



MINISTÈRE
DE LA TRANSITION
ÉCOLOGIQUE
ET SOLIDAIRE



MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
ET DE
L'ALIMENTATION



ÉCOPHYTO
RÉDUIRE ET AMÉLIORER
L'UTILISATION DES PHYTOS
AGENCE FRANÇAISE
POUR LA BIODIVERSITÉ
ÉTABLISSEMENT PUBLIC DE L'ÉTAT



MINISTÈRE
DES SOLIDARITÉS
ET DE LA SANTÉ



MINISTÈRE
DE L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR,
DE LA RECHERCHE
ET DE L'INNOVATION



STIMULRAV : Impact des stimulateurs de défense des plantes ou SDP sur un ravageur du pommier, le puceron cendré et sur ses ennemis naturels

Impact of Plant resistance inducers (PRI) on the Rosy Apple Aphid and on its natural enemies.

« **Alternatives aux néonicotinoïdes** »

Complément au rapport final

Date de la version du rapport:

13/07/2021

UMR 1345 IRHS
42 rue Georges Morel
49071 Beacouzé

Alexandre DEGRAVE
Agrocampus Ouest CFR
Angers
2, rue André Le Nôtre
49045 Angers cedex 01
alexandre.degrave@agrocampus-ouest.fr

Contexte du projet Stimulrav

Le projet exploratoire Stimulrav avait pour objectif de déterminer si, chez le pommier, l'utilisation de stimulateurs de défense des plantes (SDP), dont certains sont d'ors et déjà homologués (ou en voie de l'être) contre des microorganismes pathogènes, pouvaient protéger cette culture contre le puceron cendré du pommier, *Dysaphis plantaginea*. Ce dernier fait l'objet d'une lutte chimique importante reposant notamment sur l'emploi de néonicotinoïdes puisque le seuil de déclenchement des traitements est d'un individu par parcelle. Les mécanismes de défense activés par les SDP devaient ensuite être explorés pour identifier les modalités d'action des composés de défense végétaux. Des travaux antérieurs au projet nous ont permis d'étudier en particulier le rôle de composés organiques volatils (COV) émis par les pommiers stimulés et de tenter de mesurer leur impact non seulement sur le comportement de ce puceron mais également sur celui de l'un de ses ennemis naturels, l'hyménoptère parasitoïde *Ephedrus persicae*.

L'une des difficultés du modèle pommier/puceron cendré réside dans la complexité du cycle de vie du puceron. En effet, les œufs qui éclosent au printemps donnent lieu à plusieurs cycles de reproduction par parthénogénèse sur pommier (c'est à ce stade que les dégâts sont maximaux), chaque individu néoformé étant capable de produire de nouveaux individus en 12 jours environ. A la fin du printemps, des individus ailés migrent sur leur hôte secondaire, le plantain. Au début de l'automne, une première vague d'individus ailés retourne sur le pommier pour y produire des femelles sexuées, rejoindes environ 3 semaines plus tard par des individus ailés mâles. La fécondation a alors lieu, puis les femelles pondent les œufs qui passeront l'hiver sur les arbres. La connaissance de ce cycle laisse entrevoir deux fenêtres d'intervention pour limiter les populations de pucerons cendré : le printemps et l'automne. La fenêtre printanière est celle qui concentre la grande majorité des traitements, c'est aussi celle que les producteurs de pomme ne peuvent pas permettre de manquer, car l'épidémie peut alors vite devenir hors de contrôle. De plus, l'éclosion se produit de manière quasiment synchrone avec la floraison, et donc avec la présence d'insectes pollinisateurs dans les parcelles. La fenêtre automnale est délicate, car pour que la lutte soit effective en limitant la quantité d'œufs déposés, elle doit être mise en œuvre sur les 3 uniques semaines où la reproduction aura lieu. Pour compliquer les choses, c'est aux alentours de cette période que la plupart des variétés de pommes sont récoltées. La lutte automnale contre *Dysaphis plantaginea* ne peut donc se faire qu'avec des intrants dont l'application est compatible avec les délais d'application avant récolte. C'est pour cela qu'une grande partie des produits autorisés pour l'usage « traitement des parties aériennes contre les pucerons » ne peuvent être appliqués qu'au printemps et à l'été.

