



**HAL**  
open science

## Rapport intermédiaire n°3 du programme SaveBuxus II (Bilan 2020)

Lucile Muller, Anne Sophie Brinquin, Edgar Raguenet

### ► To cite this version:

Lucile Muller, Anne Sophie Brinquin, Edgar Raguenet. Rapport intermédiaire n°3 du programme SaveBuxus II (Bilan 2020). INRAE UEFM Avignon. 2021. <hal-04542585>

**HAL Id: hal-04542585**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04542585v1>**

Submitted on 16 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 - Attribution - Non-commercial use - No Derivative Works - International License

# Programme SAVEBUXUS II

## BILAN 2020



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



**Rapport d'activité - 15/02/2021**

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

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 (2018/2021), 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 émergent. 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 substances d'origine naturelle comme les huiles essentielles ou extraits de plantes, 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, trois études ont été expérimentées en 2020 :

**Etude 1 :** Etude de l'effet attractif d'une solution à base de buis sur le comportement de ponte des femelles *C. perspectalis*.

**Etude 2 :** Etude de l'effet attractif de solutions sur des supports inertes de ponte dans le but de développer un système de piégeage des femelles de *C. perspectalis*.

**Etude 3 :** Etude de l'effet répulsif de solution à base d'huile essentielle et d'extrait naturel sur le comportement de ponte des femelles de *C. perspectalis*.

## Table des matières

Introduction .....	4
Matériels et Méthodes .....	5
1. L'élevage de <i>C. perspectalis</i> .....	5
2. Les solutions testées .....	5
2.1 Provenance des solutions attractives et répulsives.....	5
2.2 Préparation des solutions .....	5
Etude 1.....	6
Matériels et Méthodes .....	6
Préparation de la solution attractive .....	6
Déroulement de l'expérimentation et mesures effectuées.....	6
Résultats .....	7
a. Mesures sur le Fusain du Japon <i>Euonymus japonicus</i> .....	7
b. Mesures sur le Chêne vert <i>Quercus ilex</i> .....	8
c. Mesures sur le Troène <i>Lingustrum vulgare</i> .....	8
d. Mesures sur le Houx <i>Ilex aquifolium</i> .....	9
Etude 2.....	10
Matériels et Méthodes .....	10
Préparation des solutions à base de matières fraîches.....	10
Préparation des supports de ponte .....	10
Déroulement de l'expérimentation.....	10
Mesures réalisées.....	11
Résultats .....	11
a. Effet du traitement sur le comportement de ponte.....	11
b. Effet du type de support sur le comportement de ponte.....	12
i. Effet du type de papier.....	12
ii. Effet du type de pliage .....	13
Etude 3.....	14
Matériels et Méthodes .....	14
Préparation des solutions à base d'huile essentielle et d'extrait naturel .....	14
Déroulement de l'expérimentation.....	14
Mesures réalisées.....	15
Résultats .....	15
a. Effet de l'huile essentielle de thym sur le comportement d'oviposition .....	15
b. Effet de l'extrait naturel de l'essence Y sur le comportement d'oviposition.....	16
Discussion générale.....	18
Conclusion.....	20

## Introduction

Considérée comme une espèce invasive en France depuis 2008 (Feldtrauer et al. 2009), la pyrale du buis *Cydalima perspectalis* est un Lépidoptère originaire d'Asie du Sud-Est (Hannemann 1985), introduit de manière non intentionnelle en Europe en 2007 par le transport de plantes infestées (Krüger 2008; Nacambo et al. 2014). Depuis, son aire de répartition n'a cessé de s'étendre. Son cycle de vie dynamique avec notamment une fécondité élevée, un nombre important de générations par an et une 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 (Leuthardt, Glauser, et Baur 2013). Les premières observations de ce ravageur ont été faites dans les Jardins, Espaces Verts et Infrastructures (JEVI). Fréquemment utilisé comme plante ornementale dans de nombreux jardins et parcs à haute valeur patrimoniale, la préservation du buis en France représente un enjeu culturel et économique important (Kenis et al. 2013; Mitchell et al. 2018). La gestion de ce ravageur dans les espaces verts s'avère donc nécessaire.

Le programme SaveBuxus s'inscrit donc dans cette démarche. La première phase de ce programme (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.

La deuxième phase de du programme (SaveBuxus II 2018/2021) a eu pour objectif de mettre en place de nouvelles méthodes de biocontrôle innovantes. Ce rapport rend compte des trois études menées en 2020 par l'UEFM d'Avignon. La première a permis d'étudier l'effet attractif d'une solution sur le comportement d'oviposition des femelles de *C. perspectalis* (Etude 1). La deuxième a permis d'évaluer l'effet attractif de solutions sur des supports inertes de ponte dans le but de développer un système de piégeage des femelles de la pyrale du buis (Etude 2). Enfin, la troisième étude visait à étudier l'effet répulsif de différentes solutions sur le comportement de ponte des femelles de *C. perspectalis* (Etude 3).

## Matériels et Méthodes

### 1. L'élevage de *C. perspectalis*

Les papillons utilisés pour les différentes études ont été élevés au laboratoire UEFM d'Avignon. Ils proviennent soit de chenilles issues de l'élevage de l'UEFM d'Avignon, soit de chenilles prélevés en milieu naturel (Drôme) suite au déconfinement de juin 2020. Les chenilles ont été réparties dans 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). 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 beurriers. Une fois les chrysalides matures, elles ont été sexées, 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.

### 2. Les solutions testées

#### ***2.1 Provenance des solutions attractives et répulsives***

Les macérâts utilisés pour les études 1 et 2 sont réalisés le jour même de la mise en place d'une modalité, à partir de matière fraîche récoltée le matin.

L'huile essentielle utilisée pour l'étude 3 provient de l'entreprise « La Compagnie des sens ». L'entreprise garantit un produit naturel, pur, certifié « Agriculture Biologique ». Pour garantir la présence en composés actifs, des contrôles sont réalisés avant leur commercialisation, notamment un profil chromatographique.

