



HAL
open science

Projet “ FORBUIS ” : Recherche des facteurs biotiques et abiotiques freinant la progression de la pyrale du buis sur certains sites forestiers suivis par le Département de la Santé des Forêts dans le Jura (39) – 2021-2022

Anne Sophie Brinquin, Lucile Muller, Marianne Correard, Aurore Gili,
Mathieu Mirabel

► To cite this version:

Anne Sophie Brinquin, Lucile Muller, Marianne Correard, Aurore Gili, Mathieu Mirabel. Projet “ FORBUIS ” : Recherche des facteurs biotiques et abiotiques freinant la progression de la pyrale du buis sur certains sites forestiers suivis par le Département de la Santé des Forêts dans le Jura (39) – 2021-2022. INRAE UEFM Avignon. 2023. hal-04542675

HAL Id: hal-04542675

<https://hal.inrae.fr/hal-04542675>

Submitted on 17 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 Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

Projet « FORBUIS »

Recherche des facteurs biotiques et abiotiques freinant la progression de la
pyrale du buis sur certains sites forestiers suivis par le DSF dans le Jura

Jura (39) – 2021-2022

Brinquin Anne-Sophie¹, Muller Lucile¹, Correard Marianne¹, Gili Aurore¹, Mirabel Mathieu².

¹ INRAE UEFM Avignon ; ² DRAAF Bourgogne-Franche-Comté Besançon



Rapport de fin d'étude

20/01/2023

Table des matières

Introduction	4
ETUDE 1 : Etude de l'entomofaune liée au buis et de parasitoïdes et prédateurs potentiels de la pyrale du buis	7
A. Etude de l'entomofaune associée au buis	7
1. Objectif.....	7
2. Sites d'étude	7
3. Méthodes d'échantillonnage	7
a. Prélèvement de l'entomofaune présente sur le buis (battage)	7
b. Prélèvement des insectes volants (filets)	7
c. Identification des prélèvements	8
4. Résultats.....	8
a. Etat sanitaire des buis	8
b. Diversité de l'entomofaune présente sur les buis	9
5. Discussion.....	12
a. Etat sanitaire des buis	12
b. Diversité de l'entomofaune associée aux buis	12
6. Conclusion et perspectives	15
B. Etude de l'avifaune susceptible de prédater la pyrale du buis	16
1. Objectif.....	16
2. Site d'étude	16
3. Méthodes.....	16
a. Point d'écoute.....	16
b. Observation des comportements de prédation	16
4. Résultats.....	17
a. Point d'écoute.....	17
b. Observation des comportements de prédation	17
5. Discussion.....	17
6. Conclusion et perspectives	19
ETUDE 2 : Etude de l'influence de l'ensoleillement et du stress hydrique sur les propriétés physico-chimiques du buis, engendrant une possible modification de son pouvoir attractif sur la pyrale du buis	20
A. Etude de l'appétence des chenilles <i>Cydalima perspectalis</i> pour le buis en fonction de son implantation sous couvert végétal ou sous ensoleillement direct et stress hydrique ..	20
1. Objectif.....	20
2. Matériels	20
3. Déroulement de l'expérimentation en laboratoire	20
4. Analyses statistiques.....	21
5. Analyses moléculaires.....	22
6. Résultats et discussion	22
a. Tests d'appétence	22
b. Analyses moléculaires.....	24
7. Conclusion et perspectives	30

B. Etude de l'attraction de différents types de buis sur les papillons femelles <i>Cydalima perspectalis</i> en fonction de leur implantation sous couvert végétal ou sous ensoleillement direct et stress hydrique	31
1. Objectif.....	31
2. Matériels.....	31
3. Déroulement de l'expérimentation en laboratoire.....	31
4. Analyses statistiques.....	32
5. Résultats des tests de comportement de ponte.....	32
6. Discussion.....	33
7. Conclusion et perspectives.....	35
Conclusion et perspectives du projet FORBUIIS	36
BIBLIOGRAPHIE	37
ANNEXES	42

Introduction

La pyrale du buis, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera : Crambidae), fait partie des espèces exotiques invasives de France. En effet, introduite de manière non intentionnelle en Europe en 2007 (Leuthardt, 2010), ce Lépidoptère originaire d'Asie de l'Est (Mally and Nuss, 2010) est devenu extrêmement envahissant du fait de sa forte capacité de dispersion, de sa fécondité élevée, de sa capacité à réaliser 3 à 4 générations par an selon le climat et du manque de prédateurs naturels (Wan et al., 2014). La chenille de ce papillon est spécifique des plantes du genre *Buxus*. Par conséquent, elle consomme exclusivement les feuilles voire l'écorce de cette plante (Marinkovic and Kraak, 2010). Depuis son arrivée en France en 2008, la pyrale du buis ne cesse de causer d'importants dégâts sur les buis d'ornementation et également dans les buxaies naturelles (Brua, 2013).

En France, le buis est avant tout planté dans les zones urbanisées telles que les parcs, jardins, espaces végétalisés et infrastructures (JEVI). Il est également présent en milieu naturel, notamment dans le Jura, les Alpes, les Pyrénées, le Sud de la France et de façon plus éparse dans la région du Centre et la région du Nord (Di Domenico et al., 2012; Lenoble and Broyer, 1945). La forte pression exercée par les pyrales sur le buis a un impact à la fois sociétal, culturel, économique, mais également écologique car sa propagation progressive dans les milieux naturels à un effet sur la biodiversité et perturbe le fonctionnement des écosystèmes forestiers (DRAAF Auvergne - Rhône-Alpes, 2019; Kenis et al., 2013). En effet, les buxaies naturelles présentes en zone forestière sont une composante essentielle des sous-bois et constituent une multitude d'habitats pour la biodiversité (Mitchell et al., 2018). Leur disparition est donc susceptible d'avoir un impact sur la biodiversité. De même, le buis joue un rôle important dans le maintien de la stabilité des sols et des blocs rocheux sur les versants (DRAAF Auvergne - Rhône-Alpes, 2019; Duvigneaud, 1969; Kenis et al., 2013; Savill, 2013). D'après de récentes études, l'invasion de la pyrale du buis dans certaines régions aurait induit un dépérissement d'une grande partie de la buxaie naturelle en 4 ans (Département de la Santé des Forêts, 2020a). Les buis présents en sous-étage forestier et avec un volume de cépée plus faible étant les plus touchés (Département de la Santé des Forêts, 2020b). Enfin, les impacts économiques ne sont pas négligeables. En effet, des entreprises sont spécialisées dans le travail de cette essence, notamment pour la fabrication de cochonnets, de manches de couteaux pour Opinel ou encore de jeux d'échec et de petits ustensiles de cuisine. Ces entreprises sont ainsi directement impactées par le déclin du buis (FIBOIS, 2018).

Afin de suivre la réponse du milieu naturel face aux attaques de pyrale, le projet BIOPYR (Recherche et inventaire d'agents potentiels de régulation biologique, liés à la pyrale du buis, en milieu naturel forestier en région Auvergne-Rhône-Alpes) porté par la Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt Auvergne-Rhône-Alpes (DRAAF AURA) a été initié de 2017 à 2020. Ce programme a permis de mettre en place un suivi de l'état général et de la réaction des différents milieux face à la pyrale du buis mais aussi d'acquérir des connaissances plus poussées sur l'écosystème buis et les différentes espèces concernées par ce milieu de vie en danger. A travers l'étude de l'entomofaune associée aux buis et du parasitisme en milieu naturel, les résultats ont permis de confirmer de la grande diversité d'espèces inféodées aux buis. De plus, en 2020, une première réponse écologique a été relevée dans la Drôme avec l'identification de parasitoïdes s'adaptant à la pyrale sur une nouvelle zone de front de colonisation (UEFM - INRAE, 2020; Brinquin A.-S. et al., submitted).

Au-delà des ravages provoqués par la pyrale du buis, certains buis semblent résister aux attaques de ce ravageur comme l'indiquent les récentes observations du DSF dans certaines zones. En effet, il semblerait que les formations de buis sur zones très xérophiles hors sous-étage soient moins touchées. De plus, l'hypothèse suivant laquelle l'exposition directe au soleil peut perturber le

développement de la chenille est également avancée (Département de la Santé des Forêts, 2020b). Les zones identifiées par le DSF méritent ainsi une surveillance et une étude particulière afin de définir les potentiels freins à la progression des attaques de pyrale.

L'objectif du projet FORBUIS est de répondre aux questions scientifiques suivantes au travers de deux études menées en parallèle :

- 1) Une réponse écologique durable se met-elle en place via l'adaptation de certains parasitoïdes et prédateurs ? (Étude 1)
- 2) Les impacts de l'ensoleillement et du stress hydrique sur les propriétés physico-chimiques du buis influencent-ils l'attraction des femelles pour pondre et/ou l'appétence des chenilles pour se nourrir ? (Étude 2)

Le projet FORBUIS va nous permettre de mieux comprendre les facteurs biotiques et abiotiques en jeu dans le ralentissement de la progression de la pyrale du buis. Il nous permettra également de suivre l'adaptation du cortège d'auxiliaires, que nous avons commencé à observer en 2020 dans le cadre du projet BIOPYR, en vue de développer une nouvelle méthode de gestion contre ce ravageur. Enfin, ce projet nous permettra de réaliser une surveillance accrue des sites suivis par le DSF, potentiellement à risque.

Les sites d'échantillonnage choisis pour la mise en œuvre de l'Étude 1, se trouvent dans le Parc Naturel Régional du Haut-Jura, et font déjà l'objet de suivis réguliers de la part des agents du DSF, depuis la grosse attaque de 2018 ayant entraîné une défoliation quasi-totale des buis sur les secteurs suivis. Les sites ont été choisis en fonction des observations par les agents du DSF de présence de chenilles diapausantes dans les buis, au premier trimestre 2021. Ils sont présentés dans la Figure 1 ci-dessous, ainsi qu'en Annexe 1.

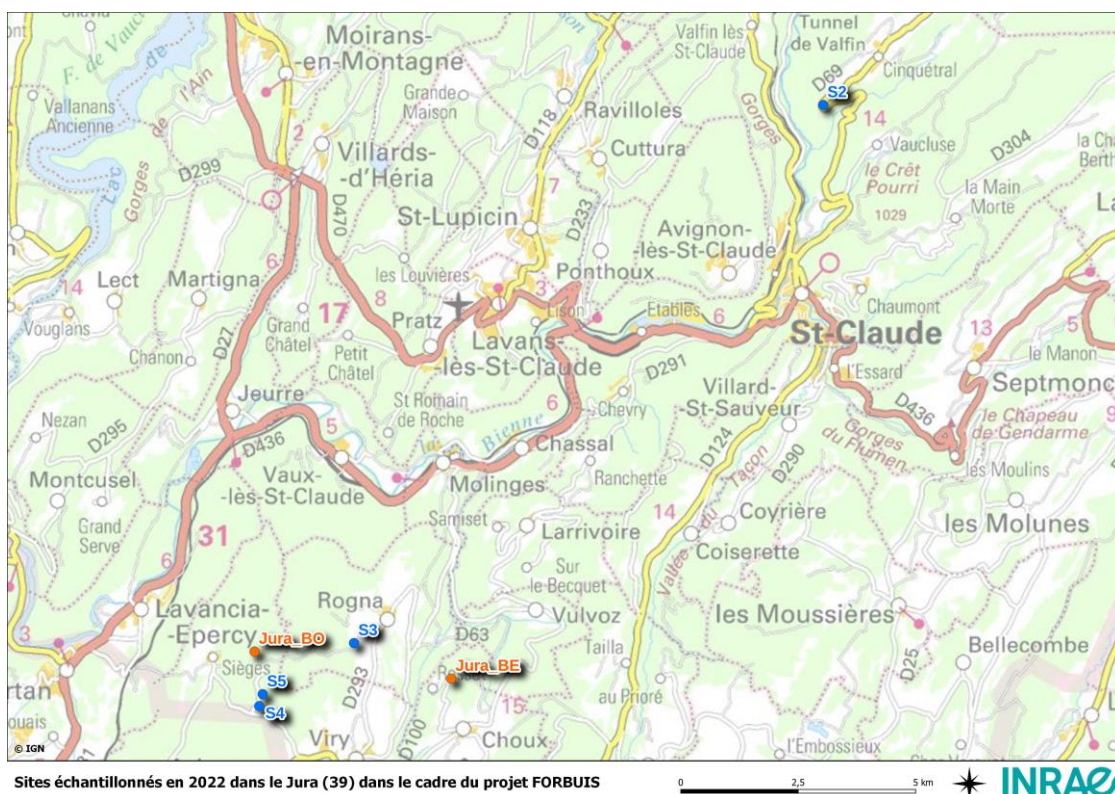


Figure 1 : Cartographie présentant les sites d'échantillonnage de l'entomofaune inféodée au buis (Etude 1) [S2, S3, S4 et S5], ainsi que les sites de prélèvements des rameaux de buis pour les tests en laboratoire (Etude 2) [Jura_BO et Jura_BE], dans le Jura.

