

**AGROCAMPUS OUEST**

CFR Angers  CFR Rennes

<p><b>Année universitaire :</b> 2020-2021</p> <p><b>Spécialité :</b> Master mention Biologie, Agrosiences</p> <p><b>Spécialisation (et option éventuelle) :</b> Master Amélioration, production, valorisation du végétal (APVV), Option Fonctionnement et gestion des agrosystèmes (FGA)</p>	<p><b>Mémoire de fin d'études</b></p> <p><input type="checkbox"/> d'ingénieur de l'École nationale supérieure des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage (AGROCAMPUS OUEST), école interne de l'institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> de master de l'École nationale supérieure des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage (AGROCAMPUS OUEST), école interne de l'institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement</p> <p><input type="checkbox"/> d'un autre établissement (<i>étudiant arrivé en M2</i>)</p>
--	--

## Criblage de produits SDP candidats et étude des effets d'un PNPP retenu, le Limocide, sur *Dysaphis plantaginea*

Par : Alisa HAMIDOVIĆ



**Soutenu à** Rennes **le** 23/06/2021

**Devant le jury composé de :**

Président : M. Carof

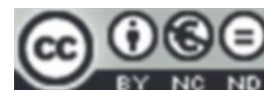
Maîtres de stage : S. Anton, P. Robert

Enseignant référent : A. Le Ralec

**Autres membres du jury**

Rapporteur : A.-M. Cortesero

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celles d'AGROCAMPUS OUEST et l'université de Rennes 1*





## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe Robert pour son immense bienveillance, sa pédagogie et sa bonne humeur. J'ai tellement appris pendant ces six mois et ai également grandement apprécié papoter avec vous, que cela soit au sujet du stage, d'entomologie ou plus généralement de sujets de société. Vous m'avez donné l'envie de me spécialiser dans l'étude de ces merveilleuses créatures que sont les Hémiptères, et je ne pourrais jamais assez vous en remercier. Je vous souhaite de tout cœur le meilleur pour la suite.

J'aimerais également remercier Sylvia Anton, pour m'avoir guidée durant cette enrichissante expérience avec gentillesse, patience et professionnalisme. Tu as toujours su donner les meilleurs conseils pour que je puisse pleinement m'épanouir au sein de ce stage, mille mercis à toi. Je ne le dirai jamais assez, mais tes lasagnes aux épinards sont vraiment succulentes ! Je me surprends à saliver quand j'y repense...

Comment ne pas remercier Christelle Heintz, ma technicienne préférée, qu'aurais-je fait sans toi ! Je ne compte plus le nombre de fois où tu m'as aidée, mais surtout le nombre de fois où tu m'as donné le sourire. J'ai passé de merveilleux moments à tes côtés, mon stage a été d'autant plus agréable grâce à ta personnalité pétillante.

Merci énormément à l'équipe ResPom pour leur gentillesse et leur assistance, notamment Marie-Noëlle Brisset, qui m'a beaucoup aidée pour la partie SDP avec ses excellents conseils, mais aussi Anthony, Matthieu, Erwan, Lilian, Raphaël, Brice et tous les autres. De grands mercis également à Ferréol et Pierre-Antoine d'ACO Angers, j'ai tant appris grâce à vous ! Je remercie aussi le CTIFL de La Morinière pour nous avoir fourni les produits ici testés, ainsi que le GIS-Fruit pour le soutien financier apporté à ce stage.

Je recouvre mon adorable sœur Azra d'une avalanche de mercis, tu as toujours été là pour me soutenir, t'es vraiment la meilleure. D'énormes bisous à Grégory, qui a toujours été là pour m'encourager à donner le meilleur de moi-même, merci d'être toi ! Mille mercis à ma famille, surtout à mes parents pour leur bienveillance, mais aussi à Anna et tous mes autres amis.

Encore merci à tout le monde d'avoir rendu ce stage si enrichissant, j'ai énormément appris au cours de ces six mois. Je chérirai cette expérience pour toujours.

# Sommaire

<b>Introduction et contexte de l'étude</b> .....	Page 1
<b>I) Biologie du puceron cendré du pommier, <i>D. plantaginea</i></b> .....	Page 1
➤ Morphologie	2
➤ Cycle de vie	2
➤ Dégâts sur le pommier	3
<b>II) Matériel et méthodes</b> .....	Page 4
➤ Matériel biologique employé	4
<b>II.1) Identification de produits à effet SDP sur semis de pommier en conditions contrôlées.</b> .....	Page 4
➤ Introduction au principe des SDP	4
➤ La qPFD, un outil pour étudier l'induction des défenses	5
➤ Produits testés	6
➤ Traitement des plantes	6
➤ Préparation des échantillons d'ADN	6
➤ Analyse moléculaire par qPFD des gènes de défense	7
<b>II.2) Étude de l'effet du Limocide sur les traits d'histoire de vie de <i>D. plantaginea</i> : fécondité, développement.</b> .....	Page 8
➤ Contexte et objectif de la méthode	8
➤ Effet du Limocide sur la fécondité	8
➤ Effet du Limocide sur le développement larvaire	8
<b>II.3) Étude olfactométrique du comportement de <i>D. plantaginea</i> en chambre à 4 voies avec le produit retenu, le Limocide</b> .....	Page 8
➤ Contexte et objectif de la méthode	8
➤ Dispositif d'olfactométrie en chambre à 4 voies	9
➤ Modalités testées	9
<b>II.4) Mise au point de techniques d'élevage sur milieu artificiel pour étudier l'effet de toxicité par ingestion sur <i>D. plantaginea</i>.</b> .....	Page 10
➤ Contexte et historique	10
➤ Méthode de réalisation du dispositif d'élevage en "ring"	10
➤ Manipulations préliminaires : dispositifs et protocoles testés	11
<b>II.5) Test de toxicité par contact du Limocide sur <i>D. plantaginea</i></b> .....	Page 13
➤ Objectifs et protocole employé	13
<b>III) Résultats</b> .....	Page 14
➤ Identification de produits à effet SDP sur semis de pommier en conditions contrôlées	14
➤ Étude de l'effet du Limocide sur les traits d'histoire de vie de <i>D. plantaginea</i> : fécondité, développement	14
➤ Étude olfactométrique du comportement de <i>D. plantaginea</i> en chambre à 4 voies avec le produit retenu, le Limocide	15
➤ Mise au point de techniques d'élevage sur milieu artificiel pour étudier l'effet de toxicité par ingestion : Manipulations préliminaires	16
➤ Test de toxicité par contact du Limocide sur <i>D. plantaginea</i>	16
<b>IV) Discussion</b> .....	Page 17
<b>Conclusion.</b> .....	Page 20
<b>Annexe</b> .....	Page 22
<b>Références bibliographiques</b> .....	Page 23

# Table des figures

<b>Fig.1</b> : Forme ailée et forme aptère de <i>Dysaphis plantaginea</i> (Bonnemaison, 1959) . . . . .	Page 2
<b>Fig.2</b> : Cycle biologique de <i>Dysaphis plantaginea</i> (ACTA, 1977) . . . . .	Page 2
<b>Fig.3</b> : Pièces buccales du puceron et coupe transversale des stylets (Encyclop'Aphid, 2018) . . . . .	Page 3
<b>Fig.4</b> : <i>D. plantaginea</i> et les déformations provoquées au pommier . . . . .	Page 3
<b>Fig.5</b> : Élevages de pucerons en chambre climatique en conditions contrôlées (gauche) ; Exemple de semis et de greffe de pommier <i>Golden Delicious</i> employés (droite) . . . . .	Page 4
<b>Fig.6</b> : Cellule au sein des serres du site de l'IRHS d'Angers. . . . .	Page 4
<b>Fig.7</b> : Protocole de pulvérisation des produits SDP sur des semis de pommiers <i>Golden</i> . (Marolleau et al., 2013) . . . . .	Page 6
<b>Fig.8</b> : Plaque de 96 puits employée pour la réalisation des qPCR . . . . .	Page 7
<b>Fig.9</b> : Plan de plaque qPFD sur pommier PL_25, avec les amorces et leurs concentrations . . . . .	Page 7
<b>Fig.10</b> : Étude de l'effet du Limocide sur la fécondité de <i>D. plantaginea</i> . . . . .	Page 8
<b>Fig.11</b> : Étude de l'effet du Limocide sur le développement larvaire de <i>D. plantaginea</i> . . . . .	Page 8
<b>Fig.12</b> : Délimitation des catégories de stades de développement pour faciliter le suivi. . . . .	Page 8
<b>Fig.13</b> : Dispositif d'olfactométrie en chambre à 4 voies de type "Petterson" . . . . .	Page 9
<b>Fig.14</b> : Dispositif d'élevage en "ring" (Luc A. pour 3dwarehouse, 2014) . . . . .	Page 10
<b>Fig.15</b> : Étapes constituant la préparation des rings. (Hoang et Dung, 2013) . . . . .	Page 10
<b>Fig.16</b> : Manipulations préliminaires d'élevage sur rings effectuées au cours de cette étude . . . . .	Page 11
<b>Fig.17</b> : Coupe transversale de la cage d'élevage des pucerons dans un dispositif à 3 couches. . . . .	Page 12
<b>Fig.18</b> : Protocole du test de toxicité par contact du Limocide sur <i>D. plantaginea</i> . . . . .	Page 13
<b>Fig.19</b> : Analyses des composantes principales (ACP) des individus et des variables. . . . .	Page 14
<b>Fig.20</b> : Étude de l'effet du Limocide sur la fécondité de <i>D. plantaginea</i> . . . . .	Page 14
<b>Fig.21</b> : Évaluation et suivi du nombre de jeunes larves (L1-L2), de larves plus âgées (L3-L4) et d'adultes <i>D. plantaginea</i> présents sur la plante au cours de l'expérience . . . . .	Page 15
<b>Fig.22</b> : Effet comportemental de différentes doses de Limocide sur <i>D. plantaginea</i> fondatrigrène adulte aptère dans un olfactomètre à 4 voies. . . . .	Page 15
<b>Fig.23</b> : Récapitulatif des comptages en comparant les espèces de pucerons. . . . .	Page 16
<b>Fig.24</b> : Récapitulatif des données issues des comptages en comparant différents milieux. . . . .	Page 16
<b>Fig.25</b> : Récapitulatif des données issues des comptages en comparant le milieu $\alpha$ et AP3 . . . . .	Page 16
<b>Fig.26</b> : Schéma d'un dispositif d'électropénétrographie ou EPG. . . . .	Page 18
<b>Fig.27</b> : Exemple de protocole alternatif à tester concernant les essais sur milieux artificiels. . . . .	Page 19
<b>Table.1</b> : Liste des gènes étudiés par la qPFD (Brisset, 2021). . . . .	Page 5
<b>Table.2</b> : Liste des 12 produits SDP testés par qPFD sur des semis de pommiers <i>Golden</i> . . . . .	Page 6
<b>Table.3</b> : Composition du milieu artificiel AP3 (Dadd et Mittler, 1966). . . . .	Page 12
<b>Ann.1</b> : "Heatmap" regroupant toutes les données obtenues par qPFD. . . . .	Page 21

# Index des abréviations

**ACP** : Analyse en Composantes Principales

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ARN** : Acide RiboNucléique

**BABA** : Acide  $\beta$ -AminoButyrique

**BET** : Bromure d'ÉthiDium

**Ct** : *Cycle Threshold*

**CTIFL** : Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes

***D. plantaginea*** : *Dysaphis plantaginea*

**EBF** : E- $\beta$ -Farnesene

**EPG** : ÉlectroPénétrographie

**HR** : Humidité Relative

**IRHS** : Institut de recherche en Horticulture et Semences

**INRAE** : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement

**KD** : “*Knock-down*”

**OILB** : Organisation Internationale de Lutte Biologique

**PCP** : Puceron Cendré du Pommier

**PCR** : Réaction de Polymérisation en Chaîne (*Polymerase Chain Reaction*)

**PNPP** : Produit Naturel Non Préoccupant

**Protéine PR** : Protéine liée à la pathogénèse (*Pathogenesis-Related protein*)

**PVC** : Chlorure de PolyVinyle

**qPFD** : Puce à Faible Densité Quantitative

**RT** : RétroTranscription

**SDP** : Simulateur de Défense des Plantes

**UEH** : Unité Expérimentale Horticole

**UV** : UltraViolet

## Structure d'accueil

Le stage a été effectué au sein de l'UMR IGEPP (INRAE, Agrocampus-Ouest, Université de Rennes) dans l'équipe angevine d'EGI (*Écologie et Génétique des Insectes*). Les travaux de biologie moléculaire ont été réalisés en collaboration avec l'équipe ResPom de l'UMR IRHS (INRAE, Agrocampus-Ouest, Université d'Angers). Les expérimentations se sont déroulées dans le laboratoire d'entomologie d'Agrocampus-Ouest du site d'Angers, dans le laboratoire de ResPom et dans les serres de l'IRHS.

Ce stage a été sujet à un soutien financier de la part du GIS-Fruit.



# Introduction et contexte de l'étude

En agriculture, notamment en arboriculture, la protection des végétaux est principalement basée sur l'usage massif de produits phytosanitaires de synthèse pour des raisons économiques et techniques. Cette lutte chimique est cependant de plus en plus contestée de par ses limites et les dangers liés à sa pratique concernant les agriculteurs, les consommateurs et l'environnement (**Vincent et Panneton, 2001**). Une étude allemande a notamment observé, sur une période de 27 ans, un déclin de 76 à 82 % des insectes volants sur des territoires entourés de parcelles aux pratiques agricoles intensives (**Hallmann et al., 2017**). Pourtant, parmi ces insectes figurent bon nombre d'auxiliaires, tels que des pollinisateurs ou des prédateurs et parasites de ravageurs. De leur déclin pourraient découler de colossaux effets en cascade mettant en péril services écosystémiques et réseaux trophiques.

Dans le cadre du plan Écophyto, mis en place par la France en 2007 et visant à réduire de 50% l'usage des pesticides d'ici 2018 – date ensuite repoussée à 2025 –, des solutions alternatives sont recherchées et testées pour lutter contre les bioagresseurs des cultures tout en diminuant au maximum l'usage d'intrants écotoxiques. La pomme *Malus domestica*, troisième fruit le plus consommé du monde, représente notamment un important axe de travail du plan Écophyto (**FAOstat, 2013**). Le pommier est en effet sujet aux attaques de plusieurs bioagresseurs occasionnant d'importants dégâts, et ce particulièrement en agriculture biologique. Le puceron cendré du pommier *Dysaphis plantaginea* est par ailleurs considéré comme le second ravageur le plus important, derrière le carpocapse du pommier *Cydia pomonella* et la plus dangereuse espèce de pucerons s'attaquant au pommier (**Kehrli et Wyss, 2001 ; Blommers et al., 2004**).

Pour lutter contre ce ravageur notable, plusieurs traitements aphicides existent déjà, mais l'application de produits de biocontrôle ou de produits naturels peu préoccupants (PNPP) pourrait servir d'alternative à l'emploi d'insecticides de synthèse écotoxiques. Lesdits produits peuvent opérer de plusieurs manières, par exemple par contact, par ingestion, par inhalation ou par stimulation des défenses de la plante (SDP).

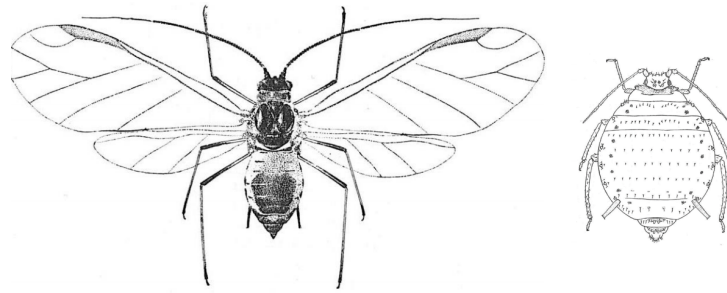
Ainsi, l'objectif principal de cette étude est de rechercher et de tester les effets de produits de lutte alternative à effet SDP. Pour ce faire, le CTIFL (*Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes*) de La Morinière, notre collaborateur, a constitué une liste de produits à étudier afin de mieux connaître leur mode d'action vis-à-vis de *D. plantaginea*. Tout d'abord, il s'agit donc d'effectuer un criblage de ces produits par qPFD, un outil d'évaluation des SDP, pour identifier un ou plusieurs produits efficaces quant à la mobilisation des gènes liés aux mécanismes de défense de la plante.

Ensuite, le ou les produits SDP candidats les plus prometteurs sont retenus pour en tester leurs éventuels effets sur les traits d'histoire de vie du puceron cendré du pommier (*fécondité, développement larvaire*), leur capacité d'attractivité ou de répulsion par olfactométrie, ainsi que leur éventuelle toxicité par ingestion – à travers la mise au point d'élevages de pucerons sur milieux artificiels – ou par contact.

## I) Biologie du puceron cendré du pommier, *D. plantaginea*

Les pucerons sont des insectes membres de la super-famille des *Aphidoidea*, se nourrissant principalement de sève élaborée. Ils appartiennent à l'ordre des Hémiptères et au sous-ordre des *Sternorrhyncha*. Ces derniers sont notamment caractérisés par un régime



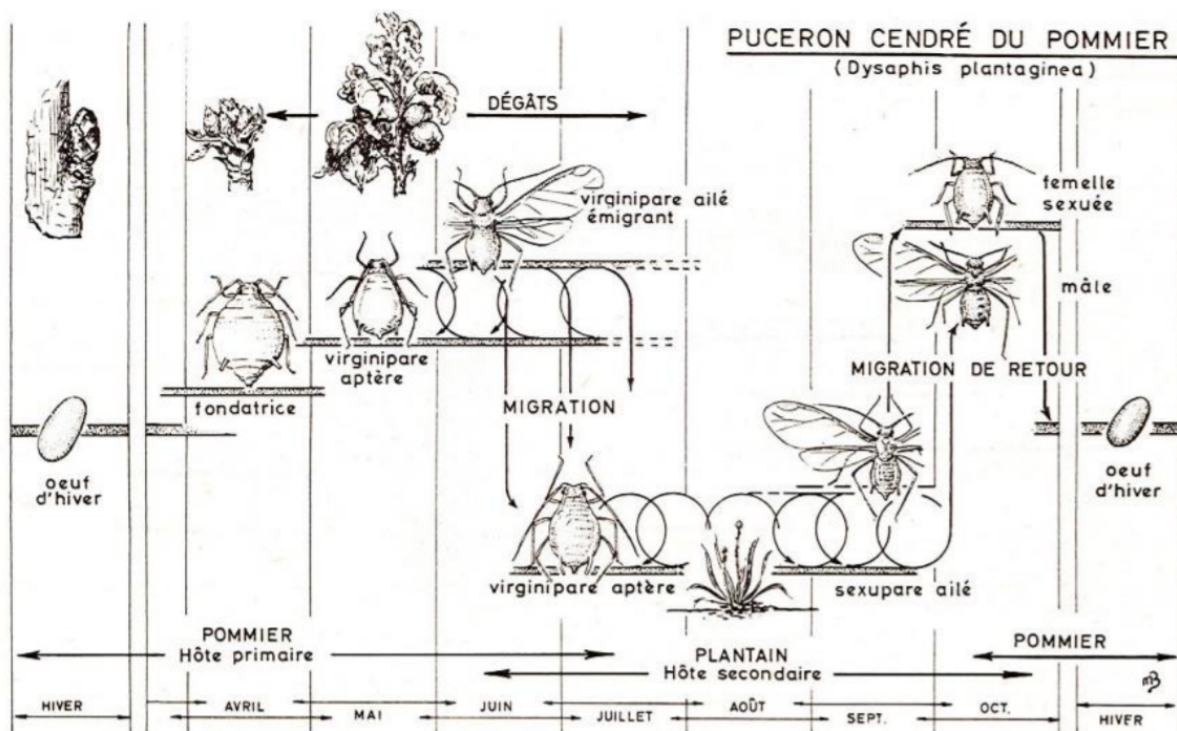


**Fig.1 :** Forme ailée et forme aptère de *Dysaphis plantaginea* adulte (Bonnemaison, 1959).

Les œufs du puceron cendré du pommier, observables à certains moments du cycle de vie, sont ovales et mesurent environ 0.5 mm ; ils sont premièrement de couleur jaune pâle, puis deviennent noir brillant au bout d'environ quatre jours. Les larves sont d'abord de couleur beige, et deviennent ensuite gris-brun-rosé au cours du développement (Bonnemaison, 1959 ; Dib, 2010 ; Encyclop'Aphid, 2010-2018).

Les aptères sont globuleux et leur teinte peut varier du vert olivâtre au rose vineux ; ils sont recouverts d'une pulvérulence blanchâtre étant un mélange de cires cuticulaires sécrétées par l'hypoderme et possèdent une large plaque médiane. Les cornicules sont longues, subcylindriques et de couleur foncée ; elles sont amincies à leur extrémité et se finissent par une fine collerette. Leur cauda est large, courte et fortement conique, ainsi que légèrement pigmentée, tandis que leur abdomen ne possède pas ou peu de pigmentation et peut occasionnellement présenter des tubercules sur les segments VII et VIII. Les antennes sont également plus courtes que le corps (Bonnemaison, 1959 ; Encyclop'Aphid, 2010-2018).

Les ailés, quant à eux, ont tendance à être de couleur noire brillante, avec des cornicules cylindriques sombres possédant une légère collerette à leur extrémité. Leur cauda triangulaire est fortement pigmentée, et les antennes sont égales à la longueur du corps, avec de petites rhinaries déformantes. Leur face est plus claire, dans les tons beige-marron. Leurs ailes sont hyalines et membraneuses, ainsi qu'arrondies aux extrémités (Baker et Turner, 1916 ; Bonnemaison, 1959 ; Dib, 2010).



**Fig.2 :** Cycle biologique de *Dysaphis plantaginea* (ACTA, 1977).

Le terme de "virginipares" regroupe toutes les formes parthénogénétiques : les fondatrigenes et les virginogènes.

phytophage, la présence d'un rostre à insertion postérieure, et des ailes antérieures homogènes, membraneuses et disposées en toit sans se croiser (**Gullan et Martin, 2009**).

Parmi les espèces de ravageurs à l'origine de dégâts sur culture de pommiers, le puceron cendré du pommier (*Dysaphis plantaginea* PASS.), *Rosy Apple Aphid* en anglais, est l'une des plus nuisibles (**Bonnemaison, 1959**). Cet hémiptère d'origine européenne a été introduit en Amérique du Nord avant 1850, mais est également trouvable en Afrique du Nord, en Asie et au Moyen-Orient (**Bonnemaison, 1959 ; Dib, 2010**).

## ➤ Morphologie

*D. plantaginea* adulte mesure entre 2 et 3 mm et il existe, comme chez bon nombre de pucerons, deux formes différentes possibles au stade adulte de cette espèce (**Fig.1**) ; ceux-ci peuvent en effet être aptères ou ailés (**Bonnemaison, 1959 ; Encyclop'Aphid, 2010-2018**). Les formes ailées disposent d'une grande capacité de dispersion mais d'une faible fécondité, tandis que les formes aptères sont très fécondes mais se dispersent peu. La forte fécondité des femelles aptères et la capacité de dispersion sur de longues distances des ailés présentent ainsi un fort avantage pour les pucerons et leur multiplication (**Bonnemaison, 1959**).

