

**Plan type de rapport final d'un projet de recherche financé dans le cadre du plan Ecophyto**

## Remarques concernant ce document

- La mise en forme de ce rapport, hormis sa partie scientifique et les annexes, doit être respectée. Ce format imposé permettra au service de la recherche une copie automatique vers d'autres documents à usage interne ou externe.
- Tous les fichiers doivent être déposés en 2 formats : au format PDF et dans des formats éditables (DOC, ODT ou RTF, XLS, ODS, etc.) pour les besoins MTES du co-pilotage de l'axe recherche et innovation. L'ensemble des fichiers doit être regroupé dans un fichier archive (par exemple au format ZIP) et déposé sur la plate-forme de téléchargement <http://melanissimo.developpement-durable.gouv.fr> du ministère, aux adresses de Anne-Sophie Carpentier ([anne-sophie.carpentier@developpement-durable.gouv.fr](mailto:anne-sophie.carpentier@developpement-durable.gouv.fr)) et Damien Corazzi ([animation-ecophyto@inrae.fr](mailto:animation-ecophyto@inrae.fr)) en indiquant en objet l'acronyme de votre projet. Nous vous invitons à vous mettre en copie du mail afin de vous assurer du bon déroulement du dépôt numérique.
- Un envoi sous forme électronique suffit dans un premier temps. Nous vous demanderons l'envoi papier une fois le rapport validé par le Conseil scientifique (en 3 exemplaires recto-verso, interligne simple, adressés à Anne-Sophie Carpentier au MTES).
- Les documents de ce rapport, en dehors de l'éventuelle partie confidentielle, serviront aussi bien pour l'évaluation finale du projet que pour la valorisation des résultats.
- Les versions électroniques des résumés et de la synthèse de votre rapport doivent impérativement nous parvenir sous format modifiable afin de pouvoir être réutilisés pour valorisation ou publiés (après relecture de votre part), ainsi que sous format pdf.



**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 »

**Rapport final V1**

*Date de la version du rapport:*

13/07/2020

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

Action pilotée par les Ministères chargés du développement durable (MTES), de l'agriculture (MAA), de la santé (MSS) et de la recherche (MESRI), avec l'appui financier de l'Agence Française pour la Biodiversité, par les crédits issus de la redevance pour pollutions diffuses attribués au financement du Plan Ecophyto

## Table des matières

Synthèse .....	6
Contexte général .....	8
Objectifs généraux du projet.....	8
Quelques éléments de méthodologie (et éventuelles difficultés rencontrées) .....	8
Résultats obtenus.....	8
Implications pratiques, recommandations, réalisations pratiques, valorisation.....	8
Partenariats mis en place, projetés, envisagés .....	8
Pour en savoir plus (quelques références).....	8
Liste des opérations de valorisation issues du contrat (articles de valorisation, participations à des colloques, enseignement et formation, communication, expertises...) .....	9
Résumés .....	10
Résumé court.....	10
Résumé long .....	10
Mots-clés.....	10
Abstract .....	10
Key words .....	10
Rapport scientifique.....	11
Annexe : textes des publications.....	13
Publications scientifiques parues .....	13
Publications scientifiques à paraître .....	13
Publications scientifiques prévues .....	13
Annexe : partie confidentielle.....	14

## **SYNTHESE**

(destinée aux utilisateurs et gestionnaires publics)

**(Environ 10 pages, hors liste des publications et autres valorisations)**

*Merci de rédiger l'ensemble de cette partie de manière à ce qu'elle soit aisément compréhensible par un utilisateur non spécialiste.*

***Vous mettrez en évidence les points qui vous paraissent les plus porteurs pour l'élaboration, le suivi ou la mise en œuvre de politiques publiques de diminution des risques environnementaux liés aux pesticides et notamment pour le plan Ecophyto.***



## **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** »  
**Synthèse pour les décideurs V1**  
*Date de la version du rapport:*  
13/07/2020

UMR 1345 IRHS  
42 rue Georges Morel  
49071 Beaucouzé

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

Action pilotée par les Ministères chargés du développement durable (MTES), de l'agriculture (MAA), de la santé (MSS) et de la recherche (MESRI), avec l'appui financier de l'Agence Française pour la Biodiversité, par les crédits issus de la redevance pour pollutions diffuses attribués au financement du Plan Ecophyto

## En français

---

### CONTEXTE GENERAL ET ENJEUX SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES

Les méthodes de lutte chimiques contre les insectes ravageurs se sont vues amputées du possible recours aux insecticides de la famille des néonicotonïdes. La production de pomme, particulièrement consommatrice en pesticides, nécessite une protection complète contre le puceron cendré du pommier, *Dysaphis plantaginea* (*Dp*), en raison de son caractère extrêmement nuisible. Plusieurs molécules de type stimulateurs de défense des plantes (SDP) sont ou vont être homologuées en protection contre la tavelure du pommier, maladie fongique qui pèse pour moitié dans l'indice de fréquence des traitements de cette culture.

La panoplie de composés de défense activés par les SDP peuvent, en théorie, impacter plusieurs catégories de bioagresseurs. En effet, ces défenses sont généralement déclenchées sans qu'elles soient destinées à cibler un bioagresseur en particulier. Parmi les défenses mobilisées suite à l'application d'un SDP, les composés issus de l'activation des voies du métabolisme secondaire revêtent une catégorie particulièrement intéressante. En effet, certaines voies de biosynthèse, sont interconnectées entre elles et peuvent en théorie conduire à la production de plusieurs composés différents, ayant des activités biologiques vis-à-vis de plusieurs bioagresseurs. Des études menées au laboratoire en amont du projet Stimulrav, ont montré que la voie de biosynthèse du pommier intervenant dans la production de composés de la famille des terpenoïdes était activée suite à l'application d'un SDP de référence capable de protéger le pommier contre la tavelure (maladie fongique) et le feu bactérien (maladie bactérienne). Parmi les gènes codant des enzymes de cette voie de biosynthèse, l'alpha farnesène synthase a en particulier retenu notre attention. En effet, cette enzyme est décrite dans la littérature comme responsable de la production de trois sesquiterpènes (alpha farnesène, caryophyllène, germacrène), des composés organiques volatils (COV). Des analyses complémentaires ont montré que le pommier émet effectivement ces trois composés en réponse à l'application d'un SDP. Ces COV sont décrits dans la littérature comme pouvant avoir un effet répulsif vis-à-vis d'insectes ravageurs, et *a contrario*, avoir un effet attractif vis-à-vis d'hyménoptères parasitoïdes affectant les populations d'insectes ravageurs.

### OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

Le projet Stimulrav, vise à déterminer si les SDP capables de protéger le pommier contre un bioagresseur fongique ou bactérien et conduisant à l'activation de la voie de biosynthèse des sesquiterpènes ont également un effet vis-à-vis d'un insecte ravageur ; le puceron cendré du pommier *Dysaphis plantaginea* (*Dp*).

Il s'agit en l'occurrence de :

- 1°) Evaluer le potentiel de protection de plusieurs SDP vis-à-vis de *Dp*.
- 2°) Déterminer par olfactométrie si certains sesquiterpènes ou l'ensemble du bouquet olfactif du pommier, produits en réponse à l'application de SDP, ont un effet répulsif sur *Dp*.

3°) Déterminer par olfactométrie si certains sesquiterpènes ou l'ensemble du bouquet olfactif du pommier, produits en réponse à l'application de SDP, ont un effet attractif sur des parasitoïdes de *Dp*.

Ce projet exploratoire vise donc à déterminer en conditions contrôlées, si les défenses induites par certains SDP sont capables d'influencer certains paramètres déterminants quant au développement de populations de l'insecte ravageurs *Dp*. Le cas échéant, des expérimentations en conditions de production seront proposées dans le cadre d'autres projets de plus grande ampleur.

### **QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE (ET EVENTUELLES DIFFICULTES RENCONTREES)**

Le dispositif d'olfactométrie (qui permet d'étudier le comportement de choix d'un insecte) a nécessité des ajustements méthodologiques qui ont été réalisés avant la date de démarrage officiel du projet, sur ressources propres. De même, la période de plusieurs mois entre l'accord scientifique et l'accord de financement du projet, nous a permis d'éprouver la méthode et d'acquérir des résultats répondant à une partie des interrogations et commentaires du CSO R&I formulés au moment de l'acceptation scientifique du projet. Ces interrogations portaient notamment sur la génération de pucerons (printemps ou automne) ciblée par les expériences.

Depuis le démarrage du projet ces résultats ont été confirmés et étendus à plusieurs générations *Dp*, puceron au cycle complexe. En effet, la première génération de puceron émerge sur pommier au printemps, migre vers son hôte secondaire au début de l'été, avant de revenir à l'automne sur le pommier où aura lieu la reproduction sexuée. Nous avons donc travaillé à la fois sur des pucerons de printemps, et des pucerons d'automne. En revanche, nous ne sommes pas parvenus à évaluer l'effet du bouquet olfactif total émis par des pommiers traités au SDP vis-à-vis de *Dp*. Dans ce type d'expérience, il s'agit de placer des plantes à l'intérieur de cloches en verre et de diriger le bouquet olfactif de ces plantes vers les olfactomètres. Pour des raisons que nous n'expliquons pas encore, les composés purs ayant un effet répulsif vis-à-vis de *Dp* lorsqu'ils sont placés à l'entrée de l'ofactomètre, ne possèdent plus cette propriété répulsive lorsque le composé est placé sous cloche, à l'entrée du tube menant vers l'olfactomètre. Il s'agit probablement d'effets de concentrations mais malgré nos tentatives, nous ne sommes pas parvenus à valider le bon fonctionnement du dispositif d'olfactométrie avec les cloches en verre pour le couple pommier/*Dp*.

Une part non négligeable du travail a également consisté à tenter d'établir les conditions propices nécessaires à la réalisation d'un élevage de parasitoïdes de *Dp* (*Ephedrus persicae*), obtenus à partir de rameaux de pommiers infestés, prélevés au printemps. Nous nous sommes donc dirigés vers des parasitoïdes issus d'élevages professionnels fournis par la société Koppert.

### **RESULTATS OBTENUS**

Avant la date de conventionnement du projet, nous avons démontré que l'alpha-farnesène, émis par des pommiers traités aux SDP, exerce un effet répulsif sur les femelles de la génération d'automne de *Dp*. Cet effet se manifeste sur le comportement de choix des pucerons, qui s'établissent très nettement sur des pommiers témoins plutôt que sur des pommiers traités aux SDP.

Depuis le début du projet, nous avons caractérisé l'effet de protection de plusieurs SDP vis-à-vis de *Dp*. Nous avons pu montrer que parmi les COV émis en réponse à

des SDP, seul l'alpha-farnesène possède également un effet répulsif vis-à-vis de la génération de printemps de *Dp*. En revanche, tous les essais menés avec des plantes en cloches reliées à un dispositif d'olfactométrie ont conduit à des résultats suggérant que l'ensemble du bouquet olfactif n'exerce aucune influence vis-à-vis de *Dp*. Toutefois, des expériences complémentaires ont suggéré que ce dispositif n'était pas approprié pour l'étude du couple pommier/*Dp*.

Au cours de l'année de prolongation par avenant du projet Stimulrav, des expériences réalisée grâce à la présence d'un collègue brésilien effectuant un congé sabbatique au laboratoire, ont montré :

- que l'alpha farnesène a un effet répulsif sur les mâles de la génération d'automne de *Dp*
- que des parasitoïdes généralistes de l'espèce *Ephedrus persicae*, obtenus auprès de la société Koppert, présentaient une absence de réponse vis-à-vis de l'alpha-farnesène.