Dans le cadre de l'Étude 2, les rameaux de buis récoltés pour la réalisation des tests d'appétence et d'oviposition en laboratoire ont été prélevés sur des buis présentant deux modalités d'implantation différentes : à l'ombre sous couvert végétal (« BO ») ou sous ensoleillement direct avec stress hydrique (« BE »). Les sites de prélèvements sont présentés dans la Figure 1.

Une répétition des tests en laboratoire a été prévue dans le protocole de l'Étude 2, à partir de rameaux récoltés dans une zone géographique éloignée du Jura. Ainsi, des rameaux de buis « BO » et « BE » ont également été récoltés sur le Mont Ventoux (Vaucluse-84) en vue de réaliser des tests d'appétence et d'oviposition en laboratoire selon le même protocole. Ceci dans le but de confirmer et de renforcer les résultats et analyses obtenus. Les emplacements de ces sites sont présentés dans la Figure 2 ci-dessous, et leurs fiches descriptives se trouvent en Annexe 2.



Figure 2 : Cartographie présentant les sites de prélèvements des rameaux de buis pour les tests en laboratoire (Etude 2) [Vtx_BO et Vtx_BE], sur le Mont-Ventoux.

ETUDE 1 : Etude de l'entomofaune liée au buis et de parasitoïdes et prédateurs potentiels de la pyrale du buis

A. Etude de l'entomofaune associée au buis

1. Objectif

Cette étude a pour objectif d'évaluer la diversité des communautés d'Arthropodes associées au buis, encore peu connue dans la littérature, ainsi que les différents groupes fonctionnels qui s'en dégagent, dans le but d'identifier des prédateurs et/ou des parasitoïdes potentiels de *C. perspectalis*, et de développer potentiellement une nouvelle méthode de gestion contre ce ravageur.

2. Sites d'étude

Les prélèvements de l'entomofaune associée aux buis ont été réalisés sur les sites S2, S3, S4 et S5 en 2021 et 2022 (Figure 1). Ces sites ont été choisis en fonction de l'état sanitaire des buis qui devait être assez bon pour permettre le développement de la pyrale du buis, du moins présenter des repousses après les ravages et défoliations totales dues aux attaques de 2018 dans le secteur de Saint-Claude. Ces sites ont également été sélectionnés en fonction d'observations de présence du ravageur sur les repousses et rameaux de l'année (dégâts d'alimentation, fèces...).

L'état sanitaire des buis ainsi que le niveau d'attaque par la pyrale du buis ont été relevés lors de chaque tournée.

3. Méthodes d'échantillonnage

a. Prélèvement de l'entomofaune présente sur le buis (battage)



Lors de la campagne de prélèvement de 2021, les relevés de juin et d'août ont été réalisés avec la méthode du battage. Cette méthode consiste à battre à l'aide d'un bâton les buis au-dessus d'un parapluie japonais, et de récupérer les Arthropodes tombés sur la toile à l'aide d'un aspirateur buccal (Figure 3). Les individus prélevés sont ensuite conservés en tube dans l'éthanol à 40°, en vue d'être identifiés.

Figure 3 : Photographie d'un parapluie japonais pour les prélèvements par battage.

Les battages ont été réalisés pour chacun des sites S2, S3 et S4 sur 3 plants de buis éloignés les uns des autres d'au moins 3 mètres. 3 passages par plant de buis ont été effectués afin de récupérer des échantillons les plus représentatifs (Annexe 3).

b. Prélèvement des insectes volants (filets)

Lors de la campagne de prélèvement de 2021 (août) et de 2022 (juin et août), les relevés ont été réalisés à l'aide de filets à papillon (Figure 4).



Cette méthode permet de capturer des insectes volants, tels que les Lépidoptères, les Odonates, les Diptères et les Hyménoptères. Les plants de buis sont balayés à l'aide des filets afin de faire pénétrer les insectes volants à l'intérieur, qui se retrouvent piégés à la suite d'un mouvement de rotation du manche de 180°. Les individus sont ensuite récupérés à l'aide d'un aspirateur buccal, puis conservés en tube dans l'éthanol à 40°, en vue d'être identifiés.

Les relevés ont été réalisés pour chacun des sites S2, S3, S4 et S5, sur 10 plants de buis éloignés les uns des autres d'au moins 3 mètres (Annexe 3).

Figure 4 : Capture des insectes volants à l'aide de filets.

c. Identification des prélèvements

Chaque individu a été individualisé, codifié et photographié sous stéréomicroscope afin de constituer une collection de référence. Un tri par ordre a été réalisé dans un premier temps par notre laboratoire, avant envoi à un bureau d'étude pour les déterminations plus poussées (famille, voire genre et espèce si possible). Une détermination des fonctions écologiques et des régimes alimentaires a également été réalisée par le bureau d'étude (Annexe 8), sur la base de données bibliographiques, afin de ne sélectionner que les prédateurs et parasitoïdes potentiels de *Cydalima perspectalis*.

4. Résultats

a. Etat sanitaire des buis

La Figure 5 ci-dessous présente l'évolution de l'état sanitaire des buis et de la pression de la pyrale du buis sur l'ensemble des sites observés, au cours de la période de juin 2021 à août 2022. Le détail des informations recueillies se trouve en Annexe 4.

Département / Site	Type de suivi	2021		2022	
		Juin	Août	Juin	Août
Jura (39) Site 2	Niveau pression pyrale	Faible à moyen	Faible	Absence	Faible
	Etat sanitaire des buis	En repousse	En repousse	Bon	Bon
Jura (39) Site 3	Niveau pression pyrale	Faible	Faible	Faible	Faible
	Etat sanitaire des buis	En repousse	En repousse	En repousse	Bon

Jura (39) Site 4	Niveau pression pyrale	Forte	Forte	Faible à moyen	Faible
	Etat sanitaire des buis	Très attaqués	Très attaqués	En repousse	En repousse
Jura (39) Site 5	Niveau pression pyrale	Absence d'observation	Absence d'observation	Faible	Faible
	Etat sanitaire des buis	Absence d'observation	Absence d'observation	En repousse	En repousse

Figure 5 : Tableau récapitulatif de l'évolution de l'état sanitaire des buis et de la pression du ravageur sur les sites visités en juin et en août 2021 et 2022.

b. Diversité de l'entomofaune présente sur les buis

Au total, 1 192 individus ont été prélevés au cours des 4 campagnes de relevés. Ces individus ont été identifiés jusqu'aux ordres au sein de notre Laboratoire. Les résultats de ces identifications sont présentés dans la Figure 6 ci-dessous.

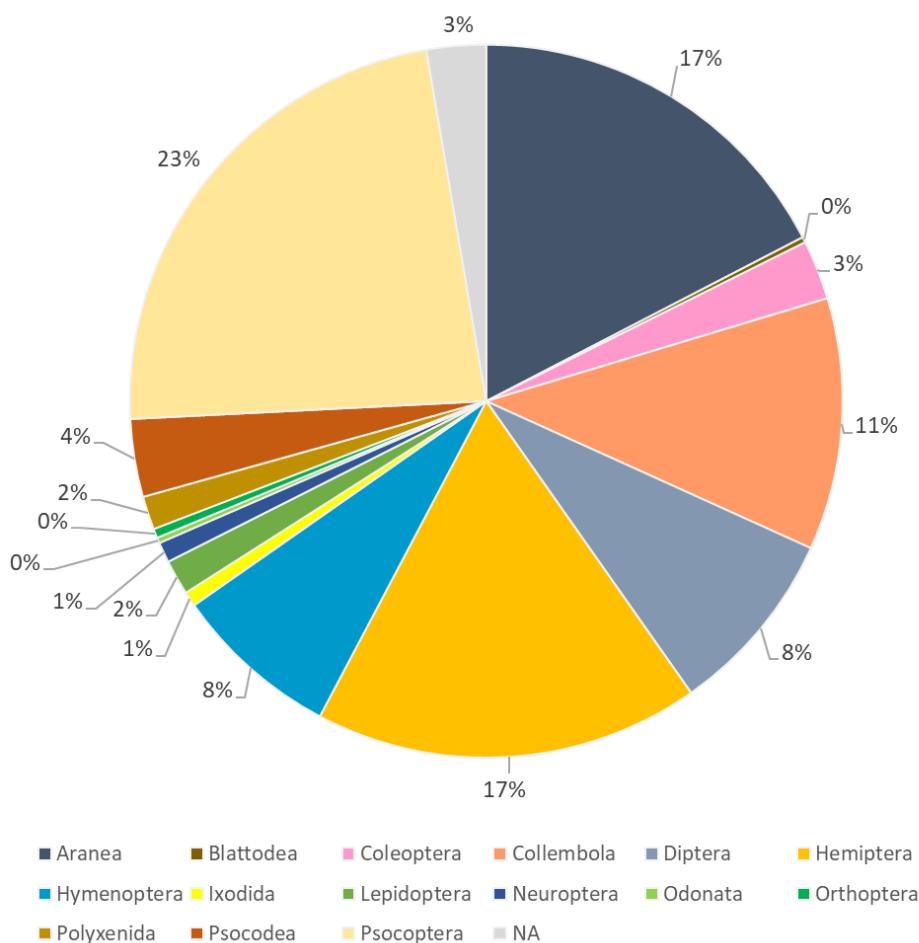


Figure 6 : Synthèse des différents ordres d'Arthropodes prélevés au cours des campagnes de relevés de juin et d'août 2021 et 2022 dans le Jura.

En parallèle, la détermination des fonctions écologiques et des régimes alimentaires de ces individus a été réalisée par un bureau d'étude, sur la base de données bibliographiques (Annexe 8). La Figure 7 présente les résultats de ces déterminations.

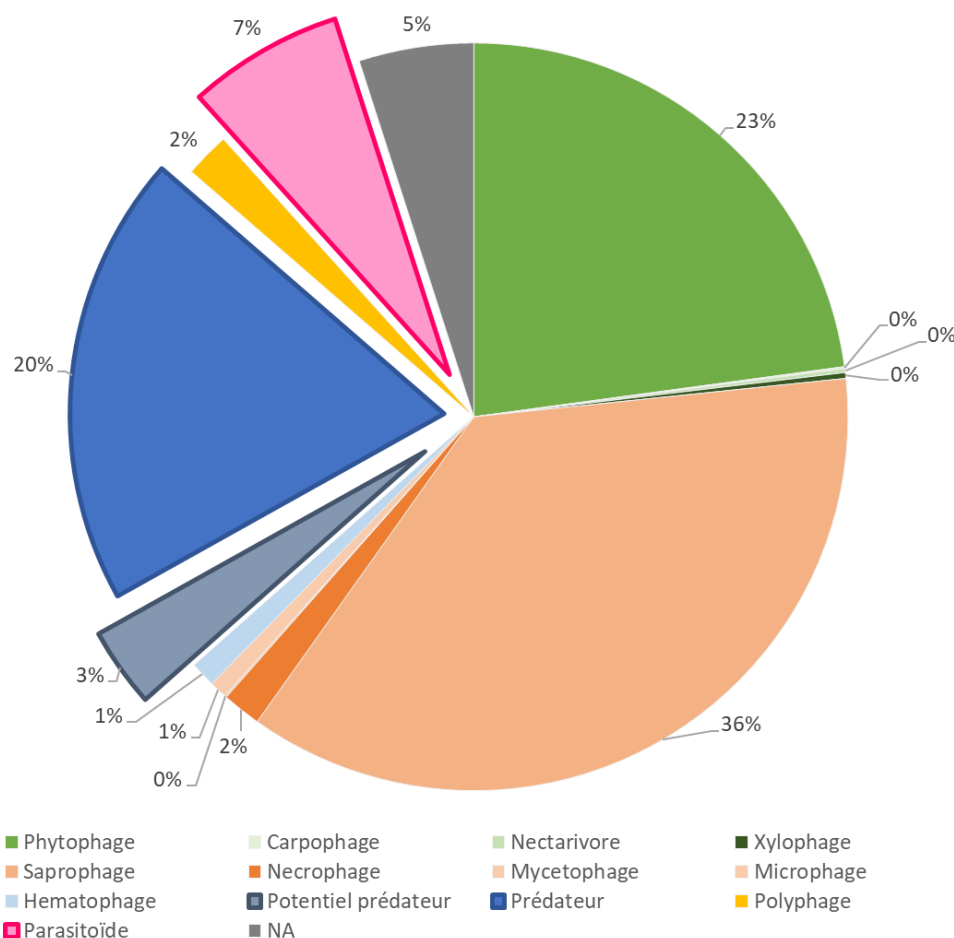


Figure 7 : Synthèse des différentes fonctions écologiques et régimes alimentaires des Arthropodes prélevés au cours des campagnes de relevés de juin et d'août 2021 et 2022 dans le Jura.

