

# Programme SAVEBUXUS II

Etude de l'effet perturbateur de certaines substances sur le comportement des pyrales du buis (*Cydalima perspectalis*).

## BILAN 2019



## Rapport intermédiaire - 26/03/2020

Porteur du projet : Anne-Sophie BRINQUIN – INRAE UEFM 0348  
Rédaction : Lucile MULLER, Ruddy KUZMIN, Anne-Sophie BRINQUIN.

Unité Expérimentale Entomologie et Forêt Méditerranéenne  
Domaine Saint-Paul – Site Agroparc - CS 40509 84914 - AVIGNON cedex 9

## **AVANT-PROPOS :**

Le projet SaveBuxus a pour objectif de développer des méthodes de gestion des populations de pyrales du buis (*Cydalima perspectalis*), adaptées aux jardins, espaces végétalisés et infrastructures (JEVI), mais pouvant éventuellement être utilisées également en milieu naturel. Un premier volet, le projet SaveBuxus I (2014/2017), a eu pour objectif de suivre l'évolution de la dynamique de population de ce bioagresseur et sa répartition à travers la France, et également d'étudier sa biologie afin de tester différentes méthodes de gestion. Les résultats de ce premier volet ont permis de définir qu'une combinaison de plusieurs techniques s'avère indispensable pour une gestion efficace de ce ravageur. C'est pourquoi le projet SaveBuxus II (2018/2020), vise à améliorer certaines méthodes de lutte déjà expérimentées, mais également de développer des solutions de biocontrôle innovantes, telle que l'utilisation de substances naturelles pouvant avoir un effet perturbateur sur le comportement du ravageur.

## **CONTEXTE DE L'ETUDE :**

Au sein du complexe parasitaire associé aux buis en France, la pyrale du buis constitue depuis 2008 un problème émergeant. Introduit de manière involontaire en 2008 par le biais de plantes infestées, on assiste depuis à une forte infestation qui ne cesse de s'étendre à l'ensemble du territoire français. En buxaies naturelles ou dans les JEVIs, la pyrale du buis a causé de nombreux dégâts irréversibles. Dans le cadre d'une gestion respectueuse de l'environnement, le développement de techniques de lutte efficaces s'avère primordial afin de réguler les populations de ce bioagresseur. L'utilisation de substance d'origine naturelle comme les huiles essentielles, semble être une technique prometteuse dans la perturbation du comportement de la pyrale du buis.

## **OBJECTIFS DE L'ETUDE :**

Afin de répondre à cette problématique, quatre études ont été expérimentées :

**Etude 1 :** Etude de l'effet de différentes solutions à base d'huiles essentielles sur l'alimentation des chenilles de *C. perspectalis*.

**Etude 2 :** Etude de la toxicité des huiles essentielles par application directe sur les chenilles de *C. perspectalis*.

**Etude 3 :** Etude de l'effet de différentes solutions d'huiles essentielles sur le comportement de ponte des femelles de *C. perspectalis*.

**Etude 4 :** Etude de l'effet d'une solution à base d'extrait naturel sur le comportement de ponte des femelles de *C. perspectalis*.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>5</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>7</b>
1. <u>La pyrale du buis (<i>Cydalima perspectalis</i>).....</u>	7
1.1 <i>Elevage des chenilles de C. perspectalis.....</i>	7
1.2 <i>Elevage des papillons de C. perspectalis.....</i>	7
2. <u>Les huiles essentielles testées.....</u>	8
2.1 <i>Provenance des huiles essentielles testées.....</i>	8
2.2 <i>Préparation des solutions à base d'huiles essentielles.....</i>	8
3. <u>Analyses statistiques.....</u>	8
 <b>ETUDE 1 : ETUDE DE L'EFFET DE DIFFERENTES SOLUTIONS A BASE D'HUILES ESSENTIELLES SUR L'ALIMENTATION DES CHENILLES DE C. <i>perspectalis</i>.....</b>	 11
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	11
<b>RESULTATS.....</b>	13
a. Mesure de la variation de masse des chenilles.....	13
b. Mesure de la consommation de buis par les chenilles.....	13
c. Mesure de la masse des fèces produites.....	14
 <b>ETUDE 2 : ETUDE DE LA TOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES PAR APPLICATION DIRECTE SUR LES CHENILLES DE C. <i>perspectalis</i>.....</b>	 16
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	16
<b>RESULTATS.....</b>	17
 <b>ETUDE 3 : ETUDE DE L'EFFET DE DIFFERENTES SOLUTIONS A BASE D'HUILES ESSENTIELLES SUR LE COMPORTEMENT DE PONTE DES FEMELLES DE C. <i>perspectalis</i>.....</b>	 18
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	18
<b>RESULTATS.....</b>	19
 <b>ETUDE 4 : ETUDE DE L'EFFET D'UNE SOLUTION A BASE D'EXTRAIT NATUREL SUR LE COMPORTEMENT DE PONTE DES FEMELLES DE C. <i>perspectalis</i>.....</b>	 20
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	20
<b>RESULTATS.....</b>	21
a. Mesure sur le Fusain du Japon <i>Euonymus japonicus</i> .....	21
b. Mesure sur le Chêne vert <i>Quercus ilex</i> .....	22
c. Mesure sur le Troène <i>Lingustrum vulgare</i> .....	22
d. Mesure sur le Houx <i>Ilex Aquifolium</i> .....	22

<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>24</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>26</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>27</b>

## Introduction

Considérée comme une espèce invasive en France depuis 2008 (Feldtrauer et al. 2009), la pyrale du buis *Cydalima perspectalis* est originaire d'Asie du Sud-Est (Hannemann 1985). Introduite de manière non intentionnelle en Europe en 2007 par le transport de plantes infestées (Krüger 2008; Nacambo et al. 2014), ce Lépidoptère n'a cessé d'étendre son aire de répartition sur le territoire. Son cycle de vie dynamique (fécondité élevée et nombre de générations par an allant de 3 à 4 selon le climat) et l'absence de prédateurs naturels spécifiques expliquent cette dispersion rapide (Nacambo et al. 2014; Wan et al. 2014). Espèce monophage, elle entraîne des défoliations totales et continues sur les buis. Les stades larvaires s'attaquent principalement à la masse foliaire des buis mais également à l'écorce et aux bourgeons entraînant le dépérissement des arbres (Florine L. G. Leuthardt, Glauser, et Baur 2013). Ces défoliations massives et irréversibles sont la cause de réelles inquiétudes pour le milieu forestier et le milieu urbanisé, où la présence des buis représente un enjeu à la fois écologique, culturel et économique.

En effet, les premières observations de ce ravageur ont été faites dans les Jardins, Espaces Végétalisés et Infrastructures (JEVI) en 2008 (Feldtrauer et al. 2009), en France. Fréquemment utilisée comme plante ornementale dans de nombreux jardins et parcs à haute valeur patrimoniale, la préservation de cette essence en France représente donc un enjeu culturel et économique important (Kenis et al. 2013; Mitchell et al. 2018; Di Domenico, Lucchese, et Magri 2012). Cependant, la progression de la pyrale du buis ne cesse de s'amplifier. L'expansion des colonies gagnent rapidement le milieu forestier, s'attaquant aux buxaies naturelles Européennes (F. L. G. Leuthardt et Baur 2013). Le passage de ce ravageur laisse les buxaies défoliées, entraînant d'une part une augmentation du risque incendie et d'autre part une diminution de la pérennité du sous-étage où elle est présente (Kenis et al. 2013; Lopez Vaamonde et al. 2010).

La limitation de la dispersion de ce ravageur s'avère donc primordiale pour le maintien de l'équilibre écologique et économique (Krüger 2008; Mitchell et al. 2018) du milieu naturel. Impliqués dans cette gestion, les gestionnaires professionnels et privés sont soumis à une utilisation stricte des méthodes de gestions existantes. Ces méthodes suivent la réglementation en vigueur, visant à interdire l'utilisation de produits phytopharmaceutiques mais à développer et encourager l'utilisation de méthodes de gestion respectueuses de l'environnement. Cependant, les méthodes existantes manquent d'efficacité pour limiter cette dispersion.

De ce fait, l'utilisation de substances d'origine naturelle comme les huiles essentielles, s'avère être une solution de biocontrôle prometteuse. En effet, depuis les années 1990, l'utilisation d'huiles essentielles contre des ravageurs s'est intensifiée notamment dans les domaines agricoles et industriels (Isman 2005). Les huiles essentielles ont démontré divers effets biologiques, sur certains insectes (Bakkali et al. 2008; Batish et al. 2008; Isman 2005; Yazdani, Sendi, et Hajizadeh 2014; Hori 1999), et sont fréquemment utilisées pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et insecticides (Bakkali et al. 2008). Les huiles essentielles sont des composés sémiochimiques, naturellement présents dans les plantes et jouant un rôle perturbateur dans la perception des signaux sensoriels des bioagresseurs (Regnault-Roger, Vincent, et Arnason 2011). Ces signaux sensoriels participent de façon

indispensable à la sélection de la zone de ponte chez les femelles Lépidoptères (Renwick et Chew 1994; Renwick et Radke 1988), mais aussi dans la capacité d'alimentation des chenilles (Göttig, Korn, et Herz 2017; Hori 1999). De plus, les huiles essentielles, de par leur caractéristiques chimiques, démontrent une faible rémanence dans l'environnement ainsi qu'une stabilité chimique à une température ambiante (Bakkali et al. 2008).