Ce dernier résultat, assez décevant, pourrait s'expliquer par le fait que les parasitoïdes obtenus dans des élevages commerciaux sont réalisés grâce des pucerons qui ne sont pas du *Dysaphis plantaginea*. Or il est avéré que chez certaines espèces de parasitoïdes généralistes, il existe une sorte d'effet maternel qui permet au parasitoïdes de s'orienter préférentiellement vers les pucerons infestant les espèces végétales qui ont précisément permis de réaliser ces élevages. Nous avions donc prévu de prélever au mois d'Avril 2020, comme l'année précédente, des rameaux de pommier infestés par du *Dp*, de les placer en cage d'émergence, et des réaliser les expériences d'olfactométrie avec les parasitoïdes issus de ces cages, sans tenter de mettre au point un élevage de parasitoïde. Malheureusement, cette dernière tentative ci a dû être abandonnée pour les raisons sanitaires que nous connaissons tous. Ces mêmes raisons ont également conduit à la destruction des greffes de pommier que nous avions réservées pour réaliser les expériences de choix d'installation pour les pucerons *Dp* en réponse aux différents SDP.

#### **IMPLICATIONS PRATIQUES, RECOMMANDATIONS, REALISATIONS PRATIQUES, VALORISATION**

- Implications pratiques : Dans l'état actuel des connaissances, la question biologique adressée par le projet Stimulrav, suggère que l'application de certains SDP mérite d'être expérimentée au verger afin d'envisager ces produits comme une méthode de lutte visant à diminuer la pression de *Dp* au printemps et de limiter le vol retour des individus à l'automne qui déterminent le niveau d'infestation au printemps suivant.
- Recommandations : néant
- Limites ou généralisations éventuelles des résultats : Il est important de préciser que les résultats obtenus à ce stade l'ont été en conditions contrôlées. La transférabilité de ces résultats à un verger en situation de production doit absolument passer par l'expérimentation au champ avant de revêtir le caractère d'une recommandation.
- Réalisations pratiques et valorisation : Les résultats obtenus ont été présentés au congrès Natural Products and Biocontrol à Perpignan (25-28 Septembre 2018), ainsi qu'à un séminaire invité réalisé au cours d'un congé sabbatique

recherche par le porteur du projet à l'institut Plant and Food Research d'Auckland, Nouvelle Zélande.

### PARTENARIATS MIS EN PLACE, PROJETES, ENVISAGES

Lors du rapport intermédiaire, nous avions évoqué les discussions initiées avec la société M2i, spécialisée dans la production et la diffusion de composés sémi-chimiques, qui devaient déboucher à moyen terme sur un projet ciblant la problématique du puceron cendré du pommier, focalisant sur la génération d'automne, et qui aurait visé à déterminer s'il est possible de lutter contre le puceron par la diffusion de COV de synthèse ayant montré un effet répulsif en olfactométrie. Ces discussions n'ont pour l'instant pas été suivie d'effet.

En revanche, les équipes membres du projet Stimulrav ont participé à un consortium d'instituts de recherche travaillant sur le pommier et la tomate afin de solliciter le financement d'un projet de grande envergure auprès de PIA3 « cultiver et protéger autrement ». Cette initiative a conduit au dépôt du projet CapZeroPhyto, qui a été défendu oralement le Lundi 22 Juin 2020, et dans lequel il est prévu de continuer à investiguer notamment sur le potentiel des SDP en tant que leviers de protection vis-à-vis du puceron cendré du pommier.

Par ailleurs, le congé sabbatique mentionné précédemment et réalisé en Nouvelle Zélande a permis de prendre contact avec des chercheurs ayant obtenu des pommiers transgéniques dont le gène codant l'alapha farnesène synthase est rendu inopérant, et ne produisant donc plus d'alpha farnesène. Les démarches sont en cours pour rapatrier quelques exemplaires de ces pommiers afin d'étudier le comportement de *Dp* vis-à-vis de plantes incapables de produire ce COV.

### POUR EN SAVOIR PLUS (QUELQUES REFERENCES)

Warneys, R., Gaucher, M., Robert, P., Aligon, S., Anton, S., Aubourg, S., Barthes, N., Braud, F., Cournol, R., Gadenne, C., Heintz, C., Brisset, M.-N., and Degrave, A. 2018. Aciben-zolar-S-Methyl Reprograms Apple Transcriptome Toward Resistance to Rosy Apple Aphid. *Front. Plant Sci.* 9:1–16

Nieuwenhuizen, N. J., Green, S. A., Chen, X., Bailleul, E. J. D., Matich, A. J., Wang, M. Y., et al. (2013). Functional Genomics Reveals That a Compact Terpene Synthase Gene Family Can Account for Terpene Volatile Production in Apple. *PLANT PHYSIOLOGY*, 161, 787–804. doi: 10.1104/pp.112.208249

Pickett, J. A., Wadhams, L. J., and Woodcock, C. M. (1992). The chemical ecology of aphids. *Annual Review of Entomology*, (37), 67–90. doi: 0.1146/annurev.ento.50.071803.130345

Vega, F. E., Simpkins, A., Miranda, J., Harnly, J. M., Infante, F., Castillo, A., et al. (2017). A potential repellent against the Coffee Berry Borer (*Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae*). *Journal of Insect Science*, 17, 1–9. doi: 10.1093/jisesa/ies095

**LISTE DES OPERATIONS DE VALORISATION ISSUES DU CONTRAT (ARTICLES DE VALORISATION, PARTICIPATIONS A DES COLLOQUES, ENSEIGNEMENT ET FORMATION, COMMUNICATION, EXPERTISES...)**

**PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES**

**COLLOQUES**

- Participations passées à des colloques : Natural Products and Biocontrol, Perpignan, 25-28 Septembre 2018 :

