

Mémoire de stage

**Présenté pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome, option Inter-
Etablissement Protection des Plantes et Environnement**



Sur le thème

**Optimisation de la lutte biologique par micro-organismes contre le
carpocapse des pommes, *Cydia pomonella***

Par Flavie DELPECH

Ecole de rattachement : L'Institut Agro Montpellier

**Stage réalisé à : l'INRAE Centre de Recherche Provence-Alpes-Côte d'Azur, Unité Plantes
et Systèmes Horticoles, Domaine Saint Paul 228 route de l'Aérodrome Site Agroparc - CS
40509 84914 Avignon Cedex 9**

Sous l'encadrement de : Myriam SIEGWART, Sophie HARDY, Carine MESTRE

Tutrice pédagogique : Alice CHARALABIDIS

**Soutenu le 25 septembre 2024 à Montpellier, devant le jury composé de :
Alice CHARALABIDIS, Elena KAZAKOU, Anne LERALEC, Jean-
Claude STREITO**

Engagement de non plagiat

Engagement de non plagiat

✓ Principes

- Le plagiat se définit comme l'action d'un individu qui présente comme sien ce qu'il a pris à autrui.
- Le plagiat de tout ou parties de documents existants constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée
- Le plagiat concerne entre autres : des phrases, une partie d'un document, des données, des tableaux, des graphiques, des images et illustrations.
- Le plagiat se situe plus particulièrement à deux niveaux : Ne pas citer la provenance du texte que l'on utilise, ce qui revient à le faire passer pour sien de manière passive. Recopier quasi intégralement un texte ou une partie de texte, sans véritable contribution personnelle, même si la source est citée.

✓ Consignes

- Il est rappelé que la rédaction fait partie du travail de création d'un rapport ou d'un mémoire, en conséquence lorsque l'auteur s'appuie sur un document existant, il ne doit pas recopier les parties l'intéressant mais il doit les synthétiser, les rédiger à sa façon dans son propre texte.
- Vous devez systématiquement et correctement citer les sources des textes, parties de textes, images et autres informations reprises sur d'autres documents, trouvés sur quelque support que ce soit, papier ou numérique en particulier sur internet.
- Vous êtes autorisés à reprendre d'un autre document de très courts passages *in extenso*, mais à la stricte condition de les faire figurer entièrement entre guillemets et bien sûr d'en citer la source.

✓ Sanction

En cas de manquement à ces consignes, la DEVE/le correcteur se réservent le droit d'exiger la réécriture du document sans préjuger d'éventuelles sanctions disciplinaires.

Engagement :

Je soussigné Flavie DELPECH
Reconnait avoir lu et m'engage à respecter les consignes de non plagiat
A Avignon le 10/09/2024
Signature :

X

Flavie DELPECH

Fiche de confidentialité et d'autorisation de diffusion du mémoire

Confidentialité

Non Oui si oui : 1 an 5 ans 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible ⁽¹⁾.

Date et signature du **maître de stage** ⁽²⁾ : 10/09/2024

(ou de l'étudiant-entrepreneur)

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

Droits d'auteur

L'auteur⁽³⁾ **DELPECH Flavie**

autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si oui, il autorise

- la diffusion papier du mémoire uniquement(4)
- la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé
- la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)
 - accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-By-Nc-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

Date et signature de l'**auteur** : 10/09/2024

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

- la diffusion papier du mémoire uniquement(4)
- la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé
- la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'**enseignant** :

Remerciements

Je voudrais remercier en premier lieu Myriam Siegwart, Sophie Hardy et Carine Mestre mes maîtres de stage pour l'encadrement et l'apprentissage dont j'ai pu bénéficier durant ces 6 mois de stage. Vous avez su être disponibles, patientes et de bons conseils. J'ai beaucoup appris en travaillant avec vous.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du GRCETA pour leur accueil bienveillant et l'implication qu'ils ont portés au bon déroulement des expérimentations et du stage. Merci à vous, Pascal, Clément, Sandrine, Bruno, et les stagiaires Tiphaine et Alioscha qui sont venus prêter main forte pendant les manips.

Je remercie Jérôme Olivares pour son accompagnement et ses précieux conseils techniques et scientifiques.

Je remercie les techniciennes de laboratoire, Sandrine et Elodie pour leurs conseils et leur expertise qu'elles m'ont transmis pour assurer le maintien de l'élevage et les tâches quotidiennes à l'insectarium.

Je remercie également les personnes de PSH, permanents comme temporaires et stagiaires pour votre aide précieuse lors des manipulations : Léa, Catherine, Kenia, Hugo, Mathis, Paulo. Je vous remercie pour votre bonne volonté, votre sérieux et la bonne humeur que vous avez apporté à ces moments intenses de travail.

Je tiens à remercier également les membres de PSH comme Valérie, Claire, Catherine, Xavier et Filipa qui m'ont fourni des outils qui m'ont permis d'accomplir mes missions.

Je remercie chaleureusement Alexandre de PSH, pour sa bienveillance et ses bonnes idées quant à l'élaboration de prototypes et d'outils innovants.

Merci au chef d'exploitation de la Pugère Jean Philippe Poisot pour avoir pris de son temps pour mettre en place les essais.

Merci à Pierre Baby, thésard à l'Université d'Avignon et Nicolas Borowiec, de l'Institut Sophia Agrobiotech, pour l'envoi de matériel biologique.

Et enfin, merci aux stagiaires et aux thésards de PSH pour tous les bons moments passés ensemble, les sorties et les déjeuners partagés à la cantine de l'INRAE. Un clin d'œil particulier à Seo, mon collègue de bureau, pour sa joie de vivre et nos conversations productives.

Table des matières

Introduction

Synthèse bibliographique

- 1) *Cydia pomonella*, (Lépidoptères : Tortricidae), papillon ravageur des pommiers et poiriers 1
- 2) Les moyens de lutte biologiques étudiés contre le carpocapse des pommes 4
 - a) Virus 4
 - b) Bactéries 5
- 3) Limites des méthodes d'évaluation de l'efficacité 5
 - a) Au laboratoire 5
 - b) Au verger 6
- 4) Leviers pour l'amélioration de l'efficacité des traitements 6
 - a) Qualité de pulvérisation 6
 - b) Connaissance de la persistance d'action des produits 7

Objectifs du stage et questions de recherche 8

Matériels et méthodes 9

- 1) Matériel biologique 9
 - a) Souche de carpocapses des pommes sensible (CpNPP) 9
 - b) Souche de carpocapses des pommes résistante (RGV) 9
 - c) Les pommiers en verger expérimental 9
 - d) Produits larvicides de synthèse et de biocontrôle 10
- 2) Méthode du test hybrides : du verger au laboratoire pour évaluer la mortalité des larves... 10
- 3) Dispositif permettant la comparaison de l'efficacité des produits phytosanitaires 11
- 4) Dispositif permettant d'estimer la rémanence de produits de biocontrôle 12
- 5) Dispositif permettant d'estimer l'impact de la qualité de pulvérisation sur l'efficacité d'un produit 12
- 6) Analyse et identification des souches de virus des larves infectées 13
- 7) Analyses statistiques 13

Résultats 15

- 1) Comparaison de l'efficacité des produits avec la technique du test hybride 15
 - a) Efficacité des produits de biocontrôle avec la méthode de biotest classique 15
 - b) Efficacité des produits testés au verger 15
 - c) Efficacité des produits selon les test hybrides 15
 - d) Corrélations des observations faites en verger et les résultats des test hybrides 16
- 2) Rémanence des produits larvicides 17
- 3) Impact de la qualité de pulvérisation sur l'efficacité des traitements... 17
- 4) Intérêt des mélanges d'isolats viraux dans les produits commerciaux pour gérer des populations d'insectes comportant une part d'individus résistants au génotype A 19
 - a) Génotypes retrouvés dans les larves sensibles exposées à des produits commerciaux 19
 - b) Impact de la durée du stade baladeur dans l'occurrence d'infections multiples 19
 - c) Rôle de la qualité de pulvérisation dans l'occurrence d'infections multiples 20
 - d) Importance de la composition en génotype viral d'un produit de biocontrôle sur des insectes résistants 21

Discussion, conclusion et perspectives 22

Glossaire

Bio-agresseur : organisme vivant nuisible à la production végétale humaine, pouvant être un animal (arthropodes, rongeurs ...), une plante (mauvaises herbes, syn. adventices) ou un micro-organisme phytopathogène (bactéries, champignons, virus ...).

Bouillie de pulvérisation : préparation d'un mélange d'eau et de produit phytosanitaire prêt à être pulvérisé

Corps d'inclusion : granule, ou une particule virale, présent dans le cytoplasme ou le noyau de certaines cellules infectées, qui joue un rôle important dans l'identification des virus qui causent l'infection

Entomopathogène : organisme ou substance qui est capable causer des maladies ou infections chez les insectes.

Formulation : ensemble de composés destinés à faciliter la manipulation, l'application, la pénétration et la sélectivité des pesticides.

Transmission verticale : transfert d'une infection sublétales d'un parent à leur progéniture.

Néonate : nouveau- né

Sérotype : ensemble des caractéristiques antigéniques de certains micro-organismes (bactéries, virus, champignons), permettant de différencier des souches appartenant à une même espèce.

Pousse de bourse : ensemble issu d'un bourgeon floral et formé d'une bourse (inflorescence composée d'une base foliaire surmontée du corymbe) et d'un axe feuillé (rameau annuel de longueur variable), aussi appelé pousse générative.

Papier hydrosensible : papier avec un revêtement spécial qui permet de visualiser la densité et la taille des gouttelettes pulvérisées, ainsi que leur répartition sur la plante et la largeur d'application.

Virion : particule virale composite dont le génome viral (un acide nucléique de type ADN ou ARN) est contenu dans une structure pouvant être simple à complexe.

Liste des abréviations

AB : Agriculture Biologique AB

CpGV : *Cydia pomonella* granulovirus

BPE : Bonnes Pratiques d'Expérimentation

IFT : indicateur de fréquence de traitement phytosanitaire

Bt : *Bacillus thuringiensis*

Introduction

Les méthodes de lutte autrefois efficaces contre les ravageurs sont désormais confrontées à de nouveaux défis en raison des effets du changement climatique sur la biologie de ces nuisibles et sur l'efficacité des stratégies employées. Face à des échecs d'efficacité récurrents, il devient essentiel de réévaluer ces méthodes afin de garantir la protection des cultures et d'optimiser l'utilisation des produits pour répondre aux enjeux environnementaux (Plan Ecophyto).

L'enjeu est particulièrement important pour la culture de pommes qui est le fruit le plus traité avec un indicateur de fréquence de traitement phytosanitaire total (IFT) de 29,5 contre 18,4 pour les pêches, deuxième fruit le plus traité (Agreste, 2018). Le carpocapse des pommes est l'un des principaux ravageurs des vergers de pommiers. Les traitements contre ce ravageur représentent plus de la moitié des traitements insecticides, avec un indicateur de fréquence de traitement phytosanitaire (IFT) de 6 contre le carpocapse pour un total de 11,3 en culture conventionnelle et 7,9 pour un IFT insecticide total de 11,8 en agriculture biologique (Réseau ferme GRCETA, 2023).

Les attaques occasionnées sur fruit par ce lépidoptère sont considérables et en absence de traitements phytosanitaires, 50 % (Guermah, Dyhia, 2019) à 100 % (Beers et al., 2003) de la production est perdue. A ce jour, malgré les stratégies mises en place par les producteurs, une partie de la production, notamment en agriculture biologique, est non commercialisable à cause des dégâts de ce ravageur, compromettant la viabilité économique des exploitations agricoles.

En agriculture conventionnelle, le contrôle de ce ravageur repose sur l'application de pesticides de synthèse. Cependant, cette approche soulève des préoccupations croissantes car elle induit des dommages collatéraux sur les espèces non ciblées (Sauphanor et al., 2009). Face à ces défis, des alternatives plus respectueuses de l'environnement, comme l'utilisation de virus et bactéries entomopathogènes semblent être des solutions prometteuses. En France, le virus de la granulose (CpGV) est largement utilisé en verger depuis les années 90 pour réduire les populations de carpocapse des pommes, et la bactérie *Bacillus thuringiensis* (Bt) l'est rarement à cause de son inefficacité.

Pour accompagner et conseiller les agriculteurs, les conseillers et techniciens agricoles s'appuient sur les données d'efficacité des produits communiquées par les firmes phytosanitaires et sur les observations réalisées sur le terrain par des stations expérimentales régionales. Cependant, les résultats des essais de terrain varient considérablement d'une année à l'autre, car la pression parasitaire dépend fortement des aléas climatiques ainsi que l'efficacité intrinsèque des produits. Ces variations rendent difficile l'évaluation de l'efficacité réelle des produits.

Quant aux essais en laboratoire, ils sont par définition répétables, mais l'artificialisation des méthodes d'exposition et d'élevage des insectes ne permet pas toujours d'extrapoler efficacement les niveaux d'efficacité observés aux conditions réelles sur le terrain, limitant ainsi leur pertinence pour orienter les pratiques agricoles. Par exemple, le Bt montre une très bonne efficacité contre le carpocapse des pommes en laboratoire (Siegwart, pers com) alors qu'il est inefficace sur le terrain à cause de l'adoption d'un comportement alimentaire différent en conditions réelles. Les produits de biocontrôle ayant des niveaux d'efficacité moindre et des

stades phénologiques cibles plus restreints que les insecticides de synthèse, il devient important d'avoir des tests d'efficacité sensibles et fiables pour pouvoir tirer de réelles conclusions.

Dans ce contexte, l'évaluation rigoureuse de l'efficacité des produits de biocontrôle à base de micro-organismes, tels que *Bacillus thuringiensis* et le virus de la granulose, devient une priorité. Développer une méthodologie d'évaluation située à l'interface entre le verger et le laboratoire est essentiel pour garantir un conseil fiable aux agriculteurs. L'objectif d'une telle approche est de se rapprocher des conditions de terrain tout en maîtrisant la pression parasitaire, la durée d'exposition des ravageurs et en mesurant précisément la mortalité des insectes. Cette nouvelle méthodologie sera également utile pour optimiser l'utilisation des produits de biocontrôle, en plus d'un renforcement de la confiance des producteurs dans ces solutions innovantes.

Pour valider une méthodologie innovante d'évaluation de l'efficacité des produits de biocontrôle du carpocapse des pommes, celle-ci a été testée avec diverses conditions d'application et produits pour confirmer sa robustesse et sa fiabilité. Ainsi, j'ai testé lors de mon stage, (i) l'efficacité, (ii) l'impact de la qualité de pulvérisation et (iii) la persistance d'action de différents produits de biocontrôle en comparaison de produit de synthèse pour déterminer leur capacité à protéger les cultures. Ces tests permettent donc non seulement de valider la nouvelle méthode, mais aussi d'identifier les conditions optimales d'application pour maximiser l'efficacité des produits de biocontrôle en conditions réelles.

Synthèse bibliographique

1) *Le carpocapse des pommes (Cydia pomonella)*, (Lépidoptères : Tortricidae), papillon ravageur des pommiers

Le carpocapse du pommier, *Cydia pomonella* Linnaeus, est un lépidoptère de la famille des Tortricidae dont les adultes mesurent entre 15 et 22 mm d'envergure. Il a une coloration spécifique qui le distingue des autres Tortricidae. Ses ailes antérieures sont gris-cendré et présentent à leur extrémité distale un spéculum à fond brun (McGuffin., 2011).

Cydia pomonella est originaire d'Asie centrale, zone d'origine du pommier domestique (*Malus domestica* Borkh). Aujourd'hui il a envahi pratiquement tous les continents grâce à l'adaptation de son cycle de vie aux différentes conditions climatiques et trophiques (Audemard., 1991). Le carpocapse est le ravageur des pommiers le plus important dans le monde entier, 70% des insecticides dans les vergers de pommiers sont orientés contre lui (Franck et al., 2005) Ce sont les larves qui causent des dégâts majeurs en consommant les fruits (Audemard., 1991). Les larves sont polyphages et s'attaquent également à d'autres espèces fruitières comme le poirier (*Pyrus communis* L.), le noyer (*Juglans regia* L.), le cognassier (*Cydonia oblonga* Miller), le pêcher et l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.) (Pszczolkowski et al., 2002).

Au début du printemps, quand les conditions climatiques dépassent les 10°C et qu'elles sont plus favorables, la larve se nymphose (Pajač et al., 2011) (Figure 1). Le temps de développement de la chrysalide dépend des conditions climatiques. Au bout d'un certain nombre de jours, entre 7 et 30 en fonction de la température, la chrysalide est formée. Les adultes émergent lorsqu'ils ont accumulé une somme de degré jour (DD) de 100 qui se situe généralement à la fin du mois d'avril (Pitcairn et al., 1992). La durée moyenne de vie des adultes varie de 9 à 13 jours. Après accouplement, la femelle pond ses œufs sur les rameaux proches des fruits, les feuilles et sur les fruits eux-mêmes (Caprile et Vossen., 2005). Généralement, les femelles pondent leurs œufs entre 10 à 15 cm du fruit (Wearing CH., 2016) sur la face supérieure des feuilles (Al Bitar et al., 2012).

Une fois les œufs éclos, les larves parcourent les feuilles et les rameaux en direction des fruits, pendant une période appelée stade baladeur allant de quelques minutes à plusieurs jours (Audemard., 1991). Les produits agissent sur la larve au moment du stade baladeur de celle-ci, par l'ingestion du matériel végétal (Ballard et al., 2000). Le stade baladeur de la larve néonate est variable en fonction de la distance de l'œuf au fruit, mais la pénétration dans le fruit s'effectue relativement rapidement, entre 10 minutes et 24 heures après l'éclosion (Geier., 1963). La majorité des œufs (90 %) sont pondus entre 10 à 15 cm du fruit et plus de 50 % des œufs sont pondus sur les feuilles près du fruit, variable au cours des générations (Wearing CH., 2016). A une allure de $1,6 \pm 0,7$ cm/min à 25°C sur la surface rugueuse des branches, la larve peut donc atteindre le fruit en un peu plus de 6 minutes quand l'œuf est pondus à 10 cm du fruit (Jackson., 1982).

Une fois la pomme atteinte, la larve perce et pénètre à l'intérieur du fruit, ce qui rend les fruits non commercialisables pour le producteur. A partir de ce moment, la larve n'est plus accessible par les traitements. Elle creuse une galerie en direction de la zone des pépins et passe le reste de sa vie larvaire dans le fruit. Le développement larvaire dure de 20 à 30 jours et comporte 5 stades successifs ; ensuite, elle quitte le fruit et cherche un abri pour tisser son cocon.

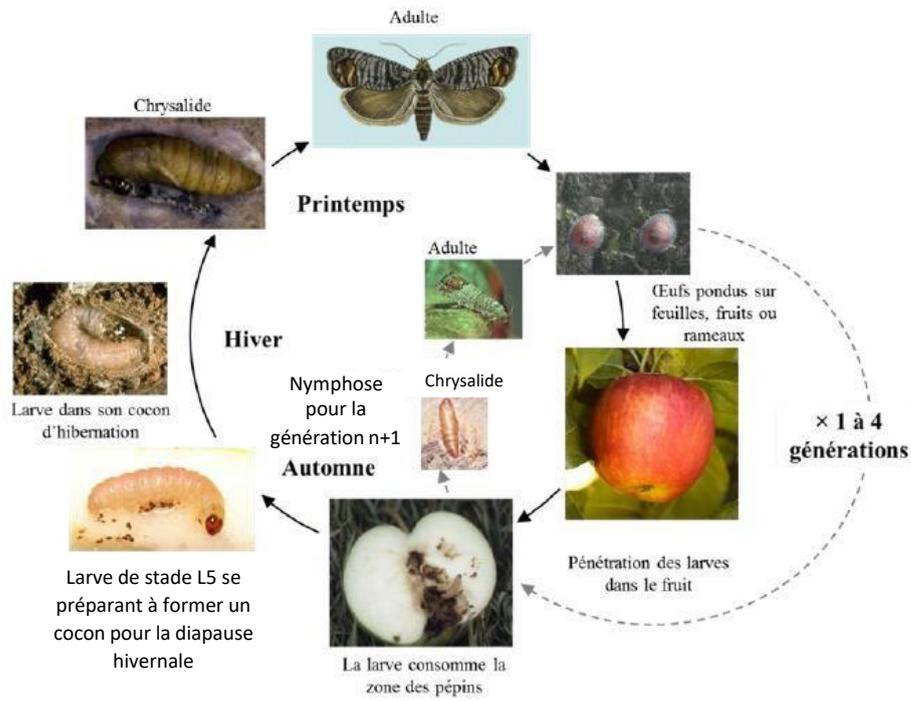


Figure 1 : Cycle de développement de *Cydia pomonella* (Graillet., 2015)

En fonction des conditions climatiques, elle pourra soit se nymphoser dans les interstices de l'écorce de l'arbre conduisant directement à une nouvelle génération dans la même saison, soit entrer en diapause au dernier stade pour passer l'hiver sur l'arbre ou dans le sol. (Pszczolkowski et al., 2002 ; Arthurs et al., 2007; Audemard.,1991)

La durée d'une génération de *C. pomonella* varie de 30 à 40 jours, selon les conditions environnementales (Mills et al., 2000). En fonction du climat (latitude et altitude), il peut y avoir 1 à 4 générations par an (Audemard., 1991). On observe généralement, 2 à 3 générations annuelle de carpocapse dans le sud de la France (Boivin et al., 2005) contre 2 à 4 générations/an en Afrique du sud (Pringle et al., 2003).

1) Les moyens de lutte biologique étudiés contre le carpocapse des pommes

a) Virus de la granulose

Le bio-insecticide le plus utilisé contre le carpocapse des pommes est le virus de la granulose ou *Cydia pomonella Granulovirus* (CpGV) que l'on trouve dans les produits commerciaux appelés Carpovirusine ou encore Madex. Il est utilisable sous le label de l'Agriculture Biologique (AB). Le CpGV appartient à la famille des baculovirus. Ce sont des virus à ADN double brin circulaire (Rohrman., 2013).

Le CpGV est hautement spécifique à sa cible et ne nuit pas aux autres organismes, en plus de ne laisser aucun résidu sur les fruits de par leur rapide dégradation dans l'environnement. (Rajamani et Negi., 2021). Ce virus a principalement une action larvicide par ingestion sur les premiers stades larvaires, mais il peut aussi avoir un léger effet différé, induisant une mortalité dans les populations hivernantes ou permettant une transmission aux générations suivantes. Ce second effet étant marginal, les traitements à base de virus sont répétés tous les ans et tous les 7 à 14 jours en saison dans les vergers en AB (Lacey et al., 2000).

Les corps d'occlusion (Occlusion bodies, OB) des baculovirus peuvent prendre deux formes : un polyèdre contenant un grand nombre de virions chez les nucléopolyédrovirus (NPV) et un granule, contenant 1 ou un faible nombre de virions chez les granulovirus (GV). Chaque corps d'occlusion peut contenir plusieurs Occlusion Derived Virus (ODV) qui est un des deux types de virions du cycle d'infection des baculovirus. L'autre type c'est le virus bourgeonnant ou Budded virus (BV). (Rohrman., 2013). L'infection se déroule en deux étapes : l'infection primaire et secondaire (Figure 2).

Les différents groupes génotypiques ont été créés à partir du premier isolat CpGV commercialisé (CpGV-M) en réalisant une mutation codant pour une répétition de 24 nucléotides au sein du gène pe38 (Figure 3). En 2020, Siegwart et al ont détecté les premiers cas de résistance aux isolats CpGV-R5 et CpGV-V15. Pour la première fois, des populations de *C. pomonella* résistantes aux trois isolats viraux actuellement commercialisés ont été trouvées (Siegwart., 2020). Plusieurs génotypes peuvent infecter l'hôte, on parle alors d'infection multiple. Une infection multiple va s'établir de manière différente en fonction de la stratégie d'infection. Celle-ci est favorisée chez les NPV de par leurs structures (occlusion multiple). Dans ce cas, s'il y a une diversité de génotypes dans un seul OB et son ingestion est suffisante. On trouve également des infections multiples chez les GV (occlusion simple). Cela nécessite en principe l'ingestion et le succès d'infection de plusieurs OB, eux-mêmes de génotypes différents (Rezapanah et al., 2004).

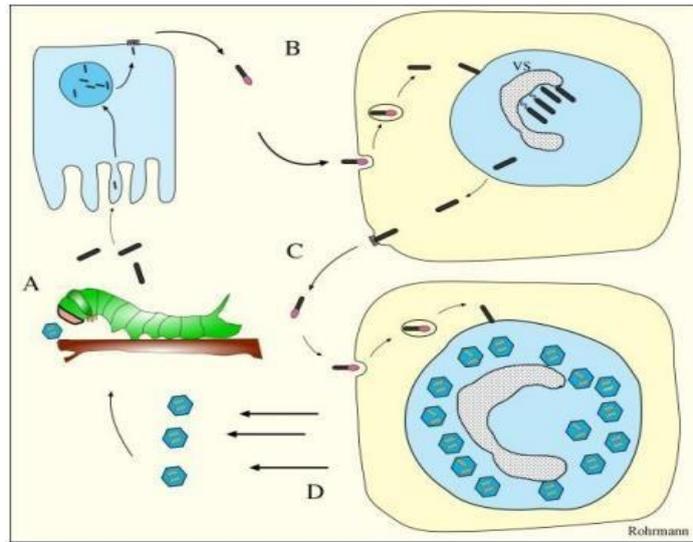


Figure 2 : Cycle de répllication du baculovirus. Les ODV sont libérés lors de la dissolution des OB après ingestion par la larve et sont responsables de l’infection des cellules épithéliales de l’insecte, c’est l’infection primaire (A). Le virion bourgeonne hors de la cellule en direction basale et initie une infection systémique (B et C) due à la production des BV. Plus tard dans l’infection, Les ODV sont produits et les protéases virales (chitinases et les cathepsines) lysent les cellules et liquéfient l’hôte en dégradent la chitine de l’exosquelette (Hawtin et al., 1997 ; Asser-Kaiser et al., 2010). La descendance virale occluse est alors disséminée dans l’environnement et peut contaminer les prochaines larves (D) (Rohrmann., 2013).

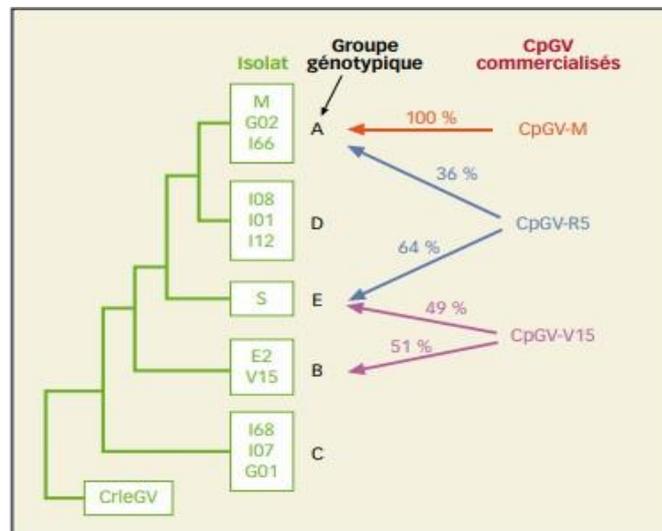


Figure 3 : Classification et composition des CpGV commercialisés en France (Adapté par Andermatt de Gebhardt et al., 2014 et Eberle et al., 2009). Sur la base de polymorphisme nucléotidique dans les gènes hautement conservés, c’est à dire la variation d’une seule paire de bases du génome entre individus d’une même espèce, ou entre un individu et la séquence de référence de l’espèce; différents isolats géographiques de CpGV ont été classés en cinq types de génome : A-B-C-D-E. Selon cela, le type de génome A correspond à CpGV-M (Eberle., 2009 ; Gebhardt., 2014).

b) Bactérie

Bacillus thuringiensis (Bt) est le bio-insecticide le plus décrit et utilisé dans le monde. C'est une bactérie anaérobie, GRAM positive, de la famille des bacilles. Les protéines qu'elle produit en sporulant sont toxiques pour les insectes. Parmi elles, les protéines CRY et CYT forment des inclusions de cristaux (Bravo et al., 2011).

Après ingestion, en présence d'un pH stomacal basique (8,9), le cristal va se désintégrer pour libérer une endotoxine qui va provoquer une rapide baisse de l'ATP au niveau des cellules stomacales, un gonflement de cellules épithéliales et une paralysie du tube digestif. L'insecte meurt par épuisement dû au manque de nutriments (Cloutier et Cloutier., 1992) ou par une septicémie provoquée par la multiplication de la bactérie dans l'hémolymphe et les tissus (Kouassi., 2001). Cela peut prendre de 12 heures à 5 jours, selon la quantité et le type de Bt consommé, la taille et l'espèce de l'insecte en question (Nollet et Singh Rathore., 2015). Les bactéries se développent dans l'hôte et le quittent quand celui-ci se désintègre pouvant contaminer d'autres insectes (Kouassi., 2001). Il n'a pas été détecté de transmission verticale (Raymond et al., 2010).

Les propriétés entomotoxiques de cette bactérie ont suscité un fort intérêt pour l'agriculture et des premiers tests ont été effectués dès 1933. En champ, Bt est utilisé depuis les années 50, au départ contre les lépidoptères défoliants. En 1970, la découverte de nouveaux sérotypes actifs contre les diptères (1977) et coléoptères (1981) a permis d'étendre son action larvicide contre les moustiques, les mouches noires et les scarabées (Graillot., 2015). Les sérotypes les plus utilisés sont : *B. thuringiensis kurstaki* contre les larves de lépidoptères défoliants, *B. thuringiensis aizawai* contre les larves de lépidoptères se nourrissant de graines (Bravo et al., 2011).

Des tests visant à déterminer l'efficacité du Bt démontrent un bon potentiel de toxicité en laboratoire (Pasquier et al., 1997). Bt est efficace quand la population de départ est faible ou modérée. (Audemart et al., 1995). Par contre, au verger, il se révèle peu efficace contre la larve du carpocapse puisque celle-ci pénètre dans le fruit avant d'ingérer une dose létale de produit (Pasquier et al., 1997).

Bien qu'il n'ait pas encore de cas de résistance du carpocapse au Bt, des résistances sont apparues dans des populations d'autres espèces de lépidoptères. Mcgaughey a constaté que *Plodia interpunctella*, un important ravageur lépidoptère des grains de céréales, peut développer une résistance à l'insecticide en quelques générations (Mcgaughey., 1985).

2) Limites des méthodes d'évaluation de l'efficacité

a) Au laboratoire

La méthode de biotest, communément utilisée au laboratoire pour déterminer l'efficacité d'un produit, dans lesquels la larve est mise en contact d'un milieu nutritif contaminé, dérive de la technique appliquée pour les tests de diagnostic de résistance de *C. pomonella* aux insecticides chimiques (Reyes & Sauphanor., 2008). Les biotests consistent à soit mettre en contact l'insecte avec l'insecticide soit par contact direct soit en contaminant sa ressource alimentaire pour qu'il s'expose au produit par voie orale. Dans notre cas, que ce soit pour le CpGV ou le Bt c'est la deuxième option qui est appropriée puisque ces microorganismes agissent par ingestion (Rohrman., 2013 ; Kouassi., 2001).

Comme décrit dans le paragraphe sur le carpocapse des pommes, la fenêtre d'exposition des larves aux pesticides se résume à son stade baladeur (Ballard et al., 2000), or dans les biotests par ingestion la larve consomme des aliments contaminés durant toute la durée du test sans être aussi mobile que son comportement naturel au vu de la taille des puits. La notion de stade baladeur qui inclut la durée et la distance de la larve n'est donc pas prise en compte dans ces tests classiques. Le milieu artificiel (Heliothis Diet, Ward's natural science, NY, USA) utilisé dans ces tests est un pré-mélange alimentaire artificiel utilisé pour de nombreuses espèces de Lépidoptères sans être spécifique au carpocapse. Cette poudre de nutriments est assez différente d'un support végétal comme une feuille, un rameau ou un fruit.

b) Au verger

L'évaluation biologique des produits phytopharmaceutiques (efficacité, résistance, phytotoxicité, effets secondaires...) est évaluée au moyen d'essais officiels par des réseaux d'expérimentation en appliquant les principes des Bonnes Pratiques d'Expérimentation (BPE). (DGAL, 2020)

Les BPE définissent le mode d'organisation et les conditions dans lesquelles les essais sont réalisés en vue d'obtenir des données fiables et comparables, cependant, la variabilité naturelle des conditions en extérieur rend la réplication des résultats plus difficile. Des essais répétés dans le même environnement peuvent donner des résultats différents simplement en raison des variations climatiques ou environnementales, ce qui influe alors sur le cycle du carpocapse et ainsi la pression.

Les évaluations de l'efficacité des produits en verger expérimental se font par comptage des fruits piqués. En effet, Charmillot, souligne que même si les larves sont contaminées par des produits à base de virus, il arrive qu'elles pénètrent dans la pomme avant de mourir le temps que le virus « fasse effet ». Ces dommages laissent normalement des traces superficielles liégeuses (Charmillot., 1995). D'ailleurs, les cicatrices occasionnées par l'entrée des jeunes larves dans les fruits même lorsqu'elles sont infectées est une des limites de l'utilisation du granulovirus (Lacey et al., 2008).

Il peut arriver qu'il y ait des erreurs dans les notations au verger en raison de la similitude des dégâts entre ravageurs. Zhao et al, ont résumé que des larves de tordeuse orientale du pêcher (*Cydia molesta*) peuvent causer des pertes considérables sur les poires et les pommes à la fin de la saison. Les larves de *C. molesta* pénètrent dans les pommes et creusent des galeries à l'intérieur du fruit semblables aux dégâts causés par le carpocapse. L'identification des larves est peu évidente sur les premiers stades larvaires, les techniques de biologie moléculaire sont disponibles pour comparer les deux espèces à ce stade (Zhao et al., 1989).

3) Leviers pour l'amélioration de l'efficacité des traitements

a) Qualité de pulvérisation

La larve de carpocapse doit ingérer une quantité suffisamment importante de virus ou de toxine bactérienne entre son éclosion et sa pénétration dans le fruit, moment à partir duquel elle ne sera plus accessible aux traitements. La probabilité qu'une larve de carpocapse des pommes ingère du CpGV ou du Bt pendant son stade baladeur dépend à la fois de la fréquence d'application et de la dose (Arthurs et al., 2005).

La qualité de pulvérisation est un facteur crucial dans l'évaluation de l'efficacité d'un produit phytosanitaire. En effet, même un produit phytosanitaire très efficace peut voir son potentiel

grandement diminué si la pulvérisation n'est pas réalisée de manière optimale. Une pulvérisation de mauvaise qualité peut entraîner une couverture incomplète, laissant certaines parties de la plante non protégées, ce qui permet aux ravageurs de survivre et de continuer à causer des dégâts. De plus, une mauvaise application peut également augmenter les risques de ruissellement ou de dérive, ce qui non seulement réduit l'efficacité du traitement, mais peut également entraîner des impacts environnementaux négatifs. Des gammes de nombre de gouttelettes/cm² de support végétal existent pour les différents produits phytosanitaires comme les herbicides, les fongicides et les insecticides de synthèse. Or, la gamme pour les biopesticides comme les virus de la granulose n'est pas établie. Les efficacités de traitements contre le carpocapse des pommes y sont conditionnées.

b) Connaissance de la persistance d'action des produits

La persistance d'action des insecticides, également appelée rémanence, est un facteur clé pour les préconisations de l'utilisation d'un pesticide. En effet, elle va déterminer la fréquence des traitements. Lors de l'élaboration d'une méthode d'évaluation de l'efficacité des insecticides, la prise en compte de cette persistance est cruciale pour établir une corrélation entre la dose appliquée, la durée de l'efficacité, et l'impact sur les populations de ravageurs.

La persistance des insecticides est influencée par divers processus de dégradation chimique, comme la température, l'humidité et les précipitations. Des conditions chaudes et humides peuvent accélérer la dégradation, tandis que des conditions sèches et fraîches peuvent prolonger la rémanence (Perrin., 2022). Ces processus réduisent progressivement la concentration de l'insecticide actif, affectant ainsi son efficacité.

La photodégradation, due à l'exposition à la lumière solaire, affectant aussi l'efficacité. Les applications fréquentes du CpGV en verger ne sont pas seulement dues à la seule pression démographique des carpocapses, mais aussi à l'inactivation du virus par l'énergie solaire dont les rayonnements UVB (280-320 nm) (Nollet., 2012). L'irradiation solaire endommage le Bt, et les températures extrêmes peuvent causer son inactivation (Ignoffo., 1992 ; Nadao., 2018 ; Patil et al., 2018). Il est recommandé d'appliquer le produit tard en après-midi ou par une journée nuageuse pour éviter l'exposition directe aux rayons du soleil (Franz., 1971 cité dans De Kouassi., 2001).

Dans l'étude d'Arthur et Lacey, la persistance et l'efficacité de l'application de plusieurs produits CpGV sont testées et témoigne qu'une application des produits est restée très efficace pour les 24 premières heures (en moyenne de 94 % de mortalité larvaire par rapport aux témoins) et modérément efficace après 72 h (perdant à 71% de mortalité) pendant les conditions sèches ensoleillées. Une activité significative est restée jusqu'à 14 jours, suggérant une survie prolongée du virus dans des endroits protégés par les UV (Arthurs et al., 2004). D'autres études, plus pessimistes, ont révélé que l'activité de dépistage du CpGV sur les pommes en plein champ était réduite à environ 50 % de l'activité originale dans les 2 jours suivant l'application, et à 17 % le 10e jour (Jacques et al., 1897).

Les formulations d'insecticides sont conçues pour moduler la persistance des substances actives et des micro-organismes, comme par exemple en protégeant le CpGV par encapsidation (Nollet., 2012).

Objectifs du stage et questions de recherche

Ce stage est financé par le Groupement d'Intérêt Scientifique Fruits (GIS FRUIT) qui réunit des partenaires de la filière fruitière française, impliqués dans la recherche, le développement et la formation, afin de mettre en œuvre, une stratégie commune, allant de la recherche fondamentale jusqu'au transfert des innovations vers les acteurs économiques.

Le stage se déroule dans trois structures : l'INRAE (institut de recherche fondamentale), le GRCETA (transfert et développement technique aux agriculteurs) et la Station expérimentale arboricole La Pugère (recherche appliquée). Dans un objectif commun d'acquérir des connaissances pour améliorer la protection phytosanitaire des systèmes arboricoles, une question se pose :

Comment améliorer la lutte biologique par micro-organismes contre le carpocapse des pommes *Cydia pomonella* ?

Plus précisément, ce travail répondra à plusieurs objectifs et questions de recherche :

- Objectif méthodologique

Le premier objectif de ce stage est de mettre au point une méthodologie de test hybride entre le terrain et le laboratoire pour mieux évaluer l'efficacité des produits de biocontrôle à base de micro-organismes et ainsi mieux les utiliser. Pour tester sa robustesse, le test hybride sera éprouvé sur différentes questions de recherche. L'objectif final est qu'il soit fiable, reproductible et en accord avec les observations faites sur le terrain.

Question de recherche :

- Est-il possible d'implémenter un test hybride combinant laboratoire et terrain afin d'obtenir des données plus représentatives de l'efficacité réelle d'un produit de biocontrôle ?

- Objectif de sciences appliquées

Le deuxième objectif est de renseigner les agriculteurs sur l'optimisation de l'utilisation des microorganismes contre le carpocapse. L'efficacité et la rémanence des produits seront étudiées ainsi que la pulvérisation optimale pour protéger les vergers.

Questions de recherche :

- Quelles sont les efficacités des produits de biocontrôle contre le carpocapse des pommes ?
- Quelles sont les persistances d'action des produits d'origine biologique et quel est l'impact sur les efficacités des produits ?
- Comment la qualité de pulvérisation influe sur les efficacités des produits d'origine biologiques ?

- Objectif de sciences fondamentales

Le troisième objectif est de mieux connaître les facteurs biologiques qui améliorent la probabilité de mortalité d'une larve de carpocapse des pommes.

Questions de recherche :

- Est-ce que la durée du stade baladeur influence la mortalité de larves exposées à des micro-organismes pathogènes ?
- Est-ce que la durée du stade baladeur est corrélée positivement à l'occurrence de multi-infection virale ?
- Est-ce que le pourcentage de couverture des feuilles par du CpGV influence la probabilité d'infection d'une larve ?
- Quelles sont les conditions requises pour que des larves résistantes au CpGV-M soient infestées par un autre CpGV et meurent lorsqu'un mélange est pulvérisé ?

Matériel et méthodes

1) Matériel biologique

a) Souche de carpocapse des pommes sensible (CpNPP)

La souche de laboratoire de carpocapse des pommes appelée CpNPP est sensible à l'isolat viral CpGV-M. Les insectes utilisés dans les essais proviennent de deux élevages différents :

- Directement de l'élevage de masse par la société NPP destiné à la production de CpGV. Des feuilles de ponte avec des œufs de carpocapse sont acheminés de Pau à Avignon par voie postale express.
- Un élevage de masse au sein de l'insectarium de l'unité PSH dans lequel a eu lieu ce stage. L'élevage a été obtenu auparavant avec des individus de la société NPP.

b) Souche de carpocapse des pommes résistante (RGV)

Ces insectes sont résistants à l'isolat viral CpGV-M. La souche RGV a uniquement été utilisée pour évaluer l'efficacité de deux produits commerciaux à base de virus : Madexpro et Carpovirusine Evo.

La souche RGV est une lignée dérivée d'une souche sensible, issue d'une population collectée dans un verger du Sud-Est de la France (Les Vignères, Vaucluse), dans laquelle a été introgressé le caractère de résistance à CpGV-M par rétrocroisement avec une population résistante (St-A) sur 9 générations. Cette dernière, a été récoltée à l'automne 2004 dans la commune de St-Andiol, Bouches-du-Rhône où des échecs de traitements au virus de la granulose isolat M (CpGV-M) avaient été mis en évidence plusieurs années de suite (Sauphanor, Berling et al., 2006). La souche RGV présente alors un niveau de résistance élevé équivalent à la souche St-A et possède un fond génétique proche à 99.6 % à celui de la souche Sv.

c) Les pommiers en verger expérimental

Les parcelles expérimentales sont situées dans la commune de Mallemort (13) dans la station expérimentale de La Pugère (Annexe I).

d) Produits larvicides de synthèse et de biocontrôle

Pour l'ensemble des essais, les produits commerciaux ont été fournis par la firme respective (Tableau 1) (Annexe II).

Tableau 1 : Caractéristiques des produits phytosanitaires utilisés et leur intérêt pour les différents essais

| Code produit | Nom commercial | Substance active et composition (groupes génotypiques pour CpGV) | Intérêt pour l'étude |
|--------------|---|--|--|
| Evo | Carpovirusine Evo 2® | CpGV-R5 33% A 67% E | Produit de biocontrôle de référence |
| EvoN | Carpovirusine Evo 2® homologuée en 2025 | CpGV-R5 33% A 67% E | Nouvelle formulation (commercialisée à partir de 2025) Niveau efficacité + Mélange de 2 Virus |
| EvoF | Carpovirusine Evo 2® + Fieldor® | CpGV-R5 : 33% A 67% E + huile de soja éthoxylée | Nouvelle formulation + Intérêt de l'adjuvant sur l'efficacité, la rémanence |
| Madexpro | Madex Pro® | CpGV-V15 51 % B 49% E | Niveau efficacité + Mélange de 2 Virus |
| MadexN | Non commercialisé BI1904 | CpGV-V45 % A % E % B % C % D | Nouveau produit (pas encore homologué en 2024, demande en cours) Niveau efficacité + Mélange de 5 Virus |
| Dipel | Dipel DF® | <i>Bt var. krustaki</i> | Niveau efficacité |
| Xentari | Xentari® | <i>Bt var. aizawai</i> | Niveau efficacité |
| Voliam | Voliam® | Chlorantraniliprole | Produit de synthèse de référence |
| Affirm | Affirm® | Emamectine benzoate | Produit de synthèse de référence |
| Success | Success 4® | Spinosad | Produit de référence en Agriculture Biologique |

2) Méthode du test hybride : du verger au laboratoire pour évaluer la mortalité des larves

Les tests de mortalité classique mettent au contact une larve sur un milieu nutritif traité à une concentration de produit larvicide préalablement déterminée. Ces test appelés « biotest » classique en microplaque avec une application directe de virus est une méthodologie réalisée par les firmes phytosanitaires, les instituts de recherche et d'homologation pour détecter les potentielles résistances des insectes face aux souches de virus. L'objectif, n'étant pas de mimer l'ingestion de virus par une larve dans son milieu naturel, ces tests n'incluent pas de support végétal et donc cette méthodologie n'est pas idéale pour évaluer de façon réaliste l'efficacité des produits sur les insectes.

Le test hybride, quant à lui, met en contact les larves sur un support végétal et évalue la mortalité des larves de carpocapse, dans des conditions contrôlées au laboratoire.

Prélèvement de feuilles de pommier traitées au verger

Les feuilles de pommier, support végétal du test hybride, sont prélevées une fois que les produits ont séché après le traitement en verger. Les feuilles sont choisies saines, indemnes de maladies ou d'attaques de ravageurs. Elles sont prélevées au milieu de l'arbre et avec sa face supérieure face au préleveur afin d'optimiser la qualité de produit reçue. Les feuilles sont prélevées dans les 15 à 20 premiers centimètres d'une pousse de bourse, organe porteur de la production fruitière.

Des arbres non traités servent d'arbres témoins qui permettent, d'une part, de connaître la pression naturelle de la parcelle en ravageurs, d'autre part, de bénéficier d'un support végétal non traité contre les lépidoptères afin d'estimer la mortalité naturelle et la mortalité due aux manipulations. Les feuilles des arbres témoins sont prélevées avant le traitement afin d'éviter de potentielles projections par la dérive des traitements voisins. Les feuilles sont transportées immédiatement après prélèvement de la parcelle expérimentale au laboratoire dans des sacs hermétiques. La dépose des larves (suite du test) est faite le jour même. Au sein de chaque parcelle, les traitements sont répartis sur 4 blocs de 5 arbres. Les 3 arbres situés au centre de chaque bloc ont fait l'objet de prélèvements. 2 feuilles sont prélevées par arbre. Ce qui donne un total de 6 feuilles par bloc et donc 24 feuilles par modalité.

Dépose de larves sur les feuilles traitées

Sur les feuilles sont déposées des larves de carpocapse de stade L1 qui ont éclos le jour même.

Deux feuilles par modalité sont placées dans une boîte de pétri ronde. Le nombre de larves souhaité (dépendant de l'expérimentation) est déposé sur la face supérieure des feuilles. Le temps de contact des larves sur les feuilles est chronométré et au bout du temps imparti (10, 30 ou 60 minutes), chaque larve est placée individuellement avec un pinceau dans un puit d'une plaque biotest. Pendant les différents temps d'incubation, les boîtes sont exposées à la lumière naturelle. En effet, dès leur émergence en verger, les larves sont activement à la recherche des fruits et la lumière participe à leur vivacité (Jackson., 1982).

Détermination du taux de mortalité de larves

Une plaque biotest est constituée de 96 puits que l'on a partiellement remplis de milieu nutritif (Stonefly heliothis artificial diet, Ward) qui permet à la larve de s'alimenter. Une fois les larves déposées sur le milieu nutritif, les puits sont scellés avec du parafilm. Les plaques sont laissées pendant 7 jours sous étuve à 23°C avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité. Les larves soumises à des virus meurent en majeure partie au bout du cinquième jour, la mortalité sera alors évaluée 7 jours après le dépôt des larves. Une larve est considérée comme morte si elle ne répond pas (pas de mouvements) à un stimulus avec un petit pic métallique. Les larves moisées sont comptées comme mortes.

3) Dispositif permettant la comparaison de l'efficacité des produits phytosanitaires

Pour déterminer au champ l'efficacité de produits insecticides appliqués lors de la période d'éclosion des œufs de première génération, un essai est réalisé à la station expérimentale de la Pugère à Mallemort sur les parcelles 5 et 16 décrites plus haut sur lesquels il y a eu les prélèvements de feuilles pour les tests hybrides. L'ensemble de cette manipulation a été répété 3 fois, à la suite de trois traitements phytosanitaires qui ont eu lieu le 7 mai, le 30 mai et le 14 juin 2024.

Les vergers sont sur des parcelles d'essai avec un dispositif en blocs (Fisher), les produits sont alors appliqués selon le référentiel BPE, au pulvérisateur à dos. Chaque produit est appliqué sur 4 blocs de 5 arbres et deux arbres tampons séparent les blocs entre eux.

La mesure de l'efficacité des produits d'après notre test hybride est mesurée en calculant la mortalité des larves. Trois durées d'exposition (correspondant à leur stade baladeur) des larves sur les feuilles sont testées : 10 minutes, 30 minutes et 60 minutes. Pour un temps d'exposition et un produit, 48 larves sont déposées, 12 par bloc. Soit, 144 larves par produit testé et par souche d'insectes.

L'efficacité des produits à base de virus Madepro et Evo a aussi été testée sur des larves RGV.

Les résultats des mortalités au laboratoire seront corrélés à l'incidence de dégâts par les carpocapses au verger afin de comparer les efficacités des produits dans leur globalité et de valider la méthode.

En fin de 1ère génération (90% des éclosions annoncés par le modèle), l'efficacité des produits au champ est évaluée grâce à deux notations de piqûre de carpocapse des pommes. 1200 fruits par modalités (300 fruits par bloc) sont inspectés. Il est fait la distinction entre « dégâts actifs » et « dégâts stoppés/cicatrisés » comme suit :

- Dégât actif ou piqûre active : fruits présentant des dégâts ne permettant pas leur commercialisation. La larve est vivante (présente ou non dans le fruit) et a pénétré dans la chair du fruit (pouvant aller jusqu'au pépin).
- Dégât stoppé/cicatrisé ou piqûre sèche : fruits présentant des morsures externes sans pénétration de larve de carpocapse. Les dégâts restent superficiels au niveau de l'épiderme, les fruits sont commercialisables mais en second choix ou pour la transformation.

4) Dispositif permettant d'estimer la rémanence de produits de biocontrôle

Pour déterminer la rémanence d'insecticides un essai est réalisé à la station expérimentale la Pugère à Mallemort sur des pommiers biologiques sous filet mono rang de la variété Dalinette (Parcelle 11). La parcelle biologique sous filet permet d'avoir un support végétal qui n'a pas été soumis à des traitements contre le carpocapse lors de la première génération. Toute rémanence de produits antérieurs est alors évitée. Le 5 juillet 2024, les produits sont appliqués au pulvérisateur agricole tracté mais, contrairement aux conditions ordinaires, les filets sont relevés pour garantir la qualité de la pulvérisation.

L'objectif de cet essai est de tester la période d'action des produits phytosanitaires soumis à des conditions environnementales extrêmes : fortes températures, forts rayonnement solaire... Les feuilles sont prélevées le jour du traitement, puis, 4, 7, 10 et 14 jours après le traitement. La suite du protocole est identique à celui suivi pour les tests d'efficacité.

Les feuilles sont prélevées sur les 4 arbres centraux du bloc de façon aléatoire.

5) Dispositif permettant d'estimer l'impact de la qualité de la pulvérisation sur l'efficacité d'un produit

Pour des raisons de précision de traitement, les pulvérisations ont été effectuées au laboratoire, afin d'être plus homogène dans la pulvérisation perçue par les feuilles et sur la surface d'une feuille. En effet, la densité de feuillage et l'orientation des feuilles influe sur la quantité de produit perçue par chacune d'entre elles. L'objectif est de reproduire au laboratoire la qualité de pulvérisation reçue par les feuilles lors d'un passage de pulvérisateur, de deux passages de pulvérisateur et un seul passage mais avec une dose deux fois plus concentrée.

L'essai est mené uniquement avec le produit Evo nouvelle formulation (EvoN) pour ainsi éviter les variabilités de la mortalité des larves due aux différents produits et essayer de se focaliser seulement sur les différentes pulvérisations. La dose du produit utilisée correspond à la dose en verger ; 1L/ha pour un volume de bouillie de 500 L, ce qui représente 0.002 L d'Evo dans 1 L de bouillie de pulvérisation.

La pulvérisation est mimée avec un spray à main. Le spray pulvérisé à travers un coude en PVC afin de sélectionner seulement les gouttelettes les plus fines pour se rapprocher au plus d'une pulvérisation de type agriculteur (Figure 3).

Les deux faces de la feuille reçoivent du produit. Afin de contrôler la pulvérisation sur les feuilles, la pulvérisation est également mimée sur des papiers hydro sensibles pour chaque modalité. Le revêtement de ce papier permet de visualiser la densité et la taille des gouttelettes pulvérisées, ainsi que leur répartition sur la plante et la surface traitée. Le papier jaune se teinte de bleu lors du contact avec l'eau.

Quatre niveaux de pulvérisation sont testés allant d'une faible intensité à une très forte intensité dans lequel quasiment toute la surface de la feuille est traitée. Le nombre de pressions sur le spray à main détermine le niveau de pulvérisation. Ainsi 2, 7 et 14 pressions sont opérées pour les niveaux 1, 2 et 3 respectivement et pour le niveau 4 le spray est fait directement frontalement à la feuille à une distance de 10 cm.

Les papiers hydro sensibles témoins des pulvérisations sont analysés sur un logiciel de traitement et d'analyse d'images scientifiques, ImageJ après avoir été scannés en haute



Figure 3 : Système de pulvérisation au laboratoire.

Tableau 2 : Tailles attendues pour les amplicons de la PCR en fonction du génotype viral

| Génotype | Taille (paire de base) |
|-----------------|-------------------------------|
| A et D | 333 |
| E | 286 |
| B | 272 |
| C | 253 |

résolution (2400 points par pouce). Les couleurs jaune et bleu du papier hydro sensible sont transformés en niveaux de gris pour que le logiciel détecte le pourcentage de surface traitée.

6) Analyse et identification des souches de virus des larves infectées

Après avoir exposé des larves néonates aux virus sur les feuilles et les avoir laissées incubées pendant 7 jours en plaque biotest, elles sont récupérées et broyées individuellement dans 100µL d'eau distillée. Une PCR est réalisée pour amplifier l'ADN dans un thermocycleur en suivant ce cycle : 3 minutes à 96°C, puis 35 cycles à 96°C/30 sec, 64°C/30 sec, 72°C/45 sec puis une période finale à 10°C.

Après la PCR, les amplicons sont placés sur un gel d'agarose à 3% soumis à une électrophorèse. Les molécules d'ADN plus petites se déplacent plus rapidement à travers le gel que les molécules d'ADN plus grandes, ce qui entraîne une séparation de taille.

Une fois la migration terminée, le gel est placé dans du bromure d'éthidium (BET), un marqueur non radioactif des acides nucléiques, qui permet de visualiser des brins d'ADN. La lecture du gel se fait aux UV.

Cette PCR a été réalisée dans une zone du génome virale présentant du polymorphisme de taille entre groupes génotypiques (Tableau 2). Elle permet donc de dire si du virus est détecté dans les larves et si oui, de quel groupe génotypique il s'agit.

7) Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel R version 4.3.3.

- Efficacité des produits au laboratoire

Le modèle dose-réponse est ajusté en utilisant la fonction `drm()` du package `drc`, avec une réponse de mortalité (Mortalité) en fonction de la dose (Dose). Le modèle log-logistique à 3 paramètres (pente, limite supérieure et dose médiane) est spécifié avec `LL.3u`. Dans cette version les paramètres limite supérieure et dose médiane ne sont pas contraints, ce qui signifie qu'ils peuvent prendre des valeurs libres en fonction des données. Cela permet au modèle de s'adapter de manière plus flexible aux données réelles, en particulier lorsque les réponses ne suivent pas strictement un comportement symétrique ou log-logistique standard.

Les analyses probits des biotests (fonction `drm`), les calculs de DL50 (fonction `ED`) et les comparaisons de DL50 (fonction `EDcomp`) ont été réalisées avec le package `drc`.

- Dégâts de fruits piqués au verger

Modèle : Modèle de régression linéaire généralisé de famille binomiale.

Ce type de modèle est approprié pour modéliser une variable dépendante binaire (ou un ensemble de comptages binaires), ici représentée par la proportion de fruits piqués (i.e., `cbind(Fruits_piqués, Fruits_sains)`). Elle utilise des données en termes de "succès"(fruits piqués) et "échecs"(fruits sains).

- Mortalité des larves dans les tests hydride

Modèle : Le modèle utilisé est un modèle mixte linéaire généralisé (GLMM) avec une fonction de lien logit pour une distribution binomiale.

Elle utilise des données en termes de "succès" (larves mortes et moisies) et "échecs" (larves vivantes). Ce modèle permet de modéliser les taux de mortalité (nombre de larves mortes sur le nombre total de larves) en fonction des insecticides utilisés en tenant compte du nombre total de larves dans chaque groupe. La régression binomiale permet de prédire une proportion, qui est le rapport entre les larves mortes et les larves installées. L'avantage de ce modèle, c'est qu'il prend directement en compte le nombre total de larves pour chaque condition, ce qui est idéal pour des comparaisons de taux de mortalité.

Les modèles ont été ajustés pour examiner l'effet des variables explicatives qui diffèrent d'un essai à un autre (Produit, Stadebal, Pulvérisation, Jours_après_traitement...) sur la mortalité observée (Mortalité).

(1 | rang) et (1 | date_instal) spécifient les effets aléatoires pour rang et date_instal, ce qui permet de tenir compte de la variabilité entre ces niveaux. En effet, une variabilité des données est importante entre les différentes répétitions (date_instal). Ces effets aléatoires ajustent les estimations pour tenir compte du fait que les observations peuvent être corrélées à l'intérieur des niveaux de rang et date_instal, cela permet de capturer la variabilité non observée liée à chaque rang. Pour l'essai qualité de pulvérisation et rémanence, il n'y a pas eu besoin de rajouter un effet aléatoire pour ajuster les estimations.

Vérification des hypothèses du modèle

La validité des différents modèles a été vérifiée par l'analyse des résidus à l'aide du package DHARMA. Afin de valider les hypothèses de base de la régression linéaire, une série d'analyses des résidus a été effectuée :

- Test d'Uniformité (Kolmogorov-Smirnov Test) :
- Test de Dispersion
- Test des Valeurs Aberrantes (Outliers)
- Vérification de la colinéarité : La colinéarité entre les variables explicatives a été évaluée à l'aide du facteur d'inflation de la variance (VIF).

La normalité des résidus a été testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

Test post-hoc de Tukey

Pour comparer les différents niveaux de variables entre eux et leur effet sur la mortalité, un test post-hoc de Tukey a été réalisé. Ce test est approprié pour faire des comparaisons multiples après un GLM. Le test de Tukey permet de voir quelles paires de groupes diffèrent de manière significative, et l'affichage compact des lettres facilite l'interprétation de ces différences.

- Corrélation entre les dégâts au verger et la mortalité des larves

Pour évaluer la corrélation entre le pourcentage de fruits piqués et la mortalité des larves, un modèle de régression linéaire est utilisé. Ce modèle permet de déterminer si le pourcentage de fruits piqués est un bon prédicteur de la mortalité des larves.

- Comparaison des génotypes viraux

Modèle de régression linéaire généralisé (GLM, family = Binomial) modélise la probabilité de mortalité des larves (en fonction de la variable réponse binomiale "Larves_infestées" et "Larves_saines") en fonction des génotypes, des modalités et du niveau de pulvérisation.

Résultats

1) Comparaison de l'efficacité des produits avec la technique du test hybride

a) Efficacité des produits de biocontrôle avec la méthode de biotest classique (virus, Bt)

Dans un premier temps, nous avons testé l'efficacité intrinsèque des produits qui ont été utilisés dans un deuxième temps pour le test hybride. Pour cela nous avons utilisé le protocole de biotest classique qui consiste à faire ingérer du produit aux larves pendant 7 jours. L'intoxication de lots de larves avec différentes concentrations de produits nous permet d'obtenir une courbe dose-réponse (Figure 4 et 5) qui est le reflet de l'efficacité intrinsèque du produit. Ces résultats montrent que les 4 produits commerciaux à base de CpGV testés ont une bonne efficacité (Figure 4).

Afin de comparer la toxicité de différentes substances entre elles, la DL_{50} est un bon indicateur. Il donne la dose ou la concentration d'un produit qui tue 50 % des individus d'une population. Une DL_{50} faible signifie que la substance est très toxique sur l'espèce testée. Le produit à base de virus le plus toxique pour les larves en plaque biotest est alors EvoN suivi par MadexN, Madex pro et Evo. La gamme de concentration a atteint la dose appliquée en verger dans l'essai efficacité et cette dose 100% des larves meurent pour les quatre produits à base de virus. (Tableau 3).

Dipel semble être plus toxique que Xentari selon nos données, cependant à la dose appliquée en verger (0.675 g/L) seules 87.50 % des larves meurent alors qu'elles sont exposées 168 fois plus longtemps dans ce test (si l'on considère que le stade baladeur dure 1h). Lorsqu'on applique Dipel à la même dose que Xentari (1.10 g/L) en biotest, le taux de mortalité des larves atteint 100 % (Tableau 3).

b) Efficacité des produits testés au verger

Aucune des modalités testées n'a d'effet significatif sur le pourcentage de fruits piqués par rapport à la modalité de référence (Tnt = le témoin) dans la parcelle 5 ou la parcelle 16. Les traitements appliqués dans ces parcelles n'ont pas un impact notable sur la réduction du nombre de fruits piqués. Pour la parcelle 5 la dispersion est faible (0.237), ce qui signifie que les observations sont relativement proches de la médiane prédite, mais cela n'est pas suffisant pour démontrer une différence statistiquement significative entre les modalités. Pour la parcelle 16 il y a une grande variabilité (avec un paramètre de dispersion de 36.46), ce qui pourrait indiquer des facteurs non pris en compte ou une variabilité intrinsèque dans les données (Figure 6).

c) Efficacité des produits selon les tests hybrides

L'analyse des résultats d'efficacité du produit Evo, qui est la seule modalité répétée sur les deux parcelles, montre des différences entre la parcelle 5 et la 16. Ceci indique qu'il y a des variables, en plus de celle du traitement, qui influent sur la mortalité des larves. Afin de s'en affranchir, les résultats d'efficacité sur les deux parcelles ont été traités indépendamment

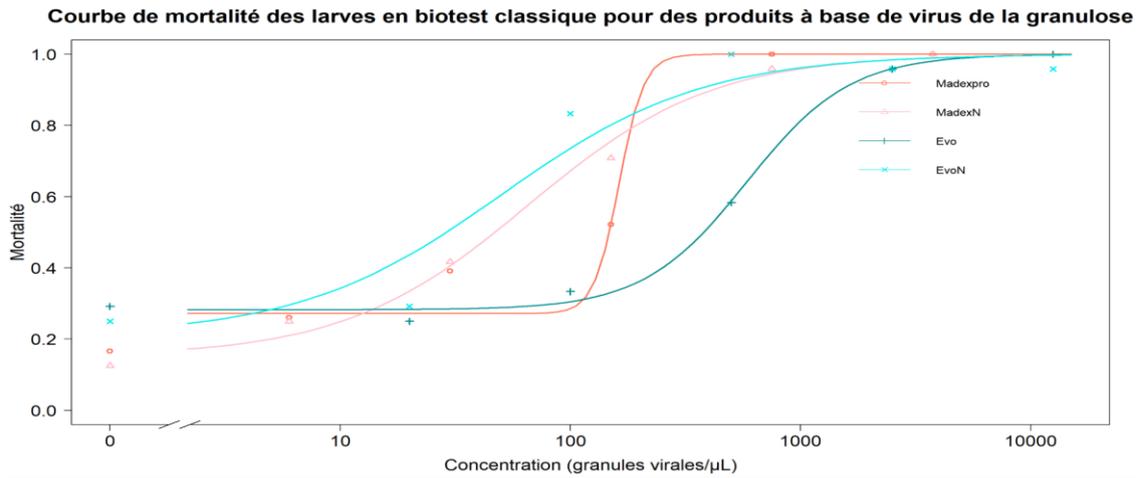


Figure 4 : Courbe dose/réponse de la mortalité de larves sensibles (CpNPP) en fonction de quatre produits à base de CpGV (Madexpro, MadexN, Evo, EvoN). La dose est exprimée en granules virales/ μ L.

Tableau 3: Liste des DL50 des produits testés

| Produit | DL 50 (GV/ μ L) | Dose appliquée en verger dans l'essai efficacité (GV/ μ L) |
|----------|---------------------|--|
| EvoN | 50.08 | 12 500 |
| MadexN | 65.40 | 3 750 |
| Madexpro | 162.5 | 3 750 |
| Evo | 583.19 | 12 500 |

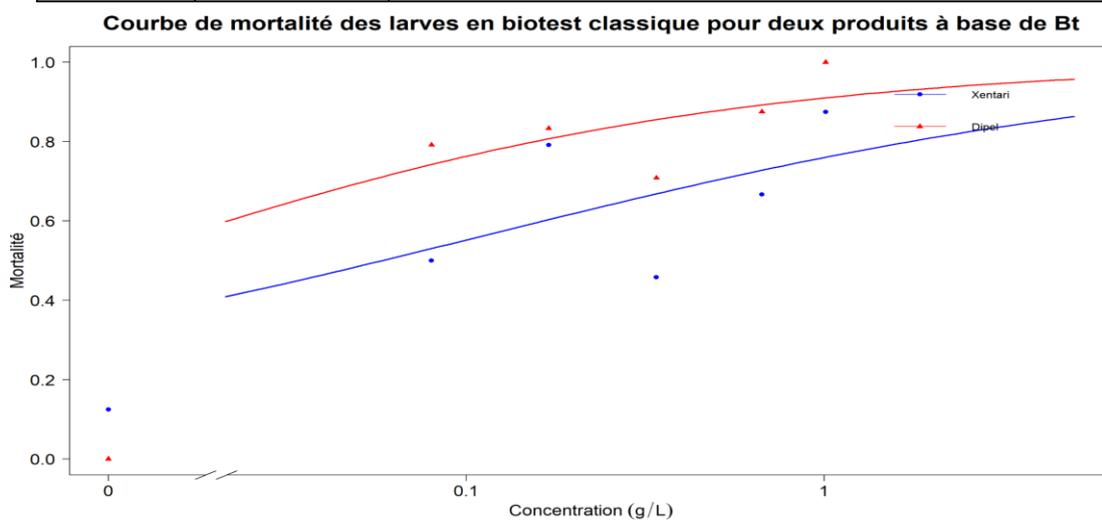


Figure 5 : Courbe dose/réponse de la mortalité de larves CpNPP en fonction de deux produits à base de *Bacillus thuringiensis* (Xentari, Dipel). La dose est en gramme de produit par litre de bouillie phytosanitaire.

Parcelle 5

Les deux témoins positifs (produits de synthèse), Affirm et Voliam, induisent des mortalités significativement différentes du témoin dès 10 minutes d'exposition des larves. Voliam atteint même une médiane de 100 % de mortalité des larves après 1h d'exposition. (Figure 7)

Les produits à base de CpGV montrent des efficacités plus faibles que les produits de synthèse. Une exposition d'au moins 30 minutes est nécessaire pour qu'une efficacité d'EvoF et EvoN se différencie du témoin. Quant au produit Evo, il lui faut au moins 60 minutes pour montrer une efficacité significative. Evo est le produit le moins significativement différent du témoin (p value < 0.01) et EvoF et EvoN ne sont pas différenciables l'un de l'autre.

Effet de la durée d'exposition aux produits

La mortalité observée a une tendance à augmenter avec la durée d'exposition des larves pour tous les produits testés, sauf pour les deux dernières pour les produits EvoN et Affirm où elle reste stable. Les différences entre les mortalités aux durées d'exposition testées pour un même produit ne sont pas toujours significatives même si elles vont toujours dans le sens attendu, c'est-à-dire une corrélation positive. Cette non significativité systématique est due à une variance importante entre observations.

Comparaisons entre traitements au sein d'un même stade baladeur

Une durée de stade baladeur de 10 minutes suffit à l'Affirm et au Voliam pour assurer une mortalité de 66.7 % et 79.2 % alors que les trois produits à base de CpGV ne sont pas significativement différents du témoin pour cette durée. Une exposition de 30 minutes avec Evo ne suffit toujours pas pour qu'il se démarque du témoin alors que c'est le cas pour tous les autres produits. Lorsque l'on expose les larves pendant 60 minutes, les mortalités provoquées par tous les produits testés sont significativement différentes du témoin. Les produits Evo, EvoF et EvoN ne sont pas dissociables entre eux. Voliam et Affirm sont les produits les plus efficaces à 60 minutes et ne sont pas significativement différents entre eux. (p value > 0.05)

Parcelle 16

Les résultats observés à partir des feuilles prélevées sur la parcelle 16 sont très différents de ceux de la parcelle 5. Tout d'abord, les larves déposées sur les feuilles non-traitées ont une probabilité plus importante de mourir quand la feuille provient de la parcelle 16 que quand elle provient de la parcelle 5 (52.9 % pour P16 contre 37,8 % pour P5). En outre, les quelques produits qui montrent des efficacités significativement différentes du témoin ont des niveaux d'efficacité très faibles. Ceci est largement insuffisant pour gérer des populations du carpocapse des pommes en vergers commerciaux (Figure 8).

d) Corrélation des observations faites en verger et les résultats des tests hybrides

Il y a une relation inverse significative entre le pourcentage de piqûres dans le verger et la mortalité des larves, observée avec le test hybride. Ceci signifie que lorsque le taux de mortalité des larves dans le test hybride est faible, le produit est moins efficace et ça se répercute sur les dégâts observés en plein champs, qui augmentent (Figure 9).

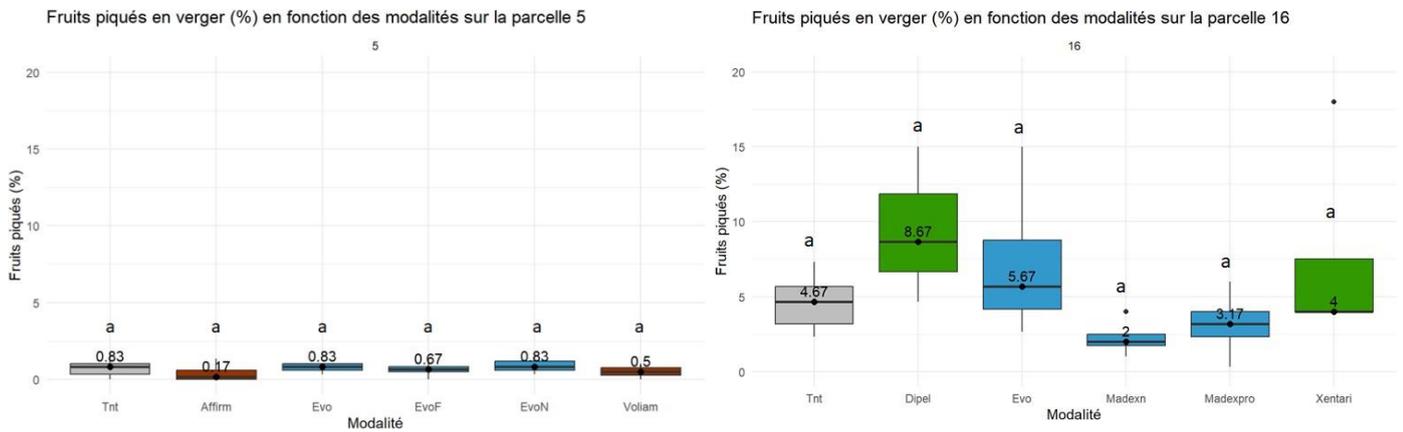


Figure 6 : Pourcentage de fruits piqués (piqûres sèches et actives) en verger dans l'essai efficacité sur la parcelle 5 et 16 au 01/07/2024. Les produits à base de virus sont en bleu, les produits de synthèse en marron et les produits à base de Bt en vert. La valeur des médianes pour chaque modalité et les lettres de significativité ($p < 0.05$) sont ajoutées.

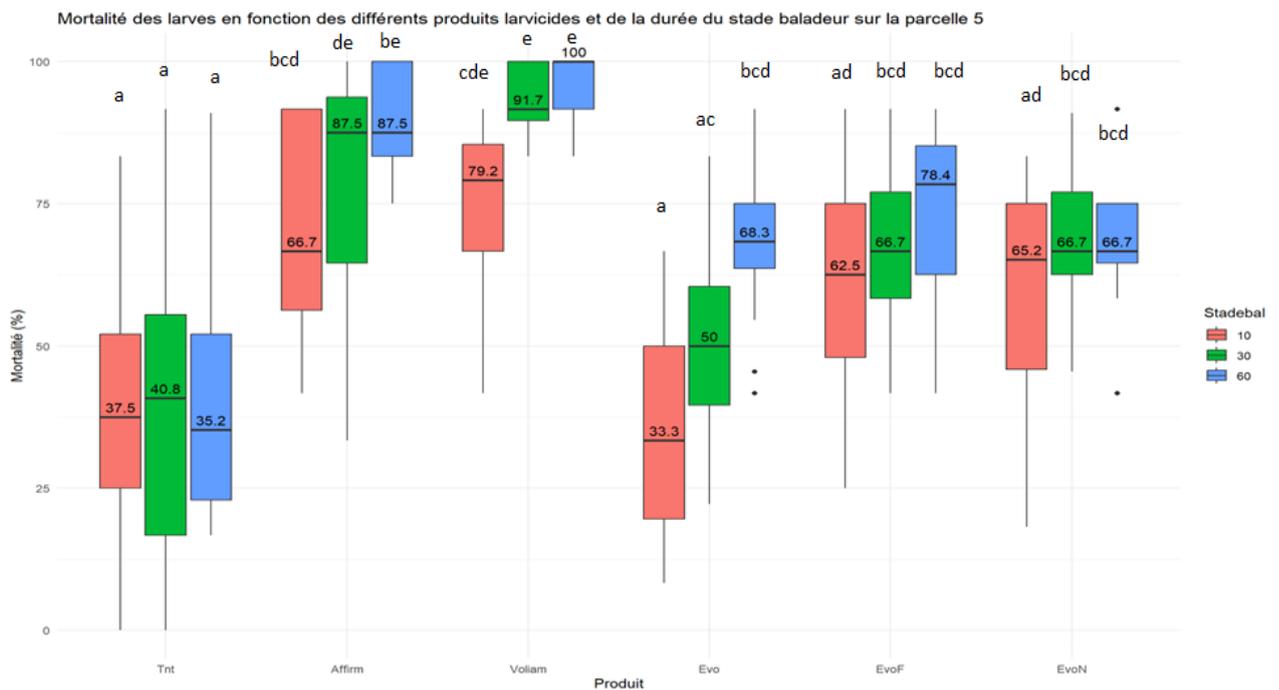


Figure 7 : Mortalité larvaire par test hybride. Les feuilles ont été prélevées sur la parcelle 5. 5 produits larvicides sont testés ainsi que trois durées de stade baladeur (10, 30 et 60 minutes). Les lettres montrent la significativité des différences entre chaque modalité ($p < 0.05$).

Le coefficient associé au pourcentage de piqûres est négatif (-1.5043), ce qui indique qu'une augmentation de 1% du pourcentage de piqûres est associée à une diminution de la mortalité des larves de 1.5043%. Ce résultat est statistiquement significatif (p-value = 0.00388), ce qui signifie que la probabilité que cette relation soit due au hasard est faible.

Le coefficient de détermination (R-squared) est de 0.1579, ce qui signifie qu'environ 15.79 % de la variance du pourcentage de piqûre est expliquée par la mortalité des larves suite à une exposition aux produits phytosanitaires. Cela indique que la relation entre ces deux variables est faible et que d'autres facteurs sont probablement importants pour expliquer les dégâts dans une parcelle.

2) Rémanence des produits larvicides

Dans cet essai nous ne pouvons présenter que les résultats pour les durées de 0, 4 et 14 jours post-traitement car les larves utilisées pour les durées 7 et 10 jours après traitement étaient de mauvaise qualité. Les mortalités naturelles, dans les témoins non traités, étaient donc beaucoup trop importantes (96 % à J7 et 79 % à J10) (Annexe IV). Le jour du traitement, EvoF est le produit ayant la meilleure efficacité (pvalue < 0.01), suivi par Evo (pvalue < 0.05) les autres produits ne montrent pas d'effet sur la mortalité de larves. C'est également le cas 4 jours après traitement (pvalue < 0.001 pour Evo et EvoF). 14 jours après l'application, aucun produit ne se distingue du témoin (Figure 10).

3) Impact de la qualité de pulvérisation sur l'efficacité des traitements

Les résultats du gradient de pulvérisation sont présentés en Annexe (Annexe III). Ces résultats montrent bien un pourcentage de couverture de la surface traitée croissant en fonction des niveaux de traitement souhaités. Cependant la modalité double passage, qui mime deux passages de pulvérisateur tractés au champ, n'offre pas toujours une couverture plus dense de la feuille en comparaison de la modalité simple passage.

Comparaisons entre les différents niveaux de pulvérisation pour une même modalité

Lorsque EvoN est pulvérisé à la dose préconisée et à un niveau 1, elle ne garantit pas un taux de mortalité élevé (46.9 %). Au niveau 2, la modalité simple passage assure 68.8 % de la mortalité mais ce n'est pas significativement différent du niveau 1 (pvalue = 0.82). Traiter à un niveau 3 assure une bonne mortalité des larves (84.4 %) et est significativement différent du niveau 1 et du témoin (pvalue < 0.001). Traiter avec une plus forte pulvérisation n'est pas plus efficace car le niveau 3 et 4 assure un taux de mortalité identique (pvalue = 0.99) (Figure 11).

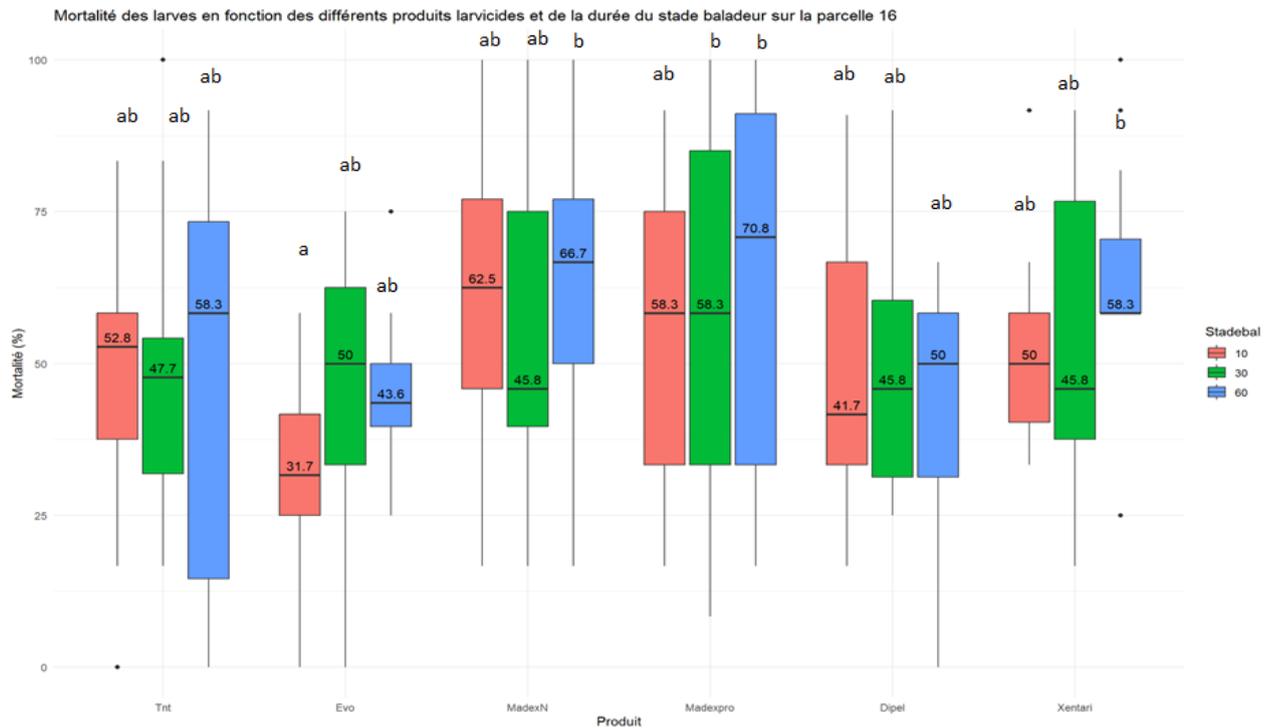


Figure 8 : Mortalité larvaire par test hybride. Les feuilles ont été prélevées sur la parcelle 16. 5 produits larvicides sont testés ainsi que trois durées de stade baladeur (10, 30 et 60 minutes). Les lettres montrent la significativité des différences entre chaque modalité ($p < 0.05$).

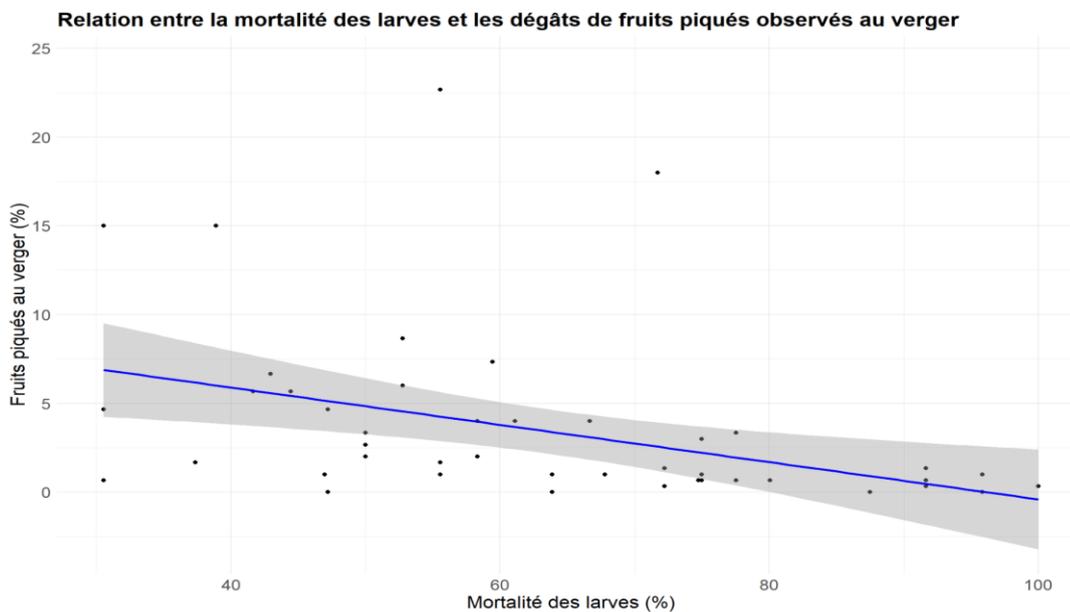


Figure 9 : Courbe de corrélation entre la mortalité observée dans le test hybride après 60 minutes d'exposition des larves et les dégâts observés dans l'essai d'efficacité en verger pour les mêmes modalités

Lorsque l'on mime un double passage de tracteur, le niveau 1 de qualité de traitement assure 62.5 % de mortalité et il est significativement différent du témoin (p value < 0.01). Traiter à un niveau 2 assure une meilleure mortalité (86.4 %) mais le résultat n'est pas significativement différent du premier niveau. C'est surtout le niveau 3 et 4 qui assure de très bonne mortalité (90.6 % et 100 %) et des belles significativités (p < 0,01).

Lorsque EvoN est utilisée à une concentration 2 fois plus haute que celle autorisée (double concentration), il n'y a pas de différence significative entre les 4 niveaux. À un niveau de pulvérisation 1 le taux de mortalité est déjà très élevé (86.4 %), et grimpe à 95.5 % pour le niveau 3 et 100 % pour le niveau 4. Le taux de mortalité étant déjà très élevé, il est difficile de discriminer ces différentes modalités (saturation du signal qui arrive à 100 % trop rapidement).

Comparaisons entre traitements au sein d'un même niveau de pulvérisation :

Si la qualité de traitement est mauvaise (niveau 1), c'est la modalité "Double concentration" qui est la plus efficace. Elle est significativement plus efficace que la modalité "Double passage" (p < 0,01). Ce résultat est surprenant car la quantité totale de particules virales sur la feuille est la même pour ces deux modalités seule la répartition des virus sur la feuille change. Cela est peut-être dû à la trop faible proportion de feuilles couvertes qui induit un biais. En effet, si la qualité de traitement est moyenne à médiocre (niveau 2), l'efficacité du "Double passage" devient égale à celle de la "Double concentration". Ces deux modalités se démarquent du simple passage de manière faiblement significative (p value = 0.0531). Enfin quand la qualité de traitement est bonne (niveau 3) les trois modalités assurent une forte mortalité larvaire quel que soit la modalité. Cependant si la pulvérisation est excessive (niveau 4), un simple passage permet déjà de tuer 84,4 % des larves et les deux autres modalités assurent 100 % de mortalité.

Le modèle indique que la modalité Double passage et Double contraction au niveau 4 ne sont pas statistiquement différentes des témoins malgré l'observation de 100 % de mortalité des larves dans ces modalités. Le modèle a des difficultés à converger à cause des résultats extrêmes (100 % de mortalité), particulièrement avec la régression logistique où l'odds ratio devient très grand ou petit. Cela peut entraîner des coefficients non fiables et des erreurs standard élevées pour ce type de données extrêmes.

Corrélation entre % de couverture d'une feuille de pommier par EvoN et % de mortalité médiane des larves exposées

Afin de déterminer si la couverture d'une feuille par le produit est un bon indicateur de la qualité de pulvérisation et influe sur la probabilité qu'une larve ingère des particules virales, nous avons cherché à voir si une corrélation existait entre ces deux facteurs (Figure 12). Nos données montrent qu'il y a une bonne corrélation positive ($r^2 = 0,87$). Le coefficient de détermination est de 0,8688 ; ce qui signifie que 87 % de la variance de la mortalité des larves est expliquée par la surface traitée. La qualité de pulvérisation est donc un facteur important dans le succès de l'action d'un produit à base de CpGV.

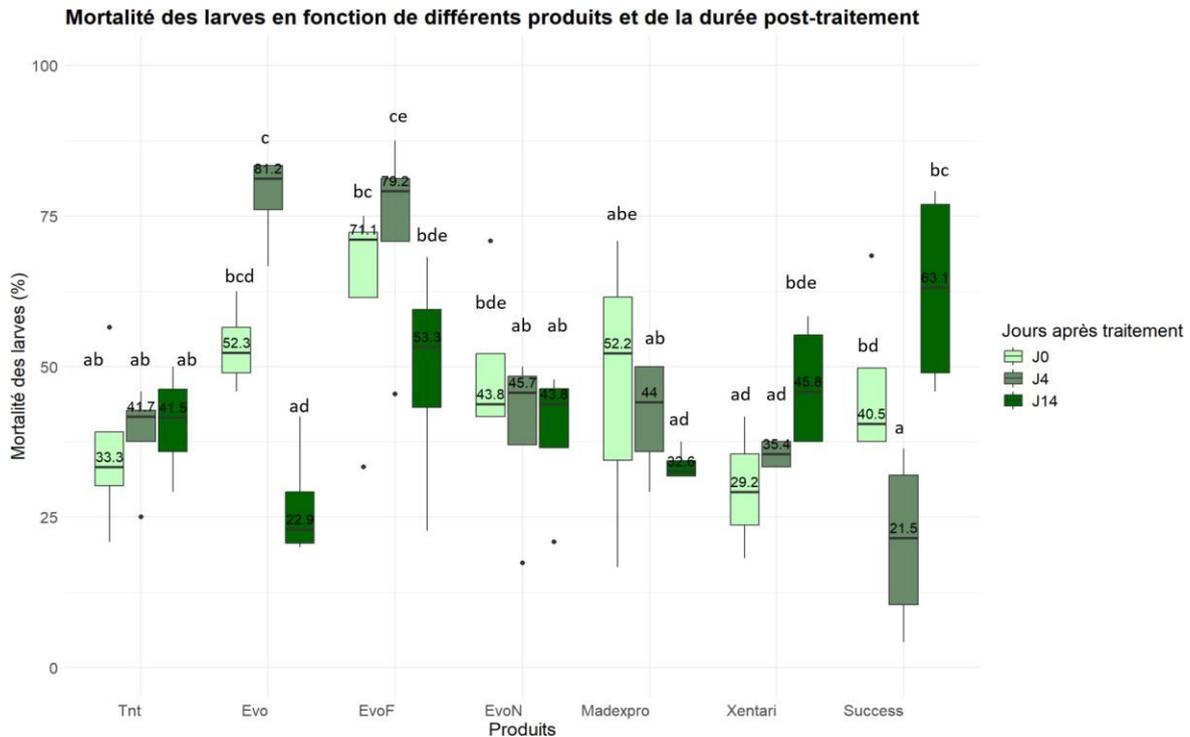


Figure 10 : Variation de la mortalité des larves dans l'essai rémanence sur la parcelle 11 en fonction des produits larvicides utilisés dans le test hybride et en fonction de la durée post-traitement (J0, J4, J14 jours après traitement). La durée d'exposition des larves est fixée à 60 minutes. Les lettres montrent la significativité des différences entre chaque modalité ($p < 0.05$).

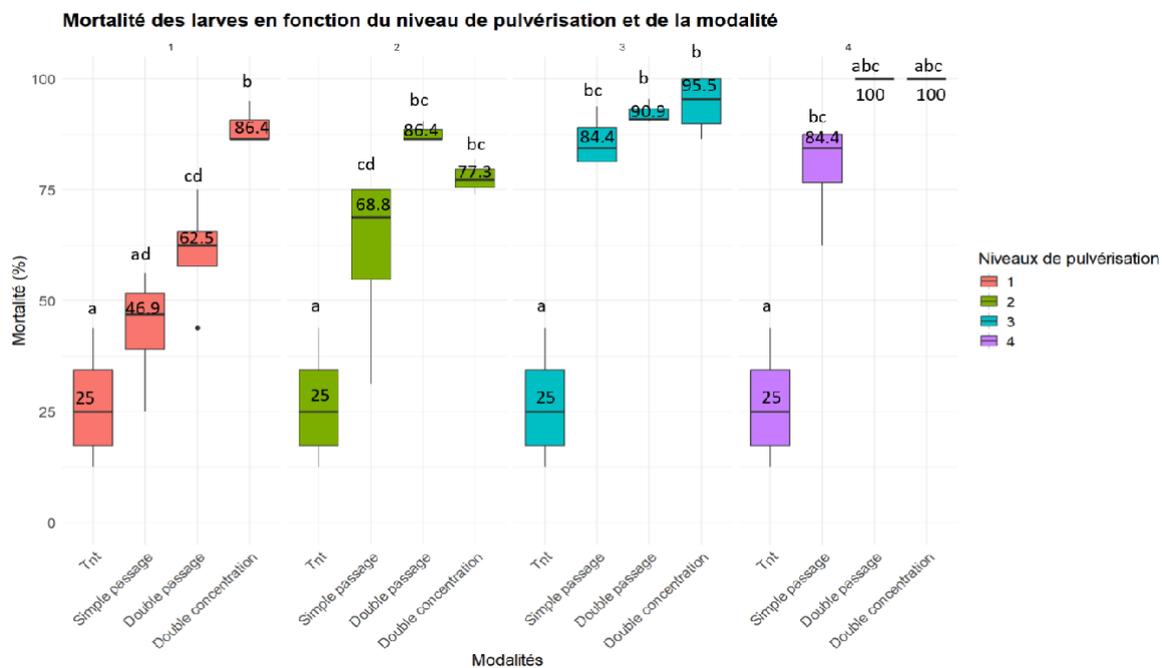


Figure 11 : Variation de la mortalité des larves en fonction de la qualité et quantité de pulvérisation (Simple passage, Double passage, Double concentration) du produit (EvoN) avec la méthode de test hybride. Les niveaux de pulvérisation sont numérotés de 1 à 4 du plus faible au plus fort. La durée d'exposition des larves sur les feuilles a été fixée à 60 minutes. Les lettres montrent la significativité des différences entre chaque modalité ($p < 0.05$).

- 4) Intérêt des mélanges d'isolats viraux dans les produits commerciaux pour gérer des populations d'insectes comportant une part d'individus résistants au génotype A
 - a) Génotypes retrouvés dans les larves sensibles exposées à des produits commerciaux

Les larves sont récupérées de l'essai efficacité sur la première et la troisième répétition, sur un total de 809 larves, 392 sont mortes (48.5 %) et 417 sont vivantes (51.5 %). 17,6 % des larves mortes sont infectées, contre 10,6 % chez les vivantes.

MadexN est un produit composé de plusieurs souches virales, 5 annoncées, ici, 3 souches ont été retrouvées dans les larves infectées : A, E et B. La souche A prédomine sur la E suivie de la B. Le groupe génotypique C n'a pas été retrouvé dans les larves mortes. Quant au groupe génotypique D, la PCR ne permet pas de différencier D de A, il est alors peut être compris dans la fréquence du A, ce qui augmente sa proportion (Tableau 4).

Une partie non négligeable des larves de la modalité Madexpro ont été infectées par le génotype A alors que ce génotype n'est mentionné que marginalement dans la composition du produit commercial (2 %).

b) Impact de la durée du stade baladeur dans l'occurrence d'infection multiples

Effet du produit : EvoN est le produit qui a infesté le plus de larves alors que Madexpro en a infecté le moins, ils sont significativement différents (p value = 0.01362). EvoN infecte également plus de larves que MadexN (p = 0.05015). Les autres comparaisons entre produits n'indiquent pas de différences significatives, ce qui signifie que ces produits n'ont pas d'effets statistiquement distincts sur le niveau d'infestation des larves (Figure 13).

Seuls les produits Evo, EvoN et MadexN présentent des multi-infections pour des durées de stade baladeur de 60 minutes et 30 minutes pour le MadexN.

Effet du stade baladeur : Lorsque le stade baladeur dure 30 ou 60 minutes, les chances d'infections multiples sont plus élevées qu'avec une durée de 10 minutes (p < 0.05). Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les durées d'exposition de 30 et 60 minutes.

Effet du génotype viral : La proportion des génotypes dans les larves infectées est liée à l'abondance de ces groupes dans le produit initial, ainsi que par une possible compétition entre les groupes génotypiques. Cependant, on observe que les larves CnPP sont particulièrement sensibles aux génotypes des groupes E et A.

La double infection AE est moins présente dans les larves infectées par rapport à E et à A (p = 0.0341), indiquant que la multi-infection AE ne se produit que si les infections simples avec A et E sont suffisamment importantes. Il semblerait donc que l'occurrence d'infections multiples soient liées à la probabilité qu'une larve rencontre deux virus de groupes génotypiques différents.

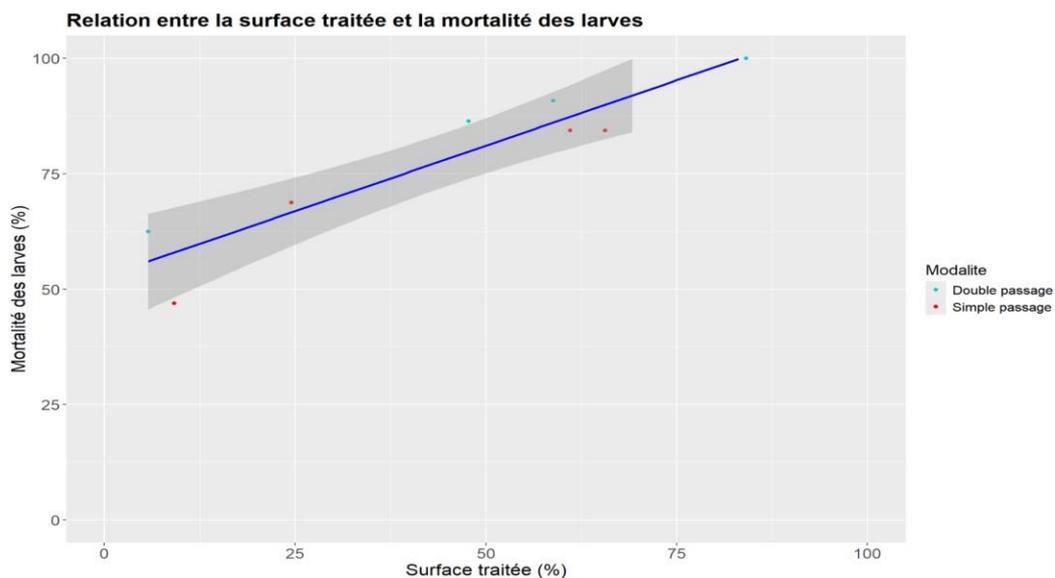


Figure 12 : Corrélation entre la médiane de la mortalité larvaire et la proportion de feuille couverte (%) par Evo pulvérisé à la dose autorisée (simple dose seulement).

Tableau 4 : Pourcentage de chaque génotypes parmi les larves infectées (A, B, C, D, E) de l'essai efficacité sur les parcelles 5 et 16.

| Groupe génotypique | Carpovirusine Evo CpGV-R5 | Madexpro CpGV-V15 | MadexN CpGV-V45 |
|--------------------|---------------------------|-------------------|-----------------|
| A et D | 36 % → 18.2 % | 2 % → 46.2 % | 35 % → 64.3 % |
| B | | 48 % → 23.1 % | 27 % → 3.6 % |
| C | | | 8 % → 0 % |
| E | 64 % → 81.8 % | 50 % → 30.8 % | 31 % → 32.1 % |

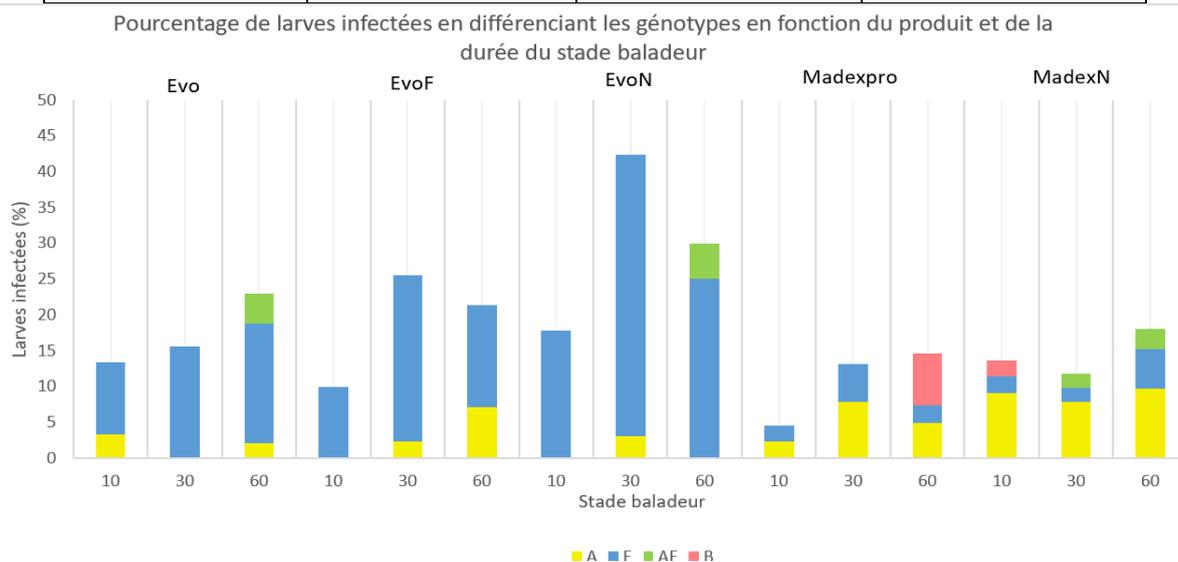


Figure 13 : Histogramme empilé de la fréquence des groupes génotypiques viraux retrouvés dans les larves CpNPP pour plusieurs produits de virus (Evo, EvoF, EvoN, Madexpro, MadexN) et trois durées de stade baladeur (10, 30, 60 minutes).

c) Rôle de la qualité de pulvérisation dans l'occurrence d'infections multiples

Les larves sont récupérées de l'essai qualité de pulvérisation, sur un total de 380 larves, 355 sont mortes (93.4 %) et 25 sont vivantes (6.6 %) et 61,8 % des larves sont infectées.

Différence avec les génotypes : Le génotype E est significativement plus présent dans les larves infectées que le génotype A, avec une p -value < 0.05, suggérant que E est plus susceptible d'infecter les larves. Étant donné qu'Evo est composé d'une majorité de génotype E, l'observation a du sens.

La double infection par les génotypes A et E est moins présente qu'une simple infection par E par exemple ($p < 0.001$) (Figure 14).

Différence avec les modalités (Simple passage, Double passage, Double concentration)

Aucune différence significative n'est observée entre les modalités de traitement pour la particularité à infecter les larves. Les modalités "Double passage" et "Double concentration" ne favorisent pas l'infection par un génotype en particulier ou une double infection par rapport à la modalité "Simple passage" (Figure 14). La quantité de particules virales sur les feuilles n'influe donc pas sur la proportion de simples et de doubles infections.

Différence avec la qualité de pulvérisation :

La fréquence de simple infection n'évolue pas avec la qualité de pulvérisation alors que c'est le cas pour les infections multiples (Figure 14).

Corrélation entre % de couverture d'une feuille de pommier par de la carpovirusine Evo2 et % de la double infection par les génotypes A et E (Figure 15).

Afin de déterminer si la couverture d'une feuille par le produit influe sur la probabilité qu'une larve ingère des particules virales de deux génotypes et que les deux l'infectent, nous avons cherché à voir si une corrélation existait entre ces deux facteurs (Figure 15). Nos données montrent qu'il y a une bonne corrélation positive ($r^2 = 0.79$). Le coefficient de détermination est de 0,79, ce qui signifie que 79% de la variance de la présence de la double infection est expliquée par la surface traitée.

Une larve a une probabilité plus élevée d'être infectée par les deux génotypes lorsqu'elle est exposée à une pulvérisation de niveau 2 par rapport au niveau 1. Cette probabilité augmente encore avec les niveaux 3 et 4 ($p = 0.001$).

La qualité de pulvérisation est donc un facteur important dans le succès de l'action d'un produit à base de CpGV.

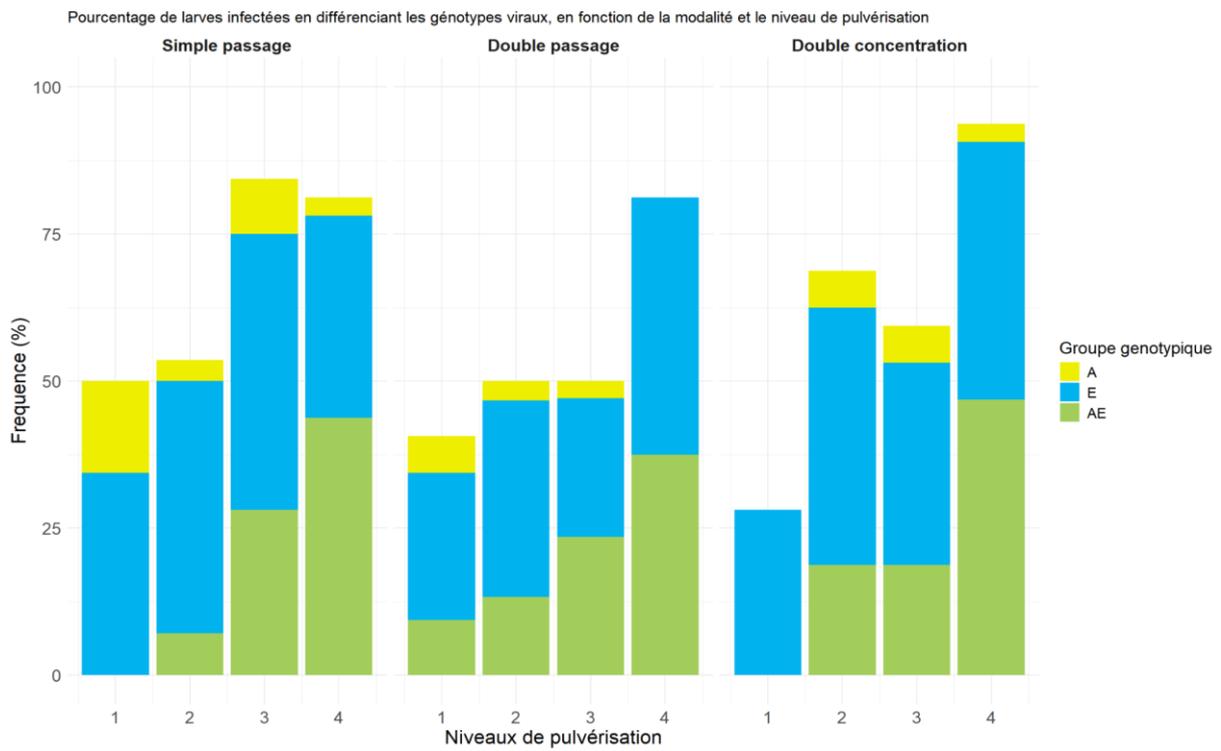


Figure 14 : Influence de la qualité de pulvérisation de EvoN sur l'occurrence d'infection avec différents groupes génotypiques de CpGV

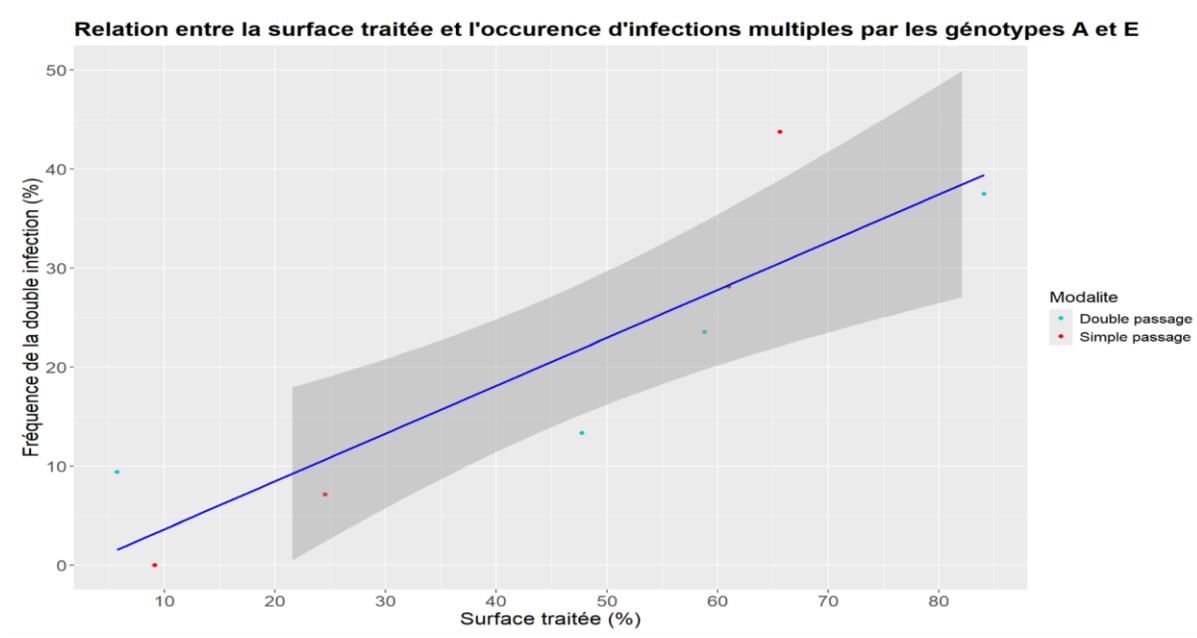


Figure 15 : Corrélation entre la fréquence de la double infection par les génotypes A et E et la proportion de feuille couverte (%) par l'insecticide EvoN pulvérisé à la dose autorisée (simple dose seulement).

d) Importance de la composition en géotypique viral d'un produit de biocontrôle sur des insectes résistants

Les larves résistantes au groupe géotypique A de CpGV ne meurent pas plus que les témoins lorsqu'elles sont mises en contact avec du MadexPro alors que c'est le cas quand elles sont déposées sur des feuilles traitées avec Evo. La mortalité induite par Evo sur les larves résistantes croît avec la durée d'exposition comme nous l'avons observé pour les larves sensibles. Seule une durée d'exposition de 30 et 60 minutes avec Evo induit des différences significatives de mortalité (Figure 16).

Il y a un effet positif du stade baladeur sur la mortalité des larves avec le produit Evo, plus la larve est en contact avec le produit, plus le produit tue et infecte. C'est observable sur la mortalité des larves mais également sur la fréquence de géotype viral retrouvée dans les larves. En effet pour un stade baladeur de 30 minutes sur des feuilles traitées avec Evo seulement 5 % des larves sont infectées par le géotype E alors qu'au bout de 60 minutes ; 9 % sont infectées par l'isolat E et 4.8 % par l'isolat A (Figure 17).

Très peu de larves RGV sont infectées par les isolats viraux, seulement 3.4 % contre 18.4 % pour les larves CpNPP. Le seul géotype ayant infecté des larves résistantes à partir d'un traitement avec du Madexpro est le B lorsque la durée d'exposition est de 60 minutes. Les résultats de test hybride sont cohérents avec ceux de PCR, puisque Madexpro semble en réalité composé d'une majorité de groupe géotypique A d'après nos PCR ne présente pas d'efficacité sur les larves RGV résistantes à ce groupe. De plus, le Madexpro a un très faible pouvoir infectieux (4 % d'infection par le géotype B).

Seule une larve a été infectée par le géotype A avec Evo mais étant donné que les insectes RGV sont résistants au CpGV-M contenant la souche de virus de géotype A, le produit ne sera pas efficace pour tuer la larve.

Mortalité des larves RGV en fonction de deux produits à base de virus et de trois stades baladeur

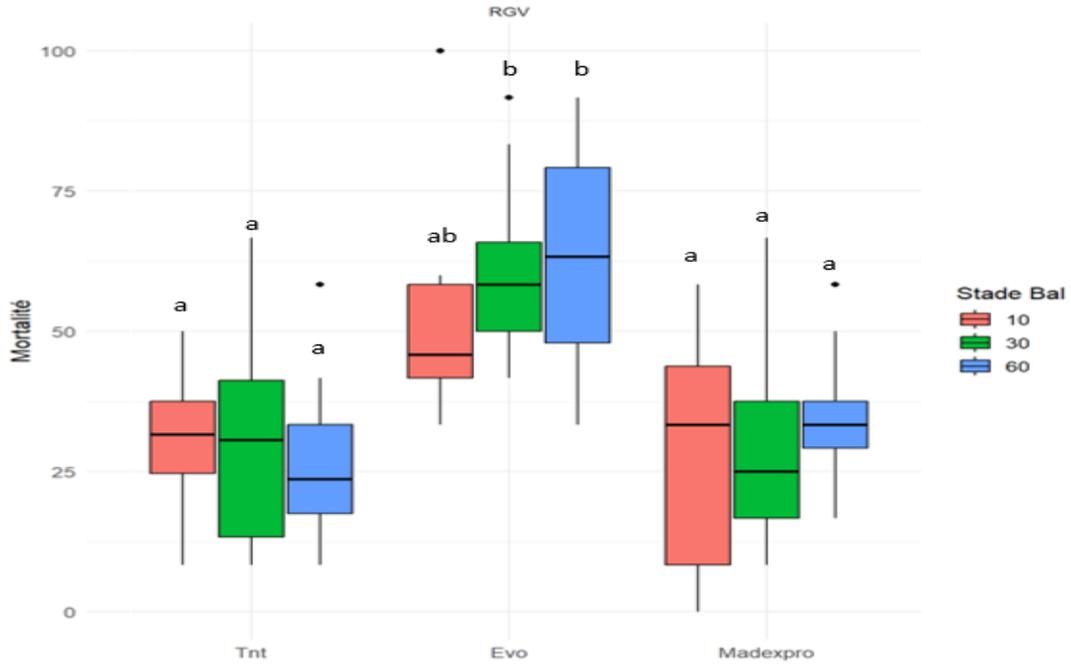


Figure 16 : Mortalité des larves RGV résistantes au CpGV-M par test hybride. Les feuilles ont été prélevées sur la parcelle 16. 2 produits larvicides sont testés ainsi que trois durées de stade baladeur (10, 30 et 60 minutes). Les lettres montrent la significativité des différences entre chaque modalité ($p < 0.05$).

Pourcentage de larves RGV infectées en différenciant les génotypes en fonction du produit et de la durée du stade baladeur

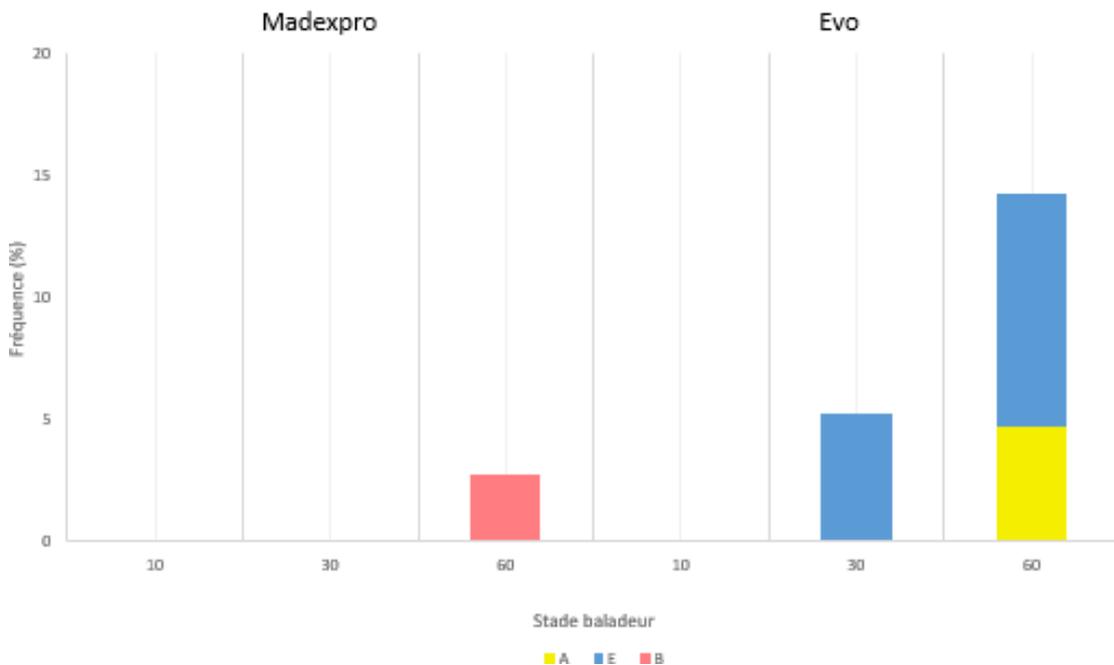


Figure 17 : Histogramme empilé de la fréquence des groupes génotypiques viraux retrouvés dans les larves RGV pour plusieurs produits de virus (Evo, Madexpro) et trois durées de stade baladeur (10, 30, 60 minutes).

Discussion, conclusion et perspectives

Un des objectifs majeurs de ce stage est de développer une méthode hybride terrain/laboratoire qui soit fiable pour l'évaluation de l'efficacité des produits phytosanitaires. Dans nos essais, la relation observée entre les résultats du test terrain et du test hybride est faible. Cela peut être en partie expliqué par la faible pression parasitaire en carpocapse des pommes cette année dans les parcelles accueillant les tests. Les contraintes expérimentales de terrain dont nous cherchons justement à nous extraire avec un test hybride nous empêchent de conclure sur la pertinence de ces tests. Il est donc nécessaire de répéter cette expérience pour valider pleinement la méthode et avoir plus de recul sur les paramètres permettant d'améliorer la corrélation.

Parmi les produits de biocontrôle, ce sont les produits Carpovirusine EVO2, notamment EvoF et la nouvelle EvoN, qui sont les plus efficaces sur les larves. Lorsque le temps d'exposition des larves est le plus long (60 minutes), les trois produits Evo montrent une efficacité similaire, ce qui n'est pas surprenant étant donné qu'ils contiennent la même concentration en virus et partagent une composition génotypique identique. EvoF et Evo montrent une très bonne persistance d'action quatre jours après le traitement. L'essai ne permet pas de démontrer que l'adjuvant Fieldor améliore l'efficacité de ce produit bien qu'une tendance positive se dessine. Les données de la persistance d'action des produits à 7 à 10 jours auraient été déterminantes puisque les traitements sont cadencés avec cette périodicité. Il est quand même observé que l'efficacité des produits à base de micro-organismes est relativement courte puisque 14 jours après l'application l'efficacité a significativement décliné. Il est donc préférable d'utiliser ces pesticides dès le début des éclosions, voire même avant son apparition.

Les produits à base de *Bacillus thuringiensis* ne montrent pas d'efficacité ni dans le test hybride ni sur le terrain. Cependant, ces toxines bactériennes tuent les larves lorsqu'elles sont exposées pendant 7 jours (test biotest classique). Andermatt et al, ont fait les mêmes observations, ils ont montré une efficacité probante au laboratoire mais des échecs sur le terrain du fait de la faible proportion de Bt ingéré (Andermatt et al., 1988). Le mode d'action du Bt semble donc différer de celui des virus. Il est possible qu'un temps d'exposition plus long soit nécessaire pour que le Bt ait une action. L'efficacité du Bt est conditionnée à la biologie de l'insecte. En effet, le Bt est efficace contre la tordeuse orientale du pêcher (*Grapholita molesta*), une tortricidae proche du carpocapse des pommes (Ricietto et al., 2016). Cette différence de sensibilité vient probablement du fait que la tordeuse orientale entre et sort du végétal plusieurs fois durant son stade larvaire. Elle a donc l'opportunité de se contaminer bien plus que le carpocapse des pommes qui n'a qu'une période courte de vie à l'extérieur des fruits. Cette hypothèse va dans le sens de l'importance de mettre au point un test qui mime la biologie de l'insecte au moment de son exposition à l'insecticide pour mieux coller à la réalité.

Le nouveau produit MadexN, en cours d'homologation, suscite beaucoup d'espoir puisqu'il contient un mélange de 5 génotypes viraux, contre 3 pour Madexpro et seulement 2 pour les produits Evo. Cependant, les résultats décevants quant à l'efficacité du mélange de 5 génotypes soulèvent des questions sur sa composition réelle et sa formulation. Il convient également de noter que les produits Madex ont une concentration en corps viraux trois fois inférieure à celle des produits Evo (Annexe II). Bien que l'entreprise assure que cette concentration est suffisante pour garantir une bonne mortalité, les résultats des essais ne permettent pas de le confirmer. Il est toutefois difficile de conclure sur l'efficacité des produits Madex, car leur performance avec le test hybride a été évaluée avec des feuilles provenant de la parcelle 16 qui soulève quelques

interrogations dû au fort taux de mortalité des larves dans les témoins et d'une très grande variabilité des résultats. Dans ces conditions l'efficacité de l'ensemble des produits testés sur cette parcelle n'a pas pu être démontrée. Les deux parcelles utilisées pour les essais suivent le même itinéraire technique et respectent le même cahier des charges des Bonnes Pratiques d'Expérimentation (BPE). L'effet de la variété de pommiers est peut-être à l'origine de cette différence, car l'efficacité des produits est également influencée par le support végétal, notamment la composition en métabolites secondaires ou la pilosité des feuilles. Les cultivars moins pileux ont l'avantage de permettre une meilleure couverture de pulvérisation que ceux à trichomes denses. Les variétés avec une pilosité abondante présentent quand même un intérêt dans la lutte contre les larves de carpocapse car elles ralentissent la locomotion des larves (Blomefield et al., 1997). La variété Breaburn sur la parcelle 5 est plus pileuse que la Granny Smith sur la parcelle 16. L'impact de la variété sur la pénétration et la répartition des gouttes pulvérisées ainsi que sur la mobilité des larves de carpocapses serait à étudier pour intégrer d'autres paramètres influençant l'efficacité des produits dans les différents tests.

Un des paramètres à améliorer dans le test hybride est le taux de mortalité des larves dans les témoins. Un taux élevé ne permet pas de comparer les produits entre eux, car il est difficile de déterminer si la mortalité est due à la santé des larves au moment du test, aux conditions expérimentales ou à l'efficacité des traitements. Etant donné que les témoins sans stade baladeur (pas de passage sur feuille) montrent une mortalité faible, nous considérons que la santé des larves est bonne. La forte mortalité des témoins pourrait donc s'expliquer par deux hypothèses. La première est la présence de résidus autres que des insecticides ciblés carpocapse des pommes sur les feuilles (fongicides, engrais foliaires ...). La deuxième hypothèse est la dérive des produits pulvérisés entre les blocs des essais BPE. Cette deuxième hypothèse a été vérifiée, grâce à une analyse résidus sur feuille réalisée sur les blocs témoins des essais BPE, la présence de chlorantraniliprole (substance active de Voliam) a été retrouvée en quantité détectable mais non quantifiable. Cela suggère une pollution avec des produits utilisés sur d'autres blocs au fil des traitements. Pour remédier à cela, il serait nécessaire de repenser la disposition des essais BPE. Aux vues de cette découverte nous avons lavé les feuilles en provenance du verger et réalisé les traitements sur feuilles coupées en laboratoire pour l'essai "qualité de pulvérisation". Grâce à cette adaptation nous avons réduit la mortalité des témoins à 25 % contre 37.8 % et 52.9 % dans les essais efficacité et 38.8 % dans l'essai rémanence.

Une fois que cette méthode de test hybride aura montré davantage sa robustesse, elle pourrait être proposée aux conseillers agricoles afin de fournir davantage de données quant à l'efficacité des produits. La méthode pourrait également être adaptée à d'autres ravageurs. Les essais en verger et les tests hybrides doivent être considérés comme complémentaires. Une stratégie possible serait d'évaluer d'abord un produit en test hybride avant de le tester en conditions BPE, permettant ainsi de présélectionner les produits les plus efficaces.

Dans les différents essais de ce stage, les méthodes de pulvérisation ont varié. Chaque essai a eu un outil de pulvérisation différent (pulvérisateur à dos, pulvérisateur agricole, spray). Pour évaluer l'efficacité des produits, l'application a été réalisée à l'aide d'un pulvérisateur à dos. Cependant, en raison de la disposition des feuilles dans l'arbre, la répartition du produit sur celles-ci n'a probablement pas été homogène. Ainsi, les feuilles prélevées n'ont peut-être pas reçu la même quantité de produit, ce qui pourrait avoir influencé les résultats d'efficacité. Dans l'essai sur la rémanence, les surfaces foliaires ayant reçu du produit étaient bien moindres par rapport à l'essai d'efficacité, ce qui pourrait expliquer les différences de résultats. Wood a

montré que l'utilisation d'un pulvérisateur à dos, comme dans l'essai d'efficacité, était associée à une meilleure mortalité des larves, probablement grâce à une meilleure couverture du produit sur le matériel végétal, contrairement à un pulvérisateur agricole (Wood., 1965). Cela expliquerait pourquoi moins de produits se démarquent du témoin dans l'essai de rémanence effectué avec un pulvérisateur agricole.

Une conclusion importante de mon travail est que pour améliorer la lutte par CpGV, le paramètre clé à retenir est la qualité de la pulvérisation. Il a été démontré qu'un simple passage avec une pulvérisation de niveau 3 était tout aussi efficace pour la mortalité des larves qu'un double passage ou une double concentration aux mêmes niveaux. La technique de pulvérisation utilisée dans l'essai de qualité n'est cependant pas représentative des conditions réelles. En effet, les produits ont été pulvérisés sur des feuilles placées horizontalement sur le support, alors que dans l'arbre, les feuilles sont suspendues verticalement par le pétiole. Dans les conditions réelles lors de la pulvérisation, le produit peut ruisseler sur la feuille et tomber au sol, entraînant ainsi une diminution de la quantité de produit sur le végétal. De plus, dans la modalité "double passage", on s'attendait à obtenir une couverture deux fois supérieure à celle de la modalité « simple passage », ce qui n'est pas le cas, notamment pour les niveaux de pulvérisation 1 et 3. Malgré une couverture non accrue, les particules virales pourraient toutefois être plus concentrées. Ces résultats démontrent aux agriculteurs qu'il est préférable de bien régler son outil que d'augmenter la dose de produit ou de multiplier les passages. Les programmes de réduction de l'utilisation des produits phytosanitaires (Plan Ecophyto) mettent régulièrement l'accent sur les produits utilisés mais peu sur la méthode d'application de ces produits, alors que cela semble être un levier prometteur.

Une pulvérisation de type 3 avec un passage de pulvérisateur est efficace pour tuer plus de 80 % des larves sensibles et en moindre mesure 15 % des larves résistantes. D'après nos résultats, la concentration en virus dans les produits Carpovirusine Evo2® est suffisante pour permettre aux larves d'être infectées lorsque la durée du stade baladeur est égale ou supérieure à 30 minutes ce qui correspond à une durée observable en première génération. En effet, lors de la première génération, le temps avant l'entrée dans le fruit est suffisamment long pour garantir une probabilité d'ingestion de virus élevée. Dans les générations suivantes, il a été montré que les femelles pondent plutôt à la surface du fruit, ce qui conduit à une réduction du temps d'exposition au virus et donc à une réduction de la probabilité d'ingestion. L'efficacité des produits sur les générations suivantes pourrait être évaluée après une exposition directement sur les fruits. Hingsgerber a montré que les morsures de larves apparaissent dès 3,5 minutes après leur contact avec les feuilles, leur nombre augmentant avec le temps, tout comme la quantité d'OB (occlusion bodies) ingérés. Nos résultats sont cohérents avec cela puisque la proportion d'infection double augmente avec le temps d'exposition des larves. Après 30 min d'exposition les deux génotypes pulvérisés sont détectés chez 26 % des larves ; après 2 heures 42 % pour une concentration de corps viraux de $2,16 \times 10^4$ OBcm⁻². (Hingsgerber., 2020). Nos résultats sont cohérents avec ceux déjà publiés.

Le faible taux d'infection général observé pourrait être lié à un niveau de détection insuffisant, comme le suggèrent les bandes faibles sur les gels d'électrophorèse. Bien que cela puisse paraître contre-intuitif, il est possible de diluer les échantillons pour réduire l'effet des inhibiteurs d'ADN. Une autre hypothèse est que certains virus ne sont pas détectés par PCR s'ils ont tué rapidement l'hôte, entraînant une faible présence du virus dans l'échantillon (Hingsgerber., 2020). Il y a également des génotypes moins virulents que d'autres. Il n'a pas été

retrouvé de génotype C dans les analyses des larves contaminées par MadexN, ce génotype étant à la fois moins virulent pour les larves de carpocapse de la pomme que les autres (Eberle et al., 2009) et présent à seulement 4% dans le produit MadexN. De plus, la migration sur gel d'agarose manque de précision lorsque les fragments ont de tailles très proches, comme c'est le cas pour les génotypes viraux A et D, ce qui peut entraîner des confusions entre eux. L'utilisation de marqueurs spécifiques à chaque génotype, capables de se colorer, permettrait une détection plus précise et fiable. Par exemple, le système ANCHORTM permet de suivre chaque génotype à l'intérieur d'une cellule infectée ou d'une larve entière grâce à la fluorescence. Cette méthode ouvre la voie à l'étude des mécanismes clés impliqués dans la résistance des insectes, ainsi qu'à l'analyse des infections multiples (Hinsgerber., 2020).

Lorsque la larve se nourrit de feuilles traitées, elle est supposée ingérer un certain nombre de virus. En effet, la surface moyenne d'une morsure d'alimentation de larve obtenue est d'environ 0,012 mm² ce qui correspond à 12 000 μm² alors qu'un corps d'occlusion NPV fait que 2 μm et un corps d'occlusion GV 0.5 μm. Il est nécessaire que les virus soient suffisamment bien répartis sur la surface de la feuille car l'occurrence de multi infection dépend de la surface traitée et dans ce cas la larve n'a pas besoin de faire beaucoup de morsures pour rencontrer A et E et ainsi être multi-infectée.

Pour contourner la résistance des individus, l'utilisation de mélanges de plusieurs génotypes est cruciale. Dans le cas de la colonie RGV de *Cydia pomonella*, bien que la probabilité de coinfection des cellules intestinales soit faible, la présence de génotype E peut rendre les cellules permissives à l'infection par le génotype A, auquel elles sont normalement résistantes. Il a été observé que même les insectes résistants à un génotype peuvent permettre la réplication de ce génotype si un autre génotype, auquel ils sont sensibles, est ingéré au préalable. Par exemple, un insecte résistant au génotype A peut encore être infecté par A s'il a d'abord consommé un génotype E. Cette stratégie permet aux virus de contourner la résistance des insectes (Hinsgerber., 2020). Il a été retrouvé une larve résistante infectée par le génotype A en contact du produit Carpovirusine Evo2, c'est un résultat très étonnant de par les explications ci-dessus. Des recherches sont à approfondir quant au possible contournement des résistances par un variant appartenant au groupe génotypique A.

Bibliographie

- Al Bitar, L., Gorb, S.N., Zebitz, C.P.W. *et al.* Egg adhesion of the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae) to various substrates: I. Leaf surfaces of different apple cultivars. *Arthropod-Plant Interactions* **6**, 471–488 (2012).
- ANDERMATT M., MANI, E., WILDBOLZ, T. H., et al. Susceptibility of *Cydia pomonella* to *Bacillus thuringiensis* under laboratory and field conditions. *Entomologia experimentalis et applicata*, 1988, vol. 49, no 3, p. 291-295
- Agreste, CHIFFRES ET DONNÉES|MAI 2021 N°8 Enquête Pratiques phytosanitaires en arboriculture en 2018 IFT et nombre de traitements
- Arthurs S.P., Lacey L.A. et Miliczky E.R., 2007: Evaluation of the codling moth granulovirus and spinosad for codling moth control and impact on non-target species in pear orchards. *Biological Control*, 41 (1): 99-109
- ARTHURS, S. P., LACEY, L. A., et FRITTS JR, R. Optimizing use of codling moth granulovirus: effects of application rate and spraying frequency on control of codling moth larvae in Pacific Northwest apple orchards. *Journal of economic entomology*, 2005, vol. 98, no 5, p. 1459-1468.
- Arthurs, s.p. et l.a. Lacey. 2004. Field evaluation of commercial formulations of the codling moth granulovirus: persistence of activity and success of seasonal applications against natural infestations of codling moth in Pacific Northwest apple orchards. *Biol. Control* 31 : 388-397.
- Asser-Kaiser, S., Heckel, D. G. & Jehle, J. A. (2010). Sex linkage of CpGV resistance in a heterogeneous field strain of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Journal of Invertebrate Pathology* 103, 59-64.
- Audemard, H., 1991. Population dynamics of the codling moth. In: Van der Guest, L.P.S., Evenhuis, H.H. (Eds.), *World Crop Pests: Tortricid Pest, their Biologie, Natural Enemies and Control*, pp. 329-338
- Audemard, H., Breniaux, D., Baudry, O., Gendrier, J. P., Antoine, C., et Luttringer, M. 1995. Protection intégrée du verger de pommiers de l'an 2000. *L'Arboriculture Fruitière*. (485) : 15-26.
- Ballard, J.; Ellis, D.J.; Payne, C.C. Uptake of granulovirus from the surface of apples and leaves by first instar larvae of the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Olethreutidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 2000, 10(5), 617–625, doi:10.1080/095831500750016415.
- Beers EH, Stuckling DM, Prokopy RJ, Avila J. (2003). Ecology and management of apple arthropod pests. In: Ferree DC, Warrington IJ (Eds.), *Apples: botany, production and uses*, CABI Publishing, Wallingford, UK 489-514.
- Berling, M., B. Sauphanor, et al. (2013). "A single sex-linked dominant gene does not fully explain the codling moth's resistance to granulovirus." *Pest Management Science* 69(11): 1261-1266
- Belkair S.A., 2018: Lutte biologique par conversation dans les vergers de pommiers : peut-on manipuler les communautés d'araignées pour augmenter leur efficacité contre certains ravageurs. Thèse de doctorat. Université d'Avignon, France. 181P
- Blomfield T.L., Pringle K. L. et Sadie A., 1997: Field observation on oviposition of codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera : Tortricidae), in an unsprayed apple orchard in South Africa. *African Entomology*, 5: 319-336

Boivin T., Chadoeuf J., Bouvier J.-C., Beslay D. et Sauphanor B., 2005: Modelling the interactions between phenology and insecticide resistance genes in the codling moth *Cydia pomonella*. *Pest Management Science*, 61: 53-67

BRAHIM Imene Evaluation d'infra-doses des métabolites primaires comme stimulateurs des défenses naturelles de la plante, sur pommier contre le Carpocapse (*Cydia pomonella* L.) (Lepidoptera ; Tortricidae).

BRAVO, Alejandra, LIKITVIVATANAVONG, Supaporn, GILL, Sarjeet S., *et al.* *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, 2011, vol. 41, no 7, p. 423-431.

Caprile J. et Vossen P., 2005: Codling moth, *Cydia* (*Laspeyresia*) *pomonella*, is a serious insect pest of apples, pears, and English walnuts. University of California, division of Agriculture, and Natural Resources. Publication 7412.

Charmillot, P.-J. 1995. Possibilités et limites de la lutte contre le carpocapse au moyen de la technique de confusion et du virus de la granulose: recommandations pratiques. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 27(2) : 76-77.

Charmillot, P.-J., Pasquier, D. et Scalco, A. 1998. Le virus de la granulose du carpocapse *Cydia pomonella* 2. Efficacité en microparcelles, rémanence et rôle des adjuvants. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 30(1) : 61-64. 104 MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES POMMIERS

Charmillot, P.-J. et Pasquier, D. 2002. Combinaison de la technique de confusion et du virus de la granulose contre les souches résistantes de carpocapse *Cydia pomonella*. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 34(2) : 103–108.

Chukwudebe AC, Cox DL, Palmer SJ, Morneweck LA, Payne LD, Dunbar DM, *et al.* Toxicity of emamectin benzoate foliar dislodgeable residues to two beneficial insects. *J Agric Food Chem* 45: 3689–3693 (1997)

Crouch LS and Feely WF, Fate of [¹⁴C]emamectin benzoate in head lettuce. *J Agric Food Chem* 43: 3075–3087 (1995)

Cloutier, C. et Cloutier, C. 1992. Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures dans la lutte biologique. Dans Vincent, C. et D. Coderre, eds. 1992. *La lutte biologique*. Gaëtan Morin, éditeur. 671p.

DGAL ; 2020, Référentiel des exigences des Bonnes Pratiques d'Expérimentation relatives à l'agrément pour la réalisation d'essais officiellement reconnus.

EBERLE, Karolin E., SAYED, Samy, REZAPANAH, Mohammedreza, *et al.* Diversity and evolution of the *Cydia pomonella* granulovirus. *Journal of General Virology*, 2009, vol. 90, no 3, p. 662-671.

FRANCK, Pierre, GUÉRIN, Fabien, LOISEAU, Anne, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in the codling moth *Cydia pomonella* L.(Lepidoptera, Tortricidae). *Molecular Ecology Notes*, 2005, vol. 5, no 1, p. 99-102.

IGNOFFO, C. M. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida entomologist*, 1992, p. 516-525.

Geier, P.W. The life history of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), in the Australian capital territory. *Aust. J. Zool.* 1963, 11(3), 323–367, doi:10.1071/zo9630323.

GRAILLOT, Benoît. Analyse de la durabilité de la lutte biologique à l'aide de Baculovirus dans les conditions de protection des cultures. 2015. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.

GEBHARDT, Manuela M., EBERLE, Karolin E., RADTKE, Pit, *et al.* Baculovirus resistance in codling moth is virus isolate-dependent and the consequence of a mutation in viral genepe38. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, vol. 111, no 44, p. 15711-15716.

GUERMAH, Dyhia. *Bioécologie du carpocapse du pommier Cydia pomonella L.(Lepidoptera: Tortricidae) et inventaire de la faune arthropodologique dans des vergers de pommier traités et écologique dans la région de Tizi-Ouzou (Sidi Nâamane et Draa Ben Khedda)*. 2019. Thèse de doctorat. Université Mouloud MAMMARI.

Hawtin, R. E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. A., Kuzio, J. A. & Possee, R. D. (1997). Liquefaction of Autographa californica Nucleopolyhedrovirus-Infected Insects Is Dependent on the Integrity of Virus-Encoded Chitinase and Cathepsin Genes. *Virology* 238, 243-253.

HINSBERGER, Aurélie. Structuration des populations virales chez les baculovirus. Importance de l'infection multiple. 2020. Thèse de doctorat. IMT-MINES ALES-IMT-Mines Alès Ecole Mines-Télécom.

JACKSON, D. Michael. Searching behavior and survival of 1st-instar codling moths. *Annals of the Entomological Society of America*, 1982, vol. 75, no 3, p. 284-289.

JAQUES, R. P., LAING, J. E., LAING, D. R., *et al.* Effectiveness and persistence of the granulosis virus of the codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae) on apple. *The Canadian Entomologist*, 1987, vol. 119, no 12, p. 1063-1067.

KOUASSI, Mathias de. Les possibilités de la lutte microbiologique. Emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. *Vertigo-la revue électronique en sciences de l'environnement*, 2001, vol. 2, no 2.

Lacey, L. A., A. Knight, and J. Huber. 2000. Microbial control of lepidopteran pests of apple orchards, pp. 557-576. In L. A. Lacey and H. K. Kaya [eds.], *Field manual of techniques in invertebrate pathology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Lacey, L. A., Thomson, D., Vincent, C. et Arthurs, S. P. 2008. Codling moth granulovirus: a comprehensive review. *Biocontrol Sci Tech.* 18(7) : 639-663.

Lacey, L. A. et Thomas, K. U. 2005. Biological control of codling moth (*Cydia pomonella*, Lepidoptera : Tortricidae) and its role in integrated pest management, with emphasis on entomopathogens. *Vedalia* 12(1): 33-60.

Luque, T.; Finch, R.; Crook, N.; O'Reilly, D.R.; Winstanley, D. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *J. Gen. Virol.* 2001, 82, 2531-2547.

Mcgaughey, W. H. (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229, 193-194.

McGuffin K.N.G., 2011: Susceptibility of codling moth in southwestern Ontario apple orchards to currently recommended insecticides. University of Guelph. 130P.

NDAO, Adama. Procédés de fortification, de floculation et de formulation dans la production de biopesticide à partir des eaux usées d'industrie d'amidon à base de *Bacillus Thuringiensis* var. kurstaki. 2018. Thèse de doctorat. Institut National de la Recherche Scientifique (Canada).

Nollet M.L., Singh Rathore. 2015. BIOPESTICIDES HANDBOOK. CRC press taylor & francis groupe, LLC CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, an Informa business. International Standard Book Number-13: 978-1-4665-9653-5

NOLLET M.. *Étude de l'encapsulation de Cydia Pomonella Granulovirus (CpGV) dans des émulsions doubles*. 2012. Thèse de doctorat. Bordeaux 1.

PAJAČ, Ivana, PEJIĆ, Ivan, et BARIĆ, Božena. Codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae)—major pest in apple production: an overview of its biology, resistance, genetic structure and control strategies. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 2011, vol. 76, no 2, p. 87-92.

Pasquier. D., Charmillot, P.-J., Scalco, A., et Renard, D. 1997. Lutte biologique contre le carpocapse *Cydia pomonella* au moyen de *Bacillus thuringiensis* (Bt) du laboratoire au verger. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 29(4): 233-238.

Pasquier, D. et Charmillot, P.-J. 1998. Le virus de la granulose du carpocapse *Cydia pomonella* 3. Essai pratique de longue durée. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 30(3): 185-187.

Provost, C., Vincent, C. et Valéro, J. 2006. Essais du VirosoftCP4 en verger biologique. Congrès Société d'entomologie du Québec et Société d'entomologie du Canada 2006. Montréal, 18 au 22 novembre 2006.

Provost, C., Vincent C., Valéro, J. et Rasamimanana, H. 2008. VirosoftCP4 : Premier insecticide viral homologué au Canada pour usage en agriculture. *Antennae : Bulletin de la Société d'entomologie du Québec*. 15(2) : 3-6.

PATIL, Satish V., PATIL, Chandrashekhar D., NARKHEDE, Chandrakant P., *et al.* Phytosynthesized gold nanoparticles-Bacillus thuringiensis (Bt-GNP) formulation: a novel photo stable preparation against mosquito larvae. *Journal of Cluster Science*, 2018, vol. 29, p. 577-583.

PERRIN, Marie. *Gestion du carpocapse du pommier: impact du changement climatique sur la lutte contre Cydia pomonella dans les vergers de Provence*. 2022. Thèse de doctorat. Université d'Avignon.)

PITCAIRN, Michael J., ZALOM, Frank G., et RICE, Richard E. Degree-day forecasting of generation time of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) populations in California. *Environmental Entomology*, 1992, vol. 21, no 3, p. 441-446.

Pringle K.L., Eyle D.K. et Brown L., 2003: Trends in codling moth activity in apple orchards under mating disruption using pheromones in the Elgin area, Western Cape Province, South Africa. *African Entomology Journal*, 11: 65-75.

Pszczolkowski M.A., Matos L.F., Brown R. et Brown J.1., 2002: Feeding and development of *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae on apple leaves. *Annals of the Entomological Society of America*, 95 (5): 603-607

SAUPHANOR, Benoit, SIMON, Sylvaine, BOISNEAU, Catherine, *et al.* Protection phytosanitaire et biodiversité en agriculture biologique. Le cas des vergers de pommiers. *Innovations agronomiques*, 2009, vol. 4, p. 217-228.

Rajamani, M., & Negi, A. (2021). Biopesticides for pest management. Sustainable bioeconomy: Pathways to sustainable development goals, 239-266.

- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-Leroux, C. Lereclus, D. & Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology* 18, 189-194
- Reyes, M. & Sauphanor, B. (2008). Resistance monitoring in codling moth: a need for standardization. *Pest Management Science* 64, 945-953
- Rezapanah, M.; Shojai-Estabragh, S.; Huber, J.; Jehle, J.A. Molecular and biological characterization of new isolates of *Cydia pomonella* granulovirus from Iran. *J. Pest Sci.* (2004). 2008, 81(4), 187–191, doi:10.1007/s10340-008-0204-2.
- RICIETTO, Ana Paula Scaramal, GOMIS-CEBOLLA, Joaquín, VILAS-BÔAS, Gislayne Trindade, *et al.* Susceptibility of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) to formulations of *Bacillus thuringiensis*, individual toxins and their mixtures. *Journal of invertebrate pathology*, 2016, vol. 141, p. 1-5.
- Rohrmann, G. F. (2013). *Baculovirus Molecular Biology* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US).
- Sauphanor, B., M. Berling, et al. (2006). "Cases of resistance to granulosis virus in the codling moth." *Phytoma* 590: 24-27.
- SCHUMACHER, Peter, WEYENETH, ALBERT, WEBER, Donald C., *et al.* Long flights in *Cydia pomonella* L.(Lepidoptera: Tortricidae) measured by a flight mill: influence of sex, mated status and age. *Physiological Entomology*, 1997, vol. 22, no 2, p. 149-160.
- SIEGWART, Myriam, MAUGIN, Sandrine, BESSE, Samantha, *et al.* Le carpocapse des pommes résiste au virus de la granulose. *Phytoma la Défense des Végétaux*, 2020, no 738, p. 45-50.
- Tanada, Y. Un virus de la granulose du *carpocapse*, *Carpocapsa pomonella* (Linnaeus) (Olethreutidae, Lepidoptera). *J. Insect Pathol.* 1964, 6, 378 à 380
- WEARING, Christopher H. Distribution characteristics of eggs and neonate larvae of codling moth, *Cydia pomonella* (L.)(Lepidoptera: Tortricidae). *International journal of insect science*, 2016, vol. 8, p. IJIS. S38587.
- WOOD, T. G. Field observations on flight and oviposition of codling moth (*Carpocapsa pomonella* (L.)) and mortality of eggs and first-instar larvae in an integrated control orchard. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1965, vol. 8, no 4, p. 1043-1059.
- Zhao, Z.R., Wang, Y.G. & Yan, G.Y. 1989. A preliminary report on the Oriental fruit moth in north Jion Gsu. *Insect Knowledge* 26: 17-19.

Annexes

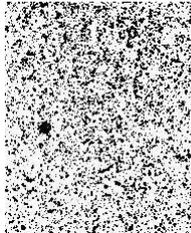
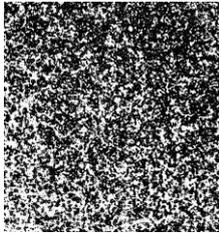
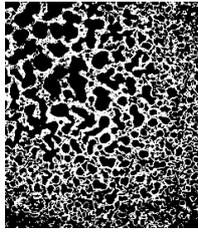
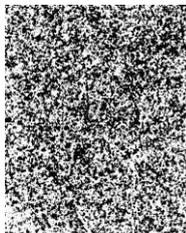
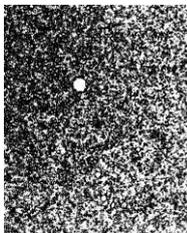
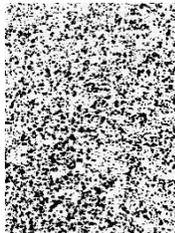
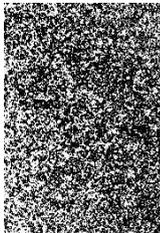
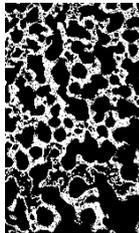
Annexe I: Parcelles expérimentales support des essais

| Nom de la parcelle | P5 | P16 | P11 |
|--------------------------|--|---|---|
| Essais agronomiques | Essai efficacité | Essai efficacité | Essai rémanence |
| Variété de pommiers | Braeburn Re | Granny Smith | Dalinette |
| Année de plantation | 2002 | 2000 | 2005 |
| Distance de plantation | 3.50 m x 1.50 m | 4 m x 1.25 m | 4 x 1.5 m |
| Mode de conduite | Axe taille longue | Axe taille longue | Axe taille longue |
| Irrigation | Micro-aspersion sous frondaison | Micro-aspersion sous frondaison | Micro-aspersion sous frondaison |
| Caractéristiques variété | Vigueur moyenne Productivité : très bonne Mise à fruit : rapide Sensible à la tavelure, mildiou, rouille et feu bactérien | Vigueur forte Mise à fruit : moyennement rapide Productivité : très bonne Sensible à la tavelure | Vigueur faible Productivité : très bonne Mise à fruit : rapide Résistance aux souches communes de la tavelure (gène Vf/Rvi6) Faible sensibilité au feu bactérien et à l'oïdium. |

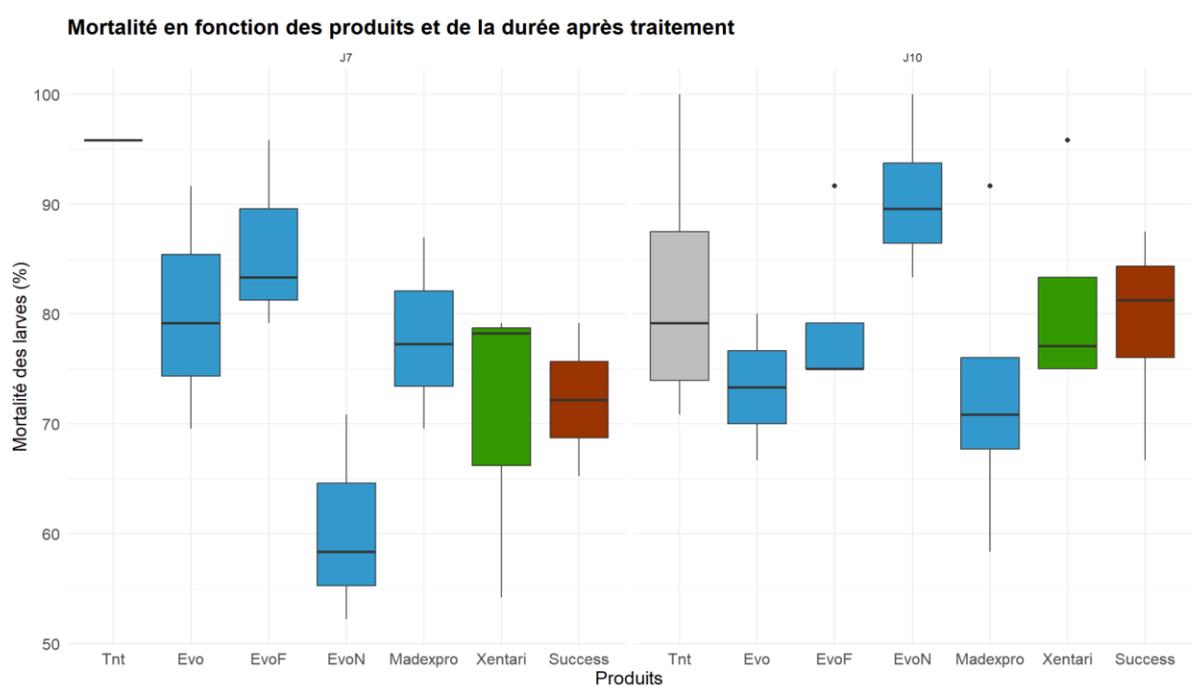
Annexe II : Produits commerciaux utilisés dans les différents essais

| Produit | Composition | Famille | Formulation | N° AMM | Dose Homologuée | Nombre d'application max | Fabricant | Mode d'action | Détails mode d'action | Cible | Utilisable en AB ? |
|---|--|-----------------|------------------------------------|--|-----------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|--|--|--------------------|
| Affirm® | 0.95 % emamectine benzoate | Avermectines | SG Granulé soluble dans l'eau | 2100231 | 2 kg/ha | 3/an | Syngenta | Ingestion | Activation du canal chlorure. L'emamectine paralyse le ravageur en créant une décontraction irréversible des muscles (myobloquant). La mort intervient rapidement après ingestion. | Chenilles phytophages : OVO-LARVICIDE ET LARVICIDE | non |
| Voliam® | 200 g/L (soit 18,28% p/p) de chlorantraniliprole (RynaXypyr®) | Anthranilamides | Suspension concentrée (SC) | 2100121 | 0.125 L/HA | 2/an | FMC France | Ingestion Contact | Bloque les récepteurs à ryanodine au niveau des fibrilles musculaires entraînant une paralysie de l'insecte (effet myobloquant) | Chenilles et coléoptères phytophages : ovocide, ovo-larvicide et larvicide | non |
| Success 4® | spinosad : 480 g/L | Biocontrôle | Suspension concentrée (SC) | 2060098 | 0,2 L/ha | 2/an | Corteva Agri-science | Ingestion Contact | | Chenilles phytophages, thrips, mouches et mineuses : Ovo- | oui |
| Carpovirusine EVO 2® | CpGV Souche NPP-R5 : 1 x 10 ¹³ corps viraux/L | Biocontrôle | Suspension concentrée (SC) | 2120081 | 1 L/ha | 10/an | Arysta LifeScience | Ingestion | Lyse cellulaire par les protéases virales qui liquéfient l'hôte et dégradent la chitine de l'exosquelette. | Lépidoptères : (Cydia pomonella), la tordeuse orientale du pêcher (Cydia molesta) : larvicide | oui |
| Nouvelle formulation Carповirusine EVO 2 | CpGV Souche NPP-R5 : 1 x 10 ¹³ corps viraux/L | Biocontrôle | Suspension concentrée (SC) | En cours d'homologation et de mise sur le marché | | | Arysta LifeScience | Ingestion | | Lépidoptères : (Cydia pomonella), la tordeuse orientale du pêcher (Cydia molesta) : larvicide | oui |
| Madex Pro® | CpGV Souche V15 : 3 x 10 ¹³ corps viraux/L | Biocontrôle | Suspension concentrée (SC) | 2130175 | 0,1 L/ha | 10/an | Andermatt Biocontrôle GmbH | Ingestion | | Lépidoptères : (Cydia pomonella): larvicide | oui |
| BI1904 : Madex nouvel isolat | CpGV Souche V45 | Biocontrôle | Suspension concentrée (SC) | En cours d'homologation et de mise sur le marché | | | Andermatt Biocontrôle GmbH | Ingestion | | Lépidoptères : (Cydia pomonella): larvicide | oui |
| Dipel DF® | 1,17 x 10 ¹³ UFC/kg <i>Bacillus thuringiensis</i> , sous-espèce kurstaki (54% p/p), souche ABTS - 351 | Biocontrôle | WG Granulés à disperser dans l'eau | 2010513 | 0,1 kg/hL | 8/an | Philagro France | Ingestion | Réplication des spores dans l'hémolymphe, destruction de l'épithélium de l'intestin par les protéases | Chenilles foreuses des fruits, chenilles phytophages, insectes xylophages (zeuzère uniquement) : larvicide | oui |
| Xentari® | 540 g/kg de <i>Bacillus thuringiensis</i> sous-espèce aizawai, souche ABTS-1857 (54% p/p), sulfate de sodium anhydre | Biocontrôle | WG Granulés à disperser dans l'eau | 2020241 | 1,5 Kg/ha | 10/an | Philagro France | Ingestion | | Chenilles foreuses des fruits, chenilles phytophages : larvicide | oui |
| citrole A® | huile de paraffine : 790 g/L | Adjuvant | EC-Concentré Emulsionnable | 2180700 | 2,2 L/ha | selon les produits | TotalEnergies Fluids SAS | | Réduction du lessivage. Amélioration de la pénétration dans la cible.. | / | oui |
| Fieldor® | huile de soja éthoxylée : 790 g/L | Adjuvant | EC-Concentré Emulsionnable | 2140227 | 0,15 L/hL | selon les préparat | Interagro | | Amélioration de la pénétration. Amélioration de l'étalement sur la cible. Amélioration de la qualité de la bouillie. Réduction du lessivage | / | oui |

Annexe III : Qualité de pulvérisation de la plus faible à la plus forte (1,2,3,4) du produit EvoN sur les papiers hydrosensibles en fonction des différentes modalités (simple passage de pulvérisateur, double passage, double concentration de produit). Les pourcentages de surface traitée sont calculés avec le logiciel ImageJ.

| | Niveau 1 | Niveau 2 | Niveau 3 | Niveau 4 |
|---|--|---|--|--|
| EvoN Simple Passage (Evo_SP) |  9.15% |  24.52% |  61.03% |  65.638% |
| EvoN Double Passage (Evo_DP) |  5.73 % |  47.75% |  58.81% |  84.06% |
| EvoN Double Concentration (Evo_DC) |  3.78% |  31.57% |  59.03% |  70.66 % |

Annexe IV : Variation de la mortalité des larves dans l'essai rémanence sur la parcelle 11 en fonction des produits larvicides utilisés dans le test hybride et en fonction de la durée post-traitement (J7, J10 jours après traitement). La durée d'exposition des larves est fixée à 60 minutes.



Nom et prénom de l'auteur : Delpech Flavie

Titre du mémoire : Optimisation de la lutte biologique par micro organisme contre le carpocapse des pommes

Ecole d'inscription : L'Institut Agro Montpellier

Lieu du stage : Unité PSH, INRAE Avignon Domaine de Saint Paul 228 route de l'Aérodrome Site Agroparc - CS 40509 84914 Avignon Cedex 9

RESUME : *Cydia pomonella* est un des principaux ravageurs des pommiers. Parmi les méthodes de lutte biologique à base de micro-organismes pour contrôler les populations de cet insecte figurent le virus de la granulose (CpGV) et *Bacillus thuringiensis*. Dans le but d'optimiser l'efficacité de ces micro-organismes, nous avons testé une méthodologie innovante et hybride en associant les traitements fait sur le terrain et les notations au laboratoire. Deux essais ont été réalisés selon la méthodologie de test hybride qui consiste à prélever des feuilles de pommier après les traitements pour y exposer des larves néonates élevées en laboratoire. Un troisième essai a été réalisé. Il diffère des 2 premiers car la pulvérisation a été faite dans des conditions contrôlées de laboratoire. Deux souches, l'une résistante et l'autre sensible, à un isolat de CpGV ont été utilisées. Dans le premier essai, nous avons évalué l'efficacité de différents produits pour trois durées d'exposition des larves. Le second essai visait à déterminer la rémanence des insecticides jusqu'à 14 jours après le traitement phytosanitaire. Enfin, le dernier essai a permis de comparer l'impact de différentes qualités de pulvérisation sur la mortalité des larves en fonction du nombre de passage de pulvérisateur et la dose appliquée. Le test hybride a validé plusieurs hypothèses telles que la relation entre la mortalité des larves et la durée du stade baladeur et l'augmentation de la mortalité en fonction de la qualité de pulvérisation. Il a également permis de montrer des corrélations positives entre la probabilité d'infection d'une larve par plusieurs génotypes viraux et la durée du stade baladeur et la qualité de pulvérisation. Les infections multiples étant souhaitées pour améliorer la durabilité des produits à base de CpGV, ces résultats offrent de perspectives d'évolutions des pratiques intéressantes pour améliorer les traitements avec ces produits de biocontrôle.

Mots clés : *Cydia pomonella*, pommiers, lutte biologique, virus de la granulose, *Bacillus thuringiensis*, efficacité, rémanence, pulvérisation

Name and surname of the author: Delpech Flavie

Title : Optimisation of biological control by micro-organisms against codling moth

Location : Unity PSH, INRAE Avignon Domaine de Saint Paul 228 route de l'Aérodrome Site Agroparc - CS 40509 84914 Avignon Cedex 9

ABSTRACT : *Cydia pomonella* is one of the main pests of apple trees. Biological control methods based on microorganisms to control populations of this insect include granulosis virus (CpGV) and *Bacillus thuringiensis*. In order to optimize the effectiveness of these microorganisms, we tested an innovative and hybrid methodology by combining field treatments and laboratory notations. Two trials were conducted using the hybrid test methodology, which involves harvesting apple tree leaves after treatment to expose neonatal larvae raised in the laboratory. A third trial was performed. It differs from the first two because the spraying was done under controlled laboratory conditions. Two strains, one resistant and the other susceptible to CpGV isolate were used. In the first trial, we evaluated the efficacy of different products for three times the larvae were exposed. The second trial was to determine the persistence of insecticides up to 14 days after the phytosanitary treatment. Finally, the last trial compared the impact of different spray quality on larval mortality based on number of spray passes and applied dose. The hybrid test validated several hypotheses such as the relationship between larval mortality and duration of the walking stage and the increase in mortality depending on spray quality. It also showed positive correlations between the probability of infection of a larva by several viral genotypes and the duration of the walking stage and the quality of spraying. Multiple infections are desired to improve the durability of products based on CpGV, these results offer prospects for developments of interesting practices to improve treatments with these biocontrol products.

Keywords : *Cydia pomonella*, apple trees, biological control, granulosis virus, *Bacillus thuringiensis*, effectiveness, persistence, spray quality