Les 353 individus identifiés comme parasitoïdes, prédateurs et potentiels prédateurs ont ensuite bénéficié d'une identification plus poussée (famille, voire genre et espèce si possible) par le bureau d'étude. Cet approfondissement dans l'analyse des spécimens a permis d'affiner la détermination des régimes alimentaires et des fonctions écologiques afin de filtrer les individus s'attaquant aux Lépidoptères, susceptibles de s'alimenter ou de parasiter la pyrale du buis de façon ciblée ou opportuniste.

Ainsi, à la suite de cet approfondissement, 24 genres d'intérêt pour notre étude ont été mis en évidence en tant qu'auxiliaires potentiels de la pyrale du buis (Tableau 1).

Nombre total d'individus récoltés	Nombre d'ordres identifiés sur la totalité des individus	Nombre de familles identifiées sur la totalité des individus	Nombre de genres d'intérêt après identification plus poussée
1 192	15	63	24

Tableau 1 : Synthèse des résultats obtenus à chaque étape de la démarche d'analyse des individus récoltés.

Ainsi, 28 individus parasitoïdes, appartenant en totalité à l'ordre des Hyménoptères, ont été identifiés comme potentiellement intéressants pour notre étude. Ces individus appartiennent en effet à 13 genres différents capables de parasiter des Lépidoptères et potentiellement la pyrale du buis. Ces genres d'intérêt sont présentés dans le Tableau 2.

Nb ind.	Ordre	Sous-ordre	Super-famille	Famille	Genre	Espèce
1	Hymenoptera	Apocrita	Chalcidoidea	Eulophidae	<i>Derostenus</i>	<i>sp.</i>
1	Hymenoptera	Apocrita	Ichneumonoidea	Braconidae	<i>Bracon</i>	<i>sp.</i>
3	Hymenoptera	Apocrita	Ichneumonoidea	Ichneumonidae	<i>(Cryptinae)</i>	NA
1	Hymenoptera	Apocrita	Ichneumonoidea	Ichneumonidae	<i>Diadegma</i>	<i>cf. fenestrale</i>
8	Hymenoptera	Parasitica	Ceraphronoidea	Ceraphronoidea	<i>Ceraphron</i>	<i>sp.</i>
3	Hymenoptera	Parasitica	Chalcidoidea	Eulophidae	<i>Aprostocetus</i>	NA
1	Hymenoptera	Parasitica	Chalcidoidea	Eulophidae	<i>Minotetrastichus</i>	<i>cf. frontalis</i>
1	Hymenoptera	Parasitica	Chalcidoidea	Eulophidae	<i>Pediobius</i>	<i>sp.</i>
2	Hymenoptera	Parasitica	Ichneumonoidea	Braconidae	<i>Apanteles</i>	<i>sp.</i>
1	Hymenoptera	Parasitica	Ichneumonoidea	Braconidae	<i>Hormius</i>	<i>sp.</i>
1	Hymenoptera	Parasitica	Ichneumonoidea	Braconidae	<i>Meteorus</i>	<i>cf. abcsissus</i>
1	Hymenoptera	Parasitica	Ichneumonoidea	Ichneumonidae	<i>Mesochorus</i>	<i>sp.</i>
4	Hymenoptera	Parasitica	Platyastroidea	Scelionidae	<i>Telenomus</i>	<i>sp.</i>

Tableau 2 : Liste des 13 genres d'intérêts identifiés comme parasitoïdes.

De même, 24 individus définis comme prédateurs potentiels ont été identifiés comme potentiellement intéressants pour notre étude. 79% d'entre eux appartiennent à l'ordre des Diptères et 21% à l'ordre des Hémiptères. Au total, 8 genres d'intérêt ont été identifiés et sont présentés dans le Tableau 3.

Nb ind.	Ordre	Sous-ordre	Super-famille	Famille	Genre	Espèce
1	Diptera	Brachycera	Empidoidea	Atelestidae	<i>Atelestus</i>	<i>pulicarius</i>
1	Diptera	Brachycera	Empidoidea	Empididae	<i>Rhamphomyia</i>	<i>hybotina</i>
2	Diptera	Brachycera	Empidoidea	Hybotidae	<i>Bicellaria</i>	<i>sp.</i>
10	Diptera	Brachycera	Empidoidea	Hybotidae	<i>Hybos</i>	<i>culiciformis</i>
1	Diptera	Brachycera	Empidoidea	Hybotidae	<i>Platypalpus</i>	<i>sp.</i>
1	Diptera	Brachycera	Empidoidea	Hybotidae	<i>Trichina</i>	<i>cf. pallipes</i>
3	Diptera	Brachycera	Empidoidea	Hybotidae	<i>Trichinomyia</i>	<i>flavipes</i>
2	Hemiptera	Heteroptera	Naboidea	Nabidae	<i>Nabis</i>	<i>cf. rugosus</i>
3	Hemiptera	Heteroptera	Naboidea	Nabidae	NA	NA

Tableau 3 : Liste des 8 genres d'intérêt identifiés comme potentiels prédateurs.

Enfin, 4 individus définis comme strictement prédateurs ont été identifiés comme potentiellement intéressants pour notre étude. 75% d'entre eux appartiennent à l'ordre des Neuroptères et 25% à l'ordre des Coléoptères. Ainsi, 2 genres d'intérêt ont été identifiés (Tableau 4).

Nb ind.	Ordre	Sous-ordre	Super-famille	Famille	Genre	Espèce
1	Coleoptera	Polyphaga	Elateroidea	Cantharidae	<i>Malthinus</i>	<i>facialis</i>
3	Neuroptera	Hemerobiiformia	NA	Chrysopidae	<i>Chrysoperla</i>	<i>cf. carnea</i>

Tableau 4 : Liste des 2 genres d'intérêt identifiés comme prédateurs.

5. Discussion

a. Etat sanitaire des buis

Au cours des 4 campagnes de suivi sur la période de juin 2021 à août 2022, l'état sanitaire ainsi que la pression exercée par les populations de pyrales sur les buxaies ont été évalués. Nous avons constaté que pour la majorité des sites observés, les buxaies présentent un état sanitaire en amélioration, avec l'observation de nombreuses repousses sur les individus ayant subi des défoliations importantes en 2017 (Département de la Santé des Forêts, 2022). Cette situation s'explique notamment par une faible pression de la part des populations de pyrales du buis ces dernières années. En effet, nos observations rejoignent celles du DSF, avec le constat que le pourcentage de consommation du buis par la pyrale est faible pour les années 2021 et 2022 sur les sites suivis (moins de 5%). La disponibilité en nourriture n'est donc pas la cause de l'effondrement des populations de pyrales depuis 2019. Malgré la présence constatée de pyrales du buis sur les sites suivis et la disponibilité en nourriture, les populations du ravageur n'arrivent pas à se développer, peut-être du fait d'une pression qu'elles subissent elles-mêmes de la part d'une réponse écologique de l'entomofaune et de l'avifaune sur les sites considérés. Cette hypothèse reste cependant à vérifier (cf. Etude 1).

b. Diversité de l'entomofaune associée aux buis

Les méthodes de récoltes par battage et par filet à papillons, employées lors des différentes campagnes de prélèvements, sont très complémentaires et permettent d'obtenir une bonne représentation de l'écosystème inféodé au buis. Cet arbuste abrite en effet une multitude d'espèces, avec des régimes alimentaires et des fonctions écologiques très variés.

Ainsi, la grande majorité des espèces prélevées sont des saprophages (36%), telles que les Collemboles et les Psocoptères, qui se nourrissent préférentiellement de matières végétales ou animales en décomposition. Les espèces phytophages ont également été récoltées en grand nombre (23%) et sont pour la plupart des Coléoptères (Curculionidae, Elateridae, Chrysomelidae), des Diptères (Cecidomyiidae et autres Nematocera), des Hémiptères (Psyllidae, Aphididae, Cicadellidae) et des Lépidoptères.

Les espèces qui nous intéressent plus particulièrement dans notre étude, i.e. susceptibles de s'alimenter ou de parasiter la pyrale du buis de façon ciblée ou opportuniste, représentent 30% des Arthropodes prélevés au cours des 4 campagnes de récoltes. Il s'agit principalement d'espèces parasitoïdes s'attaquant préférentiellement à des Lépidoptères, et des espèces exclusivement prédatrices ou intégrant la prédation dans leur régime alimentaire, avec plus ou moins de sélectivité.

Les espèces parasitoïdes d'intérêt pour notre étude sont exclusivement des Hyménoptères appartenant aux familles des Eulophidae, Braconidae, Ichneumonidae, Ceraphronoidea et Scelionidae (Tableau 2).

Les Eulophidae sont des parasitoïdes de Lépidoptères, de Diptères ou de Coléoptères. Ils sont généralement des parasites primaires des œufs, larves et nymphes, mais certaines espèces peuvent être des parasites secondaires, notamment par l'intermédiaire des Tachinidae et d'autres Hyménoptères (Clausen, 1940). Certaines espèces sont utilisées en biocontrôle.

Les Braconidae représentent une des plus importantes familles d'Hyménoptères. Leur grande diversité spécifique et les nombreuses stratégies de parasitisme employées en font un groupe majeur en tant qu'outil de biocontrôle d'insectes ravageurs. Les Braconidae pondent généralement

dans les œufs de Lépidoptères et achèvent leur développement dans les larves ou les nymphes (Clausen, 1940). Certains genres peuvent également parasiter des Diptères et des Coléoptères.

Les Ichneumonidae représentent également une grande famille d'Hyménoptères, très diversifiée. Ce sont des parasitoïdes importants des larves et nymphes de Lépidoptères, mais peuvent également parasiter un large spectre d'autres insectes dont les Coléoptères (Clausen, 1940).

Les Ceraphronoidea forment une famille encore mal connue et décrite, dont la plupart des espèces sont des parasitoïdes ou des hyperparasitoïdes (Clausen, 1940).

Les Scelionidae sont exclusivement des parasites des œufs, en particulier de Lépidoptères, d'Hémiptères, d'Orthoptères, de Diptères et d'Arachnides. Les espèces sont généralement spécifiques de leur hôte (Clausen, 1940).

Les connaissances actuelles disponibles dans la littérature ne nous permettent pas de préciser si les individus prélevés *in situ* s'attaquent exclusivement aux Lépidoptères et donc potentiellement à la pyrale du buis. Il est en effet difficile de trouver des informations plus précises au-delà de la description des familles voire des sous-familles.

Les prédateurs prélevés *in situ* sont en grande majorité des Aranea. Les araignées se nourrissent principalement d'insectes et de leurs larves, et sont plutôt généralistes. Leur non-spécificité fait qu'elles ont peu d'intérêt à être employées en lutte biologique, le risque sur la faune non-cible étant élevé. D'autres prédateurs plus ou moins opportunistes ont également été récoltés, tels que des Odonates, des Coléoptères de la famille des Coccinellidae et des Staphylinidae, des Hémiptères de la famille des Anthocoridae, des Neuroptera de la famille des Coniopterygidae et des Diptères de la famille des Muscoidea. Toutefois, à l'instar des araignées, leur non-spécificité ne permet pas d'appréhender ces prédateurs en tant qu'agent de biocontrôle de la pyrale du buis.