Le projet SaveBuxus s'inscrit donc dans cette démarche. La première phase de ce projet (SaveBuxus I 2014/2017) a permis d'approfondir les connaissances sur la biologie de ce ravageur ainsi que sur sa dynamique de population. Ces informations ont permis de tester différentes méthodes de lutte (traitement microbiologique, piégeage de masse, lâcher de parasitoïdes oophages, confusion sexuelle, installation de nichoirs à mésanges...). Ces études ont permis de mettre en évidence que l'efficacité d'une seule de ces méthodes n'est pas suffisante pour limiter la dispersion de ce ravageur. La préconisation de l'utilisation d'une combinaison de plusieurs techniques est donc nécessaire face à ce ravageur.

La deuxième phase de ce projet (SaveBuxus II 2018/2020) a pour objectif de mettre en place de nouvelles méthodes de biocontrôle innovantes. Pour cela, quatre études ont été menées. La première a permis d'étudier l'effet de solutions à base d'huiles essentielles sur le comportement d'alimentation des chenilles de *C. perspectalis* (Etude 1). La deuxième a permis d'évaluer la toxicité des huiles essentielles par contact direct sur les chenilles de *C. perspectalis* (Etude 2). La troisième étude visait à étudier l'effet de différentes solutions à base d'huiles essentielles sur le comportement de ponte des femelles de *C. perspectalis* (Etude 3). Enfin, la dernière étude a eu pour objectif d'étudier l'effet d'une solution à base d'extrait naturel sur le comportement de ponte des femelles de *C. perspectalis* (Etude 4). Ce rapport rend compte des résultats obtenus.

## Matériaux et Méthodes

### 1. La pyrale du buis (*Cydalima perspectalis*)

#### 1.1 *Elevage des chenilles de C. perspectalis*

Dans les conditions optimales de température et d'humidité, le cycle de vie de la pyrale du buis dure environ 45 jours ( $\pm 3$ ) :

**Œufs = 4 à 5 jours → chenilles = 29 à 33 jours → chrysalides = 9 à 10 jours → adultes = 12 jours**

Les chenilles utilisées pour l'étude n°1 et l'étude n°2 ont été élevées à Avignon à partir de pontes provenant de l'élevage du Laboratoire Biocontrôle de la Villa Thuret (UEFM Antibes) livrées chaque semaine. Les œufs ont été répartis dans plusieurs boites d'élevage (30 × 30 × 13 cm) avec du buis frais. Après éclosion, l'ajout de buis frais et le nettoyage des boites ont été réalisés deux à trois fois par semaine pour éviter la prolifération de moisissures. Afin d'accélérer le cycle de vie et la croissance des chenilles, les boîtes d'élevages ont été conservées en chambre climatique dans des conditions optimales de température et d'humidité (Température = 25 °C ± 1 °C, Humidité Relative = 70% ± 5%, Photopériode : 14h jour : 10h nuit). Le buis utilisé pour l'élevage des chenilles a été récolté chaque semaine en milieu naturel, sur le Mont Ventoux, à une altitude d'environ 800 mètres, zone encore non infestée par la pyrale du buis.

#### 1.2 *Elevage des papillons de C. perspectalis*

Les papillons utilisés pour l'étude n°3 et l'étude n°4 ont été élevés au laboratoire UEFM d'Avignon. Ils proviennent de chenilles mises en diapause au stade L2-L3 en décembre 2018 et janvier 2019, puis conservées pour une moitié à 6°C dans une étuve à porte vitrée, et pour l'autre moitié en chambre climatique à 10°C en période jour et 6°C en période nuit pour une photopériode de 10 heures jours : 14 heures nuit. Chaque semaine, trois boîtes contenant des chenilles diapausantes ont été sorties des étuvées et réparties dans des boîtes d'élevages avec du buis frais et mises en chambre climatique dans des conditions optimales de température et d'humidité (Température = 25°C ± 1°C, Humidité Relative = 70% ± 5%, Photopériode : 14 heures jour : 10 heures nuit) pour le cycle de développement de la pyrale du buis. Le nettoyage des boîtes et l'ajout de buis frais ont été réalisés deux fois par semaine. Le buis utilisé pour l'élevage des chenilles a été récolté chaque semaine en milieu naturel, sur le Mont Ventoux, à une altitude d'environ 800 mètres. Toutes les semaines, les chrysalides ont été récupérées et stockées dans des boites. Une fois les chrysalides matures, elles ont été sexées (Figure 1), puis les mâles et femelles ont été séparés et placés dans des cages insectproof (30 × 30 × 30 cm) distinctes en attendant l'émergence des papillons. Dès l'émergence des papillons une source de nourriture (miel et eau) a été ajoutée dans les cages.



Figure 1 : a) Agrandissement des segments inférieurs abdominaux d'une chrysalide femelle de *C. perspectalis* ; b) Agrandissement des segments inférieurs abdominaux d'une chrysalide mâle de *C. perspectalis*.

## **2. Les huiles essentielles testées**

### ***2.1 Provenance des huiles essentielles testées***

Les huiles essentielles utilisées pour les trois premières études ont été commandées auprès de l'entreprise « La Compagnie des Sens ». Elles sont 100% pures et naturelles, certifiées « Agriculture Biologique ». De plus, des contrôles « qualité » ont été réalisés avant leur commercialisation (densité, indice de réfraction, profil chromatographique...). Au total 9 huiles essentielles différentes ont été testées. Concernant l'étude n°1, un produit vendu en tant que répulsif envers certains insectes phytophages (pucerons, chenilles, aleurodes...) a également été testé. Il s'agit d'un mélange de dix huiles essentielles différentes, d'origine 100% naturelle, se trouvant en vente libre sur le marché du biocontrôle et provenant de l'entreprise « Nirvana ».

### ***2.2 Préparation des solutions à base d'huiles essentielles***

Toutes les huiles essentielles ont été testées à une concentration de 5%. Les dilutions ont été réalisées avec de l'eau distillée et un émulsifiant, le Tween20 (T20), a été rajouté à une concentration de 5% afin d'homogénéiser le mélange. Chaque solution a été réalisée sous hotte aspirante.

## **3. Analyses statistiques**

Tous les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel libre R (version 3.5.1.), au seuil alpha = 0,05.

Pour suivre le comportement d'alimentation des chenilles (étude n°1) trois paramètres ont été mesurés. Le premier est la différence de masse des chenilles qui a été déterminée en soustrayant la masse des chenilles à t = 48 heures ( $PC_{48}$ ) et la masse des chenilles à t = 0 heure ( $PC_0$ ) (équation 1).

$$Var. mc = PC_{48} - PC_0 \quad (eq. 1)$$

*Var. mc : Variation de masse des chenilles*

*PC<sub>48</sub> : Masse des chenilles à t = 48h*

$PC_0$  : Masse des chenilles à  $t = 0h$

Le deuxième paramètre est la masse de buis consommée par les chenilles. Il est considéré que la perte de masse mesurée sur les rameaux de buis entre  $t = 0h$  ( $P_0$ ) et après le passage à l'étuve ( $P_{SEC}$ ) est due à la fois à la consommation des chenilles et à la déshydratation des rameaux. Ainsi les modalités sans chenille permettent de calculer la déshydratation moyenne des rameaux dans les conditions expérimentales, avec et sans traitement à l'huile essentielle (équation 2).

$$Deshyd_{SC} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left( \frac{P_{0.sc} - P_{SEC.sc}}{P_{0.sc}} \right) i \quad (eq. 2)$$

$Deshyd_{SC}$  : Perte hydrique moyenne des rameaux de buis sans chenille

$P_{0.sc}$  : Masse des rameaux de buis sans chenille à  $t = 0h$

$P_{SEC.sc}$  : Masse des rameaux de buis sans chenille après passage à l' étuve

La part de déshydratation dans la perte de masse des rameaux est ensuite éliminée afin d'obtenir uniquement la masse de buis consommée par les chenilles (équation 3).

$$M_{conso} = (P_0 - P_{SEC}) - (Deshyd_{SC} \times P_0) \quad (eq. 3)$$

$M_{conso}$  : Masse de buis consommée par les chenilles

$P_0$  : Masse des rameaux de buis avec chenille à  $t = 0h$

$P_{48}$  : Masse des rameaux de buis avec chenille à  $t = 48h$

Enfin, le troisième paramètre utilisé pour suivre l'alimentation des chenilles est la masse des fèces produites par les chenilles.

Des analyses de variances à 2 facteurs ont été effectuées pour faire des comparaisons de la masse moyenne de buis consommée par les chenilles, de la variation de masse moyenne des chenilles et de la masse des fèces en fonction du traitement et du stade larvaire (fonction lm et anova de R) et des tests t de Student (fonction t.test de R). Les hypothèses de validité n'étant pas respectées pour les données sur la masse des fèces, une transformation logarithmique a été réalisée sur cette dernière.

Concernant l'étude de la toxicité des huiles essentielles sur les chenilles (étude n°2), le taux de survie a été obtenu en divisant le nombre de chenilles vivantes par le nombre de chenilles total.

Concernant l'étude de l'effet des huiles essentielles sur le comportement d'oviposition des femelles (étude n°3), le nombre d'œufs pondus a été comparé en fonction du traitement à l'aide d'un modèle linéaire généralisé mixte intégrant le numéro de la cage comme effet aléatoire avec une distribution d'erreur quasi-poisson pour corriger la sur-dispersion (fonction glmmQPL du package MASS de R).

En raison du faible nombre de répétition pour l'étude n°4, les nombres d'œufs des trois répétitions pour chaque modalité ont été sommées et des analyses statistiques ont été réalisées sur ces totaux. Une mesure de répulsion [RV = nombre d'œufs pondus sur rameau de buis non traité / (nombre d'œufs pondus sur rameau de buis non traité + nombre d'œufs pondus sur un rameau de buis traité)] a été calculé (Mauchline et al. 2005; Scheffler et Dombrowski 1993). Pour analyser les proportions d'œufs déposées, un test de chi2 de conformité (fonction chisq.test de R) a été réalisé afin de déterminer si les proportions moyennes d'œufs déposés sur les essences traitées et non traitées différaient de manière significative d'une distribution égale à 50%.

# Etude 1

Etude de l'effet de différentes solutions à base d'huiles essentielles sur l'alimentation des chenilles de *C. perspectalis*



## Matériels et Méthodes

### Déroulement de l'expérimentation et mesures effectuées

Pour cette expérimentation, deux catégories de stades larvaires ont été testées, les chenilles de stades L2 et L3 d'une part, et les chenilles de stades L4 et L5 d'autre part, dans le but de mettre en évidence une éventuelle différence de sensibilité des chenilles selon leur stade larvaire, par rapport au traitement par les huiles essentielles. Pour les tests avec le mélange d'huile essentielle, seul le stade L2L3 a été testé en raison d'un manque de chenille L4L5. Chaque semaine une huile essentielle (HE) a été testée en comparaison avec un témoin négatif (T-) composé uniquement d'eau distillée. Au total, deux huiles essentielles ont été testées (**HE-1** et **HE-2**), ainsi que le produit composé du mélange de dix huiles essentielles (**HE-M**). Ainsi, des rameaux de buis d'une dizaine de centimètres ont été préparés et trempés entièrement 2 à 3 secondes, soit dans une solution à base d'huile essentielle, soit dans la solution témoin composée uniquement d'eau distillée. Ils ont ensuite été placés sous hotte aspirante, afin de les laisser sécher durant 1 à 2 heures. Par la suite les rameaux ont été placés dans des gobelets avec au fond, un morceau de papier buvard dont le rôle est d'absorber l'humidité au sein du gobelet pendant toute la durée de l'expérimentation et d'éviter ainsi les moisissures. Les lots de 5 chenilles L2-L3 et les lots de 3 chenilles L4-L5 ont été isolés au préalable afin de les faire jeûner durant 4 heures. Puis, ils ont été déposés sur les rameaux de buis préparés, et les gobelets refermés par un couvercle troué afin de laisser circuler l'air (Figure 2).

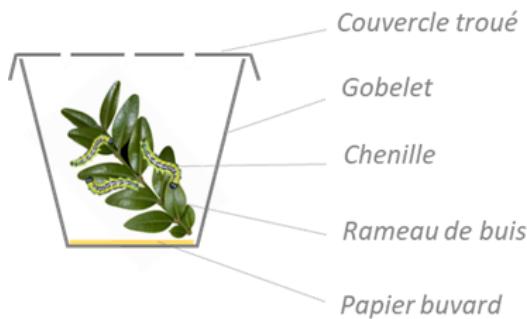


Figure 2 : Schéma représentant un gobelet contenant un rameau de buis et un lot de 3 chenilles de stade L4-L5.

Pour chaque huile essentielle, 6 modalités différentes ont été testées avec 30 répétitions pour chacune (Figure 3). Des lots « sans chenille » ont été réalisés, afin de mesurer la déshydratation moyenne des rameaux de buis dans les conditions expérimentales. Enfin, tous les lots ont été installés en même temps en chambre climatique sous conditions contrôlées (Température =  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , Humidité Relative =  $70\% \pm 5\%$ , Photopériode 14h jour : 10h nuit). Une randomisation par bloc a été faite entre chaque modalité au sein de la chambre climatique.



Figure 3 : Schéma représentant les différentes modalités mises en place dans le dispositif expérimental de l'étude n°1.

Au bout de 48 heures, les gobelets ont été retirés de la chambre climatique, et les mesures et éventuelles observations (chenilles mortes, moribondes, diapausantes...) ont été réalisées. Les rameaux ont ensuite été placés individuellement dans des sachets en papier, puis installés en même temps dans une étuve à  $45^{\circ}\text{C}$  durant 7 jours afin de les déshydrater totalement et obtenir ainsi leur poids sec.

Différentes mesures ont été réalisées afin de suivre la consommation de buis par les chenilles. Ainsi, les rameaux ont été pesés à  $T=0$  ( $P_0$ ), à  $T=48$  ( $P_{48}$ ) et après leur passage à l'étuve ( $P_{SEC}$ ). La masse des chenilles a été déterminée à  $T=0$  ( $PC_0$ ) et à  $T=48$  ( $PC_{48}$ ). Enfin, les fèces ont été pesées à  $T=48$  et après leur passage à l'étuve. L'ensemble des pesées ont été réalisées à l'aide d'une balance haute précision.

## Résultats

### a. Mesure de la variation de masse des chenilles

Les analyses statistiques ne montrent aucune différence significative de variation de masse des chenilles entre le traitement HE-1 et le témoin (ANOVA 2 facteurs, effet traitement :  $F_{1,116} = 0.046, p = 0.83$ ). De plus, les stades larvaires L2L3 et L4L5 ont eu la même sensibilité au traitement (ANOVA 2 facteurs, interaction stade larvaire-traitement :  $F_{3,114} = 0.10, p = 0.75$ ) (figure 4).

De même, d'après les analyses statistiques, nous n'avons pas constaté de différence dans la variation de masse des chenilles de stades L2L3 et L4L5 en fonction du traitement avec l'huile essentielle HE-2 (ANOVA 2 facteurs, effet traitement :  $F_{1,116} = 0.64, p = 0.43$ ). En revanche, les chenilles de stade L4L5 présentaient une variation de masse plus élevée que les chenilles de stade L2L3 (ANOVA 2 facteurs, effet stade larvaire :  $F_{1,116} = 45.9, p < 0.001$ ) (figure 4).

Enfin, concernant les tests avec le mélange d'huile essentielle HE-M, la variation de masse des chenilles de stade L2L3 nourries sur le buis traité était plus importante que la variation de masse des chenilles nourries sur le buis non traité (Test de Student,  $t = -3.60, df = 38.44, p < 0.001$ ) (figure 4).

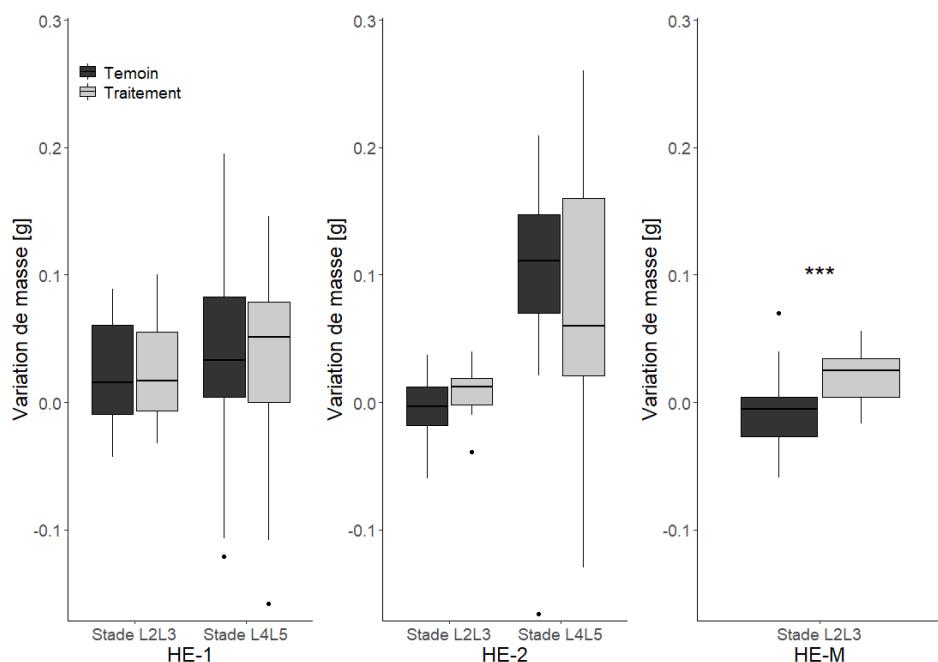


Figure 4 : Variation de masse des chenilles *C. perspectalis* en fonction du stade larvaire et du traitement aux huiles essentielles HE-1, HE-2 et HE-M (\*\*\*) :  $p < 0.001$ .

### b. Mesure de la consommation de buis par les chenilles

D'après les analyses statistiques, le traitement réalisé avec l'huile essentielle HE-1 a semblé avoir un effet sur la consommation des chenilles de stade L2L3. En effet, la masse de buis traité consommée par les chenilles de stade L2L3 était plus importante que la masse de buis non traité consommée par les chenilles de même stade (ANOVA 2 facteurs, effet traitement :  $F_{1,118} = 10.46, p < 0.01$ ). Cependant, la masse de buis consommée par les stades L4L5 n'est pas

différente quel que soit le traitement. Néanmoins, la masse de buis consommée par les chenilles de stade L4L5 était supérieure à celle des stades L2L3 quel que soit le traitement (ANOVA 2 facteurs, effet stade larvaire :  $F_{1,118} = 222, p < 0.001$ ) (Figure 5).

Concernant le traitement avec l'huile essentielle HE-2, les chenilles de stade L2L3 et L4L5 n'ont pas montré une consommation de buis différente en fonction du traitement (ANOVA 2 facteurs, effet traitement :  $F_{1,118} = 2.66, p = 0.105$ ). En revanche, la masse de buis consommée par les chenilles de stade L4L5 était supérieure à celle des stades L2L3 quel que soit le traitement (ANOVA 2 facteurs, effet stade larvaire :  $F_{1,118} = 23.93, p < 0.001$ ) (Figure 5).

Le mélange d'huile essentielle HE-M n'a pas eu d'effet sur la consommation de buis par les chenilles. En effet, la masse de buis non traité consommée par les chenilles n'était pas différente de la masse de buis traité consommée par les chenilles (Test de Student,  $t = -1.32, dl = 47.6, p = 0.19$ ) (Figure 5).

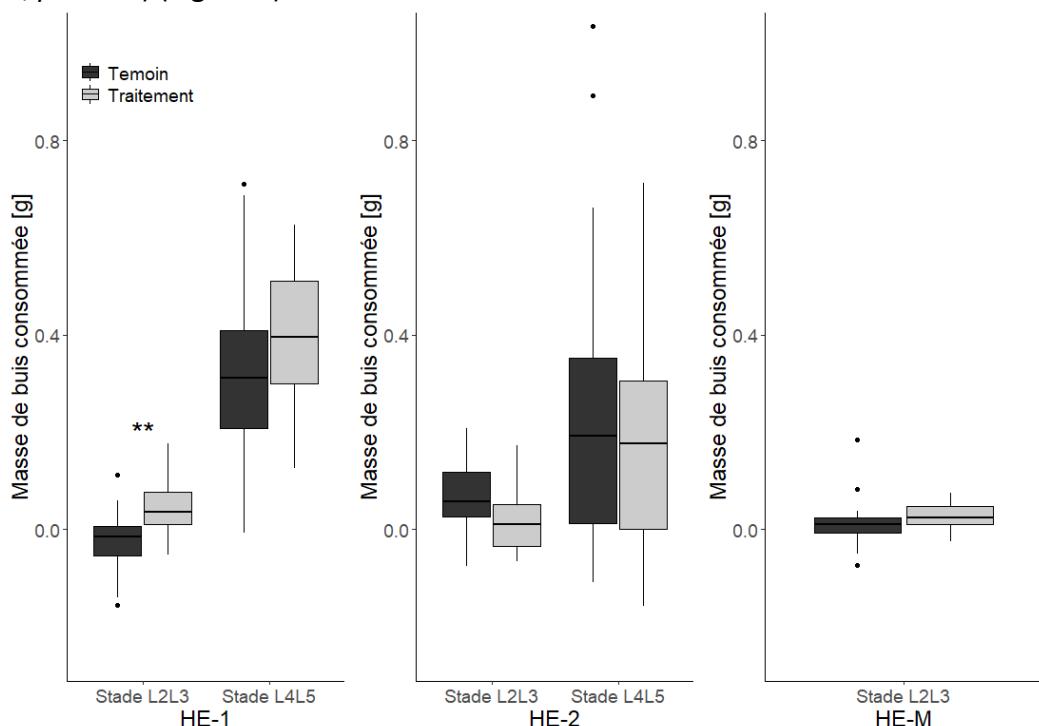


Figure 5 : Masse de buis consommée par les chenilles *C. perspectalis* en fonction du stade larvaire et du traitement aux huiles essentielles HE-1, HE-2 et HE-M (\*\* :  $p < 0.01$ ).

### c. Mesure de la masse des fèces produites

Le traitement réalisé avec l'huile essentiel HE-1 ne présentait pas d'effet sur la masse de fèces produite par les chenilles de stade L2L3. La même chose a été observée pour les chenilles de stade L4L5 (ANOVA 2 facteurs, effet traitement :  $F_{1,118} = 0.12, p = 0.73$ ) (Figure 6). En revanche, quel que soit le traitement, la masse des fèces produite par les chenilles de stade L4L5 était plus élevée que celle des chenilles de stade L2L3 (ANOVA 2 facteurs, effet stade larvaire :  $F_{1,118} = 343, p < 0.001$ ).

De la même manière, le traitement avec l'huile essentielle HE-2 n'a pas montré d'effet sur la masse de fèces produite par les chenilles de stade L2L3 et de stade L4L5 (ANOVA 2 facteurs, effet traitement :  $F_{1,118} = 0.18, p = 0.67$ ). La masse des fèces produite par les chenilles de stade

L4L5 était plus élevée que celle des chenilles de stade L2L3, quel que soit le traitement (ANOVA 2 facteurs, effet stade larvaire :  $F_{1,118} = 214.6$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 6).

Contrairement aux autres huiles essentielles, le mélange d'huile essentielle HE-M a montré un effet sur la masse de fèces produite par les chenilles L2L3. Elle était en effet moins importante pour le groupe traitement (Test de Student,  $t = 5.52$ ,  $df = 42.67$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 6).

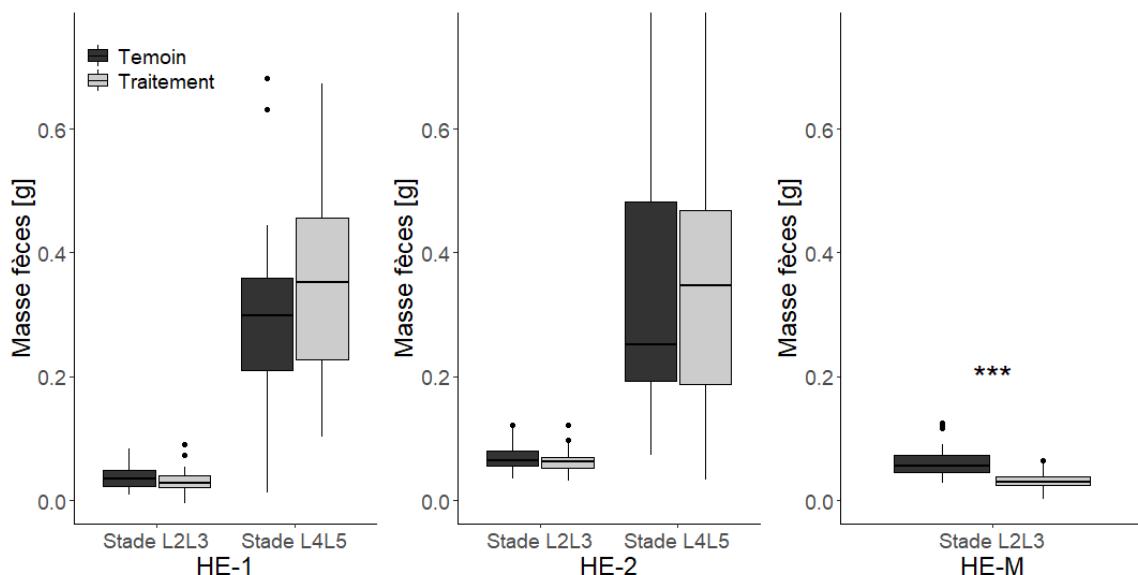


Figure 6 : Masse des fèces des chenilles de *C. perspectalis* en fonction du stade larvaire et du traitement aux huiles essentielles HE-1, HE-2 et HE-M (\*\*\*) :  $p < 0.001$ .

## Etude 2

Etude de la toxicité des huiles essentielles par application directe sur les chenilles *C. perspectalis*



### Matériaux et Méthodes

#### Déroulement de l'expérimentation et mesures effectuées

Pour cette expérimentation, seul le stade larvaire L4 a été testé. Chaque semaine une huile essentielle (HE) a été testée en comparaison avec un témoin négatif (T-) composé uniquement d'eau distillée. Au total, neuf solutions d'huiles essentielles différentes ont été testées. Les chenilles ont été, à l'aide d'un pinceau déposées dans un récipient contenant un morceau de papier buvard, afin d'absorber l'excédent de solution. Puis, à l'aide d'un vaporisateur, une vaporisation à une distance d'environ 10 centimètres a été effectuée sur chaque chenille soit avec une solution à base d'huile essentielle, soit avec la solution témoin. Une fois la vaporisation terminée, les chenilles ont été transférées dans un gobelet en plastique contenant un morceau de papier buvard dans le fond et un rameau de buis d'environ 5 centimètres comme source d'alimentation, puis les gobelets ont été refermés avec un couvercle troué. Enfin, l'ensemble des gobelets ont été installés en même temps en chambre climatique sous conditions contrôlées (Température =  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , Humidité Relative =  $70\% \pm 5\%$ , Photopériode 14h jour : 10h nuit). Une randomisation par bloc a été réalisée entre chaque modalité. Au total, chaque semaine, 2 modalités différentes ont été testées avec 15 répétitions pour chacune. Au bout de 24 heures, l'état des chenilles a été vérifié et le nombre de chenilles mortes comptabilisé, et d'éventuelles observations ont été notées (chenilles moribondes, présence de fèces...). Une nouvelle observation a été effectué 24 heures plus tard afin de vérifier l'évolution de l'état des chenilles et noter d'éventuelles observations.

## Résultats

L'application d'huiles essentielles directement en contact avec les chenilles n'a eu aucun impact toxique durant les 48 heures d'essai. En effet, aucune mortalité n'a été détectée chez les chenilles, ayant ou non subit le traitement, et quel que soit l'huile essentielle testée.

# Etude 3

Etude de l'effet de différentes solutions à bases d'huile essentielles sur le comportement de ponte des femelles de *C. perspectalis*



## Matériaux et Méthodes

### Déroulement de l'expérimentation et mesures effectuées

Pour cette expérimentation, un test à deux choix a été réalisé. Ainsi, chaque semaine une huile essentielle (HE) a été testée en comparaison avec un témoin négatif (T-) composé uniquement d'eau distillée. La première semaine, seul l'effet de l'émulsifiant Tween20 a été testé afin de vérifier qu'il n'avait pas d'effet sur le comportement d'oviposition des femelles de *C. perspectalis*.

Pour chaque répétition, des cages insectproof ( $30 \times 30 \times 30$  cm) contenant quatre couples de *C. perspectalis* et une source de nourriture (miel, eau) ont été préparées. Le nombre de répétitions a été fixé à cinq minimum. Les papillons utilisés pour l'expérimentation étaient âgés de 48 à 72 heures (période où ils deviennent matures sexuellement). Huit rameaux de buis d'environ quinze centimètres ont été préparés pour chaque répétition, puis quatre d'entre eux ont été trempés trois secondes dans une solution d'huile essentielle et les quatre autres dans une solution témoin. Ils ont ensuite été placés sous hotte aspirante pour les laisser sécher durant 1 à 2 heures. Les rameaux ont par la suite été piqués dans deux morceaux de mousse florale distincts imbibés d'eau et disposés dans les coins opposés de la cage (Figure 7).



Figure 7. Photographie présentant le dispositif pour le test à 2 choix de l'étude n°3.

Toutes les cages ont ensuite été placées en chambre climatique sous conditions contrôlées (Température =  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , Humidité Relative =  $70\% \pm 5\%$ , Photopériode : 14 heures jour : 10 heures nuit) et randomisées. Après 72 heures, tous les rameaux de buis ont été récupérés, et les nombres d'œufs total ont été comptabilisés à l'aide d'une loupe binoculaire.

## Résultats

Les femelles ont pondu un nombre d'œuf significativement différent sur les buis traités et non traités pour les essais avec les huiles essentielles HE-3 et HE-9. En effet, pour l'essai avec l'huile essentielle HE-3, les femelles ont pondu un nombre d'œufs significativement plus élevé sur le buis non traité que sur le buis traité (glmmPQL,  $t = -6.4$ ,  $p < 0.001$ ) indiquant alors un effet répulsif de cette huile essentielle. Cependant, pour l'essai avec l'huile essentielle HE-9, l'inverse est observé, les femelles ayant déposé significativement plus d'œufs sur le buis traité que sur le buis non traité (glmmPQL,  $t = 3.06$ ,  $p = 0.028$ ). Ces résultats sont toutefois à prendre avec précaution, car lors de la réalisation de cet essai, la chambre climatique est entrée en panne, modifiant ainsi les paramètres abiotiques de cet essai. Ces résultats ne sont donc pas comparables aux autres modalités testées.

En revanche, les essais avec les autres huiles essentielles n'ont pas montré un nombre d'œufs pondus significativement différent entre le buis traité et non traité, indiquant alors que ces huiles essentielles n'ont pas d'effet répulsif (Figure 8).

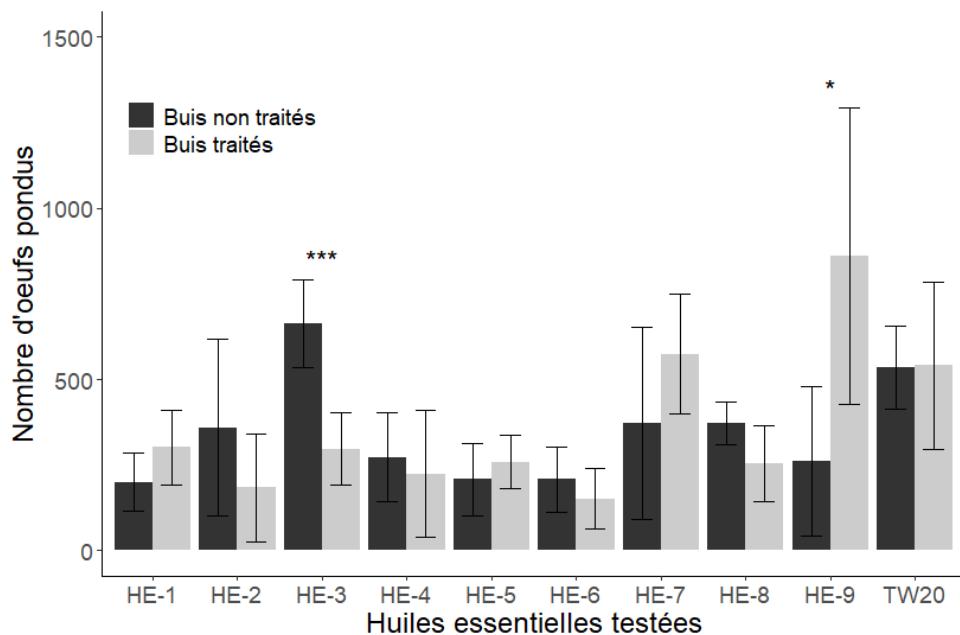


Figure 8 : Résultat des tests à deux choix sur la ponte des femelles *C. perspectalis*. Nombre d'œufs pondus sur des rameaux de buis non traités et traités avec une huile essentielle (HE-1 à HE-9) et TW20 : émulsifiant Tween20 (\*\*\*) :  $p < 0.001$  ; \* :  $p < 0.05$ ) : Moyenne  $\pm$  IC<sub>95%</sub>.

# Etude 4

Etude de l'effet d'une solution à base d'extrait naturel  
sur le comportement de ponte des femelles *C.  
perspectalis*



## Matériels et Méthodes

### Déroulement de l'expérimentation et mesures effectuées

Dans cette étude, un test à deux choix a été réalisé, afin d'étudier l'effet d'une solution à base d'extrait naturel de buis sur le comportement de ponte des femelles de *C. perspectalis*, appliquée sur 4 essences de plantes différentes. Les 4 essences qui ont été utilisées pour cette étude sont : le Troène *Lingustrum vulgare*, le Chêne vert *Quercus ilex*, le Fusain du Japon *Euonymus japonicus* et le Houx commun *Ilex aquifolium*. Chaque semaine, une essence de plante traitée avec la solution à base de buis a été testée en comparaison avec un rameau de buis et la même essence non traitée. Pour cela, des cages insectproof (30 × 30 × 30 cm) contenant quatre couples de *C. perspectalis* et une source de nourriture (miel, eau) ont été préparées chaque semaine.

Trois modalités différentes ont été testées avec pour chacune trois répétitions (Figure 9). La première modalité permet de comparer un rameau de l'essence à tester traitée avec la solution, avec un rameau de buis (**Modalité 1**). La deuxième permet de comparer un rameau traité de l'essence à tester, et un rameau de cette même essence non traité (**Modalité 2**). Enfin, la troisième permet de tester un rameau de l'essence à tester non traité en comparaison avec un rameau de buis (**Modalité 3 = Témoin**).

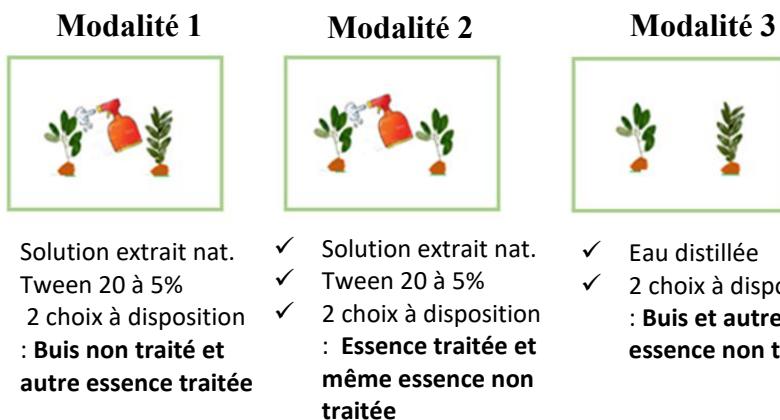


Figure 9 : Schéma descriptif des modalités à deux choix testés pour l'étude n°4.

Les rameaux des différentes essences ont été préalablement préparés et trempés entièrement durant 3 secondes pour certains dans une solution à base d'extrait naturel de buis et les autres dans une solution témoin composée d'eau distillée. Ils ont ensuite été placés sous hotte aspirante pour les laisser sécher durant 1 à 2 heures. Les rameaux ont par la suite été piqués dans deux morceaux de mousse florale distincts imbibés d'eau et disposés dans les coins opposés de la cage. Toutes les cages ont ensuite été placées en chambre climatique sous conditions contrôlées (Température =  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , Humidité Relative =  $70\% \pm 5\%$ , Photopériode : 14 heures jour : 10 heures nuit). Au bout de 72 heures, les rameaux ont été récupérés, puis pour chaque modalité et chaque répétition, les nombres d'œufs total et d'œufs morts ont été comptabilisés à l'aide d'une loupe binoculaire. Les papillons utilisés pour l'expérimentation étaient âgés entre 48 et 72 heures (période où ils atteignent leur maturité sexuelle).

Les essences de plantes et le buis utilisés pour cet essai étaient âgés de 2 ans et ont été achetés auprès de la pépinière « ARBRES DE PROVENCE ». Les buis ont été traités au préalable avec du *Bacillus thuringiensis* (Bt) deux semaines avant la livraison, afin d'éviter tout apport extérieur de pyrales du buis dans les essais.

## Résultats

### a. Mesure sur le Fusain du Japon *Euonymus japonicus*

Concernant la modalité 1, la proportion d'œufs déposés par les femelles était plus élevée sur le Fusain du Japon traité avec l'extrait naturel que sur le rameau de Buis (*E. japonicus* traité,  $RV = 0.65$ ,  $\chi^2 = 23.56$ ,  $dl = 1$ ,  $p < 0.001$ ). C'est également le cas pour la modalité 2 où la proportion d'œufs était également plus importante sur le Fusain du Japon traité (*E. japonicus* traité,  $RV = 0.67$ ,  $\chi^2 = 54.98$ ,  $dl = 1$ ,  $p < 0.001$ ) que sur le Fusain du Japon non traité. Enfin, la modalité 3, qui joue le rôle de contrôle, a montré une plus grande proportion d'œufs pondus sur le Buis (Buis,  $RV = 0.74$ ,  $\chi^2 = 133.6$ ,  $dl = 1$ ,  $p < 0.001$ ) que sur le Fusain du Japon non traité (Figure 10).

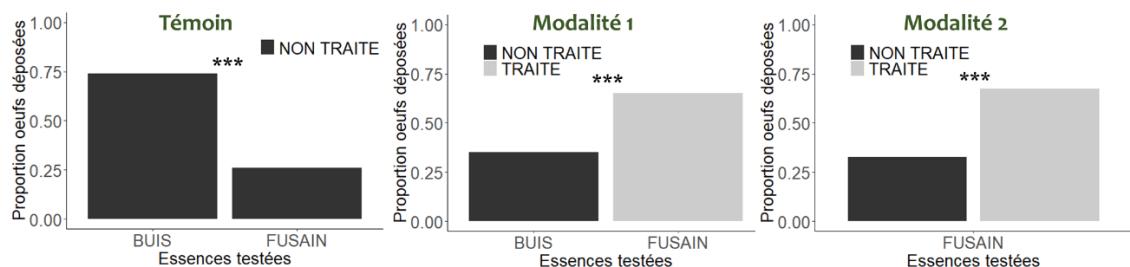


Figure 10 : Proportion d’œufs déposés par les femelles sur les rameaux de buis et de Fusain du Japon traités/non traités.

#### b. Mesure sur le Chêne vert *Quercus ilex*

Pour cette essence, la modalité 2 a montré que la proportion d’œufs pondus était plus élevée pour le Chêne vert traité (*Q. ilex* traité,  $RV = 0.66$ ,  $\chi^2 = 330.05$ ,  $dl = 1$ ,  $p < 0.001$ ) que pour le Chêne vert non traité. En revanche, la proportion d’œufs pondus était plus élevée sur le Buis (Buis,  $RV = 0.89$ ,  $\chi^2 = 258.38$ ,  $dl = 1$ ,  $p < 0.001$ ) que sur le Chêne vert traité pour la modalité 1. De même pour la modalité 3 (Buis,  $RV = 0.77$ ,  $\chi^2 = 320.33$ ,  $dl = 1$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 11).

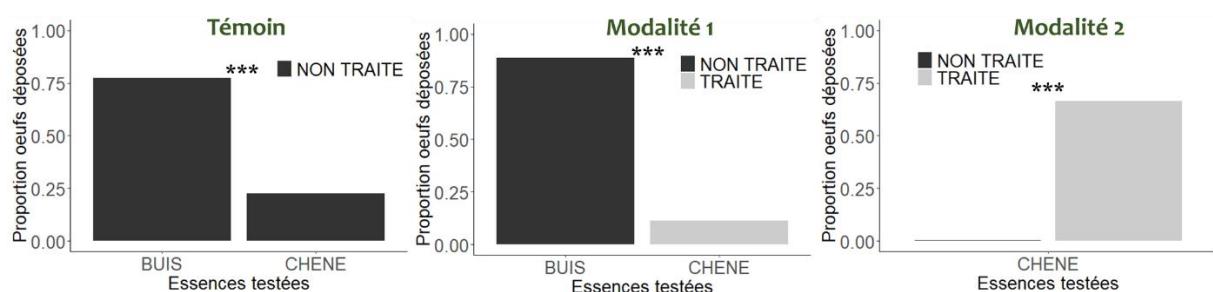


Figure 11 : Proportion d’œufs déposés par les femelles sur les rameaux de buis et de Chêne vert traités/non traités.

#### c. Mesure sur le Troène *Lingustrum vulgare*

Concernant la modalité 1 la proportion d’œufs pondus était plus importante sur le Buis (Buis,  $RV = 0.67$ ,  $\chi^2 = 95.07$ ,  $dl = 1$ ,  $p < 0.001$ ) que sur le Troène traité. En revanche, pour la modalité 2 la proportion d’œufs pondus était plus importante sur le Troène traité que sur le Troène non traité (*L. vulgare* traité,  $RV = 0.89$ ,  $\chi^2 = 260.12$ ,  $dl = 1$ ,  $p < 0.001$ ). Enfin, la proportion d’œufs pondus était plus importante sur le Buis (Buis,  $RV = 0.81$ ,  $\chi^2 = 118.23$ ,  $dl = 1$ ,  $p < 0.001$ ) que sur le Troène non traité pour la modalité 3 (Figure 12).

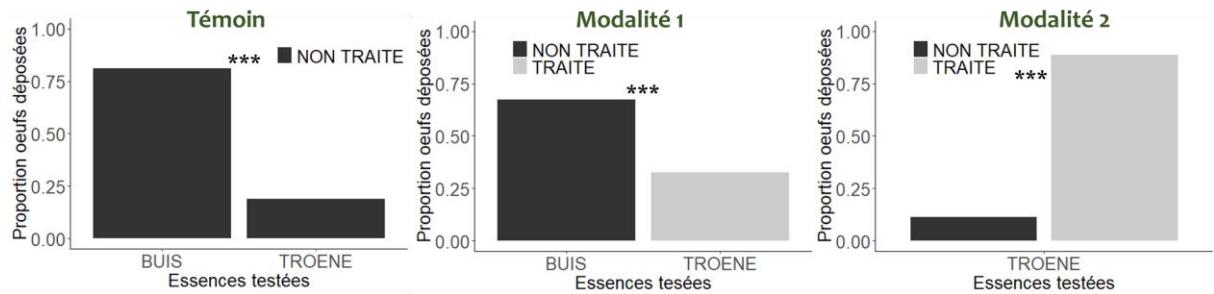


Figure 12 : Proportion d’œufs déposés par les femelles sur les rameaux de buis et de Troène traités/non traités.

#### d. Mesure sur le Houx *Ilex aquifolium*

Concernant la modalité 1, la proportion d’œufs pondus ne différait pas entre le rameau de Buis et le Houx traité ( $\chi^2 = 2.17, dl = 1, p = 0.14$ ). Pour la modalité 2 le nombre d’œufs déposés sur le Houx traité était plus important que sur le Houx non traité (*I. aquifolium* traité,  $RV = 0.72, \chi^2 = 55.94, dl = 1, p < 0.001$ ). Enfin, la modalité 3 présente une proportion d’œufs plus importante sur le Buis que sur le Houx non traité (Buis,  $RV = 0.70, \chi^2 = 60.84, dl = 1, p < 0.001$ ) (Figure 13).

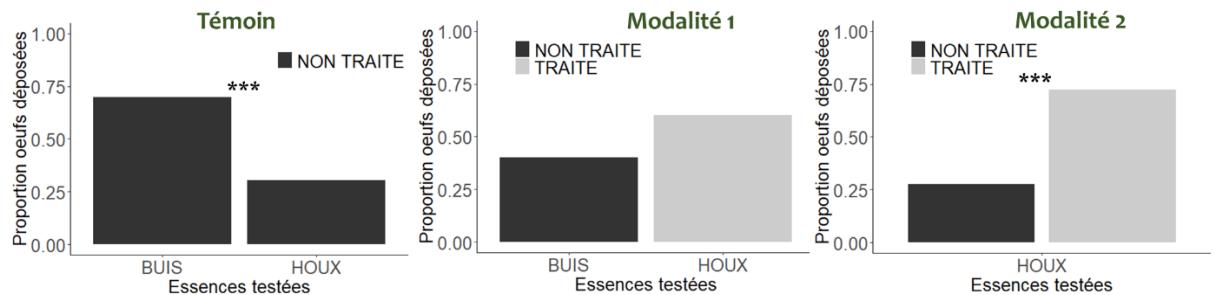


Figure 13 : Proportion d’œufs déposés par les femelles sur les rameaux de buis et de Houx traités/non traités.

## Discussion générale

Ce rapport rend compte des résultats de quatre études visant à caractériser des effets répulsifs ou attractifs de solutions produites à base d'huiles essentielles et d'autres substances naturelles, sur la pyrale du buis *C. perspectalis*, dans le but de développer de nouvelles techniques de biocontrôle contre cet insecte ravageur. Ainsi, l'effet répulsif des huiles essentielles a été testé, d'une part sur l'activité alimentaire des chenilles de stades larvaires L2L3 et L4L5, en mesurant à la fois leur prise de poids, leur consommation de buis et la masse de fèces produite, et d'autre part, sur le comportement d'oviposition des papillons femelles. L'application directe sur les chenilles de solutions à base d'huiles essentielles a également été testée afin d'étudier leur toxicité. Enfin, l'effet attractif d'une solution réalisée à base d'extrait naturel de buis a également été testé sur le comportement de ponte des femelles.

Les deux huiles essentielles testées dans l'étude n°1, HE-1 et HE-2, avaient montré un effet répulsif sur l'alimentation des chenilles lors de premiers tests réalisées en 2018 dans le cadre de ce même projet. L'objectif a donc été de confirmer ces résultats en augmentant le nombre de répétitions de 16 à 30. En suivant le même protocole expérimental, le produit « Mélange » HE-M, composé d'un mélange de 10 huiles essentielles et vendu dans le commerce pour ces vertus répulsives envers les insectes ravageurs en jardins, a également été testé.

Les résultats de l'étude n°1 ont mis en évidence une absence d'effet répulsif sur l'alimentation des chenilles pour les deux huiles essentielles testées ainsi que pour le mélange de 10 huiles essentielles. Ainsi, concernant l'huile essentielle HE-1, bien que la masse moyenne de buis consommée par les chenilles de stade L2L3 était significativement plus élevée pour les chenilles de la modalité traitement, aucune différence n'a été observée pour la variation de poids des chenilles et la masse des fèces. Ces résultats sont toutefois à prendre avec précaution car un fort taux de chenilles en diapause a été observé dans les deux modalités traitement et témoin, ce qui est susceptible de biaiser les résultats. Des difficultés ont été rencontrées au début de la mise en place de l'élevage pour maintenir la stabilité des conditions de température et d'humidité occasionnant alors un stress potentiel pour les chenilles. De plus, elles bénéficiaient d'une photopériode naturelle propice à la mise en diapause ce qui pourrait expliquer ce taux élevé de diapause. Cette huile essentielle avait été sélectionnée pour être testée dans cette étude du fait des effets insecticides et toxiques montrés dans les études de Enan (2001), Yang et al (2003) et Fichi et al (2007). Or, notre étude ne nous permet pas d'observer ces effets sur la pyrale du buis.

Les tests avec l'huile essentielle HE-2 n'ont montré aucune différence dans la variation de masse, la consommation de buis et la masse des fèces. Ainsi, cette huile essentielle n'a pas d'effet, à la concentration testée, sur l'alimentation des chenilles pyrales du buis.

En revanche, les tests avec le mélange de 10 huiles essentielles ont montré des résultats avec une variation de masse significativement plus élevée chez les chenilles L2L3 pour la modalité traitement et une masse moyenne de fèces plus élevée pour les chenilles L2L3 de la modalité témoin. Bien qu'aucune différence significative soit observée au niveau de la consommation de buis, les chenilles de la modalité traitement ont en moyenne consommé plus de buis. Nous pouvons donc supposer que les chenilles ont mieux assimilé le buis générant ainsi moins de fèces et une prise de poids. Ainsi ces résultats ne nous permettent pas de conclure à un effet répulsif du mélange d'huiles essentielles.

L'ensemble de ces résultats interrogent sur la capacité des chenilles pyrales du buis à assimiler les principaux composés des huiles essentielles. D'après la littérature, les composés des huiles essentielles testées dans notre étude induisent un effet insecticide dépendant du modèle vivant testé. Dans le cas de la pyrale du buis, il semble que ces composés n'aient pas d'effet répulsif sur le comportement d'alimentation des chenilles. Cette absence d'effet pourrait s'expliquer par la capacité de dégradation, d'accumulation ou d'exclusion de ces composants dans leur organisme (Florine L. G. Leuthardt, Glauser, et Baur 2013). En effet, une récente étude a mis en évidence la capacité d'absorption des alcaloïdes par les chenilles, substance active hautement毒ique pour les herbivores et présente dans le buis. Ainsi, les chenilles ont la capacité de stocker une grande quantité d'alcaloïdes bibasiques dans leur organisme, tandis que les alcaloïdes monobasiques sont métabolisés et excrétés (Florine L. G. Leuthardt, Glauser, et Baur 2013). Cette situation permet de suggérer que les composés toxiques des huiles essentielles peuvent être stockés et/ou dégradés par les chenilles après ingestion.

Les neuf huiles essentielles que nous avons appliquées directement sur les chenilles, dans le cadre de l'étude n°2, n'ont montré aucune toxicité aboutissant à la mort des individus. La totalité des chenilles ont survécu quel que soit le traitement. Pourtant, la plupart de ces huiles essentielles ont un effet toxique sur les insectes. Cependant, l'efficacité n'est pas la même selon le stade larvaire (Plata-Rueda et al. 2017) et la concentration (Göttig, Korn, et Herz 2017). Ainsi, Machial et al. (2010) ont montré 64% de mortalité avec l'huile essentielle de Thym, 22% de mortalité avec l'huile essentielle d'Ail et 23% de mortalité avec l'huile essentielle de Clou de girofle sur des chenilles de 1<sup>er</sup> stade larvaire. Pour nos essais, le quatrième stade larvaire a été utilisé ce qui pourrait expliquer notre absence de mortalité, car elle semble diminuer avec l'augmentation du stade de développement (Plata-Rueda et al. 2017). Bien que les huiles essentielles n'aient pas occasionné de mortalité, après pulvérisation nous pouvions observer que la chenille était gênée par la solution et se frottait la tête contre le buvard, comme si ses capteurs sensoriels se retrouvaient saturés par les composants de l'huile essentielle testée et la désorientaient. Cette gêne s'estompait toutefois dès que la chenille se trouvait de nouveau en présence de buis.

Les résultats obtenus dans l'étude n°3 mettent en évidence l'influence de deux huiles essentielles sur le comportement d'oviposition de *C. perspectalis*. En effet, l'huile essentielle HE-3 a montré un effet répulsif sur les femelles pyrales du buis, tandis qu'un effet attractif a été observé pour l'huile essentielle HE-9. Concernant ce dernier résultat, il est important de noter que durant la réalisation de cet essai, une panne est survenue dans la chambre climatique, perturbant ainsi l'ensemble des facteurs abiotiques. Il est donc très difficile d'interpréter ces résultats au vu de ces conditions expérimentales particulières.

Par contre, les résultats obtenus pour l'huile essentielle HE-3 sont tout à fait prometteurs dans l'objectif de mettre au point et de développer un nouveau produit de biocontrôle.

Enfin, les résultats de l'étude n°4 montrent que la solution préparée à base d'extrait naturel produit un effet attractif sur les femelles dans leur comportement de ponte. En effet, sur l'ensemble des tests de la modalité 2, la proportion d'œufs pondus était à chaque fois plus importante sur l'essence traitée (*E. japonicus* traité, RV = 0.67 ; *Q. ilex* traité, RV= 0.66 ; *L. vulgare*, RV =0.67 ; *I. aquifolium* traité, RV = 0.72) que sur l'essence non traitée. De plus, pour la modalité 1, la solution appliquée sur le Fusain du Japon a montré un effet encore plus attractif sur les femelles que le rameau de buis lui-même (RV = 0.65). De même, la solution

appliquée sur le Houx a bien eu un effet sur l'oviposition car les femelles ont pondu un nombre d'œufs dans les mêmes proportions que sur le rameau de buis. D'après ces résultats, cela signifie que les femelles de la pyrale du buis prennent leur décision de pondre en fonction de signaux sensoriels et qu'elles sont sensibles aux composés chimiques émis par la solution à base d'extrait naturel de buis (Renwick et Chew 1994). L'effet plus attractif de la solution observé sur le Fusain du Japon est peut-être lié à un effet additif. Nous pouvons donc supposer que cette essence émet des signaux sensoriels stimulants pour les femelles qui s'additionneraient avec ceux provenant du buis et également la préférence des femelles à pondre sur des feuilles plus larges (F. L. G. Leuthardt et Baur 2013) peut avoir également influencé son choix d'oviposition. En effet, le comportement de sélection de la plante hôte par les femelles est composée de différentes étapes. La première étape de sélection fait intervenir majoritairement des caractéristiques visuelles (forme, taille, couleur...) et olfactives (composés volatiles de la plante...). La seconde étape est la reconnaissance au contact où la femelle évalue les caractéristiques physiques et chimiques de la surface des feuilles par le biais de palpations. Lorsque l'ensemble de ces étapes est évalué positivement par la femelle, celle-ci peut alors pondre. Ces différentes étapes montrent l'importance des composés volatiles des plantes hôtes mais également la forme et la texture de leurs feuilles dans le choix du site de ponte des femelles. Cela permet donc d'expliquer les différences d'attraction entre les plantes hôtes testées. D'après la littérature, les femelles pyrales du buis sont attirées par des feuilles larges (F. L. G. Leuthardt et Baur 2013). Ainsi, il est donc possible que le choix d'oviposition de la femelle ait été influencé par les propriétés visuelles des feuilles de Fusain du Japon et du Houx commun car leur feuillage est plus épais et plus brillant (Hirota et Kato 2001). Au contraire, le Troène et le Chêne vert ne présentent pas un feuillage lisse, épais et brillant pouvant alors expliquer l'effet moins attractif de la solution de buis. D'après ces résultats, il serait envisageable de déterminer les composants chimiques responsables de cette attractivité afin de développer une nouvelle stratégie de gestion de la pyrale du buis.

## Conclusion et perspectives

Les résultats de nos quatre études nous permettent d'avoir quelques perspectives prometteuses en terme de lutte contre la pyrale du buis. En effet, l'huile essentielle HE-3 montre un effet répulsif sur le comportement de ponte des femelles *C. perspectalis*. Ces résultats obtenus en conditions de laboratoire sont désormais à adapter à un contexte semi-naturel afin de permettre une utilisation efficace dans la préservation des buis en JEVI. De plus, la solution à base d'extrait naturel de buis a montré des résultats très prometteurs. L'augmentation du nombre de répétitions dans cette étude est primordiale dans l'optique de conforter ces résultats. L'utilisation de cet attractif permettrait d'orienter les femelles soit vers des sites de ponte non viables pour les chenilles émergentes, soit vers un système de piégeage adapté, permettant ainsi une régulation de la population. Il serait de plus intéressant de caractériser la composition chimique du Buis, du Fusain du Japon et du Houx, testés dans l'étude n°4, afin d'identifier et de hiérarchiser les composés volatiles de chacune de ces espèces, et de permettre d'identifier les composés induisant une réponse chez la pyrale du buis lors de la sélection de la plante hôte. Le but étant de savoir si l'effet additif observé sur le Fusain du Japon et le Houx traités est dû à leur composition chimique ou bien à leurs propriétés physiques.

## Références bibliographiques

- Bakkali, F., S. Averbbeck, D. Averbbeck, et M. Idaomar. 2008. « Biological effects of essential oils – A review ». *Food and Chemical Toxicology* 46 (2): 446-75.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- Batish, Daizy R., Harminder Pal Singh, Ravinder Kumar Kohli, et Shalinder Kaur. 2008. « Eucalyptus Essential Oil as a Natural Pesticide ». *Forest Ecology and Management* 256 (12): 2166-74. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.008>.
- Di Domenico, Francesco, Fernando Lucchese, et Donatella Magri. 2012. « Buxus in Europe: Late Quaternary Dynamics and Modern Vulnerability ». *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 14 (5): 354-62.  
<https://doi.org/10.1016/j.ppees.2012.07.001>.
- Enan, Essam. 2001. « Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130 (3): 325-37. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00255-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00255-1).
- Feldtrauer, Jean-François, Jean-Jacques FELDTRAUER, Christophe BRUA, Société d'Entomologie, et Société (SEM). 2009. « Premiers signalements en France de la Pyrale du buis Diaphania perspectalis (Walker, 1859), espèce exotique envahissante s'attaquant aux buis (Lepidoptera, Crambidae) ». *Bulletin de la Société entomologique de Mulhouse* 0373-4544 65 (janvier): 55-58.
- Fichi, G, Guido Flamini, F Giovanelli, D Otranto, et Stefania Perrucci. 2007. « Efficacy of an essential oil of Eugenia caryophyllata against Psoroptes cuniculi ». *Experimental Parasitology* 115 (2): 168-72.
- Göttig, Stefanie, Stefanie Korn, et Annette Herz. 2017. « Repellent and toxic properties of plant oils and extracts on Cydalima perspectalis Walker (Lepidoptera: Crambidae) ». *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 50 (13-14): 658-73.  
<https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1358506>.
- Hannemann. 1985. « Inoue, H., Sugi, S., Kuroko, H., Moriuti, S. u. Kawabe, A.: Moths of Japan. Vol. 1. 966 S.; Vol. 2. 231 Farbtafeln, 161 Schwarz-Weiß-Tafeln, 552 S. Text. 1982. Kodansha Co. Ltd. Tokyo. IBNN 4-06-124 036-6 (0) ». *Deutsche Entomologische Zeitschrift* 32 (1-3): 230-230.  
<https://doi.org/10.1002/mmnd.19850320130>.
- Hirota, Tadao, et Yoshiomi Kato. 2001. « Influence of visual stimuli on host location in the butterfly, Eurema hecabe ». *Entomologia experimentalis et applicata* 101 (2): 199-206.
- Hori, Masatoshi. 1999. « Antifeeding, settling inhibitory and toxic activities of labiate essential oils against the green peach aphid, Myzus persicae (Sulzer) (Homoptera : Aphididae) ». *Applied Entomology and Zoology* 34 (1): 113-18.  
<https://doi.org/10.1303/aez.34.113>.
- Isman, Murray B. 2005. « Botanical insecticides, Deterrents ans repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world ». *Annual Review of Entomology* 51 (1): 45-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>.
- Kenis, M., S. Nacambo, F. L. G. Leuthardt, F. di Domenico, et T. Haye. 2013. « The Box Tree Moth, Cydalima Perspectalis, in Europe: Horticultural Pest or Environmental Disaster? » *Aliens: The Invasive Species Bulletin*, n° No.33: 38-41.
- Krüger, E. O. 2008. « Glyphodes perspectalis (Walker, 1859) - new for the European fauna (Lepidoptera: Crambidae) ». *Entomologische Zeitschrift mit Insekten-Börse* 118 (2): 81-83.

- Leuthardt, F. L. G., et B. Baur. 2013. « Oviposition Preference and Larval Development of the Invasive Moth *Cydalima Perspectalis* on Five European Box-Tree Varieties ». *Journal of Applied Entomology* 137 (6): 437-44. <https://doi.org/10.1111/jen.12013>.
- Leuthardt, Florine L. G., Gaetan Glauser, et Bruno Baur. 2013. « Composition of Alkaloids in Different Box Tree Varieties and Their Uptake by the Box Tree Moth *Cydalima Perspectalis* ». *Chemoecology* 23 (4): 203-12. <https://doi.org/10.1007/s00049-013-0134-1>.
- Lopez Vaamonde, Carlos, David Agassiz, Sylvie Augustin, Jurate De Prins, Willy De Prins, Stanislav Gomboc, Povilas Ivinskis, et al. 2010. « Lepidoptera. Chapter 11 ». *BIORISK ? Biodiversity and Ecosystem Risk Assessment* 4 (juillet): 603-68. <https://doi.org/10.3897/biorisk.4.50>.
- M.A. Ibrahim, P. Kainulainen, et A. Aflatuni. 2001. « Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests ». *Agricultural and Food Science* 10 (3). <https://doi.org/10.23986/afsci.5697>.
- Machial, Cristina M, Ikkei Shikano, Michael Smirle, Roderick Bradbury, et Murray B Isman. 2010. « Evaluation of the toxicity of 17 essential oils against Choristoneura rosaceana (Lepidoptera: Tortricidae) and Trichoplusia ni (Lepidoptera: Noctuidae) ». *Pest management science* 66 (10): 1116-21.
- Mauchline, Alice L., Juliet L. Osborne, Andrew P. Martin, Guy M. Poppy, et Wilf Powell. 2005. « The effects of non-host plant essential oil volatiles on the behaviour of the pollen beetle Meligethes aeneus ». *Entomologia Experimentalis et Applicata* 114 (3): 181-88. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2005.00237.x>.
- Mitchell, Ruth, Savelj Chitanava, Roman Dbar, Volodymyr Kramarets, Asko Lehtijärvi, Izolda Matchutadze, Giorgi Mamardashvili, et al. 2018. « Identifying the Ecological and Societal Consequences of a Decline in Buxus Forests in Europe and the Caucasus ». *Biological Invasions* 20 (12): 3605-20. <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1799-8>.
- Nacambo, S., F. L. G. Leuthardt, H. Wan, H. Li, T. Haye, B. Baur, R. M. Weiss, et M. Kenis. 2014. « Development Characteristics of the Box-Tree Moth *Cydalima Perspectalis* and Its Potential Distribution in Europe ». *Journal of Applied Entomology* 138 (1-2): 14-26. <https://doi.org/10.1111/jen.12078>.
- Plata-Rueda, Angelica, Luis Carlos Martínez, Marcelo Henrique Dos Santos, Flávio Lemes Fernandes, Carlos Frederico Wilcken, Marcus Alvarenga Soares, José Eduardo Serrão, et José Cola Zanuncio. 2017. « Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) ». *Scientific reports* 7: 46406.
- Regnault-Roger, Catherine, Charles Vincent, et John Thor Arnason. 2011. « Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World ». *Annual Review of Entomology* 57 (1): 405-24. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100554>.
- Renwick, J A A, et F S Chew. 1994. « Oviposition Behavior in Lepidoptera ». *Annual Review of Entomology* 39 (1): 377-400. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.002113>.
- Renwick, J.A.A., et Celia D. Radke. 1988. « Sensory cues in host selection for oviposition by the cabbage butterfly, *Pieris rapae* ». *Host Finding and Feeding in Adult Phystophagous Insects* 34 (3): 251-57. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(88\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0022-1910(88)90055-8).
- Scheffler, I., et M. Dombrowski. 1993. « Behavioural responses of *Blattella germanica* L. (Orthopt., Blattellidae) induced by repellent plant extracts ». *Journal of Applied Entomology* 115 (1-5): 499-505. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1993.tb00419.x>.
- Wan, H., T. Haye, M. Kenis, S. Nacambo, H. Xu, F. Zhang, et H. Li. 2014. « Biology and Natural Enemies of *Cydalima Perspectalis* in Asia: Is There Biological Control

- Potential in Europe? » *Journal of Applied Entomology* 138 (10): 715-22.  
<https://doi.org/10.1111/jen.12132>.
- Yang, Young-Cheol, Si-Hyeock Lee, Won-Ja Lee, Don-Ha Choi, et Young-Joon Ahn. 2003.  
« Ovicidal and Adulticidal Effects of Eugenia caryophyllata Bud and Leaf Oil Compounds on Pediculus capitis ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (17): 4884-88. <https://doi.org/10.1021/jf034225f>.
- Yazdani, Elham, Jalal Jalali Sendi, et Jalil Hajizadeh. 2014. « Effect of Thymus Vulgaris L. and Origanum Vulgare L. Essential Oils on Toxicity, Food Consumption, and Biochemical Properties of Lesser Mulberry Pyralid Glyphodes Pyloalis Walker (Lepidoptera: Pyralidae) ». *Journal of Plant Protection Research* 54 (1): 53-61.  
<https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0008>.