Pour toutes ces raisons, nous avons souhaité étudier le rôle des défenses, notamment des défenses de type COV, activées par les SDP sur les générations de puceron de printemps et d'automne, mais également sur le parasitoïde *Ephedrus persicae*.

Résultats acquis dans le cadre du travail collaboratif du projet Stimulrav

L'emploi de SDP efficaces peut impacter les populations d'insectes ravageurs à plusieurs niveaux :

- 1- de manière directe sur leur longévité et leur fécondité une fois que les individus sont installés sur la plante hôte

2- de manière plus indirecte en altérant leur comportement de choix d'installation sur la plante hôte

Des défenses végétales actives au niveau 1 limiteront la taille des colonies, alors que des défenses actives au niveau 2 limiteront le nombre de colonies. L'idéal étant que le panel des défenses activées par un SDP impacte les populations d'insectes ravageurs sur les deux niveaux.

Durant le projet Stimulrav, nous avons pu montrer sur des plants greffés de Golden delicious cultivés en serre que parmi 4 SDP testés, deux d'entre eux diminuaient significativement la taille des populations de pucerons cendré d'environ 35% (Bion 50WG et LBG01F34).

Des travaux parallèles à ceux conduits ici, nous ont indiqués que ces deux produits activaient l'expression de gènes du pommier impliqués dans la biosynthèse de COV de la famille des sesquiterpènes. Des analyses de COV émis par des pommiers traités avec différents SDP (dont du Bion 50 WG), ont par ailleurs montré que des sesquiterpènes comme l'a-farnesène, le b-caryophyllène et le Germacrène-D étaient produits 3 jours après traitement au SDP. Certains sequiterpènes sont connus pour leur propriétés répulsives vis-à-vis d'insectes ravageurs comme les pucerons. Nous avons donc étudié par olfactométrie les propriétés de l'a-farnesène et du b-caryophyllène purifiés (le Germacrène-D n'étant pas disponible) sur le comportement du puceron cendré. Les résultats obtenus ont montré qu'à faible dose, l'a-farnesène était répulsif à la fois sur les individus de printemps et sur les ailés d'automne migrant du plantain vers le pommier. Fait intéressant : ce sont non seulement les ailés d'automne déposant les femelles reproductrices mais également les mâles qui sont sensibles à cet effet répulsif à faible dose de l'a-farnesène.

Nous avons ensuite pu montrer qu'en situation de choix, les pucerons de printemps comme les pucerons d'automne s'établissent très préférentiellement sur des plants greffés de Golden delicious préalablement traités à l'eau, délaissant les plants traités au Bion 50WG.

L'ensemble de ces résultats montre que les défenses activées par les SDP sont susceptibles d'altérer indirectement les populations de puceron cendré en affectant leur comportement d'installation sur la plante hôte. De plus, des COV de la famille des sesquiterpènes et notamment l'a-farnesène, produits en réponse aux SDP sont impliqués dans cet altération du comportement. Nous n'avons toutefois pas réussi à démontrer formellement que le choix d'installation sur les pommiers était strictement dû aux COV émis par les pommiers.

Les expériences portant sur le comportement du parasitoïde *Ephedrus persicae*, ne nous ont pas permis de conclure quant à un rôle des COV du pommier sur un éventuel effet attractif du parasitoïde. Les raisons de cet échec sont expliquées dans la section suivante.

Difficultés méthodologiques identifiées et voies d'amélioration envisagées

Nous avons rencontré deux obstacles méthodologiques au cours de ce travail préparatoire :

- l'étude du bouquet olfactif complet émis par de jeunes pommiers
- la maîtrise des élevages du parasitoïde *Ephedrus persicae*