Enfin, certains des prédateurs prélevés *in situ* intègrent dans leur régime alimentaire des Lépidoptères et pourraient potentiellement et de manière plus spécifique s'attaquer aux œufs et larves de la pyrale du buis. Il s'agit de Diptères appartenant aux familles des Atelestidae, Empididae et Hybotidae, d'Hémiptères de la famille des Nabidae, de Coléoptères de la famille des Cantharidae, et enfin de Neuroptera de la famille des Chrysopidae.

Toutefois, la difficulté d'accéder à des informations plus précises dans la littérature quant à la biologie et à l'écologie des individus récoltés, au-delà de la description des familles voire des sous-familles, est limitante dans notre étude. Ainsi, nos conclusions se basent sur les dires d'expert taxonomiste et nos recherches bibliographiques. Dans le cas des parasitoïdes, l'idéal aurait été de récolter *in situ* des larves et chrysalides présentant des marques de parasitismes dans l'optique de valider les émergences des parasitoïdes au laboratoire. Toutefois, peu de chrysalides ont été observées sur les sites de prélèvements durant les 2 années d'étude, ce qui ne nous a pas permis de mettre en œuvre ce protocole.

Pour autant, les résultats obtenus dans notre étude sont en cohérence avec les données issues de la littérature, avec quelques recoupements constatés (Wan et al. 2014 ; Hulusan et al. 2021) (Tableau 6). En effet, plusieurs ennemis naturels ont déjà été observés en Asie et en Europe, tels que les Diptères (Tachinidae), les Hyménoptères (Braconidae, Chalcididae, Pteromalidae, Encyrtidae, Ichneumonidae, Trichogrammatidae), les Thysanoptères (Aeolothripidae), les Hyménoptères (Vespidae), les Neuroptères (Chrysopidae), les Coléoptères (Coccinellidae), ainsi que les Hémiptères (Anthocoridae).

Ordre	Famille	Espèce	Références
Parasitoïdes			
Diptera	Tachinidae	<i>Compsilura concinnata</i> (Meigen)	Shima (1973) Brinquin et al. (Submitted) Venard et al. (2019) Lopez et al. (2022) Farahani et al. (2018)
	Tachinidae	<i>Exorista larvarum</i> (Linnaeus)	Martini et al. (2019)
	Tachinidae	<i>Exorista</i> sp.	Shi & Hu (2007)
	Tachinidae	<i>Pseudoperichaeta nigrolineata</i> (Walker)	Shima (1973) Nacambo (2012) Ferracini et al. (2022) Bird et al. (2020)
	<hr/>		
Hymenoptera	Braconidae	<i>Chelonus tabonus</i> (Sonan)	She & Feng (2006)
	Braconidae	<i>Chelonus</i> sp.	Chen et al. (2005)
	Braconidae	<i>Dolichogenidae stantoni</i> (Ashmead)	She & Feng (2006)
	Braconidae	<i>Apanteles glomeratus</i> (L.)	Brua (2013)
	Braconidae	<i>Bracon brevicornis</i> (Wesmael)	Hulujan et al. (2021)
	Braconidae	<i>Bracon hebetor</i> (Say)	Hulujan et al. (2021)
	Braconidae	<i>Protapanteles mygdonia</i> (Nixon)	Belokobylskij & Gninenko (2016)
	Chalcidae	<i>Brachymeria lasus</i> (Walker)	Chen et al. (2005)
	Pteromalidae	<i>Stenomalina cf. communis</i>	Bird et al. (2020)
	Encyrtidae	<i>Tyndarichus</i> sp.	Zhao et al. (2004)
	Ichneumonidae	<i>Apechthis compunctator</i> (L.)	Nacambo (non publié)
	Ichneumonidae	<i>Casinaria</i> sp.	Zhao et al. (2004)
	Ichneumonidae	<i>Pimpla turionella</i> (Linnaeus)	Brinquin et al. (Submitted)
	Trichogrammatidae	<i>Trichogramma dendrolimi</i> (Matsumura)	Göttig & Hertz (2016)
	Trichogrammatidae	<i>Trichogramma</i> sp.	Göttig & Hertz (2016)
<hr/>			
Prédateurs			
Thysanoptera	Aeolothripidae	<i>Aeolothrips</i> sp.	Chen et al. (2005)
Hymenoptera	Vespidae	<i>Vespa velutina</i> (Lepeletier)	Hulujan et al. (2021)
Neuroptera	Chrysopidae	<i>Chrysoperla carnea</i> (Stephens)	Göttig (2017)
Coleoptera	Coccinellidae	<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas)	Göttig (2017)
Hemiptera	Anthocoridae	<i>Orius majusculus</i> (Reuter)	Göttig (2017)

Tableau 5 : Liste des ennemis naturels de *Cydalima perspectalis* relevés en Europe et en Asie dans la littérature scientifique (en grande partie sur la base des recherches bibliographiques réalisées par Wan et al. 2014 et par Hulujan et al. 2021).

Bien que ces prédateurs et parasitoïdes ont été observés en train d'attaquer les œufs, larves ou pupes de la pyrale du buis, leur impact réel sur les populations de ce ravageur n'a pas pu être encore démontré (Wan et al. 2014 ; Göttig, 2017).

Les chenilles pyrales du buis sont en effet capables de séquestrer de grandes quantités d'alcaloïdes produits par leur plante hôte, ce qui leur confère une certaine protection vis-à-vis d'éventuels prédateurs ou parasitoïdes (Leuthardt et al., 2013). Le développement des larves de parasitoïdes peut en être grandement affecté, ainsi que la prédation des chenilles assimilées à une certaine toxicité du fait des alcaloïdes ingérés. Les prédateurs et parasites des œufs de pyrales du buis, stade de développement qui ne contient pas d'alcaloïdes, ont donc un rôle important à jouer dans la régulation du ravageur selon Hulujan et al. (2021).

D'après diverses études, les insectes prédateurs ou parasitoïdes qui semblent ou pourraient avoir un véritable impact sur les populations de *Cydalima perspectalis* sont :

- *Trichogramma dendrolimi*, avec un taux de parasitisme des œufs de pyrales du buis supérieur à 40% (Göttig & Herz, 2016) ;
- *Compsilura concinnata*, dont l'implication réelle a été mise en évidence, malgré un taux de parasitisme faible observé (Venard et al., 2019) ;
- *Chelonus tabonus*, qui reste un candidat prometteur pour le contrôle biologique de la pyrale en raison des niveaux élevés de parasitismes observés en Chine et de la spécificité à l'hôte généralement observée chez les espèces appartenant à la sous-famille des Cheloninae (Wan et al. 2014) ;
- *Chrysoperla carnea* et *Orius majusculus*, qui s'attaquent aux œufs de pyrales avec une grande efficacité (respectivement, prédation de 89% et de 41% des œufs présentés), et qui pourraient devenir des agents de biocontrôle par lâcher inondatif (Göttig, 2017 ; Herz, 2013).

6. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de réaliser un suivi de l'état sanitaire des buis et d'évaluer la pression exercée par la pyrale du buis dans le secteur de Saint-Claude, ainsi que le cortège d'auxiliaires présents.

Il est à noter que la faible pression de la pyrale du buis observée lors des campagnes de prélèvements constitue une limite importante de notre étude. En effet, l'idéal aurait été de récolter *in situ* des larves et chrysalides présentant des marques de parasitismes dans l'optique de valider les émergences des parasitoïdes et/ou hyperparasitoïdes au laboratoire (Brinquin et al., Submitted).

Néanmoins, les recherches bibliographiques nous ont permis de mettre en évidence quelques recoupements avec les résultats obtenus, et des perspectives intéressantes concernant notamment les parasitoïdes de la famille des Braconidae et des Ichneumonidae, et les prédateurs tel que *Chrysoperla carnea*. Ces derniers sont d'ailleurs déjà commercialisés comme agents de biocontrôle sur d'autres ravageurs. Des études de prédation plus poussées représentent donc un levier pour le développement de méthode de biocontrôle de la pyrale du buis.

B. Etude de l'avifaune susceptible de prédater la pyrale du buis

1. Objectif

Des relevés « avifaune » ont été réalisés au printemps 2022 dans le Jura afin de compléter l'étude sur les prédateurs potentiels de la pyrale du buis, susceptibles d'expliquer le ralentissement de sa progression dans cette région par l'intégration de ce ravageur dans leur régime alimentaire. Ces relevés ont été effectués via un point d'écoute et du temps d'observation comportemental des oiseaux.

2. Site d'étude

Les sites de prélèvement étudiés en 2021 (S2, S3 et S4) n'ont pas été retenus pour cette étude car insuffisamment infestés par la pyrale du buis au printemps 2022. Un nouveau site a été choisi (S5) pour réaliser ces observations. Il se situe à quelques centaines de mètres du site S4, en sous-bois (Figure 1). Quelques larves de pyrales y ont été observées au printemps 2022, sur des buis encore relativement bien feuillés.

3. Méthodes

a. Point d'écoute

Cette technique consiste à dénombrer tous les oiseaux vus et entendus en un point stationnaire au cours d'une durée fixe de 10 minutes. Chaque individu détecté est positionné dans l'espace autour du point sur une fiche de relevé telle que présentée en Annexe 7. Cette méthode permet de cartographier l'abondance et la richesse spécifique de l'avifaune dans l'environnement proche du point choisi. Toutes les espèces contactées ne sont pas forcément susceptibles de se nourrir dans les buis, il est donc intéressant de savoir lesquelles ont été entendues à proximité immédiate du point de station, où des buis sont infestés par la pyrale. Le point d'écoute a été effectué le 10/05/2022, de 7h45 à 7h55, sous une météo favorable (ciel dégagé, peu de vent).

b. Observation des comportements de prédation

Après la réalisation du point d'écoute, deux observateurs se sont installés sous une tente d'affût (Figure 8), munis d'une longue-vue, de jumelles ainsi que d'un appareil photo afin de tenter de photographier l'activité des oiseaux dans les buis. Chaque observateur s'est concentré sur un bosquet de buis face à lui afin de noter chaque déplacement d'oiseau au sein des buis. L'observation a été effectuée le 10/05/2022, de 8h00 à 11h00.



Figure 8 : Tente d'affût utilisée pour les observations des comportements de prédation des oiseaux sur le site S5.

4. Résultats

a. Point d'écoute

La liste des espèces contactées est la suivante :

Espèces	Nombre d'individus
Pinson des arbres (<i>Fringilla coelebs</i>)	3
Pouillot véloce (<i>Phylloscopus collybita</i>)	1
Fauvette à tête noire (<i>Sylvia atricapilla</i>)	1
Troglodyte mignon (<i>Troglodytes troglodytes</i>)	1
Rouge gorge (<i>Erithacus rubecula</i>)	1
Roitelet huppé (<i>Regulus regulus</i>)	1
Mésange bleue (<i>Cyanistes caeruleus</i>)	1
Geai des chênes (<i>Garrulus glandarius</i>)	1
Grive musicienne (<i>Turdus philomelos</i>)	1
Pigeon ramier (<i>Columba palumbus</i>)	2

Tableau 6 : Espèces d'oiseaux contactées sur le site S5 le 10/05/2022 de 7h45 à 7h55.

D'autres espèces, non contactées pendant le point d'écoute, ont été entendues durant la plage d'observations comportementales :

- » Merle noir (*Turdus merula*)
- » Grive draine (*Turdus viscivorus*)
- » Mésange noire (*Periparus ater*)
- » Coucou gris (*Cuculus canorus*)
- » Mésange huppée (*Lophophanes cristatus*)

b. Observation des comportements de prédation

Lors de la session de trois heures d'observations, aucun oiseau n'a été observé sur les buis. Deux rouges-gorges ont été vus non loin des buis, près du sol dans les épicéas, mais sans manifester de comportement de prospection autour des buis.

5. Discussion

Les écoutes et observations n'ont pu être effectuées qu'à une seule date en ce printemps 2022, ce qui peut expliquer en partie le manque de résultats. La date de relevé avait été choisie en fonction du cycle de reproduction des oiseaux afin de se trouver dans la période la plus propice pour observer les allées et venues des adultes en phase de nourrissage des jeunes. Afin de multiplier les chances d'observer des oiseaux, il faudrait renouveler plusieurs fois l'opération entre mi-avril et début juin. Cela permettrait aussi d'observer potentiellement différentes cohortes d'oiseaux : les sédentaires en début de saison, qui nidifient tôt, puis les migrateurs quelques semaines plus tard.