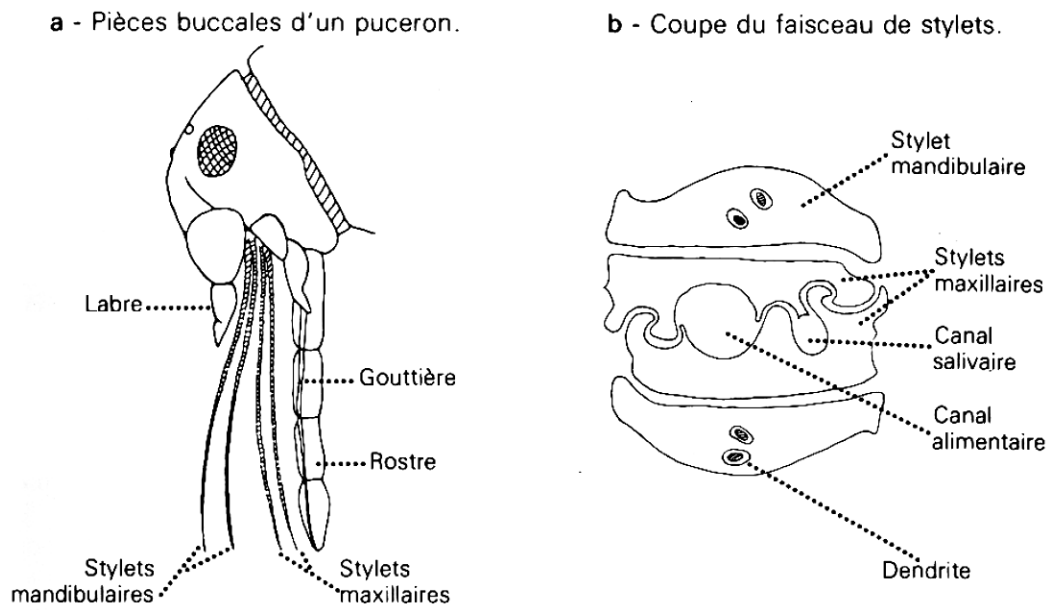
Lorsque les conditions sont favorables, la forme aptère prédomine. Les formes ailées apparaissent principalement lors d'une forte augmentation de densité d'individus, mais aussi lors d'une diminution de la température ou d'un mauvais état physiologique de la plante. Certains facteurs génétiques présentent également un impact non négligeable ; les ailés ont ainsi tendance à apparaître en automne, lors de la reproduction sexuée, ou lors d'un changement de plante-hôte (**Bonnemaison, 1959 ; Encyclop'Aphid, 2010-2018**).

## ➤ Cycle de vie

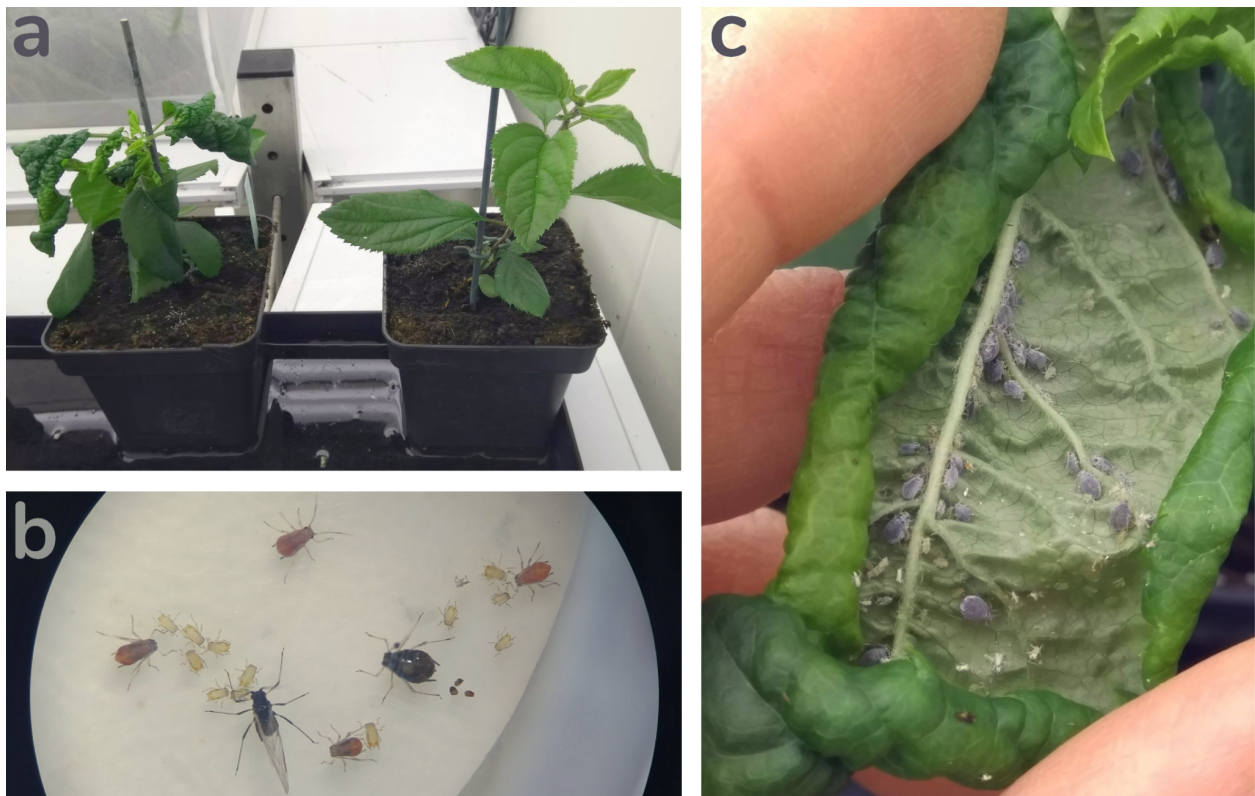
*D. plantaginea* est un puceron dit diœcique, signifiant que son cycle de vie s'effectue sur deux plantes-hôtes différentes (**Fig.2**). Il est ainsi surtout nuisible au pommier (*Malus sp.*) sauvage ou cultivé, sa plante-hôte primaire, mais passe une certaine partie dudit cycle sur les plantains (*Plantago lanceolata* L., *P. media* L., *P. major* L.), ses plantes-hôtes secondaires (**Bonnemaison, 1959 ; Dib, 2010 ; Encyclop'Aphid, 2010-2018**).

Comme bon nombre de pucerons, le cycle de *D. plantaginea* est complet, ou holocyclique, et comporte plusieurs générations asexuées parthénogénétiques et une génération sexuée par an (**Encyclop'Aphid, 2010-2018**). Sa reproduction est en effet assurée par deux moyens : (1) une reproduction asexuée, sans fécondation, où les femelles parthénogénétiques vivipares seules engendrent des larves (2) une reproduction sexuée, ayant lieu en fin de cycle ; après accouplement des mâles et des femelles sexuées, ces dernières pondent des "œufs d'hiver" en diapause afin d'assurer l'hivernation de l'espèce (**Bonnemaison, 1959 ; Dib, 2010**).

Les œufs fécondés sont déposés durant la saison automnale à la base des bourgeons ou des rameaux du pommier, mais aussi dans les anfractuosités de l'écorce. Ces œufs d'hiver éclosent généralement vers le début du printemps (*fin mars à mi-avril*), au commencement de la floraison du pommier ; ceux-ci donnent naissance à des larves qui, après développement, deviendront des femelles fondatrices aptères parthénogénétiques vivipares. Lesdites fondatrices vont ensuite, chacune, donner naissance à environ 70-80 larves "clones" qui deviendront des femelles aptères parthénogénétiques vivipares nommées fondatrigenes (*fundatrigeniæ*) (**Bonnemaison, 1959 ; Miñarro et Dapena, 2007 ; Vilcinskis, 2016**).



**Fig.3** : Pièces buccales du puceron et coupe transversale des stylets (Encyclop'Aphid, 2018)  
 Les 4 stylets ont ici été dissociés pour plus de lisibilité ; normalement, un seul filament est visible.



**Fig.4** : *D. plantaginea* et les déformations provoquées au pommier (Photos personnelles)

a = Un semis de pommier infesté par *D. plantaginea* (gauche) et un semis sain (droite) ; b = *D. plantaginea* à différents stades (larve, nymphe, ailé, adulte aptère) ; c = Pseudogalle servant d'abri.

Entre 3-4 et 6 générations de fondatrigenes vont se succéder au cours de la saison printanière, jusqu'au début de l'été. À partir de la troisième génération de fondatrigenes, des premières formes ailées peuvent être observées, avec une proportion grandissante de celles-ci liée à plusieurs facteurs dont la forte densité d'individus et l'état physiologique de la plante (**Bonnemaison, 1959**). Ces ailés migrent donc vers le plantain et donnent naissance à plusieurs générations d'aptères et d'ailés parthénogénétiques dites virginogènes (**Baker et Turner, 1916 ; Dib, 2010 ; Encyclop'Aphid, 2010-2018**).

Environ 3 à 8 générations de virginogènes aptères se succèdent avant l'apparition, à l'automne, de formes ailées parthénogénétiques dites sexupares, divisées en deux types ; les sexupares andropares, qui engendreront des mâles (*ailés*), et les sexupares gynopares (*ailés*), qui engendreront des femelles ovipares (*aptères*). Cette production de sexupares dépend principalement de la photopériode (**Bonnemaison, 1959**). Les gynopares ailées regagnent les pommiers pour donner naissance à des femelles sexuées ovipares, puis sont fécondées par les mâles ailés, venant les rejoindre sur la plante-hôte principale, attirés notamment par une phéromone sexuelle. Les œufs sont par la suite pondus par les femelles sur le pommier pour assurer l'hivernation de *D. plantaginea* (**Dib, 2010 ; Encyclop'Aphid, 2010-2018**).

Ainsi, *D. plantaginea* bénéficie des avantages de chacun de ces deux modes de reproduction. En effet, la reproduction asexuée par parthénogenèse permet une multiplication très rapide de la population, car 100% des individus obtenus sont des femelles et les générations sont courtes ; il n'y pas d'accouplement ni d'éclosion d'œufs. Quant à la reproduction sexuée, assurée par la fécondation, celle-ci permet le maintien d'une diversité génétique au sein des populations en assurant son brassage génétique, leur octroyant donc la possibilité de s'adapter à des environnements changeants sur le long terme (**Campbell et Reece, 2012**).

### ➤ Dégâts sur le pommier

*D. plantaginea* ne provoque pas ou très peu de dégâts mécaniques sur la plante, car la piqûre en elle-même est dite "furtive". Cependant, cet insecte prélève de grandes quantités de sève élaborée, entraînant diverses conséquences sur le métabolisme primaire de la plante-hôte, tels qu'une diminution de l'absorption de l'eau, de la transpiration et de la photosynthèse, ou bien une augmentation de la respiration (**Bonnemaison, 1959 ; Brest, 1997 ; Miñarro et al., 2005**).

Lors du prélèvement de la sève, des composés salivaires "toxiques" sont également injectés à travers les stylets contenus dans le rostre (**Fig.3**) du puceron cendré, engendrant la déformation des organes de la plante tels que les feuilles, les rameaux ou les fruits. Les enroulements partiels des feuilles, dits pseudogalles (**Fig.4**), permettent une certaine protection de la colonie ; les éléments nutritifs y restent également plus longtemps disponibles qu'au sein d'une feuille saine (**Bonnemaison, 1959**).

Les sucres en excès issus de la sève élaborée ingérée sont rejetés sous la forme de gouttelettes de miellat. Cette substance rend les feuilles poisseuses et provoque la brûlure de feuilles par échange osmotique, ainsi que l'occultation des stomates. La présence de sucres favorise le développement de champignons épiphytes rassemblés sous le nom de fumagine ; cette dernière forme un "écran" noirâtre perturbant les capacités de photosynthèse de la plante et dépréciant la qualité des fruits. Les attaques de *D. plantaginea* peuvent donc entraîner un



**Fig.5** : Élevages de pucerons en chambre climatique en conditions contrôlées (*gauche*) ;  
Exemple de semis et de greffe de pommier *Golden Delicious* employés (*droite*).  
(Photos personnelles)



**Fig.6** : Cellule au sein des serres du site de l'IRHS d'Angers.

affaiblissement du pommier et une perturbation de sa croissance, provoquant une altération des racines ou bien la réduction et la chute du nombre de fleurs et de fruits. En résulte de ces attaques un rendement et une valeur commerciale de la production grandement affectés (Bonnemaison, 1959 ; Dib, 2010 ; Vilcinskis, 2016).

## II) Matériel et méthodes

### ➤ Matériel biologique employé

Les *D. plantaginea* utilisés sont issus d'élevages maintenus en continu sur des semis de pommier de la variété *Golden Delicious*, au sein d'une chambre climatique aux conditions contrôlées (photopériode: 16h jour, 8h nuit ; thermopériode: 22-18°C ; HR: ~55-60%), permettant ainsi d'avoir des fondatrigenes toute l'année. Des élevages dits synchrones sont régulièrement mis en place pour maintenir un élevage sain (Fig.5). Ceux-ci sont réalisés en déposant 3 à 5 femelles aptères adultes sur les plants pendant 24h, à la suite desquelles elles sont retirées ; les pucerons issus de ces femelles ont donc un âge connu à un jour près. Il est important d'éviter une surpopulation des effectifs, au risque d'obtenir des ailés et de ne plus avoir de femelles aptères à disposition pour les expérimentations.

Les autres espèces de pucerons employées pour les essais sur milieu artificiel sont également issues d'élevages sur plantes-hôtes en chambre climatisée, dans les mêmes conditions contrôlées. Le puceron vert du pois *Acyrtosiphon pisum* est maintenu sur des jeunes plants de féverole *Vicia faba Tiffany*, tandis que le puceron des céréales *Sitobion avenae* provient de l'orge *Hordeum vulgare Prestige*. Sont également employés des *D. plantaginea* virginogènes issus de semis de plantain *Plantago lanceolata*, leur plante-hôte secondaire.

Les semis de pommier utilisés pour les tests des produits SDP par qPFD sont cultivés au sein du site de l'IRHS (*Institut de Recherche en Horticulture et Semences*) d'Angers (Fig.6). Après une première étape de vernalisation de 3 mois dans un mélange de sable et de vermiculite, les graines sont semées dans du terreau. Les semis, une fois levés, sont repiqués dans des pots individuels puis placés en serre d'élevage à 23±3°C le jour et 18°C la nuit, avec une humidité relative de 75%. L'éclairage et la photopériode sont naturels, mais un éclairage d'appoint peut être employé en complément si la luminosité est trop faible.

Des greffes de pommier de la variété *Golden* sur un porte-greffe de variété MM106 ont été utilisées pour les expériences portant sur l'impact du ou des produits SDP candidats retenus sur les traits d'histoire de vie de *D. plantaginea*. Les greffons sont produits à partir de branches issues du verger de l'UEH d'Angers prélevées pendant l'hiver puis conservées au froid avant greffage. Les plants greffés obtenus sont ensuite cultivés en pots individuels contenant du terreau et sont utilisables lorsque les pousses mesurent au minimum 10 cm.

### II.1) Identification de produits à effet SDP sur semis de pommier en conditions contrôlées

#### ➤ Introduction au principe des SDP

Les stimulateurs des défenses des plantes (SDP) constituent aujourd'hui une solution prometteuse pour la protection des cultures. Ces molécules "signal", ou éliciteurs, induisent la stimulation de gènes de défense permettant de déclencher les mécanismes de résistance des plantes face à des bioagresseurs (bactéries, champignons, virus, insectes...) sans action biocide

**Table.1** : Liste des gènes étudiés par la qPFD

Classes et sous-classes de défenses		Gènes de défenses	
		Abréviations	Noms détaillés
Barrières chimiques et/ou physiques	Protéines PR (ou assimilées)	PR-1	Pathogenesis-related protein 1
		PR-2	Pathogenesis-related protein 2 (glucanases)
		PR-4	Pathogenesis-related protein 4 (hevein-like)
		PR-5	Pathogenesis-related protein 5 (thaumatin-like, osmotin)
		PR-8	Pathogenesis-related protein 8 (class III chitinase)
		PR-14	Pathogenesis-related protein 14 (lipid transfer protein)
		PR-15	Pathogenesis-related protein 15 (oxalate oxidase)
		AGG	Agglutinine
	Voie des phénylpropanoïdes	PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
		CHS	Chalcone synthase
		DFR	Dihydroflavonol reductase
		ANS	Anthocyanidin synthase
		PPO	Polyphenol oxidase
	Voie des isoprénoïdes	HMGR	Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase
		FPPS	Farnesyl pyrophosphate synthase
		Far	(E,E)-alpha-farnesene synthase
	Voie de la cystéine	CSL	Cystéine-S-lyase
	Système antioxydant	APOX	Ascorbate peroxidase
		GST	Glutathion S-transférase
		POX	Peroxidase
	Modifications pariétales	CalS	Callose synthase
		Pect	Pectin methyl esterase
		CAD	Cinnamyl alcool dehydrogenase
Signalisation hormonale	Voie SA	EDS1	Disease resistance protein EDS1
		WRKY	WRKY transcription factor 30
	Voie JA	LOX2	Lipoxygenase AtLOX2
		JAR	Jasmonate resistant 1
	Voie ET	ACCO	1-aminocyclopropene-1-carboxylate oxidase
EIN3		EIN3-BINDING F BOX PROTEIN 1	

directe (**Ebel et Cosio, 1994 ; Nürnberger, 1999**). Les SDP sont caractérisés par leur mode d'action et non par leur nature, qui est très diverse ; ceux-ci peuvent en effet être d'origine synthétique ou naturelle, et provenir d'algues, de végétaux, d'animaux, de micro-organismes, de minéraux, etc. (**ÉcophytoPIC, 2017 ; Syngenta, 2019**).

Les SDP vont donc promouvoir chez la plante un état de résistance face à des stress biotiques. Pour ce faire, lesdits SDP sont basés sur les processus naturels de mise en œuvre des défenses au sein d'une plante se déroulant en 3 phases: (1) La détection de l'agression, où sont reconnus par la plante des composés produits par les bioagresseurs ou par le végétal lui-même suite à une agression ; (2) Le traitement de l'information, où une émission en cascade d'éliciteurs va assurer la transmission de signaux au sein de la plante afin de mobiliser ses défenses ; (3) La mise en place des défenses, dans un premier temps localisées au point d'infection puis éventuellement élargies au sein de tout l'organisme du végétal (**Agrifind, s.d. ; Syngenta, 2019**)

Se basant sur ce système, certains SDP déclenchent directement les défenses de la plante et ont donc un effet dit direct, tandis que d'autres préparent celle-ci à les déclencher en cas d'agression ultérieure et possèdent un effet dit potentialisateur. Il n'y a donc pas d'action directe biocide mais plutôt un renfort des capacités de résistance de la plante, pouvant durer de plusieurs jours à plusieurs semaines (**Marolleau et al., 2013 ; Syngenta, 2019**). L'emploi de produits SDP peut être une solution de diversification des traitements ; cette approche préventive peut aider à retarder ou réduire l'usage de pesticides écotoxiques (**Agrifind, s.d. ; ÉcophytoPIC, 2017 ; Syngenta, 2019**).

### ➤ La qPFD, un outil pour étudier l'induction des défenses

Avant de tester l'efficacité d'un SDP en verger, il faut s'assurer de sa capacité à activer les défenses de plantes de la culture étudiée. Pour ce faire, l'équipe de Brisset et Dugé de Bernonville de l'IRHS INRAE – Agrocampus Ouest d'Angers a conçu une puce à faible densité quantitative nommée qPFD, un outil moléculaire permettant l'évaluation du niveau d'expression de gènes de défense au sein d'une plante (**Marolleau et al., 2013**).

Cette méthodologie, initialement conçue pour le pommier mais aujourd'hui transposée à d'autres espèces végétales, se base actuellement sur l'analyse du niveau d'activation de 29 gènes de défense des plantes appartenant à différentes voies métaboliques, ainsi que de 3 gènes de référence pour la normalisation des données d'expression. Il est alors possible de savoir quels sont les gènes induits ou réprimés dans un échantillon par rapport à un échantillon témoin, appelé calibrateur (**Marolleau et al., 2013 ; ÉcophytoPIC, 2017**).

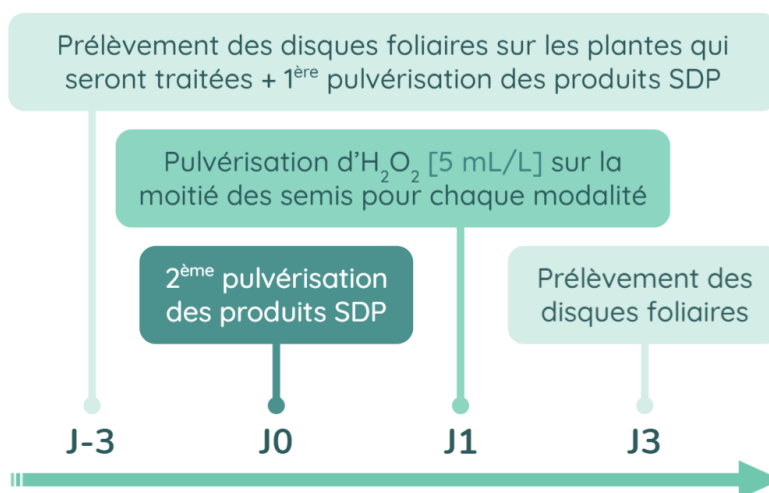
Il existe trois grandes catégories de mécanismes de défense des plantes : (1) La mise en place de barrières chimiques via la synthèse de composés à action antimicrobienne et insecticide, (2) L'établissement de barrières physiques par épaissement et rigidification des parois des cellules végétales, (3) L'émission de signaux depuis la zone agressée pour activer les défenses au sein de tout l'organisme du végétal. Ainsi, les gènes sélectionnés pour mettre au point l'outil qPFD (**Table.1**) se répartissent dans ces trois classes de défense (**Marolleau et al., 2013**).