Concernant l'étude du bouquet olfactif complet, notre dispositif expérimental était constitué de cloches en verre abritant de jeunes semis de pommier traités ou non au SDP ; chaque cloche étant reliée à un olfactomètre dans lequel était placé un puceron. L'ensemble des

expériences menées à l'aide de ce dispositif a montré que les pucerons s'orientaient de manière non-préférentielle vers le flux d'air provenant de plantes traitées à l'eau ou au Bion 50WG. Comme les autres résultats obtenus à l'aide ce SDP nous semblaient prometteurs, nous avons essayé plusieurs voies d'amélioration : augmenter le nombre de plantes sous chaque cloche, augmenter le nombre de traitements avant de placer les plantes sous cloche, augmenter le temps d'accumulation de COV dans les cloches en laissant « incuber » les plantes plus longtemps avant de déclencher l'aspiration de l'air vers les olfactomètres, ou encore étudier les différentes générations de pucerons. Quels que soit les ajustements effectués, les pucerons s'orientaient indifféremment vers les plantes traitées à l'eau ou celles traitées au Bion 50WG. A noter qu'une expérience complète doit se faire sur 30 individus différents, à raison de 10 minutes d'observation par individu et que nous disposions de quoi observer 2 individus en parallèle. La personne recrutée dans le cadre du projet Stimulrav a passé environ 2 mois rien que sur cet aspect, à temps plein.

Nous avons finalement essayé de placer de l'α-farnesène purifié sur un papier filtre sous l'une des cloches pour déterminer si ce n'était pas finalement le dispositif en lui-même qui n'était pas approprié. Et effectivement, aux doses répulsives qui fonctionnent en olfactométrie classique (=source olfactive assez proche du puceron), le dispositif à cloche n'a pas permis de constater de répulsivité vis-à-vis des mêmes pucerons. Des résultats équivalents ont été observés sur d'autres pucerons étudiés au laboratoire. L'étude olfactométrique du bouquet olfactif total émis par des plantes doit donc faire l'objet d'ajustements bien plus importants que ne le permet un projet exploratoire (sauf à ce que le projet ne soit dédié qu'à cela).

Nous envisageons donc d'étudier l'effet répulsif des COV émis par les pommiers traités au SDP par une approche radicalement opposée. Nous avons pu mettre en place une collaboration avec une équipe de recherche Néo-Zélandaise qui a produit des pommiers génétiquement modifiés qui ne produisent plus les sesquiterpènes émis en réponse au Bion 50WG (l'α-farnesène, b-caryophyllène et Germacrène-D). Des démarches sont en cours pour rapatrier ce matériel biologique qui nous servira à faire les expériences de choix d'installation du puceron cendré. Nous confronterons les pucerons au choix suivant : s'installer sur des plantes témoin traitées au SDP ou sur des plantes mutantes traitées au SDP. Il sera ainsi possible de déterminer si le défaut de production des sesquiterpènes est à lui seul suffisant pour orienter les pucerons vers les plantes mutantes.

Les expériences concernant le parasitoïde *Ephedrus persicae* ont également cumulées les désillusions, malgré le fait qu'elles aient bien débutées. Nous avons commencé par récolter des rameaux de pommiers infestés par *Dysaphis plantaginea* dans des vergers qui ne sont plus exploités. Les rameaux ont été placés en survie dans des cages d'émergence afin d'identifier les espèces parasitoïdes parasitant les populations de pucerons. De nombreux individus, exclusivement de l'espèce *Ephedrus persicae* ont ainsi pu être identifiés. Ces individus ont été placés en présence d'élevages de *Dysaphis plantaginea* afin de procéder à l'amplification du parasitoïde. Bien que la plupart des pucerons aient été parasités (transformation des pucerons en momies), aucun parasitoïde n'a émergé de notre collection de momies. En rassemblant les quelques éléments du cycle de vie de ce parasitoïde, éléments dispersés dans la littérature scientifique, nous sommes arrivés au constat qu'*Ephedrus persicae* passe la majeure partie de son cycle dans les momies. En effet, au printemps, *Ephedrus persicae* émerge à partir de momies de pucerons présentes dans l'environnement, pucerons qui peuvent être d'autres espèces que *Dysaphis plantaginea*. Ces individus émergeants parasitent alors des pucerons, dont le puceron cendré (comme ceux que nous avons récoltés en verger). De nouveaux individus émergent quelques semaines plus tard, ce qui permet d'amplifier la population de