D'autre part, il n'a pas été possible de trouver des sites suffisamment infestés par la pyrale du buis pour favoriser les observations cette année. Selon les localités, les buis étaient entièrement défoliés, donc sans présence de pyrale, ou bien sains et non attaqués en 2022.

Ainsi, la présence de nombreuses larves multiplie les chances d'observations. C'est ce que nous avons constaté sur d'autres sites infestés, suivis hors cadre du projet FORBUIIS. Les adultes en nourrissage sont à la recherche d'insectes abondants et faciles d'accès à proximité du nid. Les larves et chrysalides de pyrale du buis sont par conséquent des proies idéales. Dans ces conditions, nous avons pu observer des comportements de prédatons par plusieurs espèces de passereaux, et ce sur différents stades de développement de la pyrale. Par exemple :

- » Pinson des arbres (*Fringilla coelebs*), sur chenilles de stade larvaire L5 (Figure 9-a) (Val-de-Marne, 94) ;
- » Mésange bleue (*Cyanistes caeruleus*), mésange charbonnière (*Parus major*), fauvette à tête noire (*Sylvia atricapilla*), et moineau domestique (*Passer domesticus*), sur chrysalides (Figures 9-b, 9-c, 9-e et 9-f), Baronnie (Drôme, 26) ;
- » Geai des chênes (*Garrulus glandarius*), sur buis (Figure 9-d), Baronnie (Drôme, 26) ;
- » Mésange charbonnière (*Parus major*) et fauvette passerinette (*Curruca iberiae*), sur papillons (Figures 9-g et 9-h), Baronnie (Drôme, 26).



Figure 9 : a) Pinson des arbres (*Fringilla coelebs*); b) Mésange bleue (*Cyanistes caeruleus*); c) Mésange charbonnière (*Parus major*); d) Geai des chênes (*Garrulus glandarius*); e) Fauvette à tête noire (*Sylvia atricapilla*); f) Moineau domestique (*Passer domesticus*); g) Mésange charbonnière (*Parus major*); h) Fauvette passerinette (*Curruca iberiae*).

D'autres espèces ont également pu être observées en train de prédater la pyrale du buis, dans le cadre d'études menées en Italie, en Hollande et en Espagne (Mostini, 2018 ; Espluga & Garcia-Readigos, 2020), et viennent compléter notre liste : le merle noir (*Turdus merula*) ; l'huîtrier pie (*Haematopus ostralegus*) ; la pie bavarde (*Pica pica*) ; l'étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*) ; le coucou geai (*Clamator glandarius*).

6. Conclusion et perspectives

De nouvelles observations mériteraient d'être effectuées, notamment sur des sites où la pyrale du buis est abondante, afin de suivre l'impact réel de la prédation par l'avifaune sur les populations de ce ravageur. De plus, il faudrait renouveler plusieurs fois les observations et points d'écoute entre mi-avril et début juin, période de l'année la plus propice pour observer des oiseaux.

ETUDE 2 : Etude de l'influence de l'ensoleillement et du stress hydrique sur les propriétés physico-chimiques du buis, engendrant une possible modification de son pouvoir attractif sur la pyrale du buis

A. Etude de l'appétence des chenilles *Cydalima perspectalis* pour le buis en fonction de son implantation sous couvert végétal ou sous ensoleillement direct et stress hydrique

1. Objectif

Cette étude a pour objectif de tester l'appétence des chenilles pyrales du buis sur des rameaux ayant subi des modifications physico-chimiques du fait de l'adaptation aux conditions climatiques extrêmes (= stress hydrique), susceptibles d'expliquer le peu d'observations de dégâts sur ces buis.

Pour cela, des tests en laboratoire ont été réalisés en 2021 sur deux types de buis différents : les buis exposés à l'ensoleillement direct et au stress hydrique et les buis protégés en sous-bois sous couvert végétal.

2. Matériels

Les rameaux de buis utilisés pour les tests en laboratoire ont été prélevés sur des placettes ensoleillées (« **BE** ») et des placettes ombragées (« **BO** »), sur deux zones géographiques éloignées : le Massif du Jura (Figure 1) et le Mont-Ventoux (Figure 2). Les fiches descriptives des placettes se trouvent en Annexes 1 et 2.

Les chenilles pyrales du buis utilisées pour les tests en laboratoire ont été élevées au laboratoire UEFM d'Avignon. L'élevage comprend plusieurs boîtes où les chenilles sont réparties en fonction de leur date d'éclosion. Elles sont nourries avec du buis frais non infesté, récolté chaque semaine en milieu naturel sur le Mont-Ventoux à une altitude d'environ 800 mètres. Les boîtes d'élevage sont 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 sont réalisés deux fois par semaine (Annexe 5).

3. Déroulement de l'expérimentation en laboratoire

Pour chaque zone d'étude, deux prélèvements de buis ont été réalisés au cours de l'année sur les deux types de placettes « **BE** » et « **BO** » : un premier prélèvement en juin lorsque la végétation est encore verte, puis un deuxième en août lorsque la végétation a subi des périodes de sécheresse estivale. Les tests d'appétence effectués à partir de rameaux prélevés au Mont-Ventoux ont été réalisés à chaque fois 1 à 2 semaine après ceux effectués à partir de rameaux prélevés dans le Jura.

Les tests d'appétences ont été réalisés au laboratoire à chaque fois le jour-même des prélèvements de rameaux de buis. La figure 10 présente les différentes modalités mises en place dans le dispositif expérimental. Des rameaux de buis d'une dizaine de centimètres ont été préparés pour chaque modalité « **BE** » et « **BO** ». Par la suite, les rameaux sont 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 éviter ainsi les moisissures. Les lots de 3 chenilles de stades L3-L4 ont été isolés au préalable afin de les faire jeûner durant 4 heures (Annexe 6). 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 11). La modalité « Sans chenille » permet de mesurer la deshydratation moyenne des rameaux de buis dans les conditions expérimentales. Pour chaque modalité testée, 30 répétitions ont été réalisées. Enfin, tous les lots ont été installés en même temps en chambre climatique sous conditions contrôlées (Température = 25°C ± 1°C, Humidité Relative = 70% ± 5%, Photopériode 14h jour : 10h nuit). Une randomisation par bloc a été faite entre chaque modalité au sein de la chambre climatique. 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. Le poids des rameaux à T0 et à T48 a été mesuré.

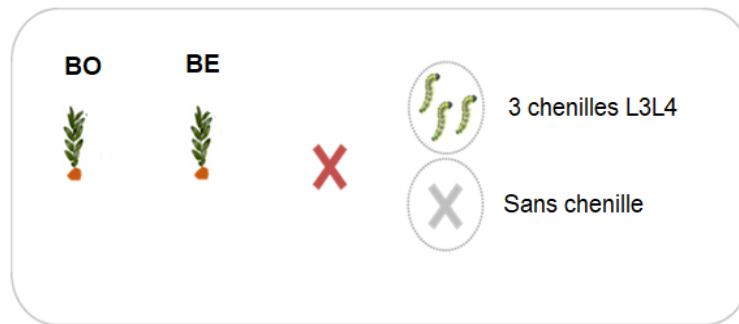


Figure 10 : Présentation des différentes modalités testées (BO : Buis sur placette ombragée, en sous-bois / BE : Buis sur placette ensoleillée, sans couverture végétale).

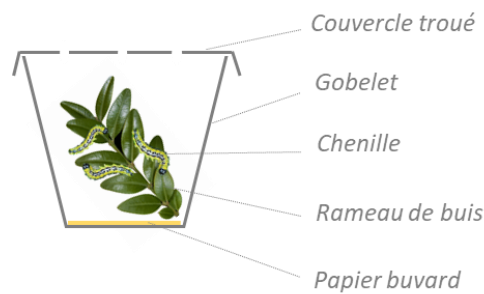


Figure 11 : Schéma d'un gobelet contenant un rameau de buis et un lot de 3 chenilles.

4. Analyses statistiques

Tous les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel libre R (version 3.5.1.), au seuil $\alpha=5\%$. Il est considéré que la perte de masse mesurée sur les rameaux de buis entre $t = 0h$ (P_0) et $t = 48h$ (P_{48}) 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 (équation 1).

$$Deshyd_{sc} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{P_{0,sc} - P_{48,sc}}{P_{0,sc}} \right) i \quad (eq. 1)$$

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

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

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

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 2).

$$M_{\text{cons}} = (P_0 - P_{48}) - (\text{Deshyd}_{SC} \times P_0) \quad (\text{eq.2})$$

M_{cons} : 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 $t = 48h$

La consommation nette des chenilles est analysée statistiquement sous le logiciel R, afin de mettre en lumière d'éventuels effets des modalités de buis sur l'alimentation des chenilles. Le test de Shapiro-Wilk est utilisé pour tester la normalité des données et le test de Bartlett est utilisé pour vérifier les conditions d'homoscédasticité. Enfin, une ANOVA à deux facteurs est réalisée afin de suivre l'effet du type de buis testé sur l'alimentation des chenilles.

5. Analyses moléculaires



En parallèle des tests d'appétence en laboratoire, 5 rameaux frais d'environ 10 cm de chaque modalité « **BE** » et « **BO** » et de chaque zone d'étude ont été prélevés en juin et août 2021. Chaque rameau a été individualisé dans un sachet en papier, puis étiqueté. Les échantillons ont été séchés et stockés dans une étuve à 45°C, en vue de leur envoi à l'Université de Toulouse III (Plateau MetaboHUB – MetaToul – AgromiX) pour des analyses moléculaires.

6. Résultats et discussion

a. Tests d'appétence

La Figure 12 présente la consommation moyenne de buis par les chenilles en fonction du type de buis (« **BE** »/« **BO** »), du mois de prélèvement (juin/août), et de la provenance du buis (Jura/Ventoux). Ainsi, quelle que soit la provenance, les résultats obtenus présentent une même tendance. Les chenilles pyrales du buis s'alimentent autant sur le buis « **BE** » que sur le buis « **BO** » et aucune différence significative n'a été relevée selon le type de buis considéré (ANOVA 2 facteurs, effet « type de buis » : Jura : p-value = 0.3162 / Ventoux : p-value = 0.2450).

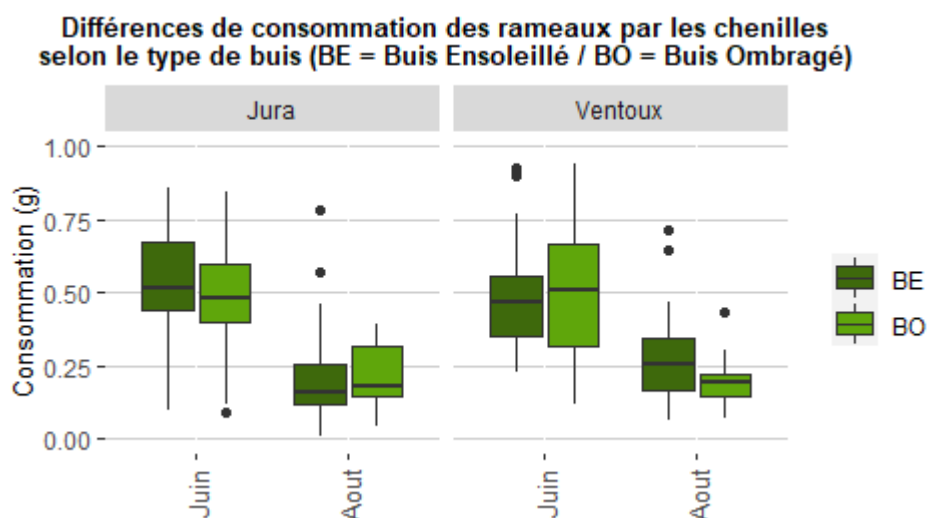


Figure 12 : Graphique présentant la consommation moyenne de buis par les chenilles en fonction du type de buis (Ensoleillé « **BE** » / Ombragé « **BO** ») et du mois de prélèvement (Juin/Août), pour le Jura et le Mont-Ventoux.