Il s'agit par exemple de gènes codant des protéines liées à la pathogénèse, dites protéines PR (*classes 1 ou 2*), ainsi que des enzymes impliquées dans des modifications pariétales (*classe 2*), dans la réponse au stress oxydant (*classes 1 ou 2*), dans diverses voies du métabolisme secondaire (*classes 1 ou 2*), ou encore des gènes de signalisation des trois principales phyto-



**Table.2** : Liste des 12 produits candidats testés par qPFD sur des semis de pommiers *Golden*.

Nom du produit	Dose (%)	Composés principaux	Catégorie d'intrant	Autorisé en AB	Société
Alterfructus	10	Infusion de fragments de végétaux sélectionnés	PNPP	Oui	Biovitis
Bion (Réf. haute)	0.04	Granulés d'acibenzolar-S-méthyl	Produit phytosanitaire	<b>Non</b>	Syngenta
Eau (Témoin)	×	Eau osmosée	×	×	×
Equisetum arvense	10	Décoction de prêle des champs	PNPP	Oui	Biovitis
GreenFlash Bio	2.5	Biostimulant à base de cuivre	Engrais, amendement	Oui	Medinbio
HE-TAV	8	Huiles de cannellier de Chine, tournesol, origan, ajowan, ail, gomme de guar	PNPP	Oui	Medinbio
Kanne Brottrunk	1	Boisson à base de pain complet fermenté	Engrais, amendement	Oui	Kanne
KHI2	1.25	Décoction de prêle des champs, chlorhydrate de chitosan et ortie dioïque	PNPP	Oui	Medinbio
K-WIN	1.25	Décoction de prêle des champs, chlorhydrate de chitosan, substances naturelles de lin et de giroflier, extraits de théier	PNPP	Oui	Medinbio
Limocide	1	Huile essentielle d'orange douce	Fongicide, insecticide NPP	Oui	Vivagro
Myco-Sin	1	Argile sulfurée et extraits de prêles élaborés	Engrais, barrière physique	Oui	Andermatt Biocontrol
Procrop ISR	0.2	Solution à base de bicarbonate de sodium et de sels minéraux	Engrais, amendement	Oui	Alltech
Qap Mil	1	Mélange d'extraits de thym, cannelle, origan et sulfate de zinc	Engrais, amendement	Oui	Qap Nature
Salix	10	Infusion d'écorce d'osier contenant de l'acide salicylique	PNPP	Oui	Biovitis



**Fig.7** : Protocole de pulvérisation des produits candidats sur des semis de pommiers *Golden*.

-hormones de défense : l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène (classe 3) (Marolleau et al., 2013).

### ➤ Produits testés

Une liste des produits candidats à tester a été établie en collaboration avec le CTIFL de La Morinière afin d'observer leur capacité à activer les défenses (**Table.2**). Ces produits sont les suivants : HE-TAV 8%, K-WIN 1.25%, KHI2 1.25%, GreenFlash Bio 2.5%, Kanne Brottrunk 1%, Argile Sulfurée 1%, Procrop ISR 0.2%, Qap Mil 1%, Limocide 1%, Alterfructus 10%, Salix 10%, Equisetum arvense 10%, Eau servant de témoin, Bion 0.04% servant de référence haute.

Les produits ont été testés en serre sur des semis de pommier *Golden Delicious* issus de pollinisation libre, âgés d'environ de 4 à 6 semaines. Ces plants, certes peu représentatifs des arbres matures retrouvés en vergers, ont cependant l'avantage d'être produits et utilisables toute l'année. Il est aussi important de noter que *D. plantaginea* se développe principalement sur les jeunes feuilles poussantes ; ces dernières sont donc particulièrement sensibles à ce ravageur (Bonnemaison, 1959).

### ➤ Traitement des plantes

Les plantes ont été traitées dans une cellule des serres de l'IRHS d'Angers réservée à cet effet (**Fig.7**). Un premier prélèvement est effectué sur des plants non traités au démarrage de l'expérimentation (J-3) ; ensuite, les différents produits à tester sont appliqués sur les plantes jusqu'à ruissellement à l'aide d'un pulvérisateur à air comprimé. Trois jours plus tard (J0), une seconde application des produits est effectuée. Le lendemain (J1), une solution d' $H_2O_2$  [5 mL/L] est pulvérisée sur la moitié des semis pour chaque modalité, afin de mimer une attaque de bioagresseurs et ainsi permettre de mettre en avant un éventuel effet potentialisateur. Le surlendemain (J3), pour chaque modalité, 10 disques foliaires sont prélevés à l'emporte-pièce ( $\varnothing$  6mm) sur la plus jeune feuille développée de 5 semis différents.

Une première série a été effectuée avec les produits suivants : HE-TAV 8%, K-WIN 1.25%, KHI2 1.25%, GreenFlash Bio 2.5%, Kanne Brottrunk 1%, Argile Sulfurée 1%, Procrop ISR 0.2%, Qap Mil 1%, Limocide 1%, Eau servant de témoin, Bion [0.4 g/L] servant de référence haute. Une seconde série a été réalisée avec ces mêmes produits, avec en plus : Alterfructus 10%, Salix 10%, et Equisetum arvense 10%.

Une dernière itération a été effectuée avec ces mêmes produits, cette fois-ci en n'effectuant pas la pulvérisation d' $H_2O_2$  sur la moitié des semis pour chaque modalité, dans l'optique d'obtenir une troisième répétition de plantes traitées sans  $H_2O_2$ , avec deux répétitions biologiques supplémentaires par produit testé.

### ➤ Préparation des échantillons d'ADN

L'extraction de l'ARN des échantillons a été réalisée à l'aide du kit Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA Plant. Les disques foliaires sont tout d'abord broyés à froid à l'aide d'un broyeur à billes MM-301 Retsch pendant  $2 \times 20$  s à une fréquence de 30 Hz. Après le broyage est ajouté un mix contenant du PVP-40 (2%) pour éliminer les phénols, du  $\beta$ -mercaptoéthanol (3,5  $\mu$ L) pour dénaturer la RNase, ainsi qu'un tampon de lyse RAP (350  $\mu$ L). Le lysat est ensuite filtré sur une première colonne à membrane afin d'éliminer les débris cellulaires. Les

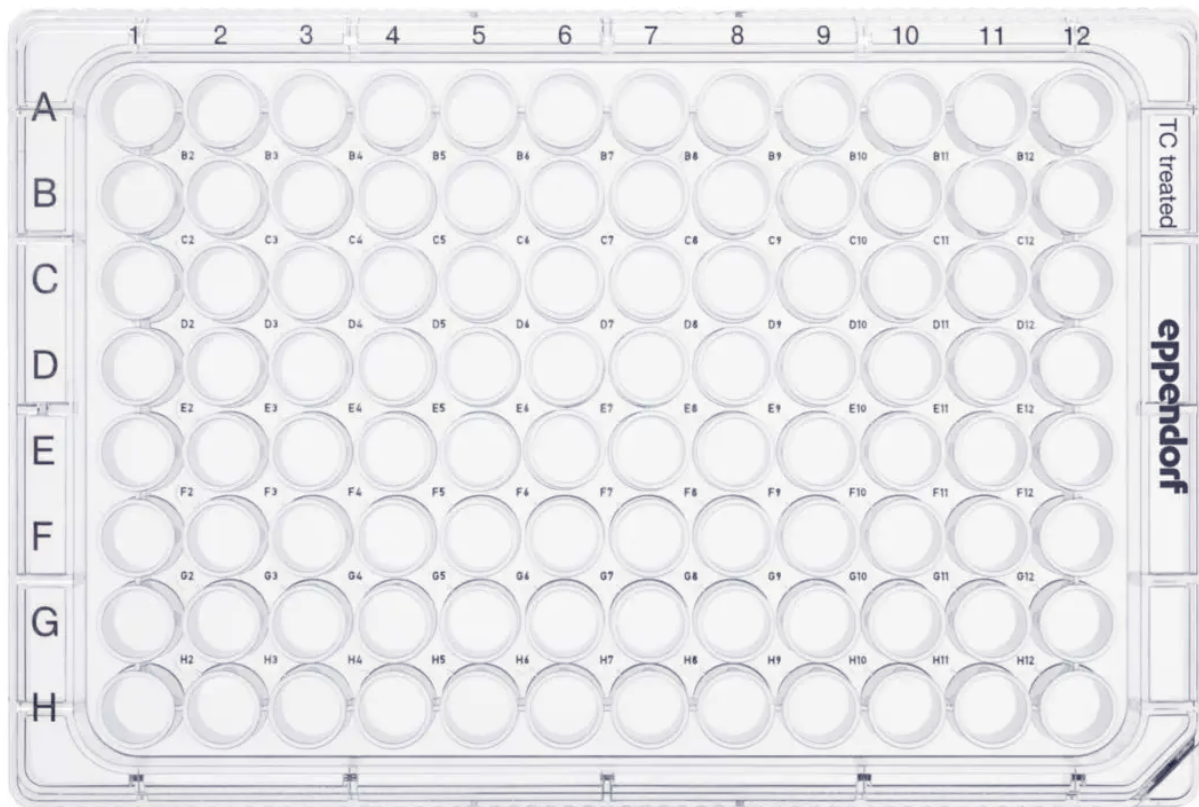


Fig.8 : Plaque de 96 puits employée pour la réalisation des qPCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PR1 (200 nM)	PR1 (200 nM)	PR1 (200 nM)	PR2 (400 nM)	PR2 (400 nM)	PR2 (400 nM)	PR4 (200 nM)	PR4 (200 nM)	PR4 (200 nM)	PR5 (600 nM)	PR5 (600 nM)	PR5 (600 nM)
B	PR8 (200 nM)	PR8 (200 nM)	PR8 (200 nM)	PR14 (200 nM)	PR14 (200 nM)	PR14 (200 nM)	PR10 (200 nM)	PR10 (200 nM)	PR10 (200 nM)	PAL (200 nM)	PAL (200 nM)	PAL (200 nM)
C	CHS (100 nM)	CHS (100 nM)	CHS (100 nM)	DFR (200 nM)	DFR (200 nM)	DFR (200 nM)	BIS2 (200 nM)	BIS2 (200 nM)	BIS2 (200 nM)	PPO (200 nM)	PPO (200 nM)	PPO (200 nM)
D	HMGR (400 nM)	HMGR (400 nM)	HMGR (400 nM)	FPPS (200 nM)	FPPS (200 nM)	FPPS (200 nM)	FAR (200 nM)	FAR (200 nM)	FAR (200 nM)	CSL (200 nM)	CSL (200 nM)	CSL (200 nM)
E	APOX (200 nM)	APOX (200 nM)	APOX (200 nM)	GST (200 nM)	GST (200 nM)	GST (200 nM)	POX (300 nM)	POX (300 nM)	POX (300 nM)	CalS (200 nM)	CalS (200 nM)	CalS (200 nM)
F	PECT (300 nM)	PECT (300 nM)	PECT (300 nM)	CAD (200 nM)	CAD (200 nM)	CAD (200 nM)	EDS1 (200 nM)	EDS1 (200 nM)	EDS1 (200 nM)	WRKY (200 nM)	WRKY (200 nM)	WRKY (200 nM)
G	LOX2 (200 nM)	LOX2 (200 nM)	LOX2 (200 nM)	JAR (200 nM)	JAR (200 nM)	JAR (200 nM)	ACCO (200 nM)	ACCO (200 nM)	ACCO (200 nM)	EIN3 (400 nM)	EIN3 (400 nM)	EIN3 (400 nM)
H	AGG (300 nM)	AGG (300 nM)	AGG (300 nM)	TuA (300 nM)	TuA (300 nM)	TuA (300 nM)	Actin (100 nM)	Actin (100 nM)	Actin (100 nM)	GADPH (300 nM)	GADPH (300 nM)	GADPH (300 nM)

Fig.9 : Plan de plaque qPFD sur pommier, avec les amorces et leurs concentrations.

ARN sont subséquentement adsorbés sur une membrane de silice, où l'ADN génomique (ADNg) est dénaturé par une solution de DNase. Sont par la suite effectués plusieurs lavages pour dénaturer la DNase et d'éliminer les composés cellulaires résiduels. Enfin, l'ARN est élué dans 30 µL d'eau RNase-free à 55 °C.

Afin de s'assurer du bon déroulement de l'extraction, l'éluat obtenu est dosé par spectrophotométrie Nanodrop ND 1000® ; ce dosage permet de vérifier la qualité des échantillons en mesurant les quantités de sucres et de protéines à 230 et 280 nm respectivement. Les échantillons d'ARN sont alors stockés à -80°C.

Les ARN extraits sont ensuite transcrits en ADN complémentaires par rétro-transcription (RT). Cette dernière est réalisée à partir de 2 µg d'ARN auxquels est ajoutée une solution d'oligo-dT15 [0,070 µmol/L]. La queue poly-T, servant d'amorce à la RT, est fixée sur les ARN au thermocycleur à 75°C pendant 5 min. Par la suite est ajouté un mix contenant du dNTP [2,5 mM], du tampon RT et de la reverse transcriptase M-MLV [200 U/µL]. Une seconde réaction thermique s'effectue à 42°C pendant 75 min. Les ADNc sont enfin conservés à -20°C.

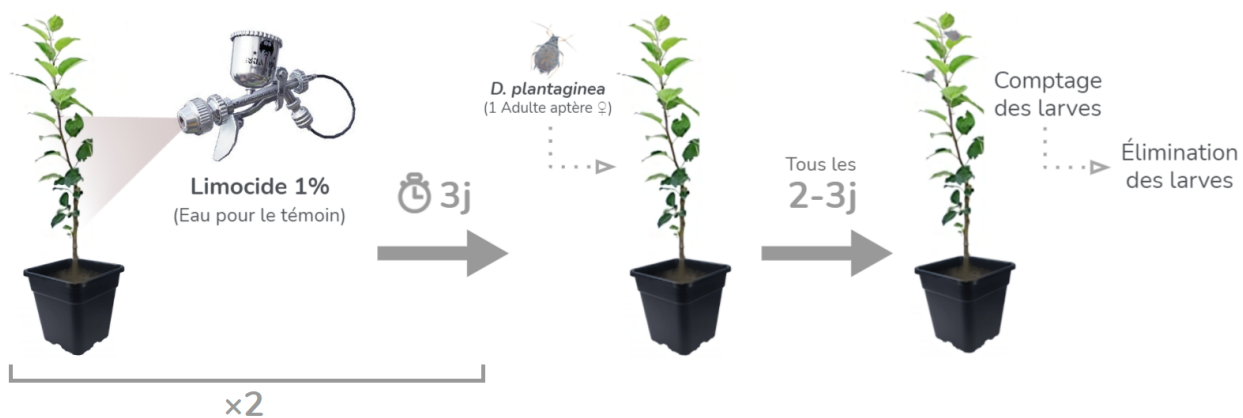
La qualité de la RT est alors vérifiée par une PCR (*Polymerase Chain Reaction*) avec l'enzyme GoTaq Flexi ; la séquence ici amplifiée est une portion du gène EF-1α, dont les amorces encadrent un intron. Pour finir, une migration des produits issus de la RT est effectuée sur gel d'agarose pendant 15 min à 100 V, suivie d'une révélation au bromure d'éthidium BET [0,5 mg/mL], afin de vérifier la qualité et l'homogénéité des bandes d'ADN entre échantillons.

## ➤ Analyse moléculaire par qPFD des gènes de défense

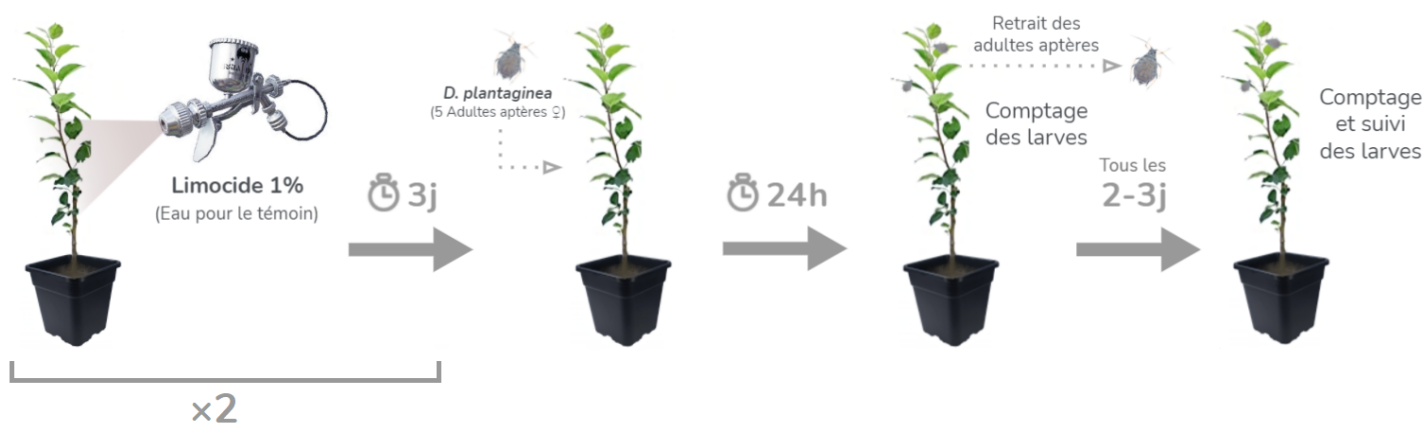
Le niveau d'expression des gènes a été déterminé par qPFD, où tout d'abord sont réalisées des qPCR (*PCR quantitatives*) sur plaques de 96 puits (**Fig.8**) précoâtées avec des amorces déshydratées. Ce dispositif permet le suivi de l'expression de 29 gènes de défense du pommier et de 3 gènes de référence en triplicata (**Fig.9**). Une plaque équivaut à une modalité, donc à un échantillon. Dans chaque puit est déposé 15 µL d'un mix réactionnel préparé avec 15 µL de produit RT, 375 µL de MESABlue, et 1110 µL d'eau ultrapure stérile. Les plaques sont incubées à 4°C à l'obscurité pendant 20 minutes minimum, pour réhydrater les amorces, avant d'être placées dans un thermocycleur BioRad CFX96 Touch™ pour une qPCR.

La qPCR permet de connaître le nombre de cycles nécessaires pour atteindre un certain seuil de fluorescence appelé *Cycle Threshold*, ou Ct. Celui-ci est atteint plus ou moins rapidement selon le nombre initial de transcrits ; plus le Ct est faible, plus il y a de transcrits dans l'échantillon, donc plus les gènes de défense sont activés. Leur expression renseigne ainsi sur l'état de stimulation des défenses des plantes. Les valeurs des Ct ont été obtenues via le logiciel Bio-Rad CFX Maestro™ version 3.1.

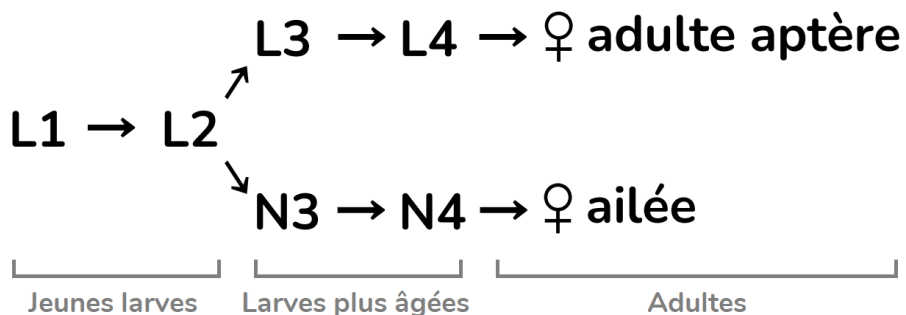
L'expression de chaque gène est calculée par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , l'expression relative du gène dans un échantillon d'intérêt par rapport à un échantillon choisi comme calibrateur (*ici les témoins non traités*), soit  $2^{-(Ct_{\text{échantillon}} - Ct_{\text{calibrateur}})}$ , normalisée par la moyenne géométrique des expressions relatives des 3 gènes de référence dans ce même échantillon par rapport à l'échantillon calibrateur. Une fois normalisées, les expressions relatives sont transformées en log2 afin de représenter les inductions et les répressions d'expression avec la même amplitude (**Livak et al., 2001**). Enfin, les données peuvent être représentées notamment sous forme de *heatmaps* ou d'ACP afin de mieux visualiser les résultats.



**Fig.10** : Étude de l'effet du Limocide sur la fécondité de *D. plantaginea*.



**Fig.11** : Étude de l'effet du Limocide sur le développement larvaire de *D. plantaginea*.



**Fig.12** : Délimitation des catégories de stades de développement pour faciliter le suivi pour l'étude de l'effet du Limocide sur le développement larvaire de *D. plantaginea*.

## II.2) Étude de l'effet du Limocide sur les traits d'histoire de vie de *D. plantaginea* : fécondité, développement

### ➤ Contexte et objectif de la méthode

*D. plantaginea*, comme bon nombre de pucerons, fait partie des insectes nuisibles les plus destructeurs en raison de leur capacité à augmenter rapidement leur effectifs. Il est ainsi primordial d'étudier leurs traits d'histoire de vie afin de cibler les meilleures stratégies pour contrer leur prolifération.

L'objectif de ce duo d'expériences est de déterminer si le produit SDP candidat retenu, le Limocide, aurait, en stimulant les défenses de la plante, un effet sur les traits d'histoire de vie de *D. plantaginea* tels que la fécondité ou le développement larvaire. Les expériences se sont déroulées en serres, sur le site de l'IRHS d'Angers, en conditions habituelles (*Photopériode naturelle, température de 23±3°C le jour et de 18°C la nuit, humidité relative de 75%*).

### ➤ Effet du Limocide sur la fécondité

Dans cette étude (**Fig.10**), 60 plants greffés de pommier *Golden Delicious* ont été employés au total, avec 30 par modalité, ici l'eau (*témoin*) et le Limocide 1%. Tout d'abord, les plantes ont été pulvérisées jusqu'à ruissellement, puis, 3 jours plus tard une seconde fois ; puis, de nouveau 3 jours plus tard, une femelle adulte aptère âgée d'une douzaine de jours est déposée par plante. Tous les 2-3 jours, un comptage des larves émises par la femelle est alors effectué. À chaque comptage, les larves sont éliminées afin d'éviter de les compter de nouveau la prochaine fois. L'expérience se termine lorsque la majorité des femelles n'émettent plus de larves. Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide d'un test Mann-Whitney.

### ➤ Effet du Limocide sur le développement larvaire

Pour cette manipulation (**Fig.11**), ont été utilisés 12 plants greffés de pommier *Golden Delicious*, avec 6 par modalité, l'eau (*témoin*) et le Limocide 1%. Les plantes ont été traitées jusqu'à ruissellement, puis, 3 jours plus tard une seconde fois ; puis, 3 jours plus tard, 5 femelles adultes aptères sont déposés sur chaque greffe. Ces femelles vont émettre des larves pendant 24h ; au bout de ce délai, toutes les femelles sont retirées et les larves néonates sont laissées sur la plante. Les larves vont ensuite être comptées environ tous les 2-3 jours, et leur stade de développement sera suivi. Pour faciliter l'identification, des catégories de stades de développement ont été délimitées (**Fig.12**). La manipulation se termine quand les larves suivies deviennent adultes, c'est-à-dire lorsqu'une génération entière s'est écoulée. Les résultats ont également été analysés statistiquement avec un test Mann-Whitney.