**Mechanisms underlying ASM-induced resistance to the apple rosy aphid,**

***Dysaphis plantaginea.***

**Romain Warneys, Sylvia Anton,**

**Christophe Gadenne, Matthieu Gaucher,**

**Christelle Heintz, Sébastien Aubourg,**

**Nicolas Barthes, Marie Noëlle Brisset,**

**Alexandre Degrave.**

Participations futures à des colloques

**THESES**

Thèses passées

Thèses en cours

**AUTRES**

Séminaire invité à l'institut Plant and Food Research, Auckland, Nouvelle Zélande (22 Octobre 2019): **The taste and smell of induced resistance in**

**apple: the word is to the parasites.**  
**A. Degrave.**

# RESUMES

En français

---

## RESUME COURT

Le projet exploratoire Stimulrav visait à déterminer si certains stimulateurs de défense (SDP), susceptibles d'être employés dans le cadre de la lutte contre les maladies du pommier, pouvaient être repositionné contre un ravageur du pommier : le puceron cendré. Certains SDP affectent à la fois le comportement de choix du puceron et/ou la croissance de la colonie de ce ravageur. Un composé organique volatil du pommier émis en réponse aux SDP, l'alpha farnesène, exerce un effet répulsif vis-à-vis de l'ensemble des générations de puceron évaluées dans le cadre de cette étude. En revanche, il n'a pas été possible de conclure quant à un éventuel effet attractif de ce même composé vis-à-vis d'une guêpe parasitoïde appartenant à l'espèce *Ephedrus persicae*.

## RESUME LONG

**2 pages reprenant les rubriques de la synthèse – A mettre à jour par rapport à votre projet initial**

**Contexte** général et enjeux scientifiques et techniques

**Objectifs**

**Méthodologie**

**Principaux résultats obtenus**

**Sorties opérationnelles pour décideurs, applications éventuelles**

**Recommendations**

## MOTS-CLÉS

Pommier, stimulateur de défense, *Dysaphis plantaginea*, composés volatils, parasitoïdes.

In English

---

## ABSTRACT

**2 pages based on the headings of the synthesis:**

The Stimulrav project was designed to determine whether some plant resistance inducers (PRI), which could be used for apple disease control, can be repositioned against a major apple pest: the apple rosy aphid. Some of the evaluated PRI affect both the choice behaviour of the aphid and/or the growth of the aphid colony. A volatile organic compound emitted by apples in response to PRI, alpha farnesene, is repellent toward all the generations of aphids evaluated in this study. On the other hand, it has not been possible to conclude on an attractive effect of the same compound towards the parasitic wasp *Ephedrus persicae*.

**Context**

**Objectives**

**Methodology**

**Main results**

**Applications for public policies**

**Recommendations**

**KEY WORDS**

Apple, Dysaphis plantaginea, Plant resistance inducers, Volatil compounds, parasitic wasps.



## RAPPORT SCIENTIFIQUE

*Dans le rapport scientifique, nous vous prions de fournir des éléments méthodologiques présentés succinctement et clairement afin de pouvoir avoir une vision des limites des résultats*

### **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 »

***Rapport scientifique V1***

*Date de la version du rapport :*

13/07/2020

UMR 1345 IRHS  
42 rue Georges Morel  
49071 Beaucouzé

Alexandre DEGRAVE  
Agrocampus Ouest CFR  
Angers  
2, rue André Le Nôtre  
49045 Angers cedex 01  
[alexandre.degrave@agrocampus-ouest.fr](mailto:alexandre.degrave@agrocampus-ouest.fr)

Action pilotée par les Ministères chargés du développement durable (MTES), de l'agriculture (MAA), de la santé (MSS) et de la recherche (MESRI), avec l'appui financier de l'Agence Française pour la Biodiversité, par les crédits issus de la redevance pour pollutions diffuses attribués au financement du Plan Ecophyto

**Note importante**

---

*Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier pdf de préférence).  
Son format est laissé à la libre appréciation de ses rédacteurs.*

## Préambule

L'objectif du projet est de déterminer si des stimulateurs de défense des plantes, dont l'activité stimulatrice a été démontrée par des approches moléculaires sur le pommier, sont capables de réguler, en conditions semi-contrôlées, la pression parasitaire exercée par le puceron cendré du pommier, *Dysaphis plantaginea* (*Dp*). Le cas échéant, les mécanismes à l'origine de cette efficacité de protection seront analysés plus en avant. Il est important de noter que l'acceptation scientifique du projet date de Décembre 2017, alors que la date de conventionnement date de Septembre 2018. Dès l'acceptation scientifique du projet, nous avons donc entrepris de réaliser des expériences sur fonds propres puisque la thématique du projet s'intègre dans la thématique des deux équipes impliquées : l'équipe Respom de l'UMR IRHS et l'équipe EGI de l'UMR IGEPP. Certains résultats ne sont donc pas à proprement parler issus du projet Stimulrav, mais puisqu'ils forment un tout cohérent, nous avons choisi de les présenter dans ce rapport scientifique.

### 1/ Régulation des populations de *Dp* par les SDP en situation de non-choix sur pommier

#### *Introduction*

Un projet CASDAR (projet PEPS 2014-2018) dirigé par l'équipe Respom de l'UMR IRHS a permis d'identifier plusieurs SDP dont l'application sur semis de pommiers provoque l'activation des mécanismes de défense (analyses moléculaires d'expression de gènes de défense). Trois produits commerciaux ont été testés pour leur capacité à maîtriser le développement de populations de *Dp* (génération de printemps *fundatrigeniae*) : le Bion 50WG (m.a. Acibenzolar-S-méthyl), le LBG 01F34 (m.a. phosponate de potassium) et l'Armicarb (m.a. bicarbonate de potassium).