Néanmoins, une différence significative a été relevée selon le mois de prélèvement, et ce pour les deux provenances ; la consommation des chenilles ayant été significativement plus importante au mois de juin par rapport au mois d'août (ANOVA 2 facteurs, effet « type de buis » : Jura : p-value < 2e-16 ***/ Ventoux : p-value = 1.22e-13 ***) (Figure 13).

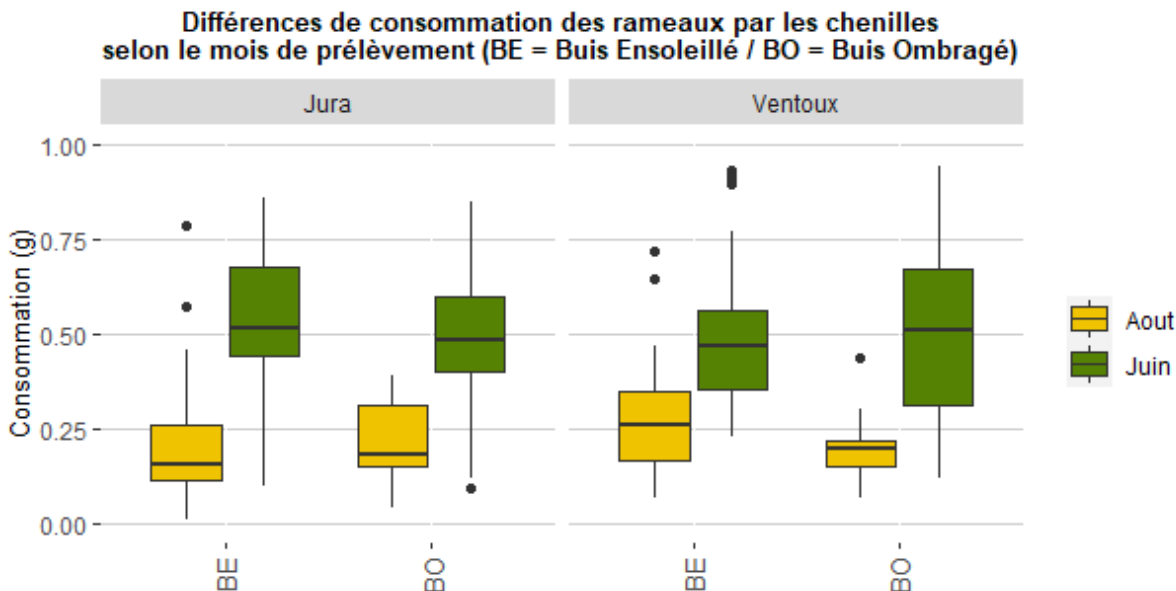


Figure 13 : Graphique présentant la consommation moyenne de buis par les chenilles en fonction du mois de prélèvement (Juin/Août) et du type de buis (Ensoleillé « BE » / Ombragé « BO »), pour le Jura et le Mont-Ventoux.

Les espèces spécialistes, telles que la pyrale du buis, ne sont capables d'exploiter qu'un nombre restreint de ressources végétales, et l'exclusivité de l'interaction est souvent maintenue par une certaine toxicité de la plante hôte (Moreau et al. 2013). Ainsi, la production de métabolites secondaires par la plante hôte (tannins, flavonoïdes, terpénoïdes et alcaloïdes) en tant que mécanismes de défense confèrent à l'insecte phytophage leurs propres moyens de défense contre leurs prédateurs, grâce à une capacité physiologique leur permettant de stocker ou d'excréter ces composés. C'est le cas des chenilles pyrales du buis qui sont capables de séquestrer dans leurs tissus de grandes quantités d'alcaloïdes dibasiques et de métaboliser ou excréter les alcaloïdes monobasiques, molécules hautement toxiques produites par les buis (Leuthardt et al. 2013). Dès le début de leur développement, les chenilles ingèrent en peu de temps de grandes quantités d'alcaloïdes en préférant des feuilles contenant de plus fortes concentrations de ces composés, afin d'assurer rapidement leur protection contre les prédateurs, avant de maximiser leur croissance.

Les résultats de nos expérimentations en laboratoire suggèrent que les chenilles pyrales du buis sont capables de s'alimenter sur des buis de diverses qualités sans que cela n'influe ni sur leur survie, ni sur leur croissance. Ainsi, même si les facteurs environnementaux (température, lumière, stress hydrique...) affectent la physiologie des plantes et influent sur leurs teneurs en métabolites primaires et secondaires (Calatayud et al. 2013), les chenilles arrivent à ingérer et exploiter les éléments dont elles ont besoin pour leur protection et leur croissance.

Les résultats obtenus suggèrent également une différence de consommation de buis entre les chenilles issues de la génération de printemps et celles issues de la génération estivale. Ces résultats rejoignent ceux d'une autre étude réalisée en conditions contrôlées, où une forte variation

saisonnaire du taux de croissance et de la survie des chenilles avait été observée entre les chenilles de la génération de printemps et celles de la génération d'automne (Leuthardt & Baur 2013). Il a été montré que la teneur en composés secondaires dans les feuilles et les autres organes végétaux des buis variait selon la saison, les alcaloïdes s'accumulant surtout durant la phase de fructification en été (Vachnadze et al. 2009). Il est possible que la forte toxicité des feuilles influe sur la quantité de buis consommée par les chenilles de stades larvaires plus avancés, lors des tests d'appétence effectués au mois d'août, étant donné qu'elles ont déjà cumulé et séquestré dans leur corps de grande quantité d'alcaloïdes depuis le début de leur développement. Il serait intéressant de poursuivre la réflexion en étudiant les composés moléculaires contenus dans les feuilles de buis, et les éventuelles différences en teneurs, selon le type de buis « BE » et « BO » et le mois de prélèvement (juin et août).

b. Analyses moléculaires

Afin d'aller plus loin dans la compréhension de ces résultats, des analyses moléculaires ont été réalisées par l'Université de Toulouse III (Plateau MetaboHUB – MetaToul – AgromiX).

Au total, 40 échantillons ont été analysés, 5 répétitions pour chaque type de buis (« BE »/« BO »), mois de prélèvement (juin/août), et provenance du buis (Jura/Ventoux). La technique de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a été utilisée pour identifier et quantifier les substances composant les feuilles de buis (Annexe 9).

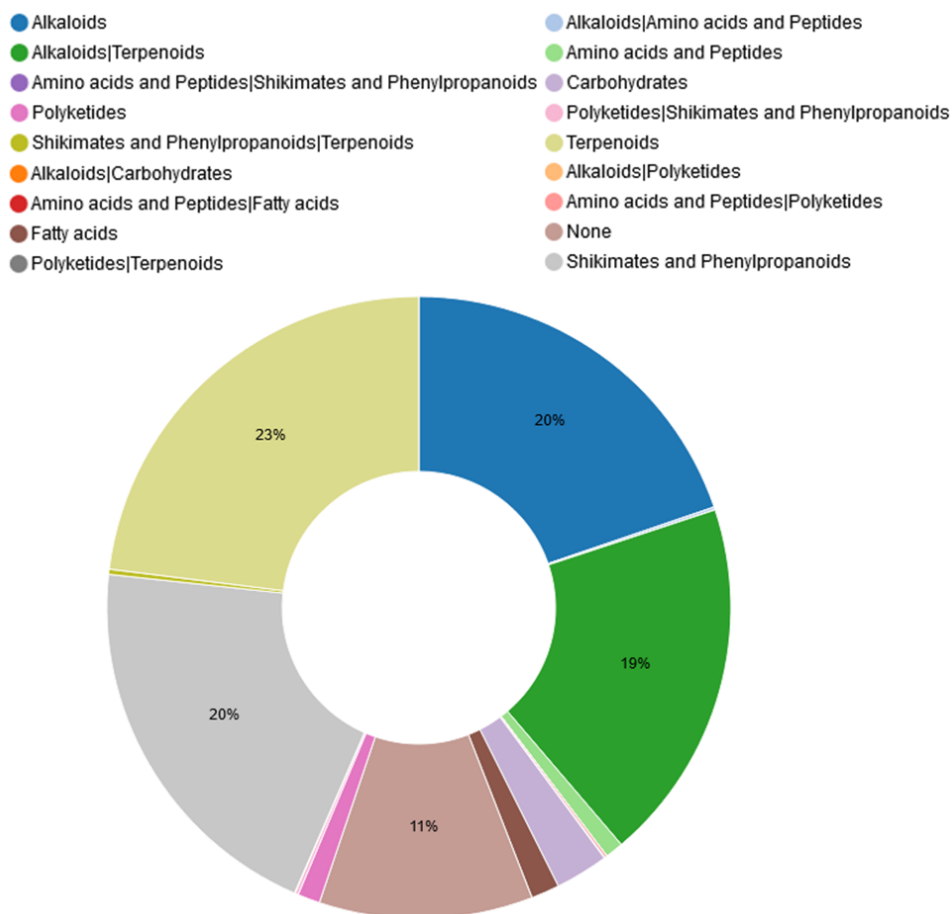


Figure 14 : Répartition des différentes classes de composés sur le nombre total de pics détectés (1750) par LC-MS.

Au total, 1 750 pics ont été détectés sur l'ensemble des 40 échantillons (Figure 14). Il s'agit principalement d'alcoïdes, de terpénoïdes, de carbohydrates, de shikimates, de phénylpropanoïdes, de polycétides, d'acides aminés et d'acides gras.

Une ACP (Analyse en Composantes Principales) a été réalisée afin de visualiser l'organisation des échantillons toutes classes confondues (Figure 15). L'ACP atteste de l'homogénéité de l'expérience avec l'ensemble des échantillons centrés.

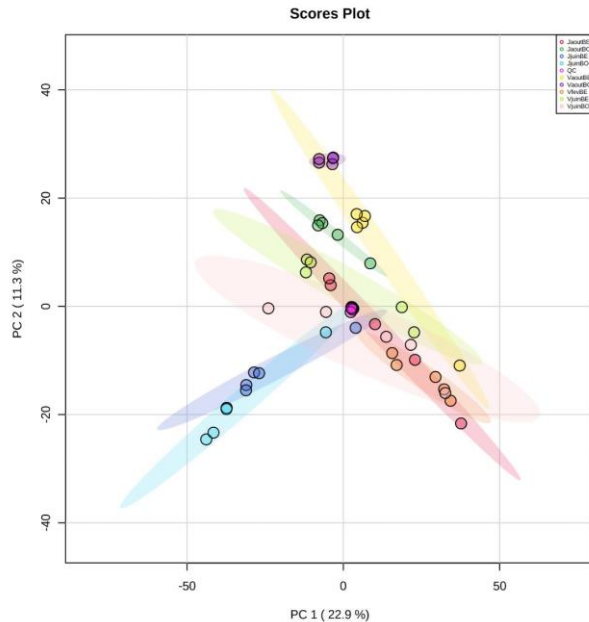


Figure 15 : Analyse en Composantes Principales des données LC-HRMS.

i. Analyse globale par site (mois confondus)

Afin de séparer les échantillons selon leur exposition au soleil et au stress hydrique, nous avons réalisé une PLS-DA (Partial Least square discriminant analysis) (Figure 16).

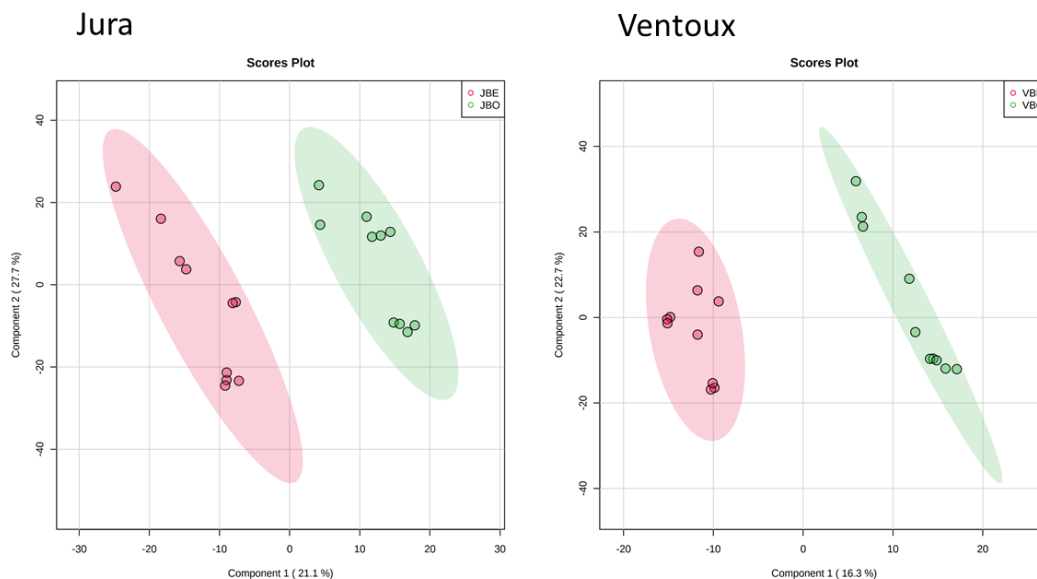


Figure 16 : Analyse Discriminante des données LC-HRMS (à gauche : échantillons provenant du Jura / à droite : échantillons provenant du Ventoux).