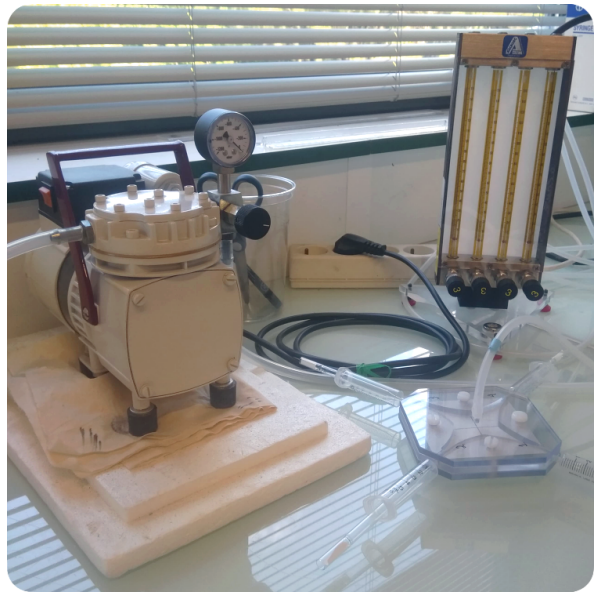
## II.3) Étude olfactométrique du comportement de *D. plantaginea* en chambre à 4 voies avec le produit retenu, le Limocide

### ➤ Contexte et objectif de la méthode

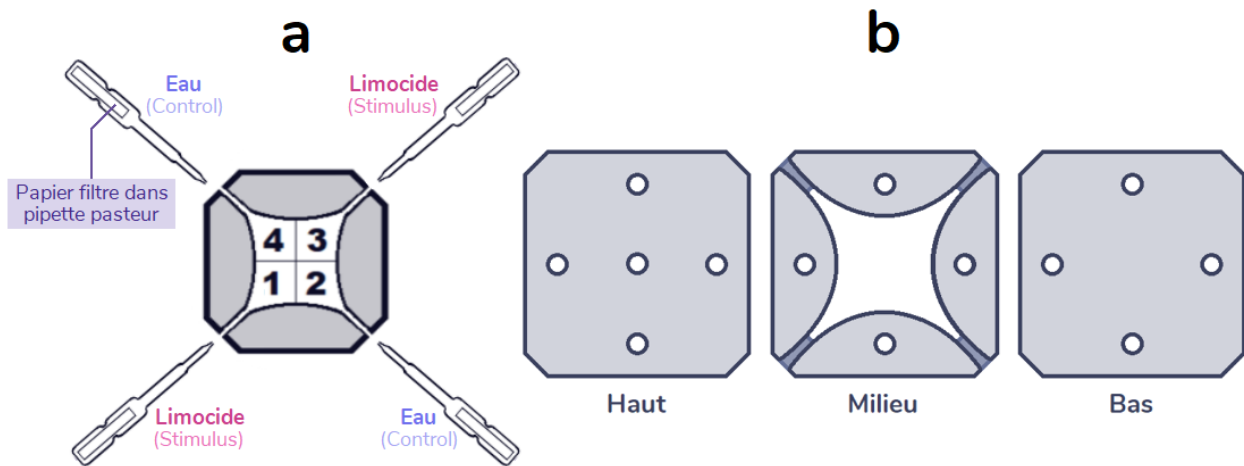
La migration fait partie intégrante du cycle de vie de *D. plantaginea*, celui-ci se produisant sur deux plantes-hôtes différentes ; être en mesure de détecter et reconnaître ces hôtes lui est donc essentiel. Cette localisation est grandement facilitée par, entre autres, la



Dispositif d'olfactométrie employé.



Dispositif relié à la pompe à membrane aspirante.



**Fig.13** : Dispositif d'olfactométrie en chambre à 4 voies de type "Pettersson"  
(Photos personnelles)

reconnaissance de divers signaux olfactifs par le puceron, tels que des composés volatils d'origine végétale (**Webster, 2012**).

L'étude de leur comportement olfactif est ainsi essentielle pour contribuer au développement de stratégies de lutte alternatives. En identifiant des substances potentiellement attractives ou répulsives pour *D. plantaginea*, il peut être possible de maximiser l'efficacité des stratégies de protection des vergers (**Badji et al., 2021**).

Le but ici est d'observer la réponse attractive ou répulsive du puceron face au Limocide, le produit SDP candidat retenu suite aux expérimentations décrites en partie II.1.

### ➤ Dispositif d'olfactométrie en chambre à 4 voies

Les expériences ont été réalisées avec un olfactomètre Pettersson (**Fig.13**), fréquemment utilisé pour les tests comportementaux d'olfactométrie chez les pucerons (**Pettersson, 1970**). Il est constitué de 3 plaques en plastique transparent assemblées entre elles par quatre vis (**Fig.13.b**). Entre la plaque du bas et celle du milieu se situe un papier filtre de 8x8 cm, sur lequel est dessinée une croix pour délimiter quatre zones. Le papier filtre permet aux pucerons de se déplacer plus aisément que sur le plastique.

Aux quatre coins du dispositif sont insérées des pipettes Pasteur en verre, dans lesquelles ont été glissés des morceaux de papier filtre imbibés de 10 µL de produit ; deux pipettes se faisant face contiennent du papier filtre imprégné du produit à tester (1,3), tandis que les deux autres le solvant du produit testé (2,4), ici l'eau (**Fig.13.a**). Le puceron à étudier est ensuite déposé dans l'ouverture centrale, au milieu du papier filtre. Enfin, est inséré dans cette même ouverture un tube de silicone relié à une pompe à membrane aspirante, au flux d'air réglé à 150 mL/min, permettant aux odeurs de ne pas se diffuser dans tout l'olfactomètre et de demeurer dans leurs zones respectives. Sur une durée de 600 secondes (10 min.) est alors noté le temps passé dans chaque zone par le puceron, avec un total de 30 pucerons employés par modalité.

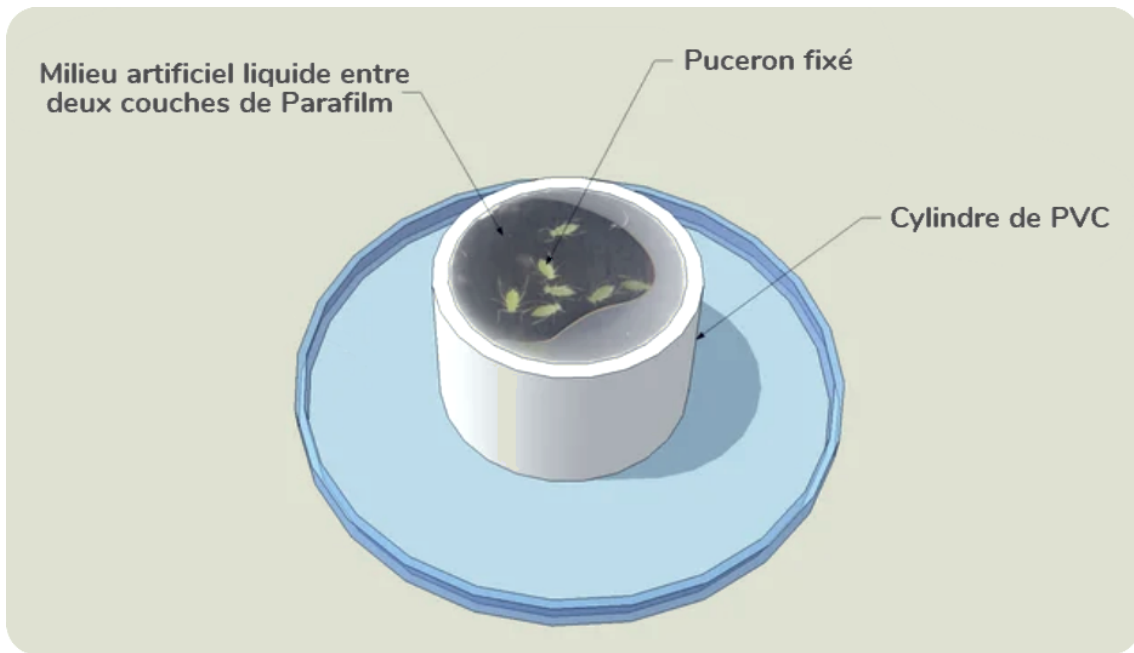
### ➤ Modalités testées

Afin de s'assurer du bon fonctionnement du dispositif, l'effet d'une solution d'E-β-farnesene (EBF) – un répulsif de référence – dans de l'hexane à une dose de 0.1µg/µL a été testée sur 15 pucerons par olfactométrie. L'EBF est une phéromone d'alarme émise par les cornicules des pucerons lorsque ceux-ci se sentent en danger, dans le but d'avertir leurs congénères. Sa détection provoque divers changements de comportement chez le puceron, notamment la fuite et leur chute de la plante-hôte (**Badji et al., 2021**).

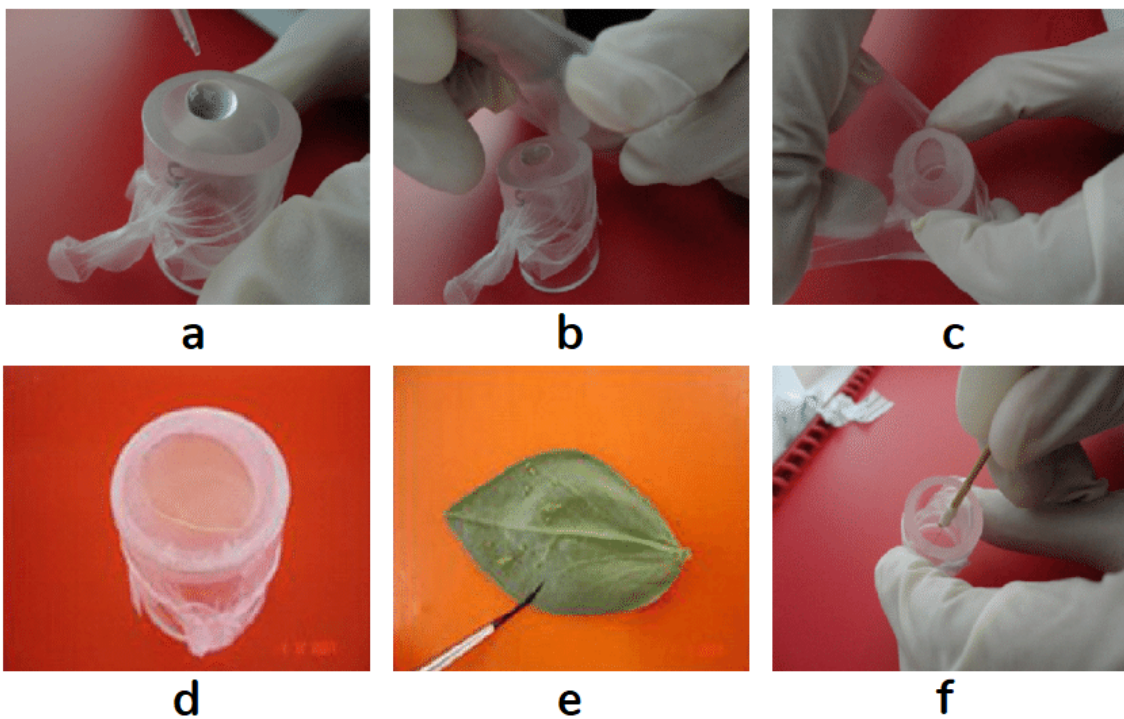
Ensuite, différentes concentrations de Limocide ont été étudiées : 1% (100 µg de Limocide sur le papier filtre), 10% (1 mg), 0.1% (10 µg). Une autre modalité a également été testée ; ici, après avoir déposé du Limocide à 1% sur le papier filtre, 72h se sont écoulées avant de réaliser les tests, afin de respecter le même délai que les traitements effectués en serre.

Pour chaque concentration de produit testée, le temps passé dans chaque zone (produit testé ou solvant) a été moyenné et comparé. Un test T a été effectué pour vérifier la significativité ou non des résultats.





**Fig.14** : Dispositif d'élevage en "ring" (Luc A. pour 3dwarehouse, 2014)



**Fig.15** : Étapes constituant la préparation des rings. (Hoang et Dung, 2013)

Une goutte de milieu artificiel est déposée sur la couche de Parafilm (a), puis une seconde couche est étirée par-dessus (b,c), renfermant le milieu entre deux couches de Parafilm (d). Les pucerons sont prélevés de la plante-hôte au pinceau (e) puis introduits dans le ring, sous le milieu artificiel (f).

## II.4) Mise au point de techniques d'élevage sur milieu artificiel pour étudier l'effet de toxicité par ingestion

### ➤ Contexte et historique

L'élevage d'aphides sur milieu artificiel est une méthode permettant de tester directement par ingestion l'effet d'une molécule donnée, en l'incorporant audit milieu artificiel, sur le développement ou le comportement du puceron étudié (**Vilcinskas, 2016**).

Les pucerons se nourrissent de sève élaborée circulant dans les tubes criblés du phloème, mais s'abreuvent aussi de sève brute occasionnellement (**Spiller et al., 1990 ; Malone et al., 1999**). La prise en compte de ce comportement est au cœur de la conception de gels et liquides nutritifs pour l'élevage de pucerons sur milieu artificiel, conception introduite puis améliorée par Hamilton (**1930, 1935**) conduisant à bon nombre d'études subséquentes dans ce domaine (**Vilcinskas, 2016**). Les milieux en question contiennent principalement de l'eau, du saccharose, des sels minéraux, des acides aminés et des vitamines (**Vilcinskas, 2016**), avec de nombreuses variantes et compositions possibles.

L'élevage sur milieu artificiel a été employé, par exemple, pour étudier l'impact de la faim d'azote sur les acides aminés libres chez le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* (**Strong, 1964**), pour la collecte de salive de différentes espèces de pucerons (**Cherqui et Tjallingii, 2000 ; Carolan et al., 2009**), ou pour simuler des changements dans les propriétés physiques des éléments des tubes criblés – par exemple la pression – et étudier leur impact sur le comportement des pucerons (**Will et al., 2008**). Hewer et son équipe ont par ailleurs été parmi les premiers à tester les effets de différents sucres (*fructose, glucose, saccharose, raffinose, sorbitol, galactose et mannose*) et de différentes valeurs de pH (*entre 5 et 8*) en élevage pour étudier l'orientation des pucerons sur leurs plantes-hôtes, notamment leur capacité à détecter les tubes criblés (**Hewer et al., 2010, 2011 ; Vilcinskas, 2016**).

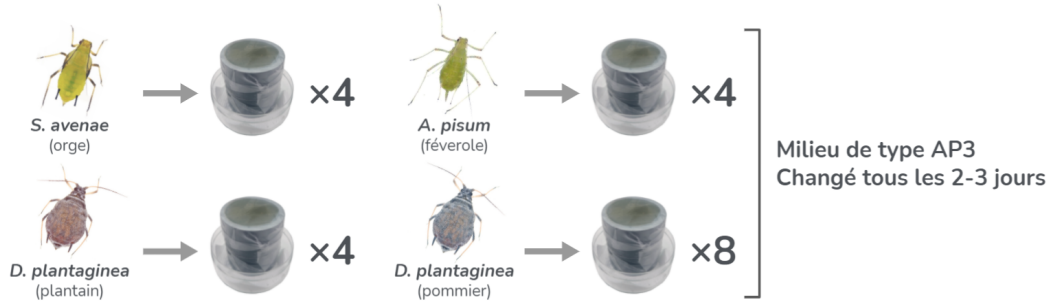
Ainsi, les tests d'élevages de *D. plantaginea* sur milieu artificiel, si concluants, pourraient permettre de caractériser l'effet direct par ingestion d'un produit sur le puceron, c'est-à-dire une toxicité aiguë (*mortalité immédiate*) et/ou une toxicité chronique (*impact négatif sur le développement et la reproduction*).

### ➤ Méthode de réalisation du dispositif d'élevage en "ring"

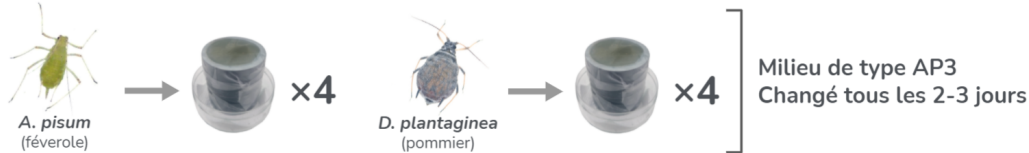
Les méthodes mises en place pour l'élevage d'aphides sont diverses, mais aujourd'hui, la technique la plus communément employée se base sur des dispositifs composés à partir de tubes de PVC (**Fig.14**) sectionnés transversalement, formant des anneaux d'un diamètre de 3-4 cm et d'une hauteur de 2-3 cm, dits "rings" (**Van Emden, 2009 ; Vilcinskas, 2016**).

La mise en place dudit dispositif se réalise sous hotte à flux laminaire, avec des gants, pour éviter toute contamination du milieu nutritif (**Fig.15**). À l'extrémité supérieure du ring est d'abord étiré un morceau de Parafilm préalablement stérilisé sous UV ; ensuite, une goutte de milieu artificiel liquide est déposée dessus à l'aide d'une seringue munie d'un filtre antibactérien. Enfin, un deuxième morceau de Parafilm est étiré par-dessus l'extrémité du tube, enfermant le milieu nutritif entre deux couches de film (**Mittler et Dadd, 1962 ; Febvay et al., 1992, 1999 ; Van Emden, 2009**).

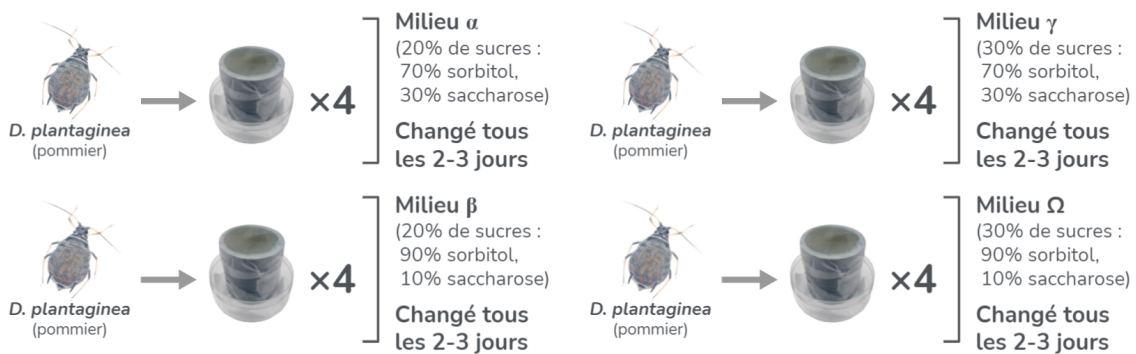
### 1) Prise en main de l'élevage sur rings



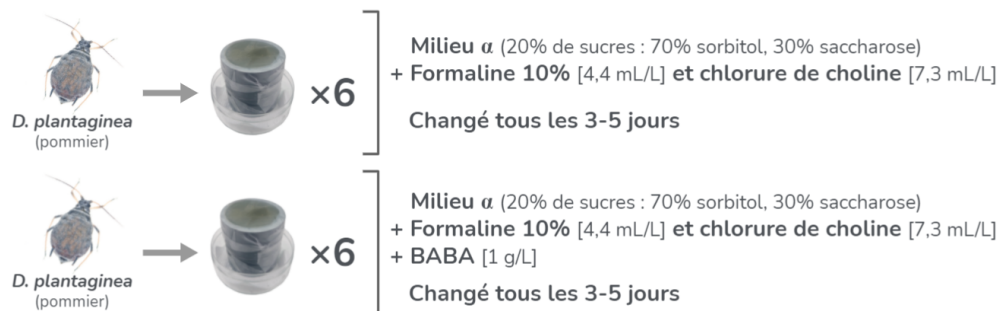
### 2) Test d'un dispositif alternatif à trois couches



### 3) Mise au point de milieux alternatifs à base de sucres



### 4) Test d'un milieu retenu avec antiseptiques



### 5) Test d'élevage sur ring avec des effectifs comparables

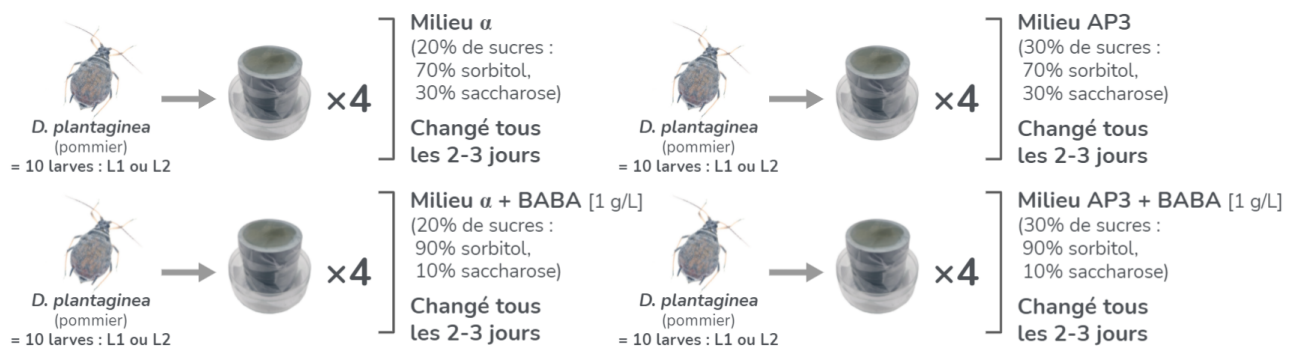


Fig.16 : Manipulations préliminaires d'élevage sur rings effectuées au cours de cette étude.

Lors de la préparation du milieu, il est primordial de dissoudre chacun des ingrédients complètement, dans l'ordre prescrit par le protocole, avant d'ajouter le suivant. Le processus peut prendre une journée entière dans certains cas. Le milieu obtenu peut être conservé au congélateur jusqu'à 4 ans avant sa première utilisation (**Van Emden, 2009**). Dans cette étude, les milieux artificiels ont ainsi été conservés à -28°C.

Après installation des dispositifs, les pucerons sont alors délicatement prélevés de leur plante-hôte et déposés dans le ring. Avant de les prélever, il est d'abord nécessaire de les tapoter doucement avec un pinceau afin qu'ils retirent leurs stylets de la plante. Omettre cette étape peut endommager lesdits stylets et le puceron ne pourra plus se nourrir correctement. Après introduction des pucerons, le ring peut maintenant être retourné afin de finaliser sa mise en place. Ces rings peuvent être utilisés immédiatement, dans les 24 heures à suivre si placés au réfrigérateur, ou encore dans le mois si conservés au congélateur (**Mittler et Dadd, 1962 ; Febvay et al., 1992, 1999 ; Van Emden, 2009**). Les milieux sont régulièrement changés pour éviter une dégradation des nutriments ainsi qu'une fermentation du milieu provoquant la formation d'éthanol toxique pour les pucerons (**Van Emden, 2009 ; Vilcinskis, 2016**).

### ➤ Manipulations préliminaires : dispositifs et protocoles testés

Des manipulations préliminaires ont été effectuées afin d'appréhender et de tester les techniques d'élevage de pucerons sur milieu artificiel. Le résultat recherché est de disposer d'une méthodologie fonctionnelle permettant de déterminer la nature de l'effet toxique par ingestion de composés vis-à-vis de *D. plantaginea*. Une synthèse graphique des différentes expériences menées a été réalisée pour faciliter leur visualisation (**Fig.16**).