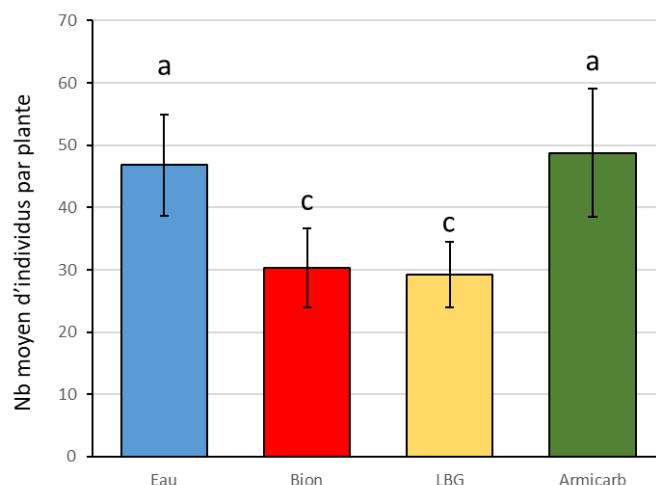
#### *Procédure expérimentale*

Des plants greffés en pleine croissance de la variété Golden Delicious sont pulvérisés deux fois jusqu'à limite de ruissellement, à 7 jours d'intervalle, avec des solutions contrôle (eau), Bion 50WG (0,375 g/l), LBG 01F34 (20 ml/l) ou Arnicarb (12,5 g/l). Les plantes ont été cultivées en serre en conditions semi-contrôlées : température diurne 21-25°C, température nocturne 15-17°C ; éclairage naturel avec complémentation par un éclairage d'appoint.

Une femelle aptère adulte, prête à pondre, issue d'un élevage synchrone de *fundatrigeniae* de *Dp* est placée délicatement au pinceau sur un plant greffé 2 jours après le dernier traitement. Chaque plant infesté est séparé des plants voisins afin que la femelle déposée ne puisse se déplacer, ni par le sol, ni par le feuillage, vers un plant voisin. Le nombre total d'individus par plante est compté au bout de 12 jours, donc avant que les larves pondues sur les plants ne puissent elles-mêmes pondre de nouvelles larves. Cette procédure permet d'évaluer l'impact global du traitement SDP sur le développement de la population de *Dp*, et combine l'effet potentiel du produit sur la mortalité de l'adulte, la fécondité de l'adulte ainsi que sur la mortalité larvaire. L'expérience est réalisée sur deux répliques biologiques indépendants composés chacun de 30 plantes par modalité.

## Résultats

Les résultats obtenus à l'issue de ces expériences montrent que le nombre d'individus moyens dénombrés par plante est d'environ 46 sur les lots témoins, 30 sur les lots traités au Bion 50WG et au LBG01F34, 48 sur les lots traités à l'Armicarb. L'analyse statistique de ces résultats indique que le Bion 50WG et le LBG01F34 diminuent tous deux d'environ 35% la population de pucerons par rapport à un traitement témoin, alors que l'Armicarb n'a aucun impact sur le développement de la population (figure 1).



**Figure 1 :** Nombre moyen d'individus dénombré 12 jours après infestation d'une femelle adulte par plantes sur des plants de pommier traités 2 et 9 jours avant infestation. Les lettres figurant au-dessus des barres d'histogramme représentent les classes statistiques (n=60).

## 2/ Effet du Bion 50WG sur le choix de la plante hôte

### Introduction

Le développement épidémique du ravageur repose à la fois sur le comportement d'installation du puceron sur la plante hôte, sur sa capacité à se multiplier sur celle-ci et à se propager de proche en proche. Dans le cas particulier de *Dp*, puceron dioécique alternant entre le pommier et le plantain, le choix de la plante hôte s'opère en particulier à l'automne, au moment où les individus ailés *gynoparae* vont effectuer le vol retour du plantain vers le pommier afin d'initier la reproduction sexuée qui aboutira à la ponte des œufs permettant à l'espèce d'émerger, sous forme de fondatrices, au printemps suivant. Ces fondatrices donneront lieu à plusieurs générations larvipares (les *fundatrigeniae*), responsables de dégâts majeurs sur pommier. Parmi les SDP capables de limiter le développement des populations de *Dp*, nous avons choisi d'évaluer l'influence d'un traitement au Bion 50WG sur le choix de la plante hôte à la fois sur les *fundatrigeniae* et sur les *gynoparae*.

### Procédure expérimentale

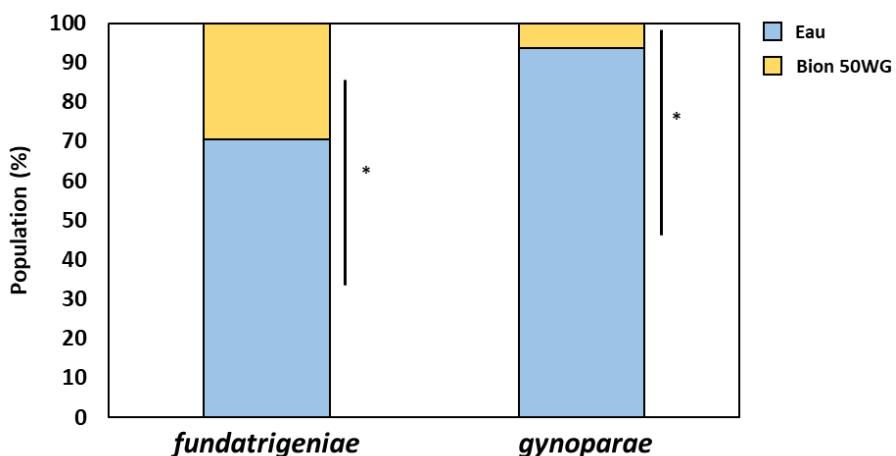
La sélection des plantes hôtes par les pucerons a été évaluée sur deux morphes de pucerons (*fundatrigeniae*/aptère et *gynoparae*/ailée). Les *fundatrigeniae* sont obtenues à partir d'un élevage sur pommier (jour :16h/22°C ; nuit 8h/18°C), alors que les *gynoparae* sont obtenues