L'extrait naturel utilisé pour l'étude 3 provient d'un échantillon obtenu auprès d'une société spécialisée dans la protection des cultures.

#### ***2.2 Préparation des solutions***

Les concentrations des solutions sont détaillées dans le matériel et méthode de chaque étude. Les dilutions sont réalisées avec de l'eau distillée. Afin d'homogénéiser les mélanges avec les huiles, un émulsifiant (Tween20) est ajouté à une concentration définie dans chaque matériel et méthodes.

Chaque solution est réalisée sous hotte aspirante le jour de la mise en place de l'essai.

# Etude 1

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

## Matériels et Méthodes

### Préparation de la solution attractive

Un macérât de matière fraîche à une concentration de 12.5% est réalisé et testé pour cette étude. Les feuilles les plus jeunes sont prélevées le jour même de l'essai, afin de garantir un niveau maximal de principes actifs, puis sont broyées à l'aide d'un hachoir mécanique. Le macérât est conservée entre 23°C et 25°C sous hôte aspirante jusqu'à son utilisation.

### 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 de buis sur le comportement de ponte des femelles de *C. perspectalis*, appliquée sur 4 essences de plantes différentes. Les 4 essences 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 le macérât 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 avec 6 répétitions chacune ont été testées (Figure 1). La première modalité permet de comparer l'effet attractif d'un rameau de l'essence à tester, traitée avec le macérât de buis, sur le comportement de ponte des femelles pyrales du buis en comparaison avec un rameau de buis (**Modalité 1**). La deuxième permet d'observer ce même effet, entre un rameau traité de l'essence à tester en comparaison avec un rameau de cette même essence non traitée (**Modalité 2**). Enfin, la troisième modalité permet de tester cet effet entre un

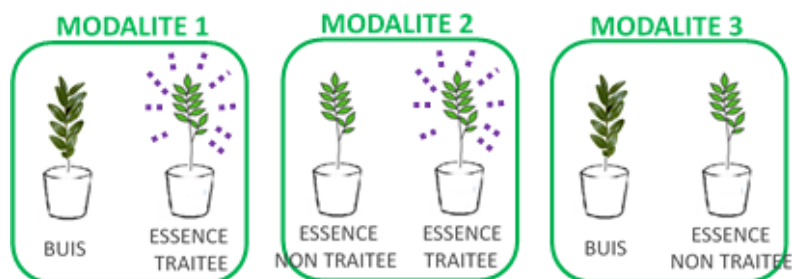


Figure 1 : Schéma descriptif des modalités à deux choix testées pour l'étude n°1.

rameau de l'essence non traitée en comparaison avec un rameau de buis (**Modalité 3 = Témoin**).

Les rameaux des différentes essences ont été préalablement préparés et trempés entièrement durant 3 secondes, pour certains dans le macérât de buis, et les autres dans de l'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 distincts de mousse florale 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°C ± 1°C, Humidité Relative = 70% ± 5%, Photopériode : 14 heures jour : 10 heures nuit). Après 72 heures, les rameaux ont été récupérés, puis pour chaque modalité et chaque répétition, les nombres d'œufs pondus 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 utilisées pour cet essai étaient âgées de 2 ans et ont été achetées auprès de la pépinière « ARBRES DE PROVENCE ».

## Résultats

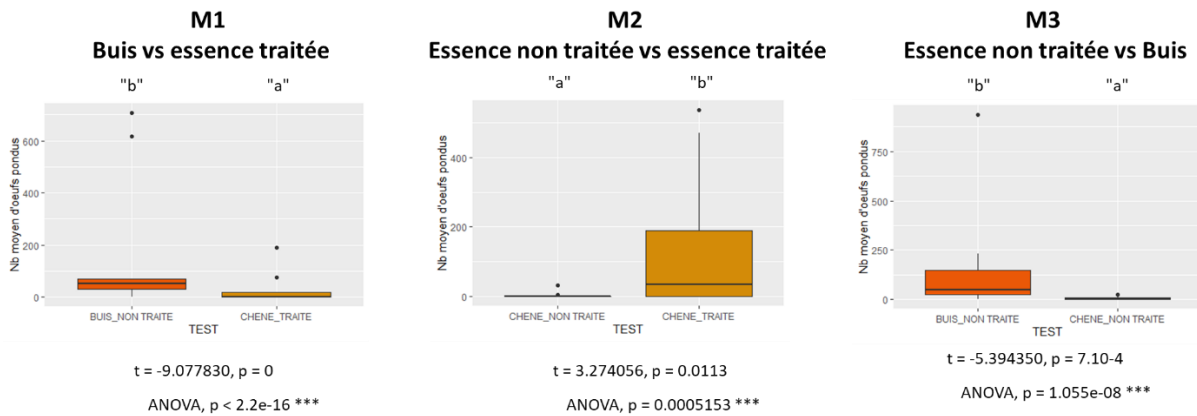
### a. Mesures sur le Fusain du Japon *Euonymus japonicus*



Figure 2 : Nombre d'œufs moyen pondus par les femelles pyrales du buis suivant les différentes modalités testées sur le Fusain du Japon.

La modalité 3 permet de confirmer la non-attractivité naturelle du Fusain du Japon sur les papillons pyrales du buis. Ainsi, le nombre d'œufs moyen pondus est significativement plus élevé sur le buis en comparaison avec le Fusain non traité ( $p=3.203e-06$ ) (Figure 2). En revanche, pour la modalité 2, le nombre d'œufs moyen pondus sur le fusain traité est significativement plus élevé que sur le Fusain non traité ( $p=0.0002669$ ). Aucune différence significative n'est observée pour la modalité 1, le nombre d'œufs moyen pondus n'étant pas différent entre le buis non traité et le Fusain traité ( $p=0.2631$ ).

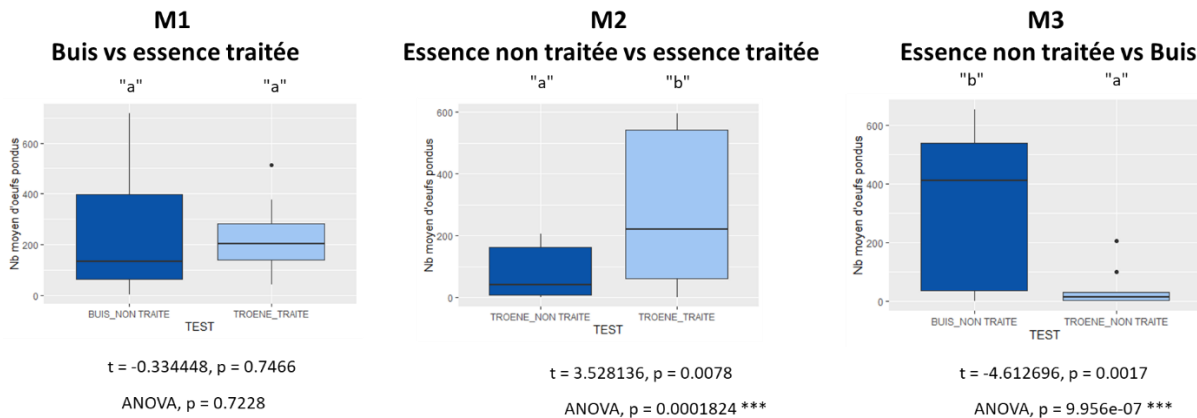
## b. Mesures sur le Chêne vert *Quercus ilex*



**Figure 3** : Nombre d'œufs moyen pondus par les femelles pyrales du buis suivant les différentes modalités testées sur le Chêne vert.

Concernant le Chêne vert, les femelles pyrales du buis ont pondus significativement plus sur les rameaux de buis que sur le Chêne vert non traité ( $p=1.055e-08$ ) (Figure 3). En revanche, pour la modalité 2, le nombre d'œufs pondus est significativement plus élevé sur le Chêne vert traité que sur le Chêne vert non traité ( $p=0.0005153$ ). Enfin pour la modalité 1, le nombre d'œufs pondus est significativement plus élevé sur le buis non traité que sur le Chêne vert traité ( $p < 2.2 e-16$ ).

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



**Figure 4** : Nombre d'œufs moyen pondus par les femelles pyrales du buis suivant les différentes modalités testées sur le Troène.

De la même manière que pour les essences précédentes testées, les femelles pyrales du buis ont pondus significativement plus sur les rameaux de buis que sur le Troène non traité ( $p=9.956e-07$ ) (Figure 4). En revanche pour la modalité 2, le nombre d'œufs pondus est significativement plus élevé sur le Troène traité que sur le Troène non traité ( $p=0.00078$ ). Enfin, pour la modalité 1, le nombre d'œufs pondus n'est significativement pas différent entre le buis non traité et le Troène traité ( $p=0.7228$ ).

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

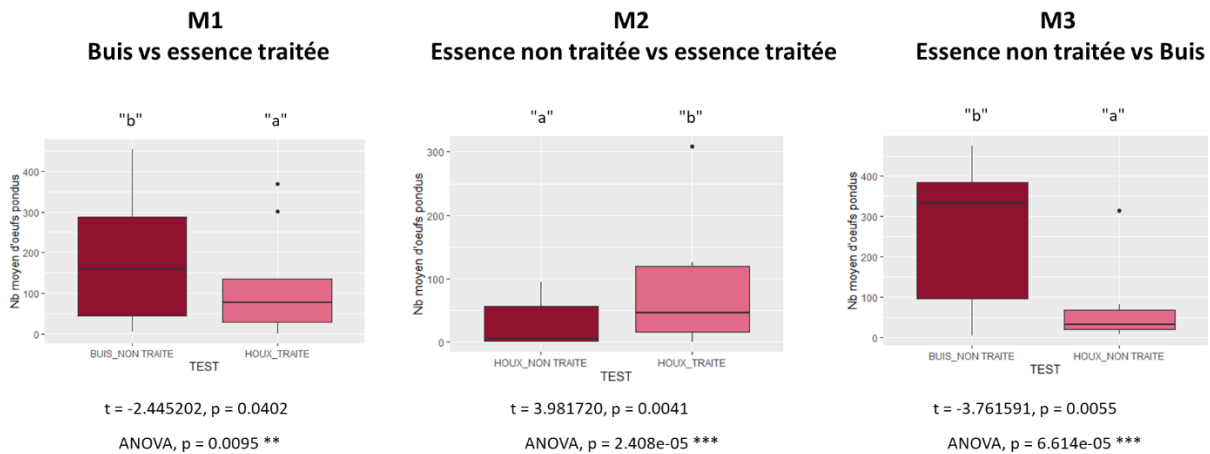


Figure 5 : Nombre d'œufs moyen pondus par les femelles pyrales du buis suivant les différentes modalités testées sur le Houx.

Concernant le Houx, la modalité 3 montre un nombre d'œufs pondus significativement plus élevé sur le buis que sur le Houx non traité ( $p=6.614e-05$ ) (Figure 5). En revanche, pour la modalité 2, le nombre d'œufs pondus est significativement plus élevé sur le Houx traité que sur le Houx non traité ( $p=2.408e-05$ ). Enfin, la modalité 1 montre un nombre d'œufs pondus significativement plus élevé sur le buis que sur le Houx traité ( $p=0.0095$ ).

# Etude 2

Etude de l'effet attractif de solutions sur des supports inertes de ponte dans le but de développer un système de piégeage des femelles de *C. perspectalis*.

## Matériels et Méthodes

### Préparation des solutions à base de matières fraîches

Trois solutions sont testées en comparaison avec un témoin négatif : Att1 (macérât de buis), Att2 (macérât d'une autre essence) et Att3 (mélange 50% Att1 + 50% Att2). Le témoin négatif est composé d'eau distillée, les autres solutions sont composées de macérâts élaborées à partir de matière fraîche de différentes essences. Ils sont réalisés selon le même procédé que l'étude 1, à la même concentration de 12,5%.

### Préparation des supports de ponte

Les différentes solutions sont testées sur différents supports de ponte. Les supports de ponte sont évalués suivant deux types de papiers (papier canson/papier glacé) et suivant deux types de pliage (plat/plié). Les supports sont d'une dimension de 7\*7cm, la modalité « pliée » suit un pliage en accordéon d'une marge de 1 cm.

### Déroulement de l'expérimentation

Au sein de chaque cage insectproof (30x30x30cm), les 4 modalités de supports inertes ont été installées comme indiqué dans la figure 6 (test à 4 choix). Ces supports ont été trempés au préalable dans une des solutions testées (un traitement par cage afin d'éviter les interférences possibles). 4 couples de papillons de même maturité sexuelle ont été installés dans chacune des cages durant 72 heures, en conditions contrôlées (T=25°C, HR=70%, photopériode 14 :10). 6 répétitions ont été réalisées pour chacun des traitements, durant 72 heures.

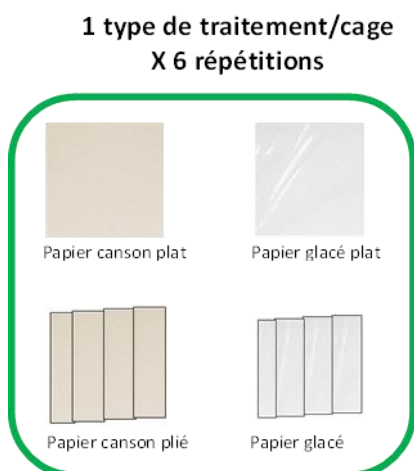


Figure 6 : Schéma du dispositif mis en place au sein de chaque cage, pour chacun des traitements testés.

## Mesures réalisées

Après le démontage du dispositif, au bout des 72 heures, les supports sont conservés à 9 °C afin de ralentir la date d'émergence, et de permettre le comptage des œufs réalisé au plus tard dans les jours suivants. Les comptages sont réalisés à la loupe binoculaire sur le support de ponte.

## Résultats

### a. Effet du traitement sur le comportement de ponte

La figure 7 présente la somme totale du nombre d'œufs pondus par les femelles pyrales du buis en fonction du type de traitement, quel que soit le type de support de ponte testé. Un total de 1155 œufs a été comptabilisé sur les 24 supports ayant été trempés dans la solution « Att3 ». 778 œufs ont été dénombrés sur les supports traités avec « Att1 », 357 sur les supports témoins, et enfin, 113 œufs ont été comptabilisés sur les supports traités avec « Att2 ».

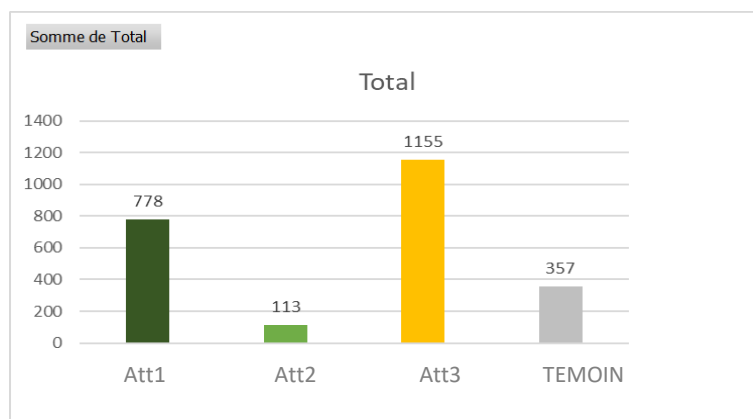


Figure 7 : Somme des œufs pondus par *C. perspectalis* comptabilisés par type de traitement.

Les analyses statistiques permettent de confirmer les différences observées entre traitements. Un test glm a été réalisé sous une loi quasi poisson (données de comptage indépendantes avec surdispersion) et montre un effet significatif du traitement sur le comportement de ponte des femelles pyrales du buis ( $p=0.001566^{**}$ ), avec un effet attractif plus important du traitement « Att3 » par rapport aux autres types de traitement et au témoin (Figure 8).

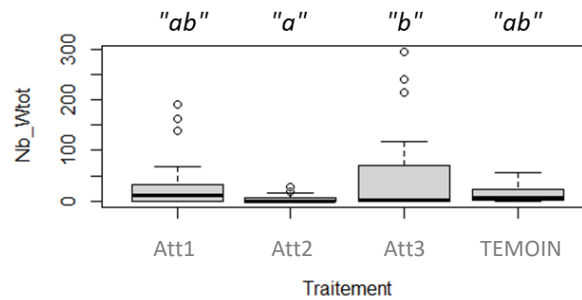


Figure 8 : Boxplot présentant le nombre de pontes par type de traitement. Test glm quasi poisson (données de comptage indépendantes, avec surdispersion) effet traitement :  $p=0.001566$  \*\*

### b. Effet du type de support sur le comportement de ponte

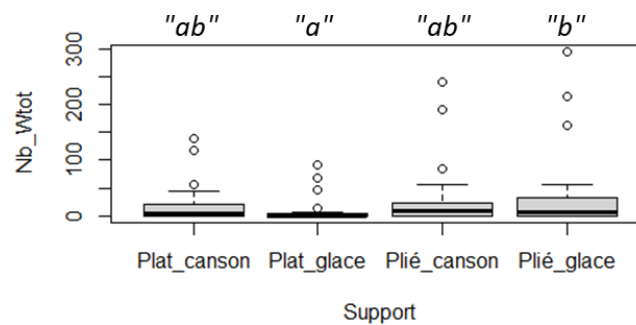


Figure 9 : Boxplot présentant le nombre de pontes par type de support. Test glmm quasi poisson (données de comptage non indépendantes, avec surdispersion) effet support :  $p=0.04835$ \*

Un test glmm a été réalisé sous une loi quasi poisson (données de comptage non indépendantes avec surdispersion) et montre des différences significatives entre les types de support testés ( $p=0.04835$ \*) (Figure 9).