Le milieu nutritif de référence employé est un milieu de type "AP3" (**Table.3 p.12**) ; ce dernier, initialement développé pour *A. pisum*, est aujourd'hui utilisé pour bon nombre d'élevages d'aphides sur milieu artificiel (**Van Emden, 2009**). D'autres milieux ont cependant été testés dans certaines manipulations ; leur préparation et leurs compositions sont détaillées dans leurs parties respectives.

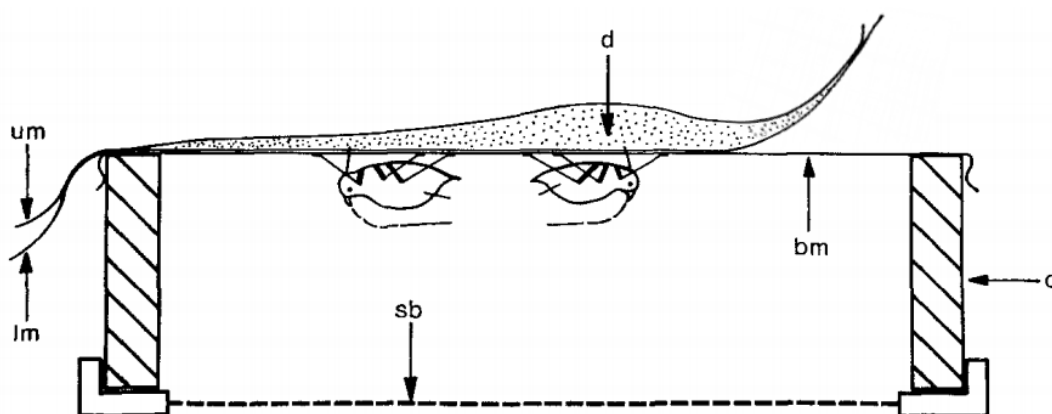
Les pucerons ont été prélevés de leurs plantes-hôtes en découpant de petits morceaux de feuilles et de rameaux infestés ; lesdits morceaux ont ensuite été placés dans les rings afin d'y introduire les pucerons. Il est cependant important de noter que cette méthode d'introduction ne permet pas une reproductibilité scientifique satisfaisante et doit être réservée à des manipulations de prise en main ; en effet, ni les effectifs, ni les stades de développement, ni les âges des pucerons ne sont ainsi précisément connus. Néanmoins, cette méthode permet d'introduire des pucerons dans les rings plus rapidement et sans les stresser, notamment des jeunes stades larvaires (L1-L2), de très petite taille et bien plus fragiles.

Au cours de chaque renouvellement du milieu des rings, un comptage des effectifs de pucerons est effectué : nombre de pucerons fixés et libres, de cadavres, d'exuvies, de nymphes vivantes, et de forme ailées vivantes. La procédure de changement de milieu consiste à joindre un nouveau ring muni d'un nouveau milieu à l'ancien ring, puis de léser ce dernier à l'aide d'un scalpel pour que son contenu fuite. Le tout est ensuite retourné sur du papier absorbant, avec l'ancien milieu fendu vers le bas ; les pucerons, privés de nourriture, migrent alors vers le haut pour se fixer sur le nouveau milieu (**Febvay et al., 1992, 1999 ; Van Emden, 2009**)

**Table.3** : Composition du milieu artificiel AP3 (Dadd et Mittler, 1966)

L-amino acids (mg) :		Sucrose (g)		15
Alanine	100	Ascorbic acid (mg)		100.0
Arginine	270	Thiamin (mg)		2.5
Asparagine	550	Riboflavin (mg)		0.5
Aspartic acid	140	Nicotinic acid (mg)		10.0
Cysteine HCl	40	Pyridoxin (mg)		2.5
Glutamic acid	140	Folic acid (mg)		0.5
Glutamine	150	Ca pantothenate (mg)		5.0
Glycine	80	Inositol (mg)		50.0
Histidine	80	Choline chloride (mg)		50.0
Isoleucine	80	Biotin (mg)		0.1
Leucine	80	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mg)		500
Lysine HCl	120	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O (mg)		200
Methionine	40		As	As
Phenylalanine	40		seques-	elemental
Proline	80		trene	metal
Serine	80			
Threonine	140	Fe <sup>a</sup>	1.5 mg	230 μg
Tryptophan	80	Zn <sup>a</sup>	0.8 mg	112 μg
Tyrosine	40	Mn <sup>a</sup>	0.8 mg	113 μg
Valine	80	Cu <sup>a</sup>	0.4 mg	65 μg

Water: to 100 ml, adjusted to pH 7.0 with KOH. <sup>a</sup> Provided as metal sequestrones (Geigy Chemical Co.), the complexes with sodium EDTA.



**Fig.17** : Coupe transversale de la cage d'élevage des pucerons dans un dispositif à 3 couches

*bm* = Membrane de base ; *c* = Ring en PVC ; *d* = Milieu nutritif ; *lm*, *um* = Membrane inférieure et supérieure, respectivement ; *sb* = Fond de la cage (du ring) (Cloutier et Mackauer, 1975)

## 1) Prise en main de l'élevage sur rings

Cette expérience a consisté à réaliser des élevages sur milieux artificiels de trois espèces de pucerons : *S. avenae*, *A. pisum* et *D. plantaginea* sous forme virginogène. Le but ici est de prendre en main la technique d'élevage sur rings, et d'observer si celle-ci fonctionne sur ces différentes espèces de pucerons communément étudiées (**Fig.16 p.11**).

## 2) Test d'un dispositif alternatif à trois couches

*D. plantaginea* est surtout étudié sous sa forme fondatrigrène retrouvée sur sa plante-hôte primaire, le pommier ; les expériences se sont donc davantage portées sur cette forme, jugée plus pertinente à observer dans le cadre de cette étude. A également été retenu *A. pisum* pour cette manipulation, cette espèce semblant mieux se porter en élevage sur rings.

Dans les manipulations précédentes, il a été constaté que les pucerons se fixent assez peu sur le milieu artificiel. Il s'agit donc ici de tester une variante de la méthode habituelle d'élevage sur rings, mise au point par Cloutier et Mackauer (**1975**). Cette méthode permettrait de limiter les manipulations excessives des élevages pouvant notamment blesser, stresser ou perturber la fixation et le développement des pucerons (**Mittler, 1972 ; Harrewijn, 1973**).

Dans cette approche alternative (**Fig.17**), une membrane de Parafilm (*bm*) est tout d'abord étirée au-dessus du ring, suivie d'une seconde membrane (*lm*), étirée sur la première. Après avoir déposé les gouttes de milieu nutritif (*d*), une troisième membrane est étirée sur la seconde pour sceller le tout. Pour changer le milieu, il suffit de décoller le sachet – formé par les deux membranes supérieures – de la première couche recouvrant le ring. Il serait ainsi possible de réapprovisionner les pucerons sans les importuner (**Cloutier et Mackauer, 1975**).

## 3) Mise au point de milieux alternatifs à base de sucres

Le sorbitol est le composé majoritaire de la sève du pommier mais aussi du plantain, suivi du saccharose. Dans la littérature, le ratio sorbitol/glucides varie entre 60% et 90% environ selon les auteurs, lesdits glucides étant essentiellement du saccharose. Les autres sont retrouvés en très petites quantités, de l'ordre du ppm. Quant à la teneur totale en sucres, celle-ci varie entre 15 et 30% selon les travaux (**Kollar et Seemüller, 1990 ; Escobar Gutiérrez et Gaudillère, 1996, Görg et al., 2021**).

Sur la base de ces connaissances, a été recherché de concevoir un milieu artificiel plus simple de préparation et potentiellement plus adapté pour *D. plantaginea*, le milieu AP3 ne semblant pas grandement convenir à cette espèce. Ainsi, dans le cadre de cette manipulation préliminaire, plusieurs milieux artificiels nutritifs contenant du sorbitol et du saccharose à différentes concentrations ont été conçus pour être testés. Pour ajuster les milieux à une valeur de pH favorable pour les pucerons d'environ 7.5 (**Vilcinskas, 2016**), un tampon à base de chlorure d'hydrogène HCl et de Tris-Base a été employé (**Fig.16 p.11**).

## 4) Test d'un milieu retenu avec antiseptiques

Le milieu  $\alpha$  de la précédente manipulation (**Fig.16 p.11**) a été retenu (20% de sucres, dont 70% de sorbitol et 30% de saccharose) et re-préparé avec une légère modification ; dans celui-ci ont été incorporés des antiseptiques à base de formaline 10% [4,4 mL/L] et de chlorure de choline [7,3 mL/L], en se basant sur les travaux de Toledo-Hernández et son équipe (**2018**). L'ajout de ces produits permettrait de ralentir l'éventuel développement de bactéries et de



**Fig.18** : Protocole du test de toxicité par contact du Limocide sur *D. plantaginea*.

champignons, et donc d'espacer les changements de milieux et d'éviter de perturber les pucerons trop fréquemment.

Pour tester la faisabilité de tests d'impact de produits SDP sur ce milieu artificiel retenu, a été employé l'acide  $\beta$ -aminobutyrique (*BABA*), un stimulateur des défenses connu pour avoir un effet SDP sur une large gamme de stress abiotiques et biotiques. Son impact négatif chronique sur les pucerons et leurs traits d'histoire de vie a également été observé : il entraîne notamment un très fort allongement du développement larvaire chez *D. plantaginea* (**Robert et al., 2016**). Il serait aussi possible que cette molécule possède un effet insecticide systémique et stable, c'est-à-dire qu'elle pénètre l'organisme et circule dans son système vasculaire. Cependant, cela signifierait que non seulement les ravageurs mais également les insectes auxiliaires seraient négativement affectés par le BABA ; ce dernier pose donc problème concernant sa potentielle écotoxicité (**Robert et al., 2016 ; ÉcophytoPIC, 2017**). Il est ici employé pour observer si la présence ou non de BABA affecte le développement et la mortalité de *D. plantaginea* sur milieu artificiel.

### 5) Test d'élevage sur ring avec des effectifs comparables

Le but est ici de mettre en place des rings avec des populations comparables. Introduire les pucerons dans les rings en y plaçant des morceaux de feuilles de plante-hôte infestée est certes bien moins chronophage que de déposer les pucerons un à un après les avoir délogés au pinceau ; cependant, cette approche reste très approximative et ne permet pas une reproductibilité scientifique satisfaisante, ce qui peut expliquer l'hétérogénéité notable entre des rings aux modalités pourtant identiques. Ainsi, des rings avec les mêmes effectifs de pucerons en leur sein faciliteraient leur comparaison entre eux.

Les pucerons semblent très peu se fixer sur les milieux antiseptiques. Une ultime manipulation a été effectuée pour observer, avec des populations comparables, si une différence notable est constatable sur la mortalité et le développement des larves en fonction du milieu artificiel employé,  $\alpha$  (*sans antiseptiques*) ou AP3, ou bien de la présence ou non de BABA.

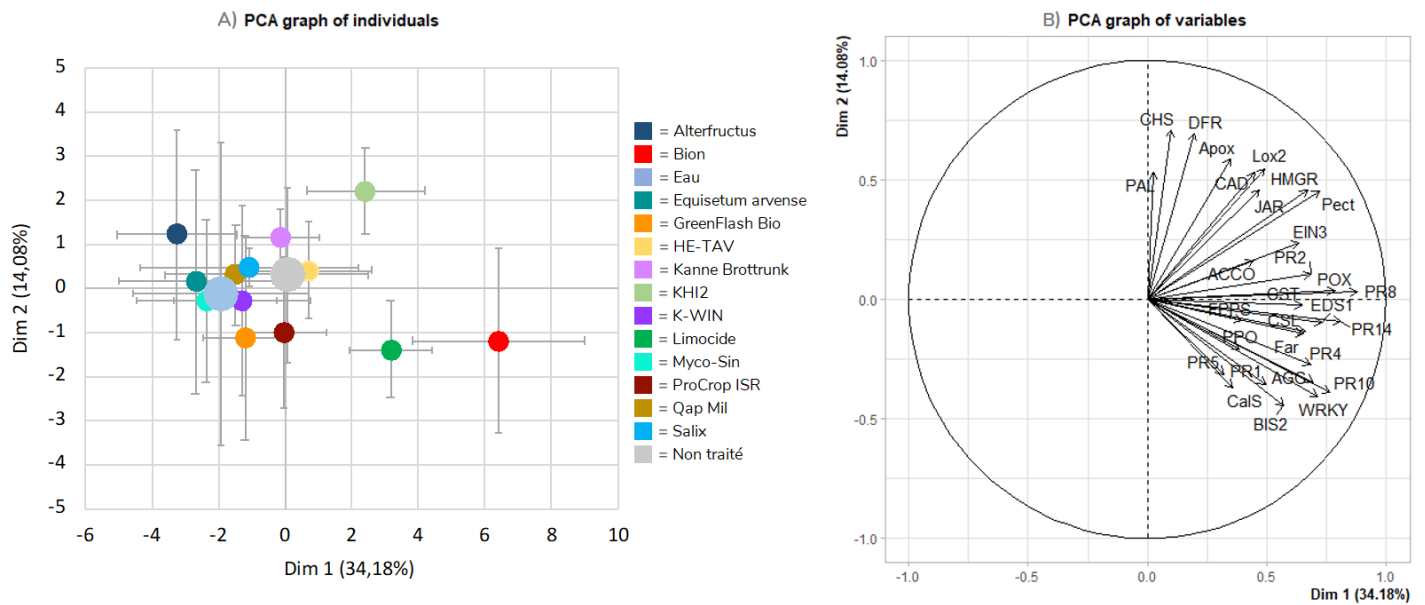
## II.5) Test de toxicité par contact du Limocide sur *D. plantaginea*

### ➤ Objectifs et protocole employé

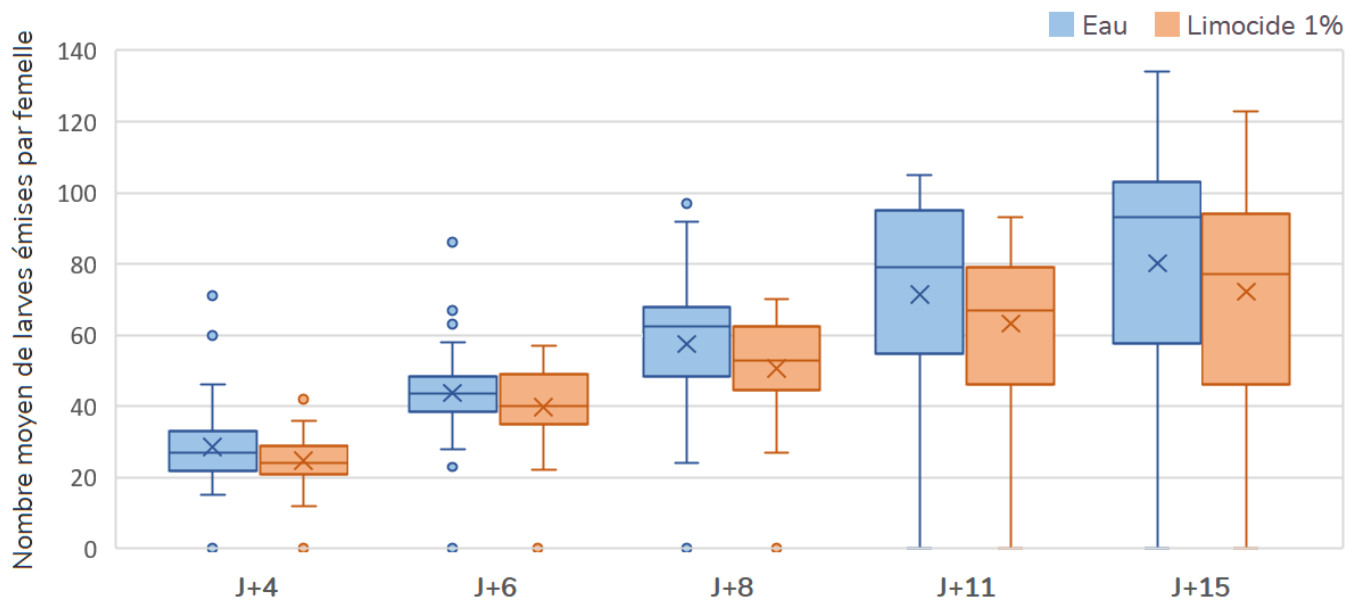
Le but de cette expérimentation était de vérifier la toxicité par contact du Limocide à 1% sur *D. plantaginea* ; en effet, ce produit est classé en tant que fongicide et insecticide par contact et est déjà homologué sur plusieurs ravageurs dont les pucerons du pêcher et de la menthe (**Groupe Saoas, 2018**).

Ici, des *D. plantaginea* de tous stades ont été pulvérisés sur un tamis à fines mailles ( $\sim 450\mu\text{m}$ ) au spray manuel, les produits employés étant ici l'eau (*témoin*) et le Limocide 1%. 12 greffes ont donc été employées, avec 6 greffes par modalité. Les pucerons ont ensuite été déposés sur des plants greffés de pommier *Golden Delicious* sains et non traités, avec un total de 10 pucerons par greffe. Enfin, au bout de 24h, est compté le nombre de pucerons vivants (**Fig.18**).





**Fig.19** : Analyses des composantes principales (ACP) des individus et des variables.



**Fig.20** : Étude de l'effet du Limocide sur la fécondité de *D. plantaginea*

Évaluation du nombre cumulé de larves émises par une adulte aptère au cours de l'expérience ; sont indiqués la médiane (ligne horizontale), les premier et troisième quartiles (boîte), les valeurs minimum et maximum (moustaches) et les valeurs aberrantes (points).

### III) Résultats

#### ➤ Identification de produits à effet SDP sur semis de pommier

Les données de la qPFD, après leur obtention et leur traitement, ont été représentées sous forme de *heatmap* indiquant l'expression relative des 29 gènes de défense du pommier afin d'avoir une première vue d'ensemble des résultats (**Ann.1**) ; ces derniers sont exprimés en  $\log_2$ ratio par rapport au témoin non traité de la première répétition. Il y est observable que les témoins non traités et les témoins Eau varient de manière notable d'une répétition à une autre ; les gènes liés à la voie des phénylpropanoïdes (*PAL*, *CHS*, *DFR*) sont particulièrement induits dans les deuxième et troisième répétitions.

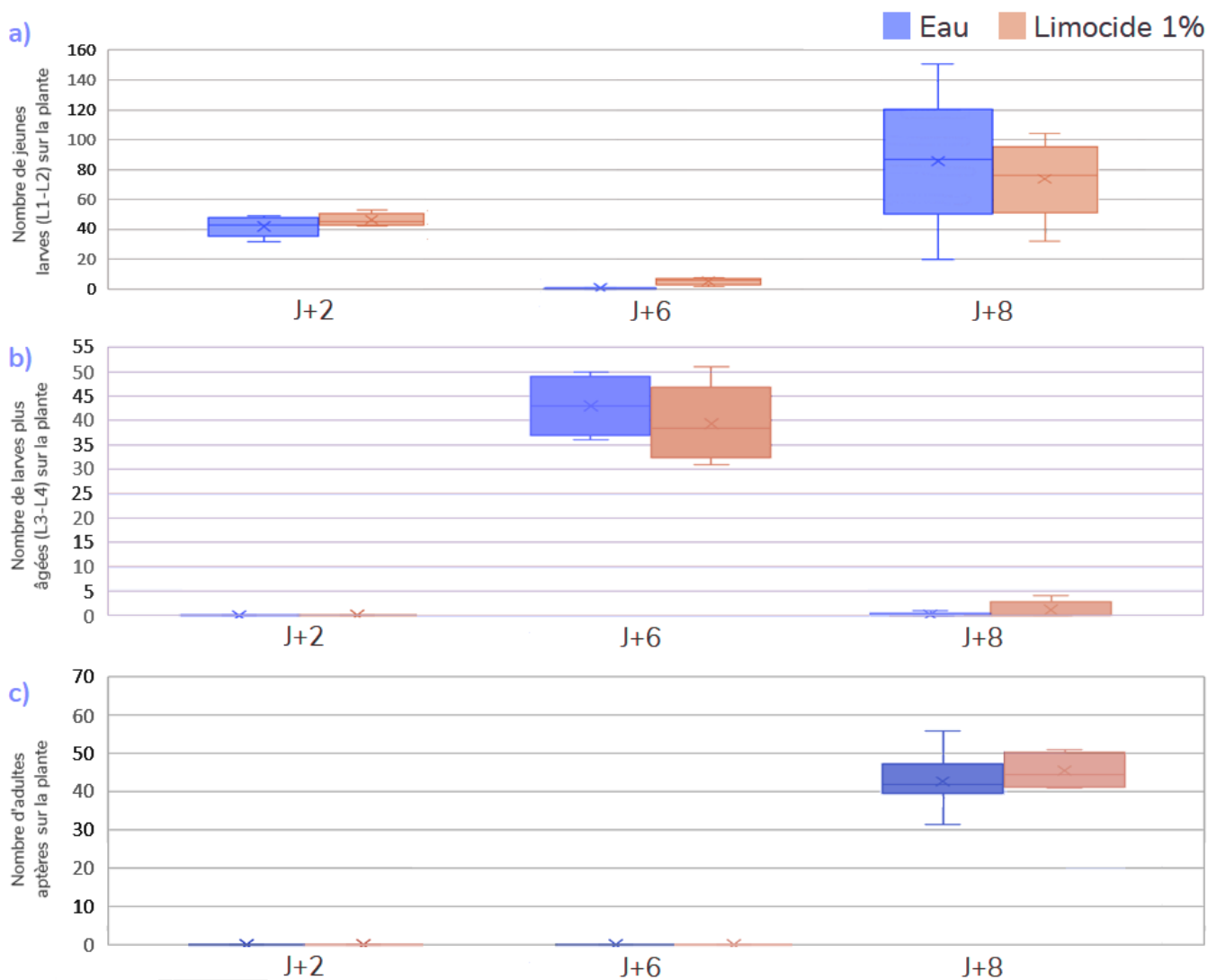
Concernant les produits, il est néanmoins possible de repérer 2 produits fortement éliciteurs, et ce de manière assez reproductible : le Bion (*témoin d'élicitation*) et le Limocide. Les plus fortes inductions sont observées pour les gènes liés aux protéines PR, aussi bien pour le Bion que le Limocide, ainsi que pour ceux liés à la farnésène-synthase (*FAR*) – surtout chez le Bion – ou encore pour ceux liés à la biphenyl-synthase (*BIS2*), plus particulièrement chez le Limocide. Il est aussi observable que le traitement à l' $H_2O_2$  ne dénote pas vraiment d'effet, quel que soit le produit : il n'y aurait donc pas de SDP potentialisateurs dans la gamme de produits testés. Ainsi, les plantes traitées à l' $H_2O_2$  peuvent ici être considérées comme des répétitions "classiques". Ensuite, une analyse en composantes principales, ou ACP, a été réalisée à partir des données d'expressions de gènes obtenues. Lesdites données y sont représentées dans un espace à deux dimensions expliquant au mieux la dispersion des échantillons (**Fig.19**). Tous les échantillons traités par un produit, avec ou non une pulvérisation additionnelle à l' $H_2O_2$ , y ont donc été considérés comme des répétitions dudit même produit.