parasitoïdes. Cette deuxième vague de parasitoïde pond alors ses œufs dans de nouveaux pucerons (comme nous avons pu le constater), puis entrent en estivation pour résister à la saison sèche, et poursuivent par une hibernation, dans la même momie, pour résister à la saison froide. Ce n'est qu'au printemps suivant que les parasitoïdes émergent à nouveau. Suivant ce schéma, nous avons donc tenté de placer nos momies de puceron cendré à des températures élevées pendant plusieurs jours, puis à des températures basses pendant plusieurs jours. Ces seuls changements thermiques ne nous ont pas permis de faire émerger des parasitoïdes. Nous nous sommes donc orientés vers une société de fourniture d'auxiliaires qui avait un élevage expérimental d'*Ephedrus persicae*, et avons ainsi obtenu des momies de pucerons (qui n'appartenaient pas à l'espèce *Dysaphis plantaginea*) prêtes à « éclore ». Les individus parasitoïdes ainsi obtenus ont été étudiés par olfactométrie afin de déterminer si l'α-farnesène purifié pouvait constituer un signal olfactif attractif. Les résultats ainsi obtenus ont montré que les *Ephedrus persicae* qui ont émergés des momies fournies par la société en question étaient indifférents à l'α-farnesène. Deux explications possibles à cela : (i) l'α-farnesène n'influence pas le comportement d'*Ephedrus persicae* en général ou (ii) l'α-farnesène n'influence pas le comportement d'*Ephedrus persicae* obtenus à partir d'une autre espèce que *Dysaphis plantaginea*. La seconde hypothèse, celle d'un « effet maternel » du puceron dans lequel le parasitoïde est installé, ayant fait l'objet de plusieurs études publiées dans la littérature scientifique, nous en avons conclu que...nous ne pouvions pas conclure. La seule manière de conclure aurait été de renouveler au printemps 2020 une importante campagne de prélèvement de *Dysaphis plantaginea*, et de travailler directement sur les parasitoïdes émergeant à partir de momies de puceron cendré. Lorsque les mesures de confinement ont pris fin, les pucerons cendrés étaient soit partis vers le plantain, soit parasités par la génération de parasitoïdes estivant puis hibernant. Du fait que nous n'avons plus de soutien personnel permettant de se consacrer à temps plein à cette tâche chronophage au printemps 2021, nous n'avons pas pu conclure cet aspect du travail exploratoire, à regret.

Bilan et perspectives

L'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de la collaboration autour du projet Stimulrav a permis de poser les bases d'un effet des SDP sur plusieurs traits de vie du puceron cendré du pommier : leur capacité à limiter la taille des colonies de printemps et leur capacité à influencer le comportement d'installation sur le pommier, et ce, au printemps, comme à l'automne. Bien évidemment, les expériences ont été menées sur des plants greffés cultivés en serre, avec des élevages de chambre de culture, avec des COV purifiés, et ne sauraient être généralisables à ce qu'il se passe en verger.

Toutefois, nous avons obtenus assez de résultats pour estimer qu'il était pertinent de poursuivre l'étude des SDP comme solution alternative, imparfaite certes, à l'emploi des pesticides de la famille des néonicotinoïdes dans la lutte contre le puceron cendré du pommier. Ces travaux seront poursuivis et complétés par des analyses en verger dans le cadre du projet PPR Capzérophyto. Ce projet, d'une durée de 6 ans est dédié à l'étude du concept d'immunité agro-écologique appliquée principalement au pommier et à la tomate. Le principe est d'étudier individuellement puis de manière combinée des leviers interventionnels ayant chacun une efficacité partielle sur la santé globale du système agro-écologique d'intérêt. Le triptyque pommier/puceron cendré/SDP y aura donc naturellement sa place.



STIMULRAV : Impact des stimulateurs de défense des plantes ou SDP sur un ravageur du pommier, le puceron cendré et sur ses ennemis naturels
Impact of Plant resistance inducers (PRI) on the Rosy Apple Aphid and on its natural enemies.

« **Alternatives aux néonicotinoïdes** »
Avancées pouvant être diffusées publiquement et intérêt pour Ecophyto

Date de la version du rapport:
13/07/2021

UMR 1345 IRHS
42 rue Georges Morel
49071 Beacouzé

Alexandre DEGRAVE
Agrocampus Ouest CFR Angers
2, rue André Le Nôtre
49045 Angers cedex 01
alexandre.degrave@agrocampus-ouest.fr

La protection du pommier contre l'insecte ravageur *Dysaphis plantaginea*, le puceron cendré du pommier, fait notamment intervenir des insecticides à large spectre comme les pyréthrinoïdes et les néonicotinoïdes. Leur emploi est doublement compliqué par deux aspects : le seuil d'intervention qui est d'un individu par parcelle, et la période d'intervention qui se fait au moment de la floraison du pommier et donc de la présence d'insectes pollinisateurs dans les vergers.

En absence de toute intervention et puisque la quasi-totalité des variétés de pommier cultivées sont sensibles à *D. plantaginea*, les épidémies de pucerons cendrés engendrent d'importants dégâts à court et moyen terme. En effet, ce puceron affecte non seulement la récolte de l'année mais également le potentiel de production des arbres sur les années suivantes. De plus, les mécanismes de régulation naturelle de ce puceron par la faune auxiliaire ne permettent pas de maîtriser totalement le caractère parfois explosif des épidémies de puceron cendré.

Pour contrecarrer la suppression de certains insecticides, sans pour autant accepter d'importantes pertes de production, il est donc nécessaire de déployer et de combiner des stratégies de lutte complémentaires contre le puceron cendré. L'utilisation de stimulateurs de défense des plantes (ou SDP) pourrait à ce titre être considérée comme une stratégie complémentaire, bien que partielle. En effet, certains SDP présentent l'avantage d'activer plusieurs facettes de l'immunité du pommier, qui pourraient à la fois protéger les plantes contre les micro-organismes et les insectes ravageurs.

Dans le cadre du projet exploratoire Stimulrav, nous avons voulu déterminer si une gamme de SDP qui protègent partiellement les arbres contre des maladies comme la tavelure pouvaient être de bons candidats à la limitation du développement épidémique du puceron cendré. Nous avons pour cela travaillé avec des plants greffés de Golden delicious cultivés en serre puis infesté ceux-ci avec *D. plantaginea* après les avoir préalablement traités avec différents SDP. Nous avons ainsi pu montrer que certains SDP avaient la capacité d'activer des défenses végétales agissant à la fois sur le développement des colonies de printemps, mais aussi sur le comportement d'installation du puceron sur son hôte. En effet, lorsque le puceron a le choix, il s'installera préférentiellement sur des pommiers témoins plutôt que sur des pommiers dont l'immunité aura été activée par des SDP. Ce choix préférentiel pour des plantes non traitées a été observé à la fois sur des individus de printemps, et également sur les individus d'automne, qui regagnent les pommiers après avoir passé l'été dans la strate herbacée. Si ces observations étaient vérifiées en condition de production, cela signifierait que l'activation des défenses par des SDP impacterait négativement plusieurs aspects et étapes importantes du cycle de vie du puceron.

Différentes analyses de laboratoire nous ont amené à formuler l'hypothèse selon laquelle le comportement d'installation du puceron pouvait être perturbé par l'émission de composés organiques volatils (COV) émis par des pommiers dont l'immunité est activée par des SDP. Un composé en particulier, l'alpha-farnesène (α -Far), a ainsi été identifié et évalué. Nous avons ainsi pu montrer que l' α -Far est, à lui seul, répulsif vis-à-vis des pucerons de printemps et des pucerons d'automne.

L'ensemble de ces résultats, qui ne sont pour l'instant que le produit d'un travail exploratoire, nous encourage à approfondir nos travaux et à maintenant aller expérimenter en conditions de production. Nous étendrons également nos études à la faune auxiliaire, afin de déterminer notamment si les COV émis par les pommiers traités aux SDP peuvent avoir un effet attractif sur les ennemis naturels du puceron cendré.