Afin de mettre en évidence les biomarqueurs d'exposition, une ANOVA a été réalisée et les résultats sont présentés sous forme de heatmap (ANOVA ($p < 0.05$) et dendrogramme de distance Pearson) (Figure 17).

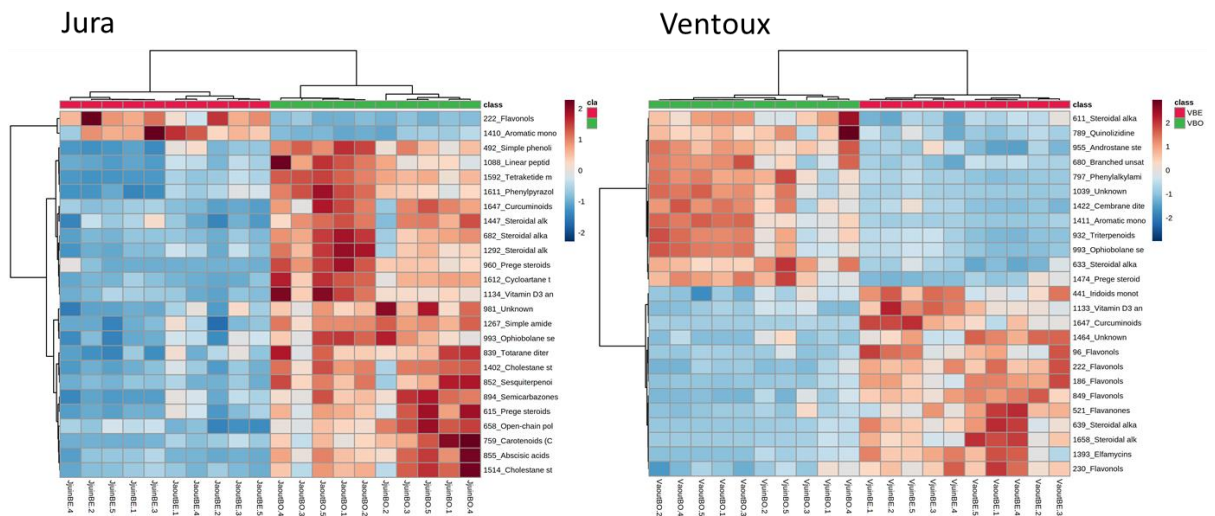


Figure 17 : Heatmap des données LC-HRMS (à gauche : échantillons provenant du Jura / à droite : échantillons provenant du Ventoux).

La heatmap recoupe avec les résultats observés dans la PLS-DA avec une séparation en fonction de l'exposition au soleil et au stress hydrique. Certains métabolites seront retrouvés en plus grande majorité en fonction des sites de collecte (carrés rouges).

Un volcano plot a été réalisé afin de montrer d'éventuels métabolites discriminants entre les deux modalités. Le volcano plot combine l'effet statistique sur l'axe des ordonnées et l'effet biologique sur l'axe des abscisses pour une matrice individus/caractère (ici, exposition) (Figure 18). L'axe des ordonnées représente donc la p-value (\log_{10} p-value). Plus la valeur est élevée, plus les effets sont significatifs et inversement. L'axe des abscisses représente le ratio des moyennes des deux modalités (\log_2 fold change).

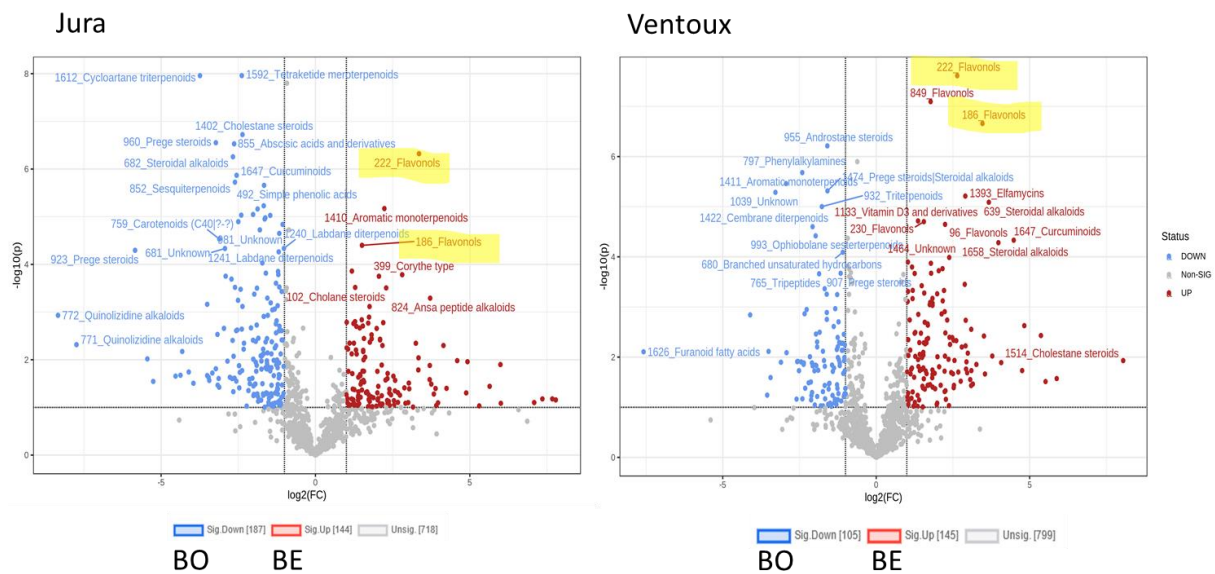


Figure 18 : Volcano plot des données LC-HRMS (à gauche : échantillons provenant du Jura / à droite : échantillons provenant du Ventoux).

Concernant le Jura, on observe que, sur les 1 049 métabolites observés, 718 métabolites ne sont pas discriminants. Cependant, 187 sont discriminants pour le buis « ombragé » et 144 sont discriminants pour le buis « ensoleillé » avec un ratio d'intensité ombragé/ensoleillé supérieur à 2 et une significativité inférieure à p-value < 0.05.

Les voies des shikimates et phenylpropanoïdes ainsi que celle des terpènes semblent être les plus impactées toutes modalités confondues avec essentiellement des flavonoïdes, des terpénoïdes surexprimés sur le buis « ombragé » (e.g. composés 1592, 1612, 852...). À l'inverse, certains composés se retrouvent surexprimés pour le buis « ensoleillé » par rapport au buis « ombragé » (flavonols : 222, 186...).

Concernant le Ventoux, sur les 1 049 métabolites observés, 799 métabolites ne sont pas discriminants, 105 sont discriminants pour le buis « ombragé » et 145 le sont pour le buis « ensoleillé ». De la même manière que pour le Jura, certains composés se retrouvent surexprimés pour chacun des deux types de buis et concernent essentiellement des terpénoïdes et flavonoïdes.

Les composés phénoliques (dont font partie les flavonoïdes) et les terpénoïdes sont des composés secondaires synthétisés par les plantes dans le cadre de mécanismes de résistance aux stress biotiques et abiotiques (Calatayud et al. 2013).

Les flavonoïdes sont présents chez toutes les plantes supérieures et constituent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié. Certains constituent les pigments naturels des fleurs, des fruits et des feuilles, d'autres peuvent être des répulsifs ou toxiques pour les insectes.

Les terpénoïdes représentent le plus important groupe de composés secondaires chez les plantes. Généralement volatils, ces composés sont responsables des odeurs et arômes de nombreuses plantes.

La teneur et la concentration de ces composés varient essentiellement en fonction de l'organe considéré (feuille, racine...), mais également en fonction de l'âge de la plante, du stade phénologique, des saisons, des stress environnementaux et de l'alternance jour/nuit. Il a été montré par exemple que les plantes situées dans des endroits ombragés possédaient 50% de composés cyanogéniques de plus que celles situées dans des endroits ensoleillés, lesquelles étaient en revanche plus riches en tannins et flavonoïdes (Calatayud et al. 2013).

Nous avons voulu poursuivre les analyses en se focalisant cette fois-ci sur ces composés spécifiquement.

ii. Extraction des composés phénoliques par modalité

Concernant le Jura, on observe autant voire plus de métabolites discriminants pour le buis « ombragé » pour les deux mois d'étude (17 contre 15) (Figure 19). À l'inverse, le buis « ensoleillé » se caractérise surtout par des concentrations de métabolites plus importants pour le mois d'août (31 contre 9). Par ailleurs, nous observons que certains métabolites sont retrouvés pour les deux mois (e.g. composés 222, 941, 209, 313...).

Concernant le Ventoux, on observe plus de métabolites discriminants pour le buis « ombragé » au mois de juin par rapport au mois d'août (33 contre 14) (Figure 19). À l'inverse, le buis « ensoleillé » se caractérise surtout par des concentrations de métabolites plus importants pour le mois d'août (38 contre 11). Nous observons également que certains métabolites sont retrouvés pour les deux mois (e.g. composés 222, 849...).

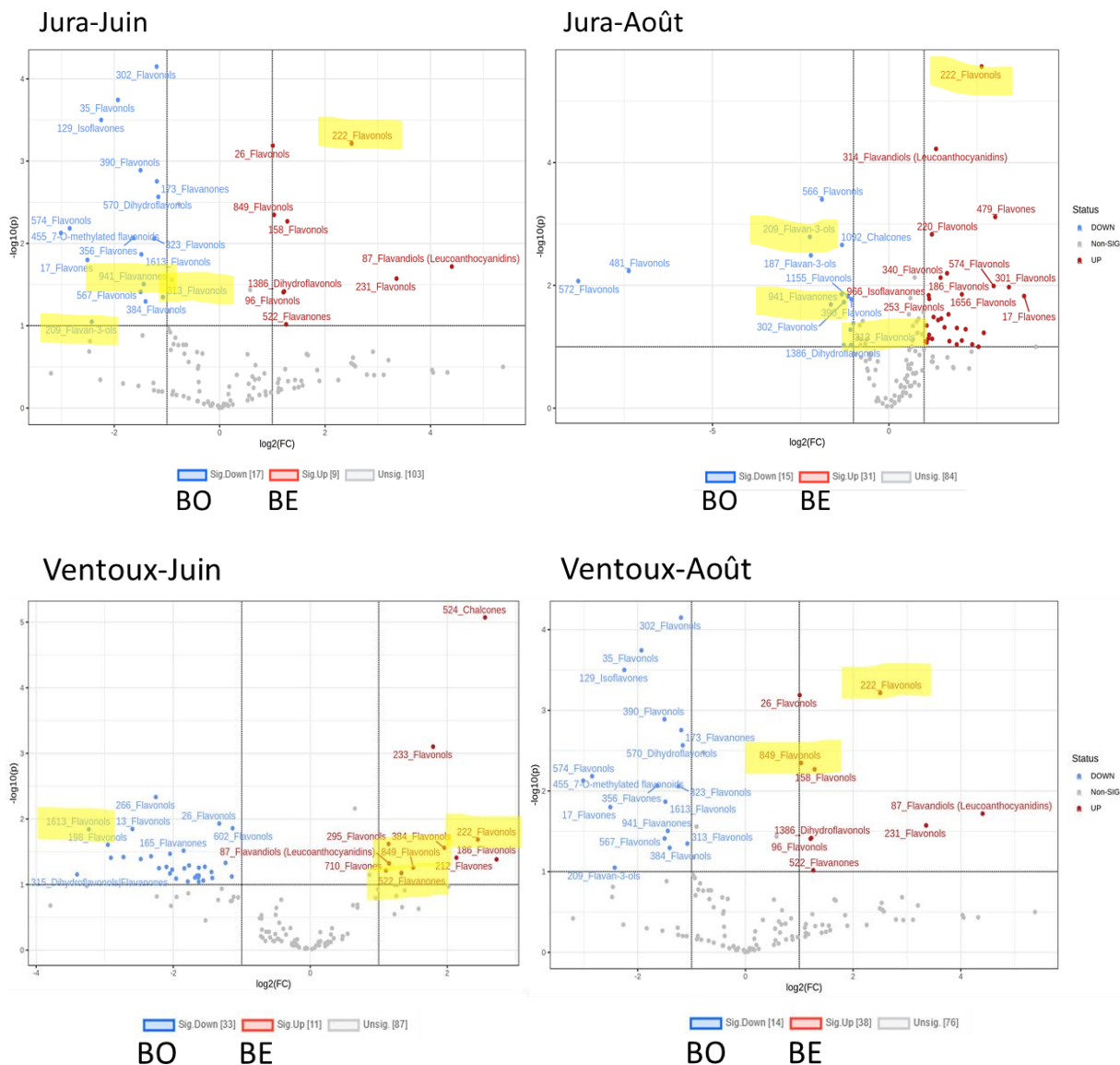


Figure 19 : Volcano plot des données LC-HRMS des flavonoïdes pour le mois de juin (à gauche), le mois d'août à droite), le Jura (en haut) et le Ventoux (en bas).

iii. Extraction des composés terpéniques par modalité

Concernant le Jura, nous remarquons qu'il y a autant de métabolites discriminants pour le buis « ombragé » que pour le buis « ensoleillé » pour les deux mois d'étude (Figure 20). De plus, nous constatons que très peu de métabolites sont retrouvés pour les deux mois (e.g. composés 775, 1612...).

Concernant le Ventoux, on observe plus de métabolites discriminants pour le buis « ombragé » au mois d'août par rapport au mois de juin (54 contre 18) (Figure 20). Il en est de même pour le buis « ensoleillé » qui se caractérise également par des concentrations de métabolites plus importants pour le mois d'août (41 contre 27). Nous observons également que certains métabolites sont retrouvés pour les deux mois (e.g. composés 1491, 238...).

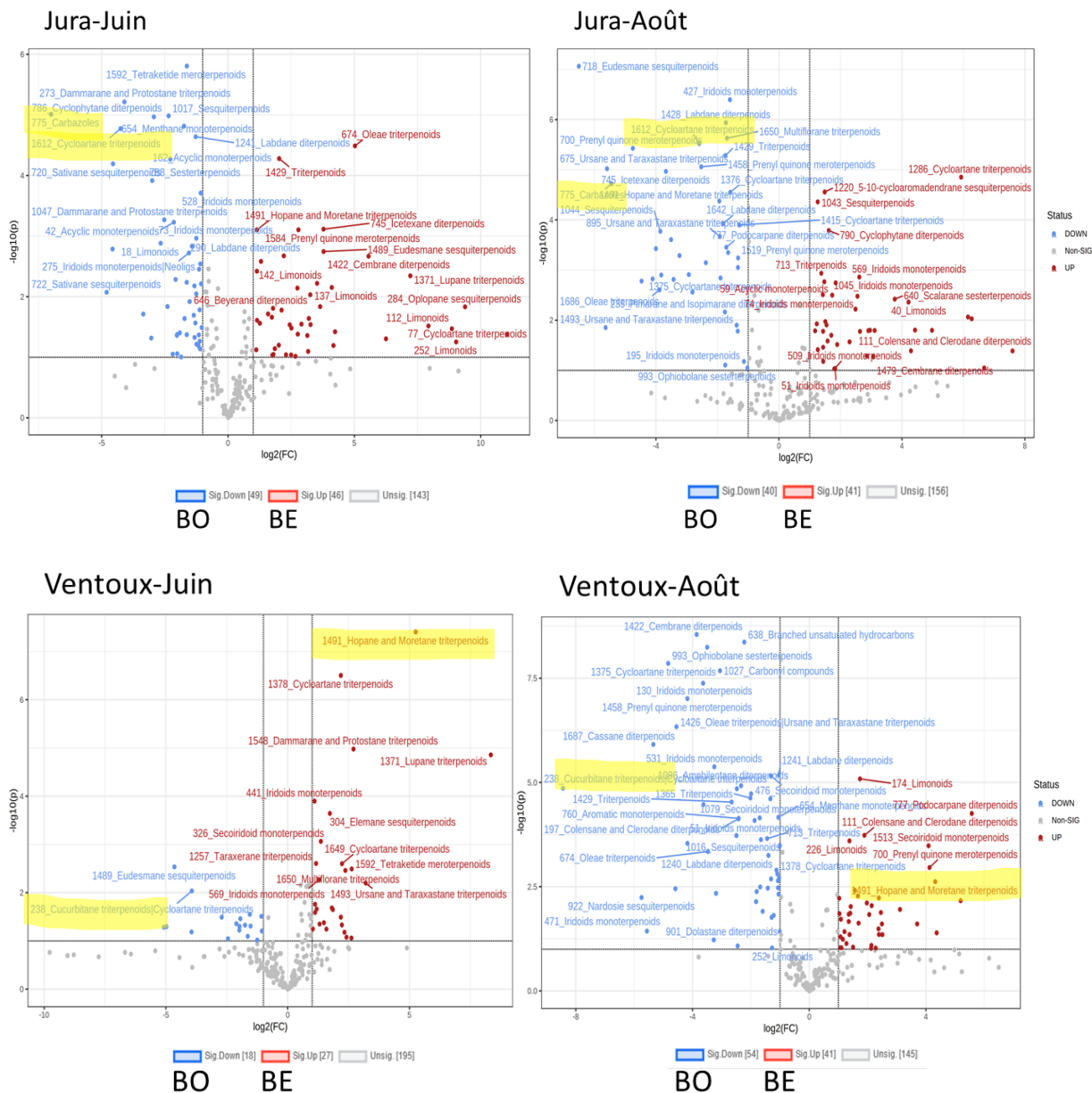


Figure 20 : Volcano plot des données LC-HRMS des terpènes pour le mois de juin (à gauche), le mois d'août à droite), le Jura (en haut) et le Ventoux (en bas).

iv. Discussion et conclusion

D'après l'ensemble des résultats, il existe une certaine répartition des métabolites en fonction de l'ensoleillement et du mois de collecte, pour les sites du Jura et du Ventoux. Les flavonoïdes sont assez discriminants en fonction des modalités étudiées, contrairement aux terpènes où les résultats sont plus variables en fonction des sites et des mois de collectes.

Néanmoins, on retrouve quelques métabolites récurrents en fonction des conditions testées comme par exemple deux flavonols (222, 1613). Ainsi, l'influence du site de collecte, de la saisonnalité et de l'exposition a pu être caractérisée par des analyses statistiques. Des biomarqueurs caractéristiques de l'exposition sur plusieurs saisons ont pu être mis en évidence et méritent une investigation plus poussée (quantification, essais biologiques...).

7. Conclusion et perspectives

Les résultats de nos expérimentations en laboratoire ne montrent pas de différence significative d'alimentation des chenilles en fonction de l'emplacement de leur plante hôte, sous ensoleillement direct ou sous couvert végétal. Cela suggère que les chenilles pyrales du buis sont capables de s'alimenter sur des buis de diverses qualités sans que cela n'influe ni sur leur survie, ni sur leur croissance, et qu'elles arrivent à ingérer et exploiter les éléments dont elles ont besoin pour leur protection et leur développement. Ainsi, les différences de dégâts observées sur le terrain entre les buis sous couvert végétal et ceux sous ensoleillement direct peuvent éventuellement s'expliquer plutôt par le comportement de ponte des femelles et le choix de la plante hôte. Cette hypothèse sera vérifiée dans l'étude suivante.

Les résultats obtenus présentent également une différence de consommation de buis entre les chenilles issues de la génération de printemps et celles issues de la génération estivale. La teneur en alcaloïdes s'accumulant surtout en été dans les feuilles et les autres organes végétaux, au cours de la phase de fructification, il est possible que la forte toxicité des feuilles influe sur la quantité de buis consommée par les chenilles de stades larvaires plus avancés, étant donné qu'elles ont déjà cumulé et séquestré dans leur corps de grande quantité d'alcaloïdes depuis le début de leur développement. Cette étude nécessiterait cependant d'être reconduite afin de gommer un éventuel effet de cohorte sur la génération de chenilles utilisées lors de l'expérimentation et de valider ces résultats.

Les analyses moléculaires ont déjà permis d'identifier des différences de répartition des métabolites en fonction de l'ensoleillement et du mois de collecte, pour les deux sites d'études, et mériteraient d'être approfondies.

B. Etude de l'attraction de différents types de buis sur les papillons femelles *Cydalima perspectalis* en fonction de leur implantation sous couvert végétal ou sous ensoleillement direct et stress hydrique

1. Objectif

Cette étude a pour objectif de tester l'effet de différents types de buis sur le comportement de ponte des papillons femelles *Cydalima perspectalis*, en fonction de leur implantation sous couvert végétal ou sous ensoleillement direct. En effet, ces derniers sont susceptibles de subir des modifications physico-chimiques du fait de l'adaptation aux conditions climatiques extrêmes (= stress hydrique), susceptibles d'expliquer le peu d'observations de dégâts sur ces buis.

Pour cela, des tests en laboratoire ont été réalisés en 2022 sur deux types de buis différents : les buis exposés à l'ensoleillement direct et au stress hydrique et les buis protégés en sous-bois sous couvert végétal.

2. Matériels

Les rameaux de buis utilisés pour les tests en laboratoire ont été prélevés sur des placettes ensoleillées (« **BE** ») et des placettes ombragées (« **BO** »), sur deux zones géographiques éloignées : le Massif du Jura (Figure 1) et le Mont-Ventoux (Figure 2). Les fiches descriptives des placettes se trouvent en Annexes 1 et 2.

Les papillons pyrales du buis utilisés pour les tests en laboratoire ont été élevés au laboratoire UEFM d'Avignon. L'élevage comprend plusieurs boîtes où les chenilles sont réparties en fonction de leur date d'éclosion. Elles sont nourries avec du buis frais non infesté, récolté chaque semaine en milieu naturel sur le Mont-Ventoux à une altitude d'environ 800 mètres. Les boîtes d'élevage sont 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 sont réalisés deux fois par semaine (Annexe 5). Une fois les chrysalides matures, elles sont sexées, puis les mâles et femelles sont séparés et placés dans des cages insectproof distinctes (30 × 30 × 30 cm) en attendant l'émergence des papillons (Annexe 6). Dès l'émergence des papillons, une source de nourriture (miel et eau) est ajoutée dans les cages. Les papillons utilisés pour les tests ont au moins 3 jours, afin de garantir leur maturité sexuelle.

3. Déroulement de l'expérimentation en laboratoire

Pour chaque zone d'étude, deux prélèvements de buis ont été réalisés au cours de l'année sur les deux types de placettes « **BE** » et « **BO** » : un premier prélèvement en juin lorsque la végétation est encore verte, puis un deuxième en août lorsque la végétation a subi des périodes de sécheresse estivale. Les tests de comportement de ponte effectués à partir de rameaux prélevés au Mont-Ventoux ont été réalisés à chaque fois 1 à 2 semaine après ceux effectués à partir de rameaux prélevés dans le Jura.

Les tests ont été réalisés au laboratoire à chaque fois le jour-même des prélèvements de rameaux de buis. Le nombre de répétition est lié à la quantité de papillons disponibles le jour de la réalisation des tests. Ainsi, dans chaque cage insectproof (30 × 30 × 30 cm) a été placé un lot de 4 couples de papillons âgés de 3 jours, ainsi qu'un rameau de buis provenant de la placette ensoleillée « **BE** » et un rameau de buis provenant de la placette ombragée « **BO** » (Figure 21). Chaque rameau mesure

environ 20 cm de hauteur et est piqué sur de la mousse florale humidifiée. Une solution sucrée (miel) ainsi que de l'eau ont été disposées à l'intérieur des cages le temps de l'expérimentation, comme source de nourriture pour les papillons.

Les cages ont été installées en chambre climatique durant 72 heures (Température = 25°C ± 1°C, Humidité Relative = 70