Au sein du nuage de points des individus sont représentés les barycentres de ces répétitions, avec les intervalles de confiance des coordonnées, selon les deux dimensions du plan principal (**Fig.19.a**). Le Bion et le Limocide se distinguent clairement des modalités, concentrées, elles, autour du témoin eau et du témoin non traité. Un autre produit se détache néanmoins, le Khi2, mais demeure moins visible sur la *heatmap*. Dans cette ACP, la dimension 1, expliquant 34.18% de la variabilité, semble clairement représenter l'effet traitement ; les protéines PR et les gènes liés à la voie de l'acide salicylique (*EDS1*, *WRKY*) en sont les plus forts contributeurs. Quant à la dimension 2, celle-ci explique 14.08% de la variabilité et représenterait plutôt l'effet répétition, avec les gènes *CHS* et *DFR* comme contributeurs majeurs (**Fig.19.b**). Le produit KHI2 se distingue cependant à la fois sur la dimension 1 et 2, ce qui s'explique par l'induction des gènes *CHS* et *DFR* provoquée sur toutes les expériences, phénomène qui n'est pas observé pour le Bion et le Limocide. Il semble néanmoins induire moins efficacement les gènes contributeurs de l'axe 1 par rapport au Limocide et au Bion. Au vu de ces résultats, le Limocide a ainsi été choisi pour les expérimentations suivantes, de par sa capacité à stimuler certains gènes de défense du pommier, et ce de manière significative et reproductible.

#### ➤ Étude de l'effet du Limocide sur les traits d'histoire de vie de *D. plantaginea* : fécondité, développement

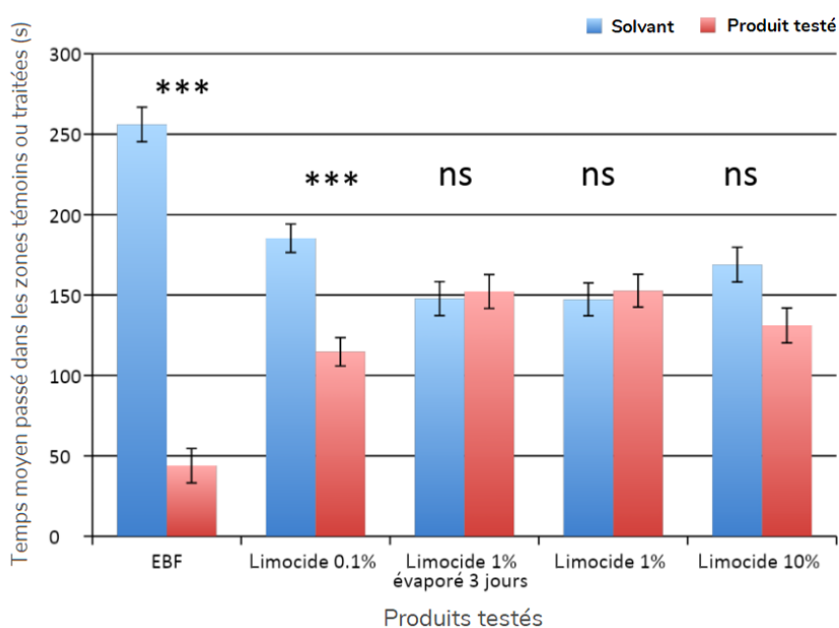
##### Effet du Limocide sur la fécondité

L'effet de l'usage du Limocide 1% sur la plante en préventif (3 jours avant l'infestation) sur la fécondité de *D. plantaginea* a été représenté de façon cumulée en *boxplots* (**Fig.20**).



**Fig.21 :** Évaluation et suivi du nombre de jeunes larves (L1-L2), de larves plus âgées (L3-L4) et d'adultes *D. plantaginea* présents sur la plante au cours de l'expérience.

Sont indiqués la médiane (ligne horizontale), les premier et troisième quartiles (boîte), les valeurs minimum et maximum (moustaches)



**Fig.22 :** Effet comportemental de différentes doses de Limocide sur *D. plantaginea* fondatrigrène adulte aptère dans un olfactomètre à 4 voies.

La significativité des résultats a été calculée par un test T.

\*\*\* = Répulsif de manière hautement significative ( $p$ -value < 0.001) ; ns = Non significatif ( $p$ -value > 0.05)

Au bout de 15 jours, les femelles sur les plantes pulvérisées à l'eau déposent environ  $93 \pm 43.5$  larves, contre  $77 \pm 47$  larves sur les plantes traitées au Limocide. Les données obtenues ne suivant pas une distribution normale, les effectifs de larves ont été comparés à chaque pas de temps entre les deux traitements avec un test non-paramétrique Mann-Whitney. Aucune différence significative n'a été trouvée (*p-values situées entre 0.061 et 0.367 pour les différents pas de temps*). Le Limocide 1% appliqué sur le pommier 3 jours avant l'infestation ne semble donc pas avoir d'impact sur la fécondité des fondatrigènes. Sur les 15 jours observés, la fécondité journalière est en moyenne de l'ordre de 5 larves par jour.

### **Effet du Limocide sur le développement larvaire**

Similairement, pour l'étude du Limocide sur le développement larvaire de *D. plantaginea* fondatrigène, le nombre de pucerons de 3 catégories d'âge sur chaque greffe a été représenté à trois pas de temps sous forme de *boxplots* (**Fig.21.a,b,c**). Un total de 3 catégories de pucerons en fonction de leur âge a été créé : les jeunes larves (*stades L1-L2*), les larves plus âgées (*L3-L4*) et les adultes aptères.

Au bout de 2 jours, il est possible de dénombrer une bonne quarantaine de jeunes larves (*L1-L2*) par plante au sein des deux modalités (**Fig.21.a**) ; la différence dans leurs effectifs n'est pas significative. Étant donné que 5 femelles avaient été placées par plante pendant 24 heures (*de J0 à J+1*), cela équivaut à 8 larves déposées en moyenne par femelle. À 6 jours, les individus ont mué en larves âgées (*L3-L4*) (**Fig.21.b**) ; la différence n'est également pas significative. La mortalité semble nulle, car est toujours observée une quarantaine de larves (*tous stades confondus, de L1 à L4*) par plante dans les deux modalités.

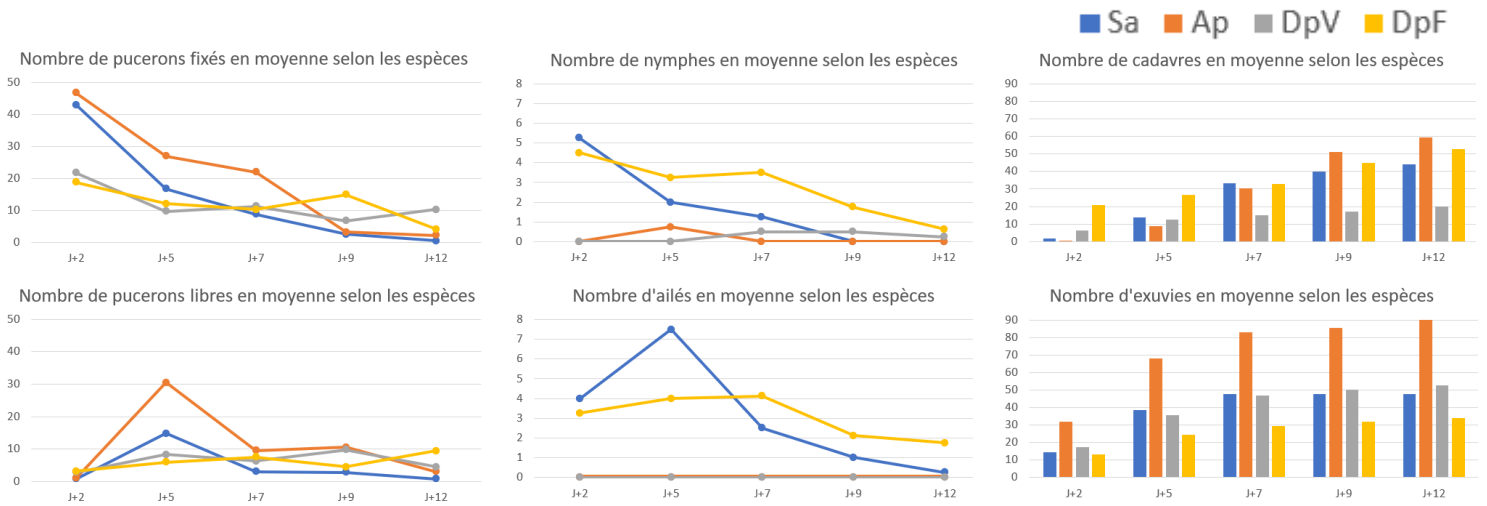
Au sein de ces deux modalités, les nouvelles femelles adultes émergent quasiment toutes au bout de 7-8 jours ; il y reste très peu d'individus encore au stade de "larve âgée". Dans les conditions d'expérimentation sous serre, le développement est donc très rapide, une génération durant ici environ une semaine, contre une douzaine de jours en chambre climatisée. Les femelles adultes émergentes commencent immédiatement à émettre de nouvelles larves L1 (**Fig.21.c**). Ainsi, dans les conditions d'expérimentation de cette étude, l'application préalable de Limocide 1% sur greffe de pommier ne semble pas avoir d'impact sur la vitesse de développement post-embryonnaire de *D. plantaginea*, ni sur sa mortalité larvaire ; aucune différence significative entre les traitements n'a été décelée après réalisation d'un test de Mann-Whitney à chaque pas de temps ( $0.377 < p\text{-values} < 0.517$ ).

### **➤ Étude olfactométrique du comportement de *D. plantaginea* en chambre à 4 voies avec le produit retenu, le Limocide**

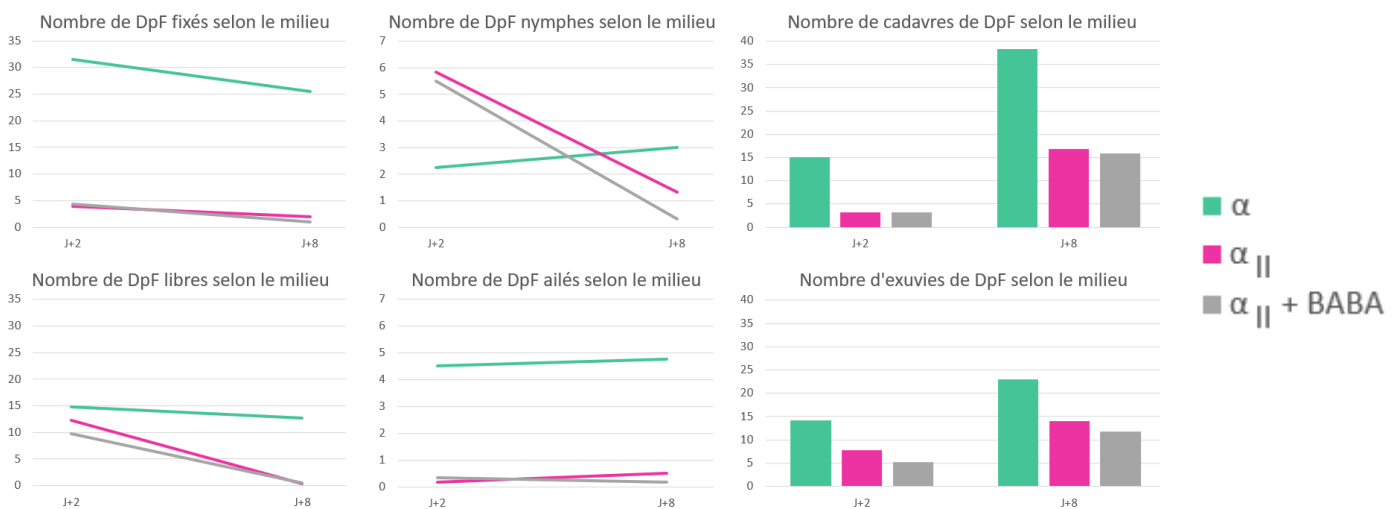
Pour chaque concentration de produit testée, le temps passé dans chaque zone (*produit testé ou solvant*) a été moyenné et comparé. Un test T a été effectué pour vérifier la significativité ou non des résultats (**Fig.22**).

Il est observé qu'en présence d'EBF, le répulsif de référence, les pucerons restent presque exclusivement dans les zones témoin sans produit ; cette différence de temps passé entre les deux catégories de zones est très hautement significative. Ces résultats permettent donc d'assurer le bon fonctionnement du dispositif.

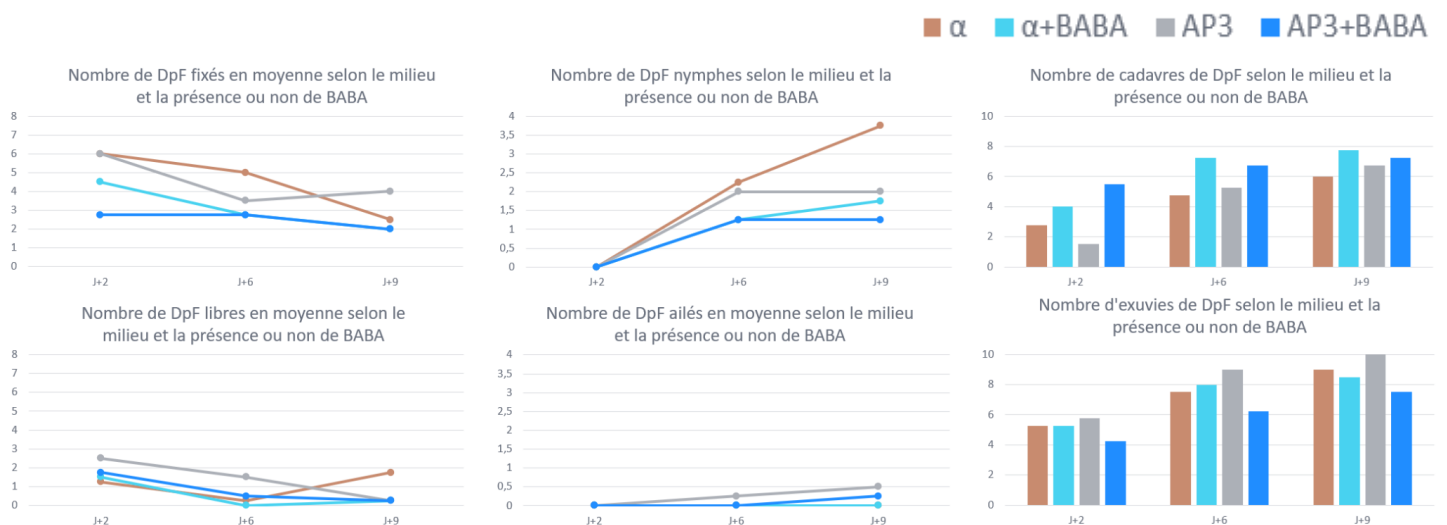
À 1%, à 10% et à 1% laissé évaporer 3 jours, les pucerons passent à peu près autant de temps dans les zones traitées que dans les zones témoins ; le Limocide ne semble pas dénoter d'effet



**Fig.23 : Récapitulatif des comptages en comparant les espèces de pucerons**  
**Sa = S. avenae ; Ap = A. pisum ; DpV = D. plantaginea virginogènes ; DpF = D. plantaginea fondatrigenes**



**Fig.24 : Récapitulatif des données issues des comptages en comparant différents milieux**  
 $\alpha$  = Milieu avec 20% de sucres : 70% sorbitol, 30% saccharose ;  $\alpha_{II}$  = Milieu  $\alpha$  + formaline 10% [4,4 mL/L] et chlorure de choline [7,3 mL/L] ;  $\alpha_{II}+BABA$  = Milieu  $\alpha$  + formaline, chlorure de choline + BABA [1g/L]



**Fig.25 : Récapitulatif des données issues des comptages en comparant le milieu  $\alpha$  et AP3**

$\alpha$  = Milieu avec 20% de sucres, dont 70% de sorbitol et 30% de saccharose ; BABA : [1g/L] ; 10 pucerons au stade L1 ou L2 par ring, afin d'avoir des populations comparables dans chaque ring

attractif ni répulsif sur *D. plantaginea* adulte aptère à ces concentrations. En revanche, pour la concentration de Limocide de 0.1%, les pucerons restent davantage de temps dans les zones témoins (en moyenne  $185.3 s \pm 48.5$ ), la différence est hautement significative. Un effet répulsif à 0.1% est donc significativement notable ( $p < 0.0001$ ), mais cet effet n'est que partiel.

### ➤ Mise au point de techniques d'élevage sur milieu artificiel pour étudier l'effet de toxicité par ingestion : Manipulations préliminaires

À travers ces manipulations préliminaires, il a été observé que les pucerons sont difficiles à élever sur les différents milieux testés ; en effet, ceux-ci présentent un développement ralenti ou halté, avec un nombre d'exuvies observables chutant rapidement à zéro, ainsi qu'une forte mortalité (Fig.23,24,25).

Chez toutes les différentes espèces testées, le nombre de pucerons fixés au milieu chute au bout de 5 jours. Concernant *D. plantaginea*, il a été constaté que les adultes aptères peinent particulièrement à se fixer sur le milieu ; dans certains rings, leur mortalité peut atteindre 100% après 48h. Les larves se fixent plus aisément, mais se développent très peu. En général, *A. pisum* semble néanmoins mieux se fixer au milieu AP3, milieu initialement conçu pour cette espèce, mais aussi se développer plus aisément, de par son plus grand nombre d'exuvies observables (Fig.23). Quant au dispositif alternatif à trois couches, celui-ci a mené à une mortalité proche de 100% en moins de 48h ; ainsi, ce type d'expérimentation n'a pas été poursuivi dans les manipulations ultérieures.

*D. plantaginea* fondatrigrène issue de pommiers semble particulièrement peu se développer comparé aux autres pucerons (Fig.23) ; le milieu AP3 ne paraissant pas lui être idéal, des milieux alternatifs ont été mis au point. Ces milieux simplifiés pourraient maintenir une partie des pucerons sur une durée de quelques jours ; cependant, ils entraînent une plus forte mortalité et un développement d'autant plus ralenti qu'un milieu AP3 (Fig.24,25).

Les milieux  $\alpha$  (20% de sucres ; 70% sorbitol, 30% saccharose) avec antiseptiques résultent à un élevage et un maintien des *D. plantaginea* d'autant plus mitigé, et pourraient leur être nocifs et/ou répulsifs. Il n'y a vraisemblablement pas de différence notable entre les milieux avec antiseptiques  $\alpha_{II}$  et  $\alpha_{II}+BABA$ , cependant le milieu  $\alpha$  seul semble fournir de meilleurs résultats, avec davantage de pucerons fixés ainsi qu'un nombre plus important d'exuvies. Est également observable une augmentation de nymphes avec le milieu  $\alpha$  seul, signalant peut-être une population potentiellement en expansion (Fig.24). L'ajout de BABA semble résulter à une mortalité des pucerons légèrement précoce, cependant ceux-ci peinent déjà à se maintenir sur un milieu sans BABA (Fig.24,25).

Ainsi, l'élevage sur milieu artificiel semble fournir des résultats discutables et n'est pour le moment guère envisageable pour maintenir ou élever *D. plantaginea*, en particulier sur le long terme ; la durée maximale de maintien semble être autour de 2-5 jours. Il serait donc, par exemple, difficile de tester la toxicité chronique d'un produit dans ce type d'expérimentation.

### ➤ Test de toxicité par contact du Limocide sur *D. plantaginea*

Il a été observé qu'au bout de 24 heures, 100% des pucerons traités au Limocide étaient morts, contre 7% pour l'eau. Il est à noter que déjà, lors de la pulvérisation au Limocide sur tamis, les pucerons ont cessé de bouger et semblaient déjà morts lors de leur dépôt sur les plantes, tandis que ceux traités à l'eau n'ont pas eu de réaction particulière et se mouvaient



normalement. Lors du comptage, les aphides ayant reçu du Limocide se trouvaient encore à l'endroit même où ils avaient été déposés la veille, alors que ceux traités à l'eau étaient pour la plupart vivants et trouvables sur toute la plante. Dans ces conditions d'expérimentation, le Limocide 1% dénote une très forte toxicité par contact sur *D. plantaginea* ; l'effet toxique semble immédiat et provoque une mortalité rapide et totale.

## IV) Discussion

Au travers de cette étude, divers produits SDP candidats ont été criblés par qPFD sur semis de pommier, dans l'optique de rechercher des solutions alternatives pour lutter contre *Dysaphis plantaginea*. Les résultats issus de cette qPFD nous indiquent tout d'abord, de par le manque de différence notable entre les semis traités avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou non, que les produits testés ne dénotent aucun effet SDP potentialisateur, mais plutôt un effet SDP direct (*lorsque stimulation des défenses il y a*).

