie. La simplification des méthodes, la réduction des coûts et l'accessibilité de ces techniques sont probablement des facteurs qui ont contribué à l'expansion de l'écologie moléculaire. Aujourd'hui, le nombre sans cesse croissant d'études publiées utilisant des techniques moléculaires en entomologie démontre une progression fulgurante de cette discipline. On peut croire que cette lancée n'est que la pointe de l'iceberg puisque chaque nouvelle application engendre de nouvelles possibilités d'études. En définitive, l'écologie moléculaire est une science bien implantée qui ne cesse de se surpasser, accélérant ainsi l'accumulation du savoir scientifique.

Références

- Aebi, A., N. Alvarez, D.J. Butcher, C. Hansson, A.M. Risterucci et B. Benrey. 2004. Microsatellite markers in a complex of *Horismenus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoids of bruchid beetles. *Mol. Ecol. Notes* 4 : 707-709.
- Beebe, T.J.C. et G. Rowe. 2004. An introduction to molecular ecology. Oxford University Press, New York. 346 pp.
- Chen, Y., K.L. Giles, M.E. Payton et M.H. Greenstone. 2000. Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. *Mol. Ecol.* 9 : 1887-1898.
- Curtis, C. 2002. Molecular medical entomology and the 'so what?' test. *Trends Ecol. Evol.* 17 : 102.
- Douglas, L.J., P.M. Untalan et D.S. Haymer. 2004. Molecular sexing in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34 : 159-165.
- Erlanson, M. et T. Garipey. 2005. Developing species-specific PCR primers for insect identification. *Bull. Entomol. Soc. Can.* 37 : 76-82.
- Frank, P., N. Koeniger, G. Lahner, R.M. Crewe et M. Solignac. 2000. Evolution of extreme polyandry: an estimate of mating frequency in two African honeybee subspecies, *Apis mellifera monticola* and *A. m. scutellata*. *Insectes Soc.* 47 : 364-370.
- Griffith, R. et B. Tiwari. 1993. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 8324-8326.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball et J.R. deWaard. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270 : 313-321.
- Hoshizaki, S. et T. Shimada. 1995. PCR-based detection of *Wolbachia*, cytoplasmic incompatibility microorganisms, infected in natural populations of *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) in central Japan: has the distribution of *Wolbachia* spread recently? *Insect Mol. Biol.* 4 : 237-243.
- Hoogendoorn, M. et G.E. Heimpel. 2002. PCR-based gut content analysis of insect predators: a field study. *Proc. of 1st Int. Symp. on Biol. Control of Arthropods* : 91-97.
- Hoy, M.A. 2003. Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications. 2nd ed. Academic Press, California. 544 pp.
- Loxdale, H.D. et J. den Hollander. 1989. Electrophoretic studies on agricultural pests. *Systematics Association Special Volume No 39*. Clarendon Press, Oxford.
- Loxdale, H.D. et G. Lushai. 1998. Molecular markers in entomology. *Bull. Entomol. Res.* 88 : 577-600.
- Moran, N.A., M.A. Munso, P. Baumann et H. Ishikawa. 1993. A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 253 : 167-171.
- Persad, A.B., A. Jeyaprakash et M.A. Hoy. 2004. High fidelity PCR assay discriminates between immature *Lipolexis oregmae* and *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Aphididae) within their aphid host. *Fla. Entomol.* 87 : 18-24.
- Pinto, J.D., D.J. Kazmer, G.R. Platner et C.A. Sassaman. 1992. Taxonomy of the *Trichogramma minutum* complex (Hymenoptera: Trichogrammatidae): allozymic variation and its relationship to reproductive and geographic data. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85 : 413-422.
- Ratcliffe, S.T., H.M. Robertson, C.J. Jones, G.A. Bollero et R.A. Weinzierl. 2002. Assessment of parasitism of house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) pupae by pteromalid (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitoids using a polymerase chain reaction assay. *J. Med. Entomol.* 39 : 52-60.
- Scott, M.P. et S.M. Williams. 1994. Measuring reproductive success in insects. Pages 61-74 in B. Schierwater, B. Streit, G.P. Wagner et R. DeSalle (eds.), *Molecular ecology and evolution: approaches and applications*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* 15 : 199-203.
- Symondson, W.O.C. 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Mol. Ecol.* 11 : 627-641.
- Wade, N. 2004. A species in a second: Promise of DNA 'Bar codes'. *New York Times*, 14 déc. : D1, D4.
- Weathersbee III, A.A., K.A. Shufran, T.D. Panchanl, P.M. Dang et G.A. Evans. 2004. Detection and differentiation of parasitoids (Hymenoptera: Aphididae and Aphelinidae) of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae): species-specific polymerase chain reaction amplification of 18S rDNA. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97 : 286-292.
- Zaidi, R.H., Z. Jaal, N.J. Hawkes, J. Hemingway et W.O.C. Symondson. 1999. Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Mol. Ecol.* 8 : 2081-2087.

Annie-Ève Gagnon est étudiante à la maîtrise au laboratoire de Jacques Brodeur au Centre de recherche en horticulture de l'Université Laval.