#### i. Effet du type de papier

L'effet du type de papier (canson/glacé) a été évalué par un modèle linéaire généralisé. L'effet du type de papier sur le nombre d'œufs pondus par les femelles apparaît comme étant non significatif ( $p=0.90208$ ) (Figure 10). De plus, il n'existe pas d'interaction entre le type de papier et le type de traitement sur le nombre d'œufs pondus par les femelles de *C. perspectalis* ( $p=0.867833$ ).

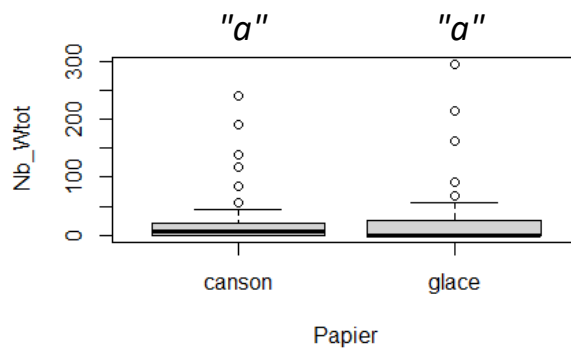


Figure 10 : Nombre d'œufs moyen pondus en fonction du type de papier (canson/glacé) utilisé.

## ii. Effet du type de pliage

L'effet du type de pliage (plié/plat) sur le comportement de ponte des femelles de *C. perspectalis* a également été testé (Figure 11). Les analyses statistiques (test glm quasi poisson) confirme un effet significatif du type de pliage sur le nombre d'œufs pondus par les femelles ( $p=0.0125309^*$ ), quel que soit le type de traitement (pliage\*Traitement :  $p=0.8735659$ ).

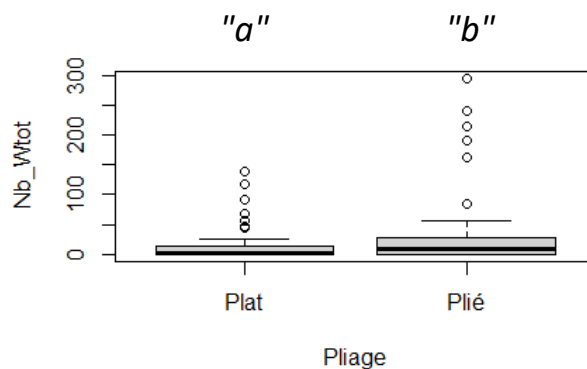


Figure 11 : Nombre d'œufs moyen pondus en fonction du type de pliage (plat/plié) utilisé.

# Etude 3

Etude de l'effet répulsif de solutions à base d'huile essentielle et d'extrait naturel sur le comportement de ponte des femelles de *C. perspectalis*.

## Matériels et Méthodes

### Préparation des solutions à base d'huile essentielle et d'extrait naturel

Au total, 5 modalités ont été testées.

L'huile essentielle de thym a été testée suivant deux modalités (6 répétitions chacune) :

- 1 % de concentration, avec 1 % de Tween 20
- 5% de concentration, avec 5 % de Tween 20

L'extrait naturel de l'essence Y a été testé suivant 3 modalités (30 répétitions chacune) :

- 5 % de concentration, avec 5% de Tween 20
- 5 % de concentration, sans Tween 20
- 30 % de concentration, sans Tween 20

Les dilutions ont été réalisées avec de l'eau distillée et un émulsifiant, le Tween20 (T20), afin d'homogénéiser le mélange. Chaque solution a été réalisée sous hotte aspirante le jour de la mise en place de l'essai.

### Déroulement de l'expérimentation

Pour cette expérimentation, un test à deux choix a été réalisé. Ainsi, chaque semaine une modalité a été testée en comparaison avec un témoin négatif (T-) composé uniquement d'eau distillée.

Pour chaque répétition, des cages insectproof (30 × 30 × 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 6 pour l'huile essentielle et 30 pour l'extrait naturel. Deux rameaux de buis d'environ quinze centimètres sont préparés pour chaque répétition, puis la moitié d'entre eux sont trempés trois secondes dans une solution (d'huile essentielle ou d'extrait naturel) et l'autre moitié dans de l'eau distillée. Les rameaux sont ensuite placés sous hotte aspirante pour sécher durant 1 à 2 heures. Les rameaux sont par la suite piqués dans deux morceaux de mousse florale distincts imbibés d'eau et disposés dans les coins opposés de la cage (Figure 12). Toutes les cages sont ensuite placées en chambre climatique sous conditions contrôlées (Température = 25°C ± 1°C, Humidité Relative = 70% ± 5%, Photopériode : 14 heures jour : 10 heures nuit).

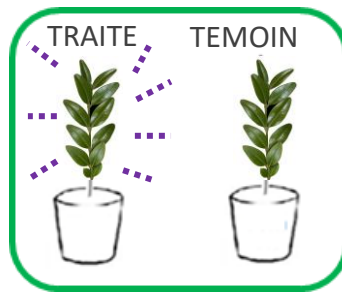


Figure 12 : Dispositif mis en place pour l'étude 3.

### Mesures réalisées

Après 72 heures, tous les rameaux de buis ont été récupérés, et le nombre d'œufs comptabilisés à l'aide d'une loupe binoculaire.

## Résultats

### a. Effet de l'huile essentielle de thym sur le comportement d'oviposition

Afin de déterminer un effet répulsif sur le comportement de ponte des femelles de la pyrale du buis *Cydalima perspectalis*, le nombre d'œufs moyens pondus a été dénombré sur les deux modalités testées (non traité et traité) pour deux concentrations de l'huile essentielle de thym (1% et 5%) (Figure 13).

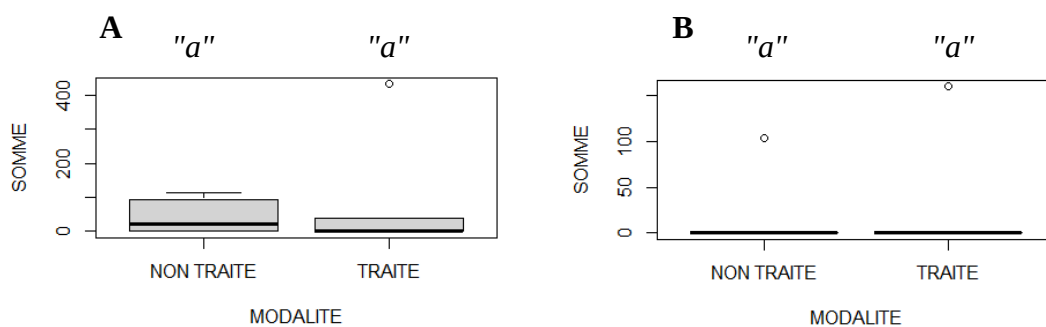


Figure 13 : Nombre d'œufs moyen pondus selon les modalités « non traité » et « traité » à l'huile essentielle de thym (A) : concentration de 1%, (B) : concentration de 5%.

Les analyses statistiques ne montrent pas d'effet significatif de l'huile essentielle de thym sur le comportement de ponte des femelles pyrales du buis, quelle que soit la concentration (1% :  $p = 0.1653$  / 5% :  $p = 0.7444$ ). Toutefois, la semaine où la concentration de 5% a été testée, nous avons observé une forte mortalité des papillons utilisés pour l'expérimentation

certainement due à des facteurs extérieurs, ce qui explique le faible nombre d'œufs comptabilisés sur les 6 répétitions.

### b. Effet de l'extrait naturel de l'essence Y sur le comportement d'oviposition

L'effet répulsif d'un extrait naturel a été testé sur le comportement de ponte des femelles pyrales du buis. Le nombre d'œufs moyens pondus a été dénombré sur les deux modalités testées (non traité et traité) pour deux concentrations (5 % et 30%), avec ou sans émulsifiant Tween20 intégré dans la solution.

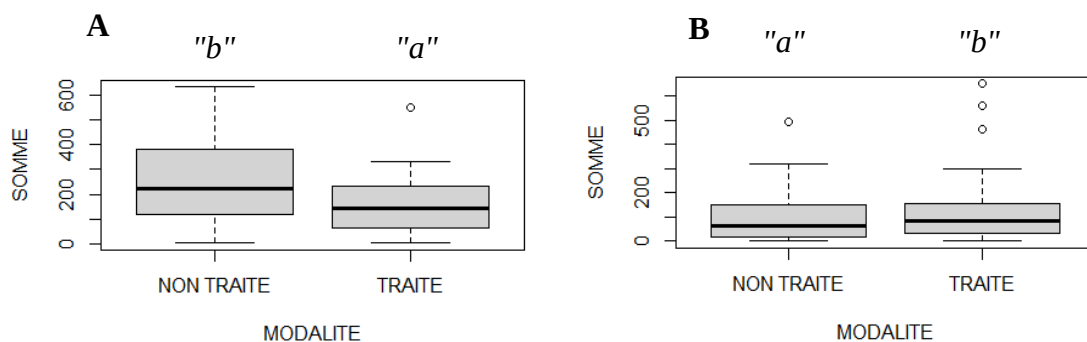


Figure 14 : Nombre d'œufs moyen pondus selon les modalités « non traité » et « traité » à l'extrait naturel à 5 % de concentration (A) : sans Tween20, (B) : avec Tween20.

Dans un premier temps, l'effet répulsif de l'extrait naturel sur le comportement de ponte a été testé à une concentration de 5 % avec et sans émulsifiant (Tween20) (Figure 14).

Les analyses statistiques nous permettent de déterminer un effet répulsif significatif du traitement des rameaux de buis à l'extrait naturel (5%) sans émulsifiant sur le nombre d'œufs pondus par les femelles de *C. perspectalis* ( $p = 0.002969^{**}$ ).

Toutefois, l'ajout de l'émulsifiant dans la solution semble avoir l'effet inverse. Les analyses statistiques permettent de déterminer un effet attractif significatif du traitement des rameaux de buis à l'extrait naturel (5%) avec l'émulsifiant sur le comportement de ponte des femelles de *C. perspectalis* ( $p = 0.02521^*$ ). Nous avons en effet observé une agrégation de l'extrait dans la solution dès l'ajout du Tween20, ce qui pourrait expliquer la baisse d'efficacité de son pouvoir répulsif.

Au regard de ces résultats, nous avons testé l'effet du traitement d'extrait naturel à 30% de concentration, sans émulsifiant, afin de confirmer le pouvoir répulsif de cet extrait à plus forte concentration. (Figure 15).

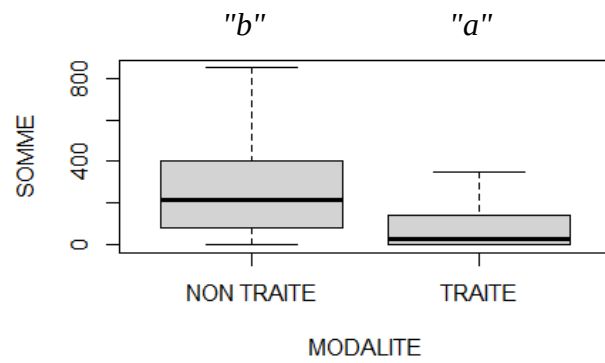


Figure 15 : Nombre d’œufs moyen pondus selon les modalités « non traité » et « traité » à l’extrait naturel à 30 % sans Tween20.

D’après les analyses statistiques, le nombre d’œufs pondus est significativement plus important sur les rameaux non traités que traité à l’extrait naturel (30%) sans émulsifiant ( $p = 8.402 \times 10^{-9}$  \*\*\*).

## Discussion générale

Ce rapport rend compte des résultats de 3 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.

L'Etude n° 1 avait pour objectif d'étudier l'effet attractif de la solution à base de buis sur le comportement de ponte des femelles de la pyrale du buis. La solution testée dans cette étude avait montré un effet attractif sur le comportement de ponte des femelles lors des premiers tests réalisés en 2019 dans le cadre de ce même projet. L'objectif a donc été de confirmer les résultats en augmentant le nombre de répétitions de 3 à 6. Le but de cette méthode est d'attirer les femelles de *C. perspectalis* afin qu'elles pondent sur des plantes non hôtes. La descendance issue de ces pontes ne pouvant pas s'alimenter sur des plantes non hôtes, cette technique représente une méthode innovante de régulation de ce ravageur.

L'ensemble des plantes non hôtes, pour la modalité 3, ont montré un nombre significativement plus élevé d'œufs sur le buis que sur la plante non hôte non traitée. Ces résultats permettent de conforter la bonne mise en place de l'expérimentation. En effet les femelles vont préférentiellement pondre sur du buis que sur un autre support. Pour la modalité 2, les plantes non hôtes traitées avec l'extrait de buis ont comptabilisé plus d'œufs que celles non traitées. Ces résultats permettent d'affirmer que la solution d'extrait naturel a bien un effet attractif significatif sur le comportement d'oviposition des femelles pyrales du buis. Enfin, pour la modalité 1, le Fusain du Japon et le Troène démontrent un intérêt particulier. L'effet attractif de la solution à base de buis sur ces deux plantes non hôtes est équivalent au buis lui-même.

Ces résultats préliminaires sont toutefois à prendre avec précaution. En effet, l'attraction des femelles de la pyrale du buis peut être dictée soit par une attraction olfactive, soit par une attraction gustative lors de la phase de sélection de la plante hôte au cours du comportement d'oviposition. 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.

Afin de pouvoir confirmer l'attraction olfactive de notre étude, il serait donc intéressant de supprimer tous biais visuels et gustatifs en réalisant des études en tunnels de vol. Le tunnel de vol est un système couramment utilisé pour tester le comportement de Lépidoptères hétérocères (Allison et CardŽ 2016). Cette technique consiste à présenter les odeurs dans des structures appropriées à la diffusion des odeurs (tunnel de vol, olfactomètre) permettant d'observer les comportements (orientation, mouvement, vitesse...) des insectes en présence de ces odeurs complexes. L'avantage de ces techniques est qu'elles permettent d'observer des comportements comme l'attraction et la répulsion vis-à-vis d'un mélange complexe. Mais elles ne permettent pas d'identifier les composés particulièrement impliqués dans ces comportements (Atiama-Nurbel, s. d.). Ce qui nécessiterait en parallèle une identification des composants chimiques du bouquet d'odeur de la solution.

L'étude n°2 a permis de mettre en évidence des modalités d'attraction des femelles de la pyrale du buis dans leur comportement de ponte. En effet, sur les 3 attractifs testés, l'attractif « Att3 » a permis d'attirer significativement plus de femelles, avec un nombre d'œufs significativement plus élevé comparé au témoin. L'effet attractif significatif de ce mélange peut s'expliquer en partie par un effet synergique des solutions « Att1 » et « Att2 » qui compose l'attractif « Att3 ». En effet, il est communément admis, que ce sont des mélanges de trois à dix composés qui constituent l'identité du message clé de la reconnaissance d'une plante-hôte (Bruce et Pickett 2011).

Chaque plante est caractérisée par un bouquet odorant spécifique, c'est-à-dire un ensemble de composés volatils qui peuvent être émis par les parties végétatives, les fruits, les fleurs (Knudsen et al. 2006), ou les racines (Steeghs et al. 2004). Ces composés sont émis d'un point de la plante et se retrouvent dans une sphère de diffusion autour de la plante, leur concentration diminuant avec la distance. L'odeur de la plante est transportée dans un panache d'odeur grâce au vent. Ainsi, l'insecte va utiliser ces composés volatils pour détecter la plante hôte dans le milieu et va parvenir à trouver le centre de cette sphère de diffusion en se dirigeant vers des odeurs de plus en plus concentrées (Bradbury et Vehrencamp 1998). Deux hypothèses ont été émises par Visser (1986) quant à la perception de composés volatils de plantes par les insectes. La première hypothèse selon laquelle la reconnaissance de la plante se fait par la présence de composés volatils hautement spécifiques à celle-ci n'a été démontrée que dans peu d'études et uniquement chez des insectes spécialistes de Brassicales comme le puceron du chou *Brevicoryne brassicae* (L.) ou le charançon des graines de chou *Ceutorhynchus assimilis* Payk. La seconde hypothèse avance que la spécificité de l'odeur de la plante-hôte est due à un mélange de composés volatils généralistes répartis selon un ratio bien spécifique à chaque espèce de plante. De nombreuses études électrophysiologiques ont permis de corroborer cette dernière hypothèse, notamment du fait qu'un grand nombre de phytophages répondent aux odeurs généralistes (Bruce, Wadhams, et Woodcock 2005) et que diverses espèces répondent de manière différentielle à des mélanges dans lesquels les ratios de composés volatils généralistes varient (Visser et Avé 1978; Thiéry et Marion-Poll 1998; Natale et al. 2003). Cette situation expliquerait peut-être le comportement d'attraction de la pyrale du buis à un mélange de deux attractifs, induisant une concentration de composés volatils généralistes plus importante.

De plus, on observe un effet significatif du type de pliage du support de pontes sur les le comportement des femelles. Le pliage des supports entraîne un nombre de ponte significativement supérieur à un support plat. Le type de papier n'a quant à lui pas d'effet sur le nombre de pontes. Ces résultats peuvent s'expliquer par la phase dite « de contact », où la femelle évalue les caractéristiques de la plante par le biais de la palpation. En plus de ces récepteurs visuels, les récepteurs tactiles et olfactifs sur les antennes, les pièces buccales, les tarsi et l'ovipositeur sont utilisés pour déterminer les caractéristiques physiques et chimiques de la plante (Fletcher et Prokopy 1991). Pendant la phase de contact, des évaluations intermittentes sont réalisées au niveau de la surface de la plante, soit par des érafllements et des percussions avec les tarsi, soit par antennation, soit par palpation et frottement de l'ovipositeur (Schoonhoven et al. 2005). Ainsi, la morphologie et la texture de la surface des feuilles influencent le comportement des femelles pouvant expliquer le choix de ponte préférentiel sur les supports de ponte pliés plutôt que plats.

L'étude n°3 a permis de déterminer que l'huile essentielle testée ne semble pas avoir d'effet répulsif sur le comportement de ponte de la pyrale du buis aux différentes concentrations testées. Il est à noter que l'effet de cette huile essentielle avait été testé lors des travaux de 2019, mais qu'un problème de chambre climatique n'avait pas permis de déterminer son effet.

A contrario, l'extrait naturel démontre un effet significatif répulsif sur le comportement de ponte des femelles de la pyrale du buis. La nature de cet extrait naturel est connue dans la littérature pour avoir un effet répulsif pour de nombreux ravageurs. D'après ces résultats il serait intéressant de déterminer la dose ainsi qu'un dispositif de diffusion permettant d'avoir un taux de molécules constant dans le temps, afin de pouvoir étudier l'effet de ce répulsif en conditions semi-naturelles puis naturelles.

## Conclusion

Les résultats de nos trois études nous permettent d'avoir des perspectives prometteuses en termes de lutte contre la pyrale du buis. En effet, l'extrait naturel montre un effet répulsif sur le comportement de ponte des femelles *C. perspectalis*. Ces résultats sont désormais à adapter à un milieu semi-naturel afin de permettre son utilisation, par la suite, par l'ensemble des gestionnaires des JEVI. De plus, les différents attractifs testés nous permettent également d'ouvrir de nouvelles pistes de réflexions. L'utilisation d'un attractif complété par l'utilisation du répulsif représente une piste intéressante d'étude dans la mise en place de méthode de gestion « push-pull » pour la régulation de la pyrale du buis en JEVI.

## Références bibliographiques

- Allison, Jeremy D., et Ring T. CardŽ. 2016. *Pheromone Communication in Moths: Evolution, Behavior, and Application*. Univ of California Press.
- Atiama-Nurbel, Toulassi. s. d. « Réponse des femelles de *Bactrocera cucurbitae* (Diptera, Tephritidae) aux composés volatils de fruits-hôtes », 352.
- Bradbury, Jack W., et Sandra L. Vehrencamp. 1998. « Principles of animal communication ».
- Bruce, Toby J. A., et John A. Pickett. 2011. « Perception of Plant Volatile Blends by Herbivorous Insects – Finding the Right Mix ». *Phytochemistry, Plant-Insect Interactions*, 72 (13): 1605-11. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.011>.
- Bruce, Toby J. A., Lester J. Wadhams, et Christine M. Woodcock. 2005. « Insect Host Location: A Volatile Situation ». *Trends in Plant Science* 10 (6): 269-74. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.04.003>.
- Feldtrauer, Jean-François, Jean-Jacques Feldtrauer, Christophe Brua, Société d'Entomologie, et Société. 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.
- Fletcher, Brian S., et Ron J. Prokopy. 1991. « Host location and oviposition in tephritid fruit flies ».

- 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>.
- 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.
- Knudsen, Eric I., James J. Heckman, Judy L. Cameron, et Jack P. Shonkoff. 2006. « Economic, Neurobiological, and Behavioral Perspectives on Building America's Future Workforce ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (27): 10155-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600888103>.
- 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, Florine LG, 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.
- 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.
- Mitchell, Ruth, Savely Chitanava, Roman Dbar, Volodymyr Kramarets, Asko Lehtijärvi, Izolda Matchutadze, Giorgi Mamadashvili, Iryna Matsiakh, Saidou Nacambo, et Irena Papazova-Anakieva. 2018. « Identifying the ecological and societal consequences of a decline in *Buxus* forests in Europe and the Caucasus ». *Biological Invasions* 20 (12): 3605-20.
- 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>.
- Natale, D., L. Mattiacci, A. Hern, E. Pasqualini, et S. Dorn. 2003. « Response of Female *Cydia Molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) to Plant Derived Volatiles ». *Bulletin of Entomological Research* 93 (4): 335-42.
- Scheffler, I, et M al. 1993. « Behavioural responses of *Blattella germanica* L.(Orthopt., Blattellidae) induced by repellent plant extracts ». *Journal of Applied Entomology* 115 (1 - 5): 499-505.
- Schoonhoven, Louis M., Borin Van Loon, Joop JA van Loon, et Marcel Dicke. 2005. *Insect-plant biology*. Oxford University Press on Demand.
- Steeghs, Marco, Harsh Pal Bais, Joost de Gouw, Paul Goldan, William Kuster, Megan Northway, Ray Fall, et Jorge M. Vivanco. 2004. « Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry as a New Tool for Real Time Analysis of Root-Secreted Volatile Organic Compounds in *Arabidopsis* ». *Plant Physiology* 135 (1): 47-58. <https://doi.org/10.1104/pp.104.038703>.
- Thiéry, Denis, et Frédéric Marion-Poll. 1998. « Electroantennogram responses of Douglas-fir seed chalcids to plant volatiles ». *Journal of Insect Physiology* 44 (5-6): 483-90.
- Visser, J. H., et D. A. Avé. 1978. « General green leaf volatiles in the olfactory orientation of the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata* ». *Entomologia experimentalis et applicata* 24 (3): 738-49.

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>.