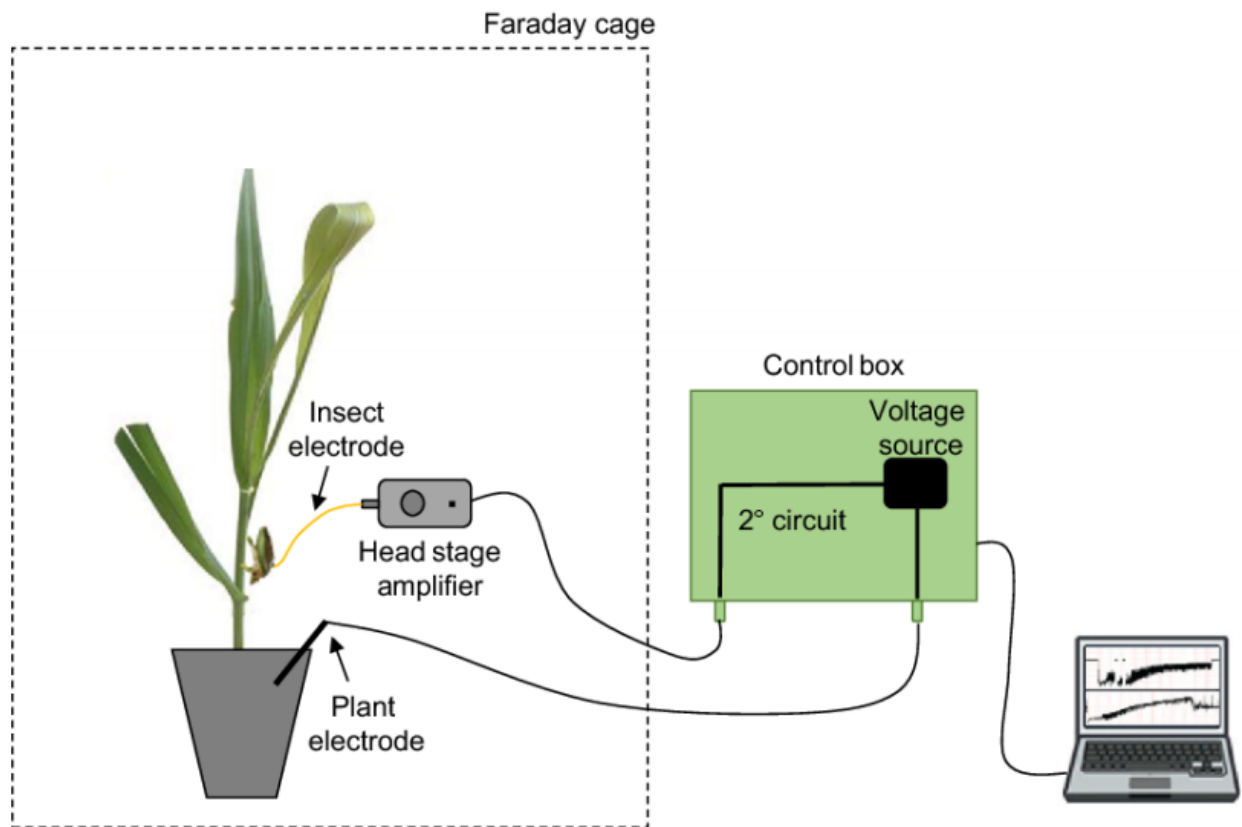
Les plus fortes modulations de gènes observées, que ce soit entre expériences ou entre modalités de traitement, sont liées à la voie des phénylpropanoïdes (*PAL, CHS, DFR, BIS2*), à la voie des isoprénoïdes (*FAR*), aux protéines PR, ainsi qu'à la voie de l'acide salicylique (*EDS1*). Les phénylpropanoïdes représentent une famille complexe de composés organiques du métabolisme secondaire, constitués notamment de précurseurs de lignine – contribuant à l'épaississement ou la rigidification des parois des cellules végétales – et de composés antimicrobiens permettant de protéger la plante des bioagresseurs, mais également de pigments utiles contre les agressions abiotiques telles que la lumière. La voie des isoprénoïdes conduit en particulier à des composés volatils pouvant être répulsifs vis-à-vis des bioagresseurs (*ou attractifs vis-à-vis des auxiliaires*). Quant aux protéines PR, celles-ci sont produites en réponse aux attaques de pathogènes avec pour certaines des actions antimicrobiennes démontrées (**Asselin, 1993**). Enfin, la voie de l'acide salicylique est une des 3 majeures voies de signalisation des plantes alertant les cellules voisines de l'organisme de l'infection (**Marolleau et al., 2013**).

Une certaine variabilité des répétitions est observable, la première répétition se démarquant particulièrement des autres ; ladite variabilité semble être expliquée par les gènes liés à la voie des phénylpropanoïdes (*PAL, CHS, DFR*). Ces gènes étant fortement dépendants de la luminosité, il est probable que les conditions d'ensoleillement furent plus fortes dans les deuxième et troisième répétitions – effectuées plus tard dans l'année, lorsque la luminosité fut plus intense – ce qui expliquerait donc leur forte induction.

Parmi les produits candidats testés, le Limocide semble se démarquer en stimulant de manière significative plusieurs gènes de défenses du pommier, principalement ceux liés aux protéines PR, mais aussi FAR ou BIS2, ce dernier étant un autre gène de la voie des phénylpropanoïdes conduisant à la synthèse des phytoalexines du pommier.

Les résultats obtenus avec ce produit en matière de stimulation de défenses de plante sont certes légèrement moins intenses que ceux observables avec le Bion, la valeur haute ; cependant, le Limocide est utilisable en agriculture biologique, contrairement au Bion. Cette préparation à base d'huiles essentielles d'orange douce est par ailleurs classée comme faiblement toxique selon le classement OILB (*Organisation Internationale de Lutte Biologique*) européen (**Groupe Saoas, 2018**). Cela en fait donc un candidat intéressant, non seulement pour lutter contre le puceron cendré, mais également contre d'autres bioagresseurs.





**Fig.26** : Schéma d'un dispositif d'électropénétrographie ou EPG.

Concernant *D. plantaginea*, il n'a pas pu être démontré que le Limocide appliqué de manière préventive ait un effet significatif sur ses traits d'histoire de vie dans les conditions d'expérimentation de cette étude. Les gènes de défense stimulés par ce produit n'affecteraient donc pas *D. plantaginea* de manière notable, ou le seraient de manière insuffisante. Il est à noter que le Bion, qui induit les mêmes gènes de manière plus intense, est capable de limiter le développement du puceron cendré (**Warneys et al, 2018**) ; il pourrait être ainsi pertinent de refaire l'expérience avec 3 pulvérisations (au lieu de 2) espacées d'une semaine (au lieu de 3 jours) afin d'observer si un éventuel effet du Limocide appliqué en préventif est notable.

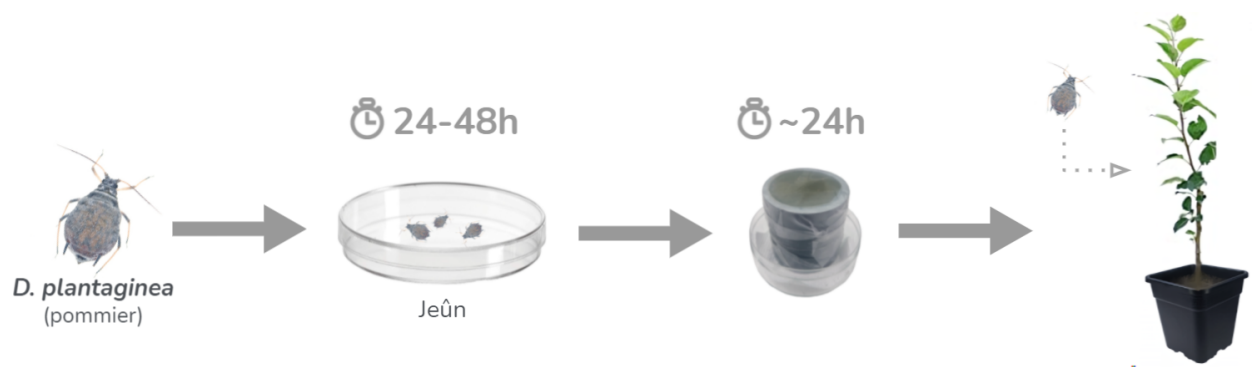
Il pourrait être intéressant de compléter les tests portant sur les traits d'histoire de vie avec une technique étudiée au cours de ce stage : l'électropénétrographie, ou EPG. Cette technique permet d'enregistrer en continu le comportement de piqûre et d'ingestion, mais aussi de savoir quelles parties de la plante les stylets du puceron ont atteint, s'il y a eu dégustation, pénétration, salivation, ingestion, etc. (**Vilcinskis, 2016**).

L'EPG consiste donc à inclure un puceron dans un circuit électrique, avec un courant continu de très grande résistance et de très faible intensité (**Fig.26**). Les tarsi du puceron ne sont pas conducteurs ; ainsi, lorsqu'il ne pique pas, le circuit reste ouvert. En revanche, les liquides contenus dans les canaux alimentaires et salivaires de son rostre étant conducteurs, lorsque le puceron pique la plante, le circuit se ferme et le courant va passer. En fonction du comportement de piqûre, le voltage va varier, provoquant des *waveforms* caractéristiques ; ces derniers vont alors être enregistrés pour être analysés afin de retracer le comportement alimentaire du puceron étudié.

Malgré la vraisemblable absence d'effet du Limocide appliqué en préventif sur la fécondité et le développement larvaire de *D. plantaginea*, il est possible que ce produit ait des effets plus subtils, par exemple sur le comportement d'alimentation du puceron. Au-delà de la recherche d'effets possiblement applicables en conditions réelles, les informations peuvent toujours être intéressantes à obtenir d'un point de vue plus fondamental.

Concernant l'étude olfactométrique du comportement de *D. plantaginea* vis-à-vis du Limocide, le produit en question n'a eu aucun effet attractif ni répulsif sur cette espèce de puceron à 1% et 10%. Il serait possible que ces concentrations saturent les récepteurs olfactifs de *D. plantaginea* et donc soient trop élevées pour permettre au puceron de détecter correctement les composés volatils. En revanche, un léger effet répulsif a été observé à 0.1%, mais aucun n'a été constaté à 1% laissé à évaporer 3 jours, modalité censée imiter les conditions de traitement en serres. Étonnamment, ces résultats ne semblent donc pas se rapprocher de ceux obtenus pour la concentration à 0.1%. Il pourrait être intéressant de tester une concentration d'autant plus faible, telle que 0.01%, afin d'essayer d'estimer une plage de concentration de Limocide idéale favorisant un comportement de répulsion de la part de *D. plantaginea*.

La capacité de répulsion de l'huile essentielle d'orange a par ailleurs déjà été testée, comme sur l'aleurode du citronnier *Aleurocanthus spiniferus* sur plantes ornementales (**Mokrane et al., 2020**) ou bien la mouche domestique *Musca domestica* (**Chauhan et al., 2018**). Ladite huile essentielle est principalement composée de monoterpènes, plus particulièrement de D-limonène (65-80%) mais aussi de  $\beta$ -pinène (2-6%), de 3-carène (0,4-4%), de  $\beta$ -phellandrène (0.5-2%), et de linalol (0,3-2%) (**Chauhan et al., 2018**).



**Fig.27** : Exemple de protocole alternatif à tester concernant les essais sur milieux artificiels.

Il est cependant important de noter qu'au verger, les doses des composés volatils du Limocide seraient fortement difficiles à estimer. Si davantage de tests effectués avec des doses encore plus faibles s'avèrent répulsifs, cet aspect peut être intéressant pour la lutte contre *D. plantaginea*. Si seule la dose de 0.1% est répulsive, il n'est pas réellement envisageable de compter sur cet effet en conditions naturelles.

L'élevage de pucerons sur milieu artificiel est une méthode qui permettrait de tester directement par ingestion l'effet d'une molécule donnée sur le développement ou le comportement du puceron étudié (**Van Emden, 2009 ; Vilcinskis, 2016**). Il s'avère cependant qu'il est difficile d'élever *D. plantaginea* avec cette technique ; ceux-ci y présentent un développement fortement ralenti voire halté, ainsi qu'une mortalité conséquente. Le maintien des pucerons sur le long terme est peu envisageable, la durée optimale dudit maintien se situant autour de 2-3 jours, jusqu'à 5 maximum.

Ce type d'expérimentation est également fortement lourd logistiquement parlant. En effet, le communément employé milieu AP3 est fastidieux à préparer de par sa longue liste de composants ; aussi, la mise en place des rings et le changement régulier des milieux est chronophage mais également susceptible de blesser ou stresser les pucerons. Il est complexe de mettre en place des rings avec des populations comparables ; les adultes aptères se fixent difficilement et meurent généralement en moins de 24h, et introduire directement au pinceau de jeunes larves est long ainsi que très délicat, ces derniers étant particulièrement fragiles.

Pour obtenir des résultats statistiquement pertinents, l'idéal serait d'être en mesure d'entretenir bon nombre de rings contenant des populations identiques pour chaque modalité testée. Cependant, ce type d'expérimentation serait lourd à mettre en place et fournirait des résultats potentiellement médiocres. Ainsi, au cours de cette étude, il n'a pas été envisageable de tester l'effet de toxicité par ingestion du Limocide sur *D. plantaginea* par cette méthode.

Une alternative potentiellement intéressante à tester serait de faire jeûner pendant 24 à 48h les pucerons dans une boîte de Pétri contenant un papier imbibé d'eau pour empêcher leur dessèchement, puis de les introduire dans des rings à milieux artificiels avec la molécule à tester pendant, par exemple, 24h. Les pucerons s'étant nourris du milieu seraient donc encore vivants, tandis que ceux étant encore restés à jeûn auraient fini par mourir de faim. Après ce délai, les pucerons seraient alors redéposés sur des pommiers sains non traités (**Fig.27**).

Les données obtenues à l'issue du test de toxicité par contact dénotant d'une mortalité immédiate à 100% de *D. plantaginea* sont en accord avec ce qui est retrouvé dans la littérature scientifique. En effet, l'effet de toxicité par contact d'huiles essentielles d'orange sur quelques espèces de pucerons comme *Myzus Persicae*, *Acyrtosiphon pisum* ou *Aphis fabae* a déjà été observé, avec une mortalité autour de 70% après 24h (**Al-Antary et al., 2018 ; Chaieb et al., 2018**). Ce même effet a aussi été étudié sur le puceron du cotonnier *Aphis gossypii* avec une vitesse d'action similaire au flonicamide et au spirotétramate, deux insecticides synthétiques conventionnels utilisés contre les pucerons sur cultures ornementales, menant à une réduction de 98% des effectifs (**Smith et al., 2018**). Sur *M. domestica* et la blatte germanique *Blattella germanica* est observé un effet "knock-down" où les insectes s'arrêtent immédiatement de bouger et finissent par mourir rapidement, avec des pertes de liquides considérables (**Karr et Coats, 1988**).



Le Limocide a effectivement été homologué en tant qu'insecticide et fongicide biologique sur plusieurs cultures et agirait par contact sur bon nombre de bioagresseurs tels que la mouche blanche, le mildiou, le psylle, les acariens, les thrips, l'oïdium, etc. En France, le Limocide ne semble être homologué uniquement pour un usage envers *Aphis sp* sur arbres et arbustes (E-Phy, 2020). Selon la firme, le produit agirait sur les ravageurs en déshydratant leur cuticule ; les terpènes présents dans l'huile essentielle d'orange douce dégradent les phospholipides constituant ladite cuticule, qui finit par se rompre. L'insecte va alors subir une "brûlure" et finir par se dessécher (Encyclop'Aphid, 2010-2018 ; Groupe Saoas, 2018).

Cependant, il semblerait ici que le Limocide ait eu un effet intense et immédiat, comparable à ce que l'on pourrait retrouver pour des insecticides neurotoxiques de synthèse. Il serait peut-être pertinent d'étudier davantage le Limocide pour préciser cet aspect immédiat (*Vitesse d'action du Limocide, étude du comportement de D. plantaginea et de sa vitesse de mortalité, de son déplacement...*). Il est néanmoins à noter que l'usage du Limocide en tant qu'insecticide par contact en conditions réelles, c'est-à-dire en verger de pommiers, peut s'avérer relativement complexe. Effectivement, les pseudogalles formées par *D. plantaginea* peuvent protéger efficacement les colonies de ce type d'intrant.

## Conclusion

Ainsi, à travers cette étude a été mis en avant le Limocide, un produit naturel non préoccupant à base d'huiles essentielles d'orange douce. Il a ici été montré que ce produit, outre ses propriétés insecticides connues par contact (et vérifiées ici sur *D. plantaginea*), possède la capacité de stimuler certains gènes de défense du pommier de manière significative et reproductible, mais dénote également un effet répulsif à une concentration de 0.1%. Ce cumul de propriétés pourrait en faire un candidat intéressant pour la protection des vergers de pommiers, avec des effets à la fois préventifs et curatifs.

Il est cependant important de noter qu'à d'autres concentrations, le Limocide ne semble pas avoir d'effet olfactif particulier sur *D. plantaginea* ; employer ce produit en tant que répulsif semble donc difficilement envisageable en conditions réelles. En effet, la lutte par usage de composés volatils est délicate à mettre en place car un dosage précis est requis pour permettre aux ravageurs de détecter les composés en question ; une concentration trop faible peut passer inaperçue, tandis qu'une trop élevée peut saturer les récepteurs olfactifs de l'insecte (Webster, 2012 ; Badji et al., 2021).

Tel quel, le protocole d'élevage sur milieu artificiel est encore peu envisageable d'utilisation ; cependant, apporter des modifications à celui-ci pour éventuellement le perfectionner pourrait non seulement permettre d'observer si le Limocide possède un effet de toxicité par ingestion sur *D. plantaginea*, mais aussi de disposer d'une nouvelle technique pouvant être appliquée ultérieurement sur d'autres produits à étudier.

Même s'il n'a pas été possible de démontrer dans ces conditions d'expérimentation que l'effet SDP du Limocide interfère sur les traits d'histoire de vie de *D. plantaginea*, cette piste reste à creuser, notamment en travaillant sur les conditions d'application pour améliorer l'élicitation des gènes. Les SDP ayant un large spectre d'action, il serait intéressant d'étudier l'effet préventif du Limocide sur d'autres bioagresseurs du pommier, notamment *Erwinia amylovora*,



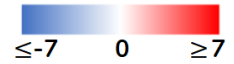
l'agent du feu bactérien, ou *Venturia inaequalis*, l'agent de la tavelure, pour lesquels le Bion a déjà démontré des capacités de protection (**Brisset, 2000 ; Johnson et al., 2016**). Dans le cadre du Cap Zéro Phyto, l'équipe ResPom mène actuellement des études sur les éventuelles capacités de protection du Limocide vis-à-vis de ces deux agents sur semis de pommier.

L'effet de toxicité par contact immédiat et puissant dit "*knock-down*" du Limocide semble être très pertinent à explorer pour lutter contre *D. plantaginea*, mais aussi contre d'autres insectes ravageurs, celui-ci étant déjà homologué pour un certain nombre d'entre eux (**Groupe Saoas, 2018**). Il est néanmoins essentiel de noter que ce type de produit possède sûrement un effet tout aussi nocif sur les auxiliaires de cultures ; les substances insecticides par contact doivent donc être employées avec parcimonie et en connaissance des cycles de vie de ces auxiliaires, en plus de ceux des ravageurs, afin de minimiser leur impact néfaste sur la biodiversité des parcelles cultivées et leurs alentours.

Le Limocide s'avère ainsi être un produit prometteur méritant d'être davantage étudié ; sans pour autant permettre de totalement supprimer l'usage de produits phytosanitaires, il pourrait représenter une solution favorisant la diversification des traitements, ou bien être employé en tant qu'insecticide en espaces verts et jardins où les produits de synthèse sont interdits.



# Annexe



Exp	H2O2	Protéines PR ou assimilées								Métabolisme secondaire								Stress oxydant			Modif. paroi			Voies de signalisation								
		PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR10	AGG	PAL	CHS	DFR	BIS2	PPO	HMGR	FPPS	Far	CSL	Apox	GST	POX	CaS	Pect	CAD	EDS1	WRKY	Lox2	JAR	ACCO	EIN3		
Alterfructus	2	-	0	-3	0	0	0	2	-1	-5	3	7	5	-3	-3	1	1	1	0	1	0	1	-2	1	1	-4	-5	0	1	1	0	
	2	+	0	-3	0	-3	-2	-2	-2	-4	1	0	3	-2	-2	0	0	1	-1	0	-1	-1	-2	-2	0	-2	-2	0	0	-2	-1	
	3	-	0	0	-1	-1	-1	0	0	-3	2	5	2	-2	-2	0	0	1	0	1	-1	-1	-2	-2	0	-1	-2	0	0	-6	-2	
Argile sulfurée	1	-	-3	-4	1	2	1	4	2	-3	-1	3	1	-1	-1	0	1	3	0	1	2	1	-1	0	1	-1	1	1	0	0		
	1	+	-2	-5	2	0	-3	-2	0	-4	1	-1	0	-3	0	-3	0	2	-1	-3	0	-3	0	-5	0	-1	-1	-4	-1	-1	-1	
	2	-	1	0	1	-2	0	2	2	-1	2	3	4	-1	-2	0	0	1	0	0	0	0	-2	2	0	0	0	0	0	0	-1	0
Bion	2	+	-1	-3	0	-3	-1	-1	-2	-5	1	2	3	-2	-2	0	-1	0	-1	0	-1	-1	-1	-2	-1	0	-2	-4	0	0	-2	-1
	3	-	1	-1	1	-1	-1	1	-2	-1	1	5	2	0	-4	0	0	2	-1	1	0	-2	-2	1	0	-2	-1	0	0	-2	-1	
	3	-	-4	-4	2	-1	-2	-1	-1	-4	1	3	2	-4	-3	0	0	2	-1	1	0	-2	-2	0	-1	0	-1	0	-1	0	-1	-2
Equisetum	1	-	9	3	5	2	3	8	5	5	0	1	1	8	0	2	1	5	2	1	2	2	-1	3	1	3	4	0	1	1	0	
	1	+	9	6	8	3	5	8	6	10	0	0	1	10	0	2	1	6	4	0	3	2	-1	3	1	3	5	0	0	1	1	0
	2	-	3	4	3	3	1	1	-1	10	2	5	4	-1	-2	2	0	6	1	0	0	0	-1	0	0	2	0	0	0	0	-2	0
GreenFlash	2	+	4	4	3	4	3	4	2	7	2	6	5	3	-2	2	1	5	1	1	1	1	-1	2	1	3	1	0	1	-1	1	
	3	-	4	4	0	4	1	4	2	0	2	5	2	-1	-3	2	1	5	0	1	1	1	-1	2	1	2	1	0	0	0	0	
	2	-	-2	0	1	2	-1	3	0	-3	2	6	3	2	-2	0	0	1	0	0	-1	-2	2	1	-4	-1	0	0	1	1	0	0
HE-TAV	2	-	-5	-3	-1	0	-1	0	0	-4	0	4	1	-3	-3	0	-1	2	-1	1	0	-2	-2	0	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-5	-2
	3	-	2	-3	1	0	1	1	-1	-2	0	4	1	1	-4	-1	-1	1	-1	0	-1	-1	-3	-3	0	-1	0	-1	-1	-1	-6	-2
	1	-	2	-1	0	0	2	1	-2	-2	-1	0	1	0	1	0	1	0	-1	0	1	0	-1	0	1	0	0	1	1	1	1	-1
K-WIN	1	+	-2	-6	1	1	-4	3	2	-2	2	-1	1	1	-1	-4	2	2	-1	-4	1	1	0	-4	1	1	0	0	-4	0	-1	0
	2	-	3	-1	2	0	0	3	1	-5	2	5	4	1	0	0	-1	-1	0	0	0	0	-2	0	0	-1	0	-1	0	2	-1	
	2	+	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-4	2	2	4	-1	-1	0	-1	0	0	0	0	0	-2	2	1	0	-1	0	0	0	0	0
Kanne Brottrunk	3	-	-1	-4	0	3	-2	0	-5	1	3	1	-1	-3	0	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	-1	-3	0	1	0	0	
	1	-	0	-1	3	2	2	4	3	-2	0	0	2	5	1	1	0	1	1	1	1	2	3	-1	2	1	0	0	1	0	2	0
	1	+	-5	0	1	-1	0	3	1	-3	-1	-1	1	-2	0	1	-2	0	1	1	1	-1	0	2	1	-1	-3	0	1	0	0	0
KHI2	2	-	1	1	2	-1	1	3	1	2	2	6	4	0	-1	1	0	4	0	0	2	-1	1	1	1	1	-1	0	0	0	0	
	2	+	-5	-5	0	-2	0	1	-2	-4	2	6	4	-2	-3	1	0	1	0	0	0	0	-1	-1	0	-1	-1	0	0	-2	-1	
	3	-	2	-5	1	0	0	4	1	-1	1	4	2	0	-3	0	0	1	0	0	1	1	-1	-3	0	-2	-2	0	0	0	-7	-1
Limocide	3	-	4	0	2	0	1	4	2	0	1	4	2	-1	-4	0	2	0	0	2	1	-1	0	1	0	-3	0	0	-1	-1		
	1	-	-1	-3	0	0	0	-1	-1	-3	0	5	1	0	-1	0	0	2	0	1	1	-1	-1	0	-1	1	1	0	0	1	2	0
	1	+	-2	-1	0	0	1	2	0	0	1	0	1	-1	-1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-1	1	0	-1
Procrop	2	-	-1	2	1	0	0	2	0	-4	2	6	4	0	-2	1	1	3	0	1	0	1	-1	3	2	1	-1	1	2	0	0	
	2	+	1	1	3	0	3	8	1	-4	2	6	4	-1	-1	1	1	2	1	1	2	2	-1	4	2	0	0	1	1	0	1	0
	3	-	1	0	0	1	1	3	1	-5	1	5	3	-2	-3	1	0	4	0	1	0	1	-1	2	1	0	-2	0	1	0	0	0
Qap	1	-	5	-3	4	0	2	4	3	6	0	4	1	6	-1	0	1	3	1	0	2	2	-1	1	1	0	1	1	0	0	-1	
	1	+	4	1	4	0	2	4	2	5	-1	3	1	3	0	0	1	3	1	0	-2	1	-1	0	0	0	1	0	0	0	-1	-1
	2	-	1	0	5	0	3	7	3	4	2	1	4	6	0	1	0	3	3	0	2	3	-1	2	1	1	2	0	1	0	0	0
Salix	2	+	3	0	2	-1	1	3	2	6	2	6	3	-2	-2	1	2	1	0	1	1	-1	1	1	0	0	0	0	0	-1	0	
	3	-	4	2	4	0	2	5	3	4	0	4	2	5	-2	0	-1	2	1	1	1	1	-2	-2	0	-1	2	0	0	-6	-1	
	3	-	6	1	4	1	2	4	2	5	1	4	2	5	-3	0	0	2	1	1	1	1	-2	-2	0	0	1	-1	0	-6	-1	
Eau	1	-	3	-1	1	-1	0	2	0	1	0	1	2	2	-2	-1	0	1	0	-1	1	0	-1	1	1	-1	-1	0	0	0	-1	
	1	+	2	-3	3	2	1	3	1	7	2	1	-2	4	-2	0	-2	2	1	0	-1	1	1	-1	1	1	-1	4	0	-2	0	1
	2	-	3	2	2	0	1	1	0	5	3	3	4	2	-3	1	0	2	1	1	0	2	-1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Non traités	2	+	0	-3	1	0	0	2	2	-1	2	2	3	1	5	0	2	0	2	1	0	-1	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	
	3	-	1	-3	1	3	-1	1	-1	0	1	4	1	3	-3	0	0	2	1	1	0	-1	-2	0	-4	-1	0	-1	-5	-1		
	3	-	1	0	2	0	0	1	0	0	1	6	2	1	-4	0	-1	1	-1	1	0	1	-2	-1	0	0	0	0	0	0	-2	-1

Ann.1 : "Heatmap" regroupant toutes les données obtenues par qPFD.