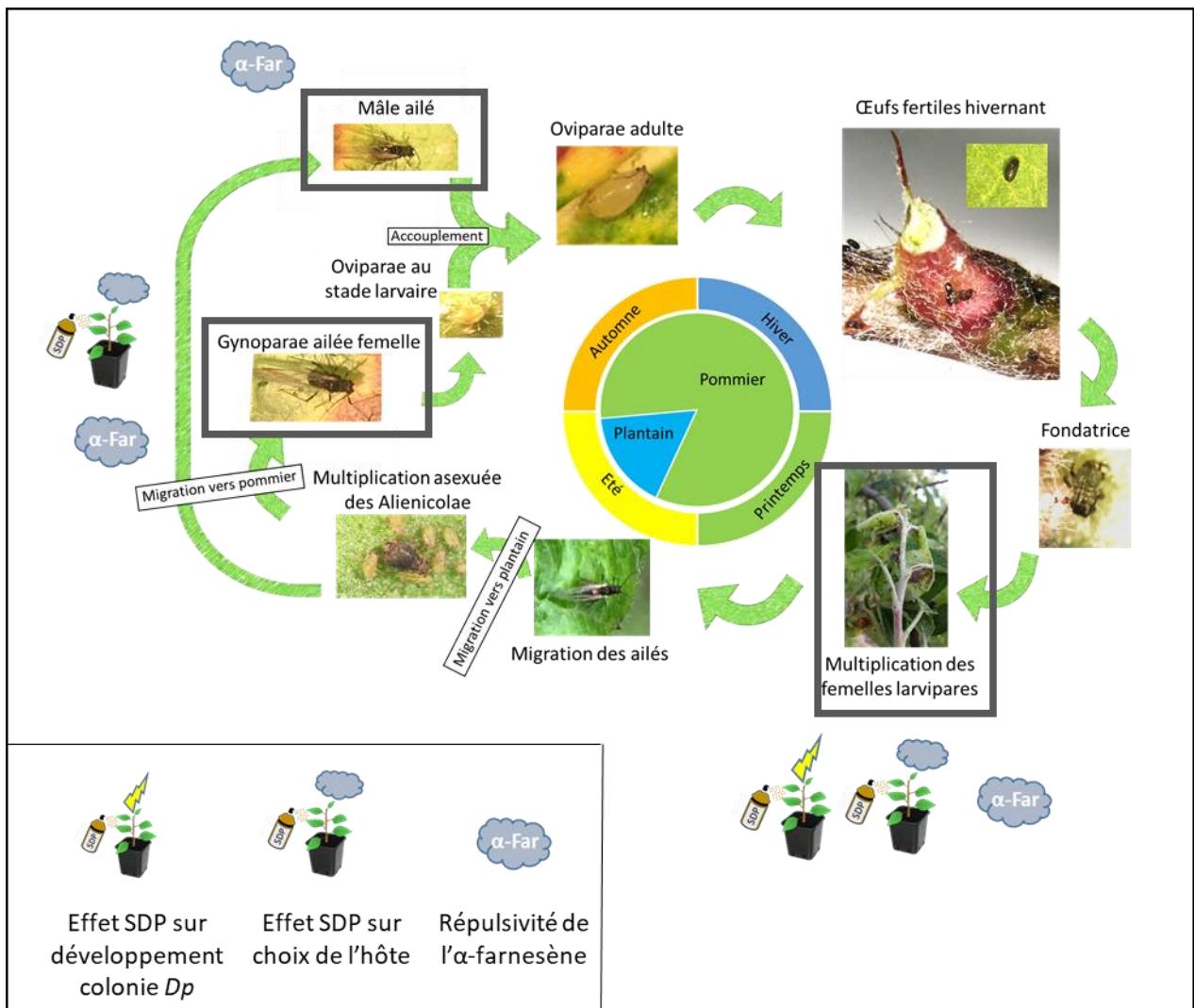


Figure résumant le cycle de vie du puceron cendré *Dysaphis plantaginea*, ainsi que les effets observés des SDP ou des composés de défense du pommier sur le développement ou le comportement du puceron (crédits : A. Degrave, adapté de Warneys et al., 2018)