à partir d'un élevage réalisé sur plantains placés en cage en condition de jour court (jour : 13h/19°C ; nuit : 11h/18°C) et en présence d'un jeune pommier. Ces dernières conditions permettent d'obtenir en une vingtaine de jour l'apparition d'individus ailés gynopares, suivies 10 à 15 jours plus tard par l'apparition de mâles ailés. Seuls les *gynoparae* ont été étudiées. La nuit précédant le test les individus sont mis à jeûner dans une boîte de Petri contenant un papier filtre humidifié. Pour les femelles aptères, 5 adultes sont placés sur chaque plante et les tiges de deux plantes pré-traitées de manière différentielle (l'une au Bion 50WG l'autre à l'eau) sont croisées pour permettre le passage des pucerons d'une plante à l'autre. Pour les *gynoparae*, émergées sur plantain et prêtes à migrer sur pommier, 20 individus sont placés dans une boîte de Petri ouverte entre deux lots de deux plantes pré-traitées de manière différentielle et placées dans une cage (50 x 50 x 50 cm). Un comptage du nombre de pucerons sur chaque plante a été réalisé 24h plus tard. Chaque expérience a été réalisée 2 fois sur 2 cages (n=4).

### Résultats

Les résultats des analyses, présentés dans la figure 2, montrent une forte préférence pour l'installation sur des plantes ayant reçu un traitement témoin, et ce, quel que soit le morphe considéré. Il est à noter que cette préférence est particulièrement marquée pour les *gynoparae*. L'application de Bion 50WG altère donc de manière significative le comportement de choix du puceron en faveur des plantes traitées à l'eau.

Les expériences similaires qui devaient être réalisées cette année avec les autres SDP ont été abandonnées à cause de la destruction des plants greffés au moment de la mise en place des mesures de confinement.



**Figure 2 :** Test de choix de *D. plantaginea* entre des plantes traitées à l'ASM ou à l'eau 3 jours avant. Pourcentages moyens calculés sur 5 expériences indépendantes (10 pucerons *fundatrigeniae* distribués équitablement entre les témoins et les plantes traitées à l'ASM par expérience) ou sur 2 expériences indépendantes (20 pucerons *gynoparae* libérés dans une boîte de Petri placée au milieu de 4 plantes : 2 "eau", 2 "Bion 50WG" - disposées par cage, 2 cages par expérience). Les différences significatives sont indiquées par une \* (Mann-Whitney test, p-value < 0,05).

### 3 / Etude olfactométrique du comportement de *Dp* vis-à-vis de composés organiques volatils

#### *Introduction*

Les analyses moléculaires préalables au choix des SDP utilisés dans cette étude indiquent que parmi les gènes de défense du pommier induits, l'alpha farnesène synthase ainsi que des terpène synthases caractérisées comme étant responsable de la production de  $\beta$ -caryophyllène et de germacrène-D sont induites en réponse au Bion 50WG. Des analyses de COV émis par des pommiers traités au Bion 50WG confirment que le traitement conduit à l'accumulation de ces sesquiterpènes : (*E,E*)- $\alpha$ -farnesène ; (*E*)- $\beta$ -caryophyllène et germacrène-D. Nous avons déterminé d'une part si (i) le (*E,E*)- $\alpha$ -farnesène et le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (seuls composés accessibles commercialement) impactent le comportement de *Dp*, et d'autre part si (ii) le bouquet olfactif de pommiers traités au Bion 50WG influence le comportement de *Dp*.

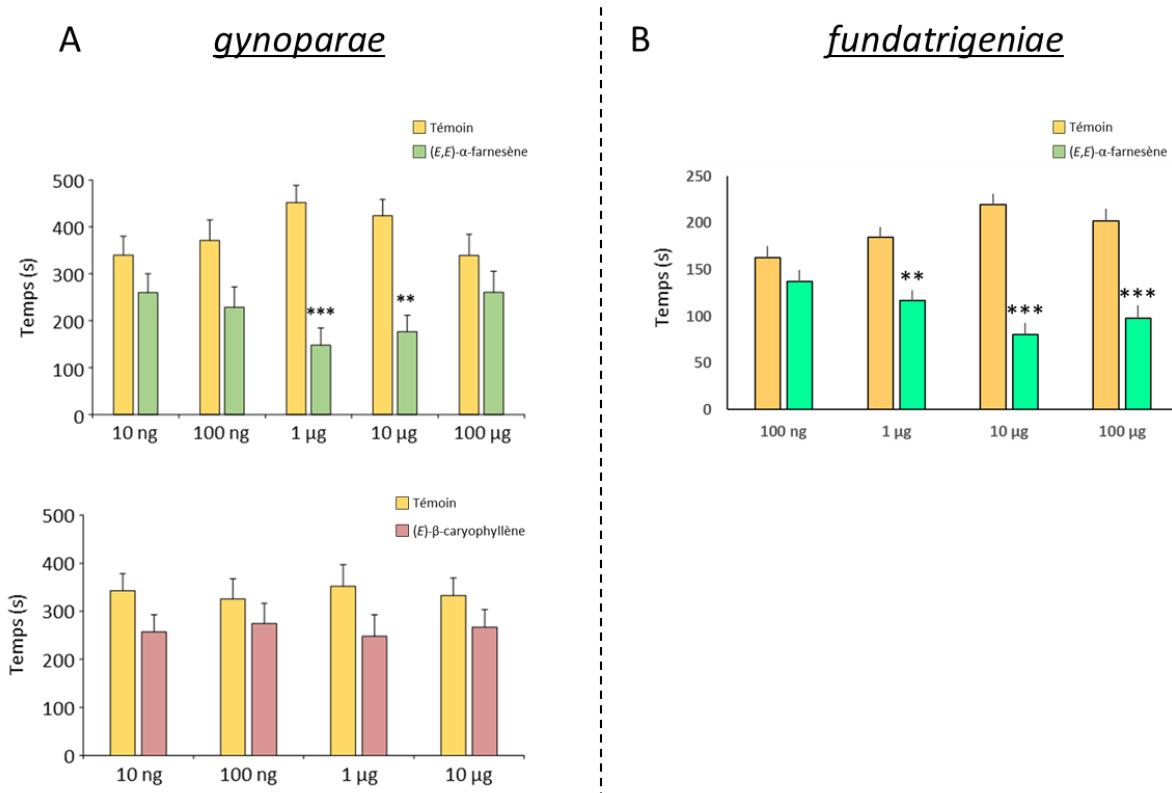
#### *Procédure expérimentale*

Des *gynoparae* ou des *fundatrigeniae* (produites dans les mêmes conditions que pour la partie 2) ont été mises à jeûner dans une boîte de Petri contenant un papier filtre humide une nuit avant l'expérimentation. Un tube de verre droit percé en son centre ou un olfactomètre à 4 voie ont été utilisés comme olfactomètres respectivement pour les *gynoparae* et les *fundatrigeniae*. Dix  $\mu$ l de solution de sesquiterpène étaient appliqués sur un morceau de papier filtre (gamme allant de 10 ng à 100  $\mu$ g), et ce dernier introduit à l'intérieur d'une des voies de l'olfactomètre (ou paire de voies face à face pour les 4 voies), un autre papier filtre avec une quantité similaire de solvant étant introduit dans l'autre voie (ou paire de voies face à face pour les 4 voies). Pour l'analyse des bouquets olfactifs totaux, deux plantes, traitées au Bion 50WG ou à l'eau à J-2 et J-9 avant l'expérience, ont été placés dans une cloche en verre. Chaque cloche en verre est reliée à deux voies des olfactomètres 4 voies (expériences effectuées pour l'instant uniquement sur les *fundatrigeniae*). Les volatils issus de ces plantes sont accumulées pendant 30 minutes sous la cloche avant de démarrer l'expérience. Un seul puceron était placé à l'intérieur du tube, par l'intermédiaire du trou situé en son centre, ce trou étant branché à une pompe à membrane en PTFE à succion (KNF Neuberger, France) assurant un flux d'air de 150 ml/mn à travers chacune des voies de l'olfactomètre, permettant l'aspiration des solutions odorantes dans chaque branche de l'olfactomètre. Chaque olfactomètre était utilisé pendant trois expériences consécutives en inversant l'emplacement des papiers filtres (solvant + sesquiterpènes et solvant seul) entre chaque expérience. Afin d'éviter tout biais phototactique, les olfactomètres étaient placés dans une boîte en carton préalablement garnie de papier filtrant la lumière. L'air contaminé était évacué à l'extérieur de la pièce où avait lieu l'expérimentation. Chaque puceron a été observé pendant 10 minutes et le temps passé de chaque branche de l'olfactomètre a été enregistré.

#### *Résultats*

Dans le but de déterminer si les sesquiterpènes identifiés lors de l'analyse de piégeage de COV peuvent présenter des activités répulsives vis-à-vis du puceron cendré, une analyse d'olfactométrie a été entreprise avec les deux sesquiterpènes disponibles commercialement : l'(*E,E*)- $\alpha$ -farnesène et le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène pour les *gynoparae* et les *fundatrigeniae*. L'activité répulsive de composés volatils étant dépendante de la dose, une gamme de 5 doses

a été testée pour l' $(E,E)$ - $\alpha$ -farnésène et de 4 pour le  $(E)$ - $\beta$ -caryophyllène (Figure 3A et 3B). L' $(E,E)$ - $\alpha$ -farnésène a présenté un effet répulsif pour deux doses intermédiaires (1 et 10  $\mu\text{g}$ ) vis-à-vis des *gynoparae* et pour les trois doses les plus élevées (1 ; 10 et 100  $\mu\text{g}$ ) vis-à-vis des *gynoparae*. Aucune activité répulsive n'a été observée pour les deux doses les plus faibles (10 et 100 ng) ainsi que pour les doses inférieures à 1  $\mu\text{g}$  (figure 3A et 3B). Pour le  $(E)$ - $\beta$ -caryophyllène, aucune activité répulsive n'a été observée quelle que soit la dose étudiée, ni pour les *gynoparae* (figure 3A) ni pour les *fundatrigeniae* (données non présentées). De même, les pucerons mâles ailés d'automne (migrant du plantain vers le pommier 3 semaines après les femelles) adoptent un comportement montrant que l' $(E,E)$ - $\alpha$ -farnésène présente un caractère répulsif aux doses 1 et 10  $\mu\text{g}$  (données non présentées). Ces résultats indiquent que ce COV est répulsif vis-à-vis des deux sexes de la génération d'automne.



**Figure 3 :** Effet du  $(E,E)$ - $\alpha$ -farnésène, et du  $(E)$ - $\beta$ -caryophyllène sur des *gynoparae* (A) et des *fundatrigeniae* (B) de *D. plantaginea*. Moyennes ( $\pm$  SEM) du temps passé par chaque zone de l'olfactomètre. Données issues de l'analyse du comportement de 30 à 33 pucerons pour chaque dose et chaque morphé. Les différences significatives ont été calculées par un T-test apparié (\*\* p-value < 0,01; \*\*\* p-value < 0,001).

Dans le cas où le comportement de *fundatrigeniae* a été étudiée vis-à-vis des bouquets olfactifs totaux issues de plantes traitées au Bion 50WG ou à l'eau, aucune préférence n'a pu être constaté, suggérant ainsi que le traitement au SDP, dans les conditions de l'expérience, ne permet pas l'émission d'une quantité de COV suffisante pour affecter le comportement de choix du puceron.

#### **4 / Etude olfactométrique d'*Ephedrus persicae*, parasitoïde de *Dp*, vis-à-vis de composés organiques volatils**

##### *Introduction*

Les analyses comportementales, réalisées par olfactométrie et présentées dans la partie précédente montrent que le (*E,E*)- $\alpha$ -farnésène est répulsif vis-à-vis de la génération de printemps de *Dp*, tout comme il l'est vis-à-vis des mâles et des femelles ailés de la génération d'automne. En complément de cette stratégie « push », et sous réserve qu'elle soit démontrée au verger, une stratégie « pull » d'attraction d'ennemis naturels de *Dp* pourrait utilement compléter un effet de contrôle biologique exercé par ce composé organique volatile émis par les pommiers.

Dans un premier temps (printemps-été 2019), nous avons tenté de mettre en place un élevage de parasitoïdes à partir d'individus émergeant de momies de *Dp* prélevées dans la région angevine. La totalité des individus ayant émergé appartenaient à l'espèce *Ephedrus persicae*, un hyménoptère parasitoïde polyphage capable de parasiter plus de 150 espèces de pucerons. Ces individus ont été placé en présence de puceron *Dp* issus d'élevages sains afin de multiplier et de synchroniser la production de parasitoïdes. Des momies ont ainsi été obtenues, mais n'ont jamais conduit à l'émergence d'une nouvelle génération de parasitoïdes. Des recherches bibliographiques ont indiqué que l'espèce *Ephedrus persicae*, lorsqu'elle parasite *Dp*, entre très vite en diapause sous forme d'un cocon parasitant un puceron pour se synchroniser avec *Dp*, et la grande majorité ne ré-émerge qu'au printemps suivant. Le contrôle biologique de *Dp* par *E. persicae* se fait donc tout au début de l'émergence des fondatrices de *Dp*, au printemps. Pour étudier le rôle des COV vis-à-vis de cette espèce, nous avons choisi d'étudier en parallèle des individus issus d'élevages commerciaux obtenus auprès d'une société de biocontrôle, et d'étudier de nouveaux individus émergents à partir de *Dp* au printemps 2020. Le deuxième aspect n'a pu être réalisé car les prélèvements devaient être faire mi-Avril 2020, alors qu'il était interdit de rompre les mesures de confinement pour ce type d'étude.

##### *Procédure expérimentale*

Des momies de puceron parasitées par *E. persicae*, obtenus auprès d'élevages commerciaux, ont été placés dans des boîtes de Petri, elles-mêmes dans des cages disposées dans des chambres de culture. L'émergence d'individus était vérifiée quotidiennement et d'un qu'un individu femelle apparaissait, il était placé dans un dispositif olfactométrique à 4 voies. La mise en place du COV à tester ainsi que la méthode d'analyse est identique à celle présentée dans la section précédente. Trente individus ont été testés par dose d'alpha farnésène, 4 doses d'alpha farnésène ont été testés.

##### *Résultats*

L'analyse du comportement de femelles d'*E. persicae* montre qu'aucune des dose d'alpha farnésène testée n'a d'effet sur le comportement du parasitoïde (données non présentées). Dans les conditions de l'expérience, il n'est pas possible de conclure à un effet attractif du COV vis-à-vis du parasitoïde *E. persicae*.

##### *Discussion*

Les élevages commerciaux d'*E. persicae* sont réalisés sur des pucerons-hôtes qui d'après nos observations, ne sont pas des pucerons de l'espèce *Dysaphis plantaginea*. La littérature scientifique indique qu'il existe un effet de l'environnement espèce de puceron hôte/espèce de plante hôte quant à la capacité du parasitoïde à infester un puceron donné. Il est ainsi fort probable que les parasitoïdes utilisés dans notre expérience n'étaient pas appropriés pour les études comportementales réalisées. L'unique expérience alternative appropriée aurait été de travailler avec des parasitoïdes ayant émergé de *Dp* prélevés sur pommier.

### **Conclusion générale**

Sur la base des expériences réalisées dans nos conditions, nous pouvons affirmer que :

- 2 SDP, le Bion 50WG et le LBG01F34 affectent significativement le développement de population de *Dp* sur le pommier
- un traitement au Bion 50WG affecte négativement le choix d'installation de *Dp* en faveur des plantes ayant subi le traitement témoin, et ce, pour les *fundatrigeniae* et les *gynoparae*
- parmi les COV que nous avons pu identifier et qui sont émis en réponse au Bion 50WG, le (E,E)- $\alpha$ -farnésène possède un effet répulsif vis-à-vis des deux générations de pucerons étudiées, et des deux sexes des générations ailés d'automne.
- le bouquet olfactif total produit en réponse à un traitement au Bion 50WG ne possède pas de propriétés répulsives vis-à-vis des *fundatrigenia*, dans les conditions de l'expérience.
- (E,E)- $\alpha$ -farnésène n'a pas d'effet sur le comportement de choix des hyménoptères parasitoïdes de l'espèce *Ephedrus persicae*, obtenus à partir de momies de pucerons n'étant pas du *Dp*.

## ANNEXE : TEXTES DES PUBLICATIONS

*Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier pdf de préférence). Son format est laissé à la libre appréciation de ses rédacteurs.*

### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PARUES**

*Merci de joindre des tirés à part, et d'indiquer les restrictions éventuelles en termes de droits de reproduction (notamment sur le site Internet du MTES). Notez que ce rapport pourra être mis en ligne sur le site Internet du MTES.*

### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES A PARAITRE**

### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PREVUES**

## ANNEXE : PARTIE CONFIDENTIELLE

*Vous pouvez insérer ici toute information ou résultat qui revêt une part de confidentialité.*

*Merci de préciser le degré de confidentialité de ces données.*

*Nous vous recommandons de préciser dans la partie non confidentielle l'existence de ces données confidentielles et d'expliquer la raison de leur confidentialité.*

*Cette partie ne sera pas diffusée sur le site Internet d'Ecophyto.*

*Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier pdf de préférence).*

*Son format est laissé à la libre appréciation de ses rédacteurs.*