Expression relative de 29 gènes de défense du pommier en fonction de différentes modalités de traitement, calibrées par rapport à celles de l'échantillon Calibrateur de la 1<sup>ère</sup> répétition. Les données sont exprimées en log2 d'expression. Plus cette valeur est élevée, plus les gènes sont exprimés ; plus elle est faible, plus ils sont réprimés.

# Références bibliographiques

Agrifind (s.d). *Les stimulateurs de défense des plantes*. Agrifind. [www.agrifind.fr/les-stimulateurs-de-defense-des-plantes](http://www.agrifind.fr/les-stimulateurs-de-defense-des-plantes)

Akey, D.H., Beck, S.D., 1975. *Programmable automated system for continuous rearing of the pea aphid, Acyrthosiphon pisum, on holidic diets*. Entomol. Exp. App. 18, 1–16.

Al-Antary, T.M., Ateyyat, M.A., Belghasem, I., Alaraj, S.A., 2018. *Aphicidal activity of orange oil to the green peach aphid Myzus persicae sulzer (Homoptera : Aphididae)*. Fresenius Environmental Bulletin 27, 1038–1042.

Asselin, A., 1993. *Quelques enzymes végétales à potentiel antimicrobien*. Phytoprotection 74(1), 3–18.

Auclair, J.L., 1965. *Feeding and nutrition of the pea aphid, Acyrthosiphon pisum (Homoptera: Aphididae), on chemically defined diets of various pH and nutrient levels*. Ann. Entomol. Soc. Am. 58, 855–875.

Auclair, J.L., 1967. *Effects of pH and sucrose on rearing the cotton aphid, aphis gossypii, on a germ-free and holidic diet*. J. Ins. Physiol 13, 431–446.

Badji, C.A., Sol-Mochkovitch, Z., Fallais, C., Sochard, C., Simon, J.-C., Outreman, Y., Anton, S., 2021. *Alarm Pheromone Responses Depend on Genotype, but Not on the Presence of Facultative Endosymbionts in the Pea Aphid Acyrthosiphon pisum*. Insects 12(1), 13p.

Baker, A.C., Turner, W.F., 1916. *Rosy apple aphid*. Journal of Agricultural Research 7, 321–343.

Blommers, L.H.M., Helsen, H.H.M., Vaal, F.W.N.M., 2004. *Life history data of the rosy apple aphid Dysaphis plantaginea (Pass.) (Homopt., Aphididae) on plantain and as migrant to apple*. Journal of Pest Science 77, 155–163.

Bonnemaison, L., 1959. *Le puceron cendré du pommier (Dysaphis plantaginea Pass.) Morphologie et biologie – Méthodes de lutte*. Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Série C, Epiphyties III, 257–322.

Brest, O., 1997. *Puceron cendré: les solutions bio*. Alter Agri 25, 16-19.

Brisset, M.-N., Cesbron, S., Thomson, S.V., Paulin, J.-P., 2000. *Acibenzolar-S-methyl Induces the Accumulation of Defense-related Enzymes in Apple and Protects from Fire Blight*. European Journal of Plant Pathology volume 106, 529–536.

Campbell, N.A., Reece, J.B., 2012. *Biology* (9ème éd.) Boston: Benjamin Cummings / Pearson.

Carolan, J.C., Fitzroy, C.I.J., Ashton, P.D., Douglas, A.E., Wilkinson, T.L., 2009. *The secreted salivary proteome of the pea aphid Acyrthosiphon pisum characterised by mass spectrometry*. Proteomics 9, 2457–2467.

Chaieb, I., Zarrad, K., Sellam, R., Tayeb, W., Ben Hammouda, A., Laarif, A., Bouhachem, S., 2018. *Chemical composition and aphicidal potential of Citrus aurantium peel essential oils*. Entomologia Generalis 37, 63–75.

Chauhan, N., Malik, A., Sharma, S., 2018. *Repellency potential of essential oils against housefly, Musca domestica L.* Environ Sci Pollut Res 25, 4707–4714.

Cherqui, A., Tjallingii, W.F., 2000. *Salivary proteins of aphids, a pilot study on identification, separation, and immunolocalization*. J. Ins. Physiol. 46, 1177–1186

- Cloutier, C., Mackauer, M., 1975. *A modified technique for rearing of the pea aphid on artificial diets*. Short communications. 2p.
- Colomb, M., 2017. *Les méthodes de lutte alternatives contre le puceron cendré (Dysaphis plantaginea) chez le pommier*. Rapport Raison'Alpes. 63p.
- Dib, H., 2010. *Rôle des ennemis naturels dans la lutte biologique contre le puceron cendré, Dysaphis plantaginea Passerini (Hemiptera aphididae) en vergers de pommiers*. Sciences agricoles. 253p.
- Ebel, J., Cosio, E.G., 1994. *Elicitors of plant defense responses*. International Review of Cytology 148, 1–36.
- ÉcophytoPIC Levier "Produits de biocontrôle", 2017 (Dernière mise à jour : 2020). *Stimulation des défenses naturelles des végétaux cultivés*. ÉcophytoPIC. [www.ecophytopic.fr/pic/proteger/stimulation-des-defenses-naturelles-des-vegetaux-cultives](http://www.ecophytopic.fr/pic/proteger/stimulation-des-defenses-naturelles-des-vegetaux-cultives) (Consulté le 12/02/2021)
- E-Phy, 2020. *LIMOCIDE J VIVAGRO*. E-Phy en partenariat avec Anses. [ephy.anses.fr/ppp/limocide-j](http://ephy.anses.fr/ppp/limocide-j) (Consulté le 07/06/2021)
- Escobar Gutiérrez A.J., Gaudillère, J.P., 1996. *Distribution, métabolisme et rôle du sorbitol chez les plantes supérieures*. Synthèse. Agronomie 16, 281–298.
- "FAOSTAT", 2013. [faostat3.fao.org](http://faostat3.fao.org) (Consulté le 12/01/2021)
- Febvay, G., Pageaux, J.F., Bonnot, G., 1992. *Lipid composition of the pea aphid, Acyrthosiphon pisum (Harris) (Homoptera: Aphididae), reared on host plant and on artificial media*. Insect Biochemistry and Physiology 21, 103–118.
- Febvay, G., Rahbé, Y., Rynkiewicz, M., Guillaud, J., Bonnot, G., 1999. *Fate of dietary sucrose and neosynthesis of amino acids in the pea aphid, Acyrthosiphon pisum, reared on different diets*. The Journal of Experimental Biology 202, 2639–2652.
- Görg, L.M., Gallinger, J., Gross, J., 2021. *The phytopathogen 'Candidatus Phytoplasma mali' alters apple tree phloem composition and affects oviposition behavior of its vector Cacopsylla picta*. Chemoecology 31, 31–45.
- Groupe Saoas, 2018. *LIMOCIDE*. Groupe Saoas, en partenariat avec Vivagro. [www.groupesaoas.com/limocide-p58.html](http://www.groupesaoas.com/limocide-p58.html) (Consulté le 26/05/2021)
- Gullan, P.J., Martin, J.H., 2009. *Sternorrhyncha*. Encyclopedia of Insects, 957–967.
- Hallmann, C.A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H., Stenmans, W., Müller, A., Sumser, H., Hörden, T., Goulson, D., Kroon, H. de, 2017. *More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas*. PLOS ONE 12, 21p.
- Hamilton, M.A., 1930. *Notes on the culturing of insects for virus work*. Ann. Appl. Biol. 17, 487–492.
- Hamilton, M.A., 1935. *Further experiments on the artificial feeding of Myzus persicae (Sulz.)*. Ann. Appl. Biol. 22, 243–258.
- Harrewijn, P., 1973. *Functional significance of indole alkylamines linked to nutritional factors in wing development of the aphid Myzus persicae*. Entomol. Exp. App. 16, 499–513.
- Hewer, A., Will, T., Van Bel, A.J.E., 2010. *Plant cues for aphid navigation in vascular tissues*. J. Exp. Biol. 213, 4030–4042.

- Hewer, A., Becker, A., Van Bel, A.J.E., 2011. *An aphid's Odyssey – the cortical quest for the vascular bundle*. J. Exp. Biol. 214, 3868–3879.
- Hoang, M.G., Dung, D.T., 2013. *Responses of the pea aphid, Acyrthosiphon pisum to artificial diet at different temperatures*. Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences 19, 77–86.
- Johnson, K.B., Smith, T.J., Temple, T.N., Gutierrez, E., Elkins, E.B., Castagnoli, S.P., 2016. *Integration of acibenzolar-S-methyl with antibiotics for protection of pear and apple from fire blight caused by Erwinia amylovora*. Crop Protection 88, 149–154.
- Karr, L.L., Coats, J.R., *Insecticidal Properties of d-Limonene*. Journal of Pesticide Science 13, 287–290.
- Kehrli, P., Wyss, E., 2001. *Effects of augmentative releases of the coccinellid, Adalia bipunctata, and of insecticide treatments in autumn on the spring population of aphids of the genus Dysaphis in apple orchards*. Entomol. Exp. App. 99, 245–252.
- Kollar, A., Seemüller, E., 1990. *Chemical Composition of Phloem Exudate of Mycoplasma-infected Apple Trees*. J. Phytopathology 128, 99–111.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. METHODS 25, 402–408.
- Malone, M., Watson, R., Pritchard, J., 1999. *The spittlebug Philaenus spumarius feeds from mature xylem at the full hydraulic tension of the transpiration stream*. New Phytol. 143, 261–271.
- Marolleau, B., Staub, J., Barrière, Q., Indiana, A., Gravouil, C., Chartier, R., Heintz, C., Devaux, M., Tharaud, M., Paulin, J.P., Dugé de Bernonville, T., Brisset, M.N., 2013. *La qPFD, un outil de criblage des SDP alias stimulateurs de défense des plantes*. Phytoma 664, 42–45.
- Miñarro, M., Hemptinne, J-L., Dapena, E., 2005. *Colonization of apple orchards by predators of Dysaphis plantaginea: sequential arrival, response to prey abundance and consequences for biological control*. Biocontrol 50, 403–414.
- Miñarro, M., Dapena, E., 2007. *Resistance of apple cultivars to Dysaphis plantaginea (Hemiptera: Aphididae): role of tree phenology in infestation avoidance*. Environmental Entomology 36, 1206–1211.
- Mittler, T.E., Dadd, R.H., 1962. *Artificial feeding and rearing of the aphid, Myzus persicae (Sulzer), on a completely defined synthetic diet*. Nature, Lond. 195, 404.
- Mittler, T.E., 1970. *Effects of dietary amino acids on the feeding rate of the aphid Myzus persicae*. Entomol. Exp. Appl. 13, 432–437.
- Mittler, T.E., 1972. *Interactions between dietary components*. Proc. Int. Conf. Insect and Mite Nutrition, 575–588.
- Mokrane, S., Cavallo, G., Tortorici, F., Romero, E., Fereres, A., Djelouah, K., Verrastro, V., Cornara, D., 2020. *Behavioral effects induced by organic insecticides can be exploited for a sustainable control of the Orange Spiny Whitefly Aleurocanthus spiniferus*. Nature Scientific Reports 10, 12p.
- Nürnbergger, T., 1999. *Signal perception in plant pathogen defense*. Cellular and Molecular Life Sciences 55(2), 167–182.
- Pettersson, J., 1970. *An Aphid Sex Attractant*. Insect Systematics & Evolution 1, 63–73.

- Quero., A., 2015. *Étude du contrôle biologique du ravageur Dysaphis plantaginea en verger cidricole par son cortège d'auxiliaires, en lien avec les infrastructures dites agro-écologiques et les pratiques agricoles*. Sciences Agricoles. 92p.
- Robert, P., Braud, F., Aligon, S., Brisset, M.N., 2016. *DL-β-Aminobutyric acid application negatively affects reproduction and larval development of the rosy apple aphid, Dysaphis plantaginea, on apple*. Entomol. Exp. App. 159, 46–53.
- Smith, G.H., Robert, J.M., Popeb, T.W., 2018. *Terpene based biopesticides as potential alternatives to synthetic insecticides for control of aphid pests on protected ornamentals*. Crop Protection 110, 125–130.
- Spiller, N.J., Koenders, L., Tjallingii, W.F., 1990. *Xylem ingestion by aphids – a strategy for maintaining water balance*. Entomol. Exp. App. 55, 101–104.
- Strong, F.E., 1964. *The effects of nitrogen starvation on the concentration of free amino acids in Myzus persicae (Sulzer) (Homoptera, Aphidae)*. J. Ins. Physiol 10, 519–523.
- Syngenta, 2019. *Biocontrôle & produits biologiques : faire la différence*. Syngenta. [www.syngenta.fr/agriculture-durable/bonnes-pratiques-agricoles/article/biocontrôle-et-produits-biologiques](http://www.syngenta.fr/agriculture-durable/bonnes-pratiques-agricoles/article/biocontrôle-et-produits-biologiques) (Consulté le 12/01/2021)
- Toledo-Hernández, E., Hernández-Velázquez, V.M., Peña-Chora, G., 2018. *An artificial diet for the sugarcane aphid (Melanaphis sacchari Zehntner) (Hemiptera: Aphididae) with potential uses for in vitro toxicological studies*. Florida Entomologist 101, 395–398.
- Turpeau, E., Hullé, M., Chaubet, B., 2010 (Dernière mise à jour : 2018). *Qu'est-ce qu'un puceron? – Cycles biologiques*. Encyclop'Aphid. [www6.inrae.fr/encyclopedie-pucerons/Qu-est-ce-qu-un-puceron/Cycles-biologiques](http://www6.inrae.fr/encyclopedie-pucerons/Qu-est-ce-qu-un-puceron/Cycles-biologiques) (Consulté le 07/01/2021)
- Turpeau, E., Hullé, M., Chaubet, B., 2015 (Dernière mise à jour : 2018). *Fiche d'identification – Dysaphis (Pomaphis) plantaginea (Passerini, 1860)* [www6.inrae.fr/encyclopedie-pucerons/Especies/Pucerons/Dysaphis/D.-plantaginea/Fiche-d-identification](http://www6.inrae.fr/encyclopedie-pucerons/Especies/Pucerons/Dysaphis/D.-plantaginea/Fiche-d-identification) (Consulté le 07/01/2021)
- Van Emden, H., 2009. *Artificial diet for aphids - Thirty year's experience*. Redia 92, 163–167.
- Vilcinskas, A., 2016. *Biology and Ecology of Aphids*. CRC Press.
- Vincent, C., Panneton, B., 2001. *Les méthodes de lutte physique comme alternatives aux pesticides*. Vertigo - Rev. Électronique en Sci. Environ., Volume 2 Numéro 2.
- 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., Degrave, A., 2018. *Acibenzolar-S-Methyl Reprograms Apple Transcriptome Toward Resistance to Rosy Apple Aphid*. Front. Plant Sci. 9, Article 1795, 16p.
- Webster, B., 2012. *The role of olfaction in aphid host location*. Physiological Entomology 37, 10–18.
- Will, T., Hewer, A., Van Bel, A.J.E., 2008. *A novel perfusion system shows that aphid feeding behaviour is altered by decrease of sieve-tube pressure*. Entomol. Exp. Appl. 127, 237–245.

	<p><b>Diplôme et Mention :</b> Master Biologie, Agrosciences</p> <p><b>Parcours :</b> Master Amélioration, production, valorisation du végétal</p> <p><b>Option :</b> Fonctionnement et Gestion des Agrosystèmes</p> <p><b>Responsable d'option :</b> M. Carof</p>
<p><b>Auteur(s) :</b> Alisa HAMIDOVIĆ  <b>Date de naissance* :</b> 03/07/1997</p>	<p><b>Organisme d'accueil :</b> INRAE</p>
<p><b>Nb pages :</b> 26 pages numérotées + 7  <b>Annexe(s) :</b> 1</p>	<p><b>Adresse :</b> BP 35327 – Domaine de la Motte  au Vicomte – 35653 Le Rheu</p>
<p><b>Année de soutenance :</b> 2021</p>	<p><b>Maîtres de stage :</b> S. Anton, P. Robert</p>
<p><b>Titre français :</b> Criblage de produits SDP candidats et étude des effets d'un PNPP retenu, le Limocide, sur <i>Dysaphis plantaginea</i></p> <p><b>Titre anglais :</b> Screening of candidate elicitor products and study of the effects of a retained non-concerning natural product, Limocide, on <i>Dysaphis plantaginea</i></p>	
<p><b>Résumé (1600 caractères maximum) :</b></p> <p>Pour lutter contre le puceron cendré du pommier (PCP) <i>Dysaphis plantaginea</i>, l'application de produits de biocontrôle ou de produits naturels non préoccupants (PNPP) pourrait servir d'alternative à l'usage d'intrants écotoxiques. Ces produits peuvent opérer par contact, par ingestion, par inhalation ou par stimulation des défenses de la plante (SDP). Le 1<sup>er</sup> objectif de l'étude est de cribler par qPFD, un outil d'évaluation des SDP, une gamme de produits candidats sélectionnés en collaboration avec le CTIFL–La Morinière. Ce criblage a mis en avant le Limocide, un PNPP à base d'huiles essentielles d'orange douce capable de stimuler de manière significative et reproductible certains gènes de défense du pommier. Le 2<sup>ème</sup> objectif est de tester les effets du Limocide sur le PCP. En traitement préventif, ce produit ne semble pas avoir d'effet sur ses traits d'histoire de vie (<i>fécondité, développement larvaire</i>) : les défenses ici stimulées n'affecteraient donc pas le PCP de manière notable. Il a été observé par olfactométrie qu'il ne lui est ni attractif ni répulsif, sauf à [0.1%] où il est significativement répulsif. L'effet de toxicité par ingestion n'a pas pu être étudié, les milieux artificiels testés n'ayant pas permis le développement du PCP : ce protocole mérite une révision. Le Limocide est toxique au contact pour le PCP ; l'effet est immédiat et puissant (effet "knock-down"), entraînant une mortalité de 100% en 24h. Ce produit serait ainsi prometteur en tant qu'élliciteur de défense et insecticide par contact, non seulement sur le PCP mais aussi d'autres bioagresseurs.</p>	
<p><b>Abstract (1600 caractères maximum) :</b></p> <p>In order to control the rosy apple aphid (RAA) <i>Dysaphis plantaginea</i>, the use of biocontrol products or non-concerning natural products could be an alternative to the use of ecotoxic inputs. These products can act by contact, by ingestion, by inhalation or by stimulation of plant defenses (SPD). The 1<sup>st</sup> objective of this study is to screen via qPFD, a tool for evaluating SPD, a range of candidate products selected in collaboration with CTIFL–La Morinière. This screening highlighted Limocide, a product based on sweet orange essential oils, which is capable of stimulating some apple defense genes in a significant and reproducible manner. The 2<sup>nd</sup> objective was to test the effects of Limocide on RAA. Preventively applied, this product does not seem to have any effect on its life history traits (<i>fertility, larval development</i>): the induced defense genes therefore do not seem to significantly affect RAA. We observed by olfactometry that Limocide is neither attractive nor repellent, except at a dose of 0.1%, which is significantly repellent. The effect of toxicity by ingestion could not be tested, as the artificial diet-based rearing did not allow the development of RAA; protocols need to be revised. Limocide was found to be toxic against RAA by contact: the effect is immediate and powerful ("knock-down" effect), resulting in 100% mortality within 24 hours. Thus, this product seems promising as a plant defense elicitor and insecticide by contact, not only against PCP but perhaps also against other apple crop pests.</p>	
<p><b>Mots-clés :</b> <i>D. plantaginea</i> ; puceron cendré du pommier ; stimulateur ; défense des plantes ; Limocide ; ravageurs ; biocontrôle ; toxicité ; pommier</p> <p><b>Key Words:</b> <i>D. plantaginea</i> ; rosy apple aphid ; elicitor ; plant defenses ; Limocide ; pests ; biocontrol ; toxicity ; apple crop</p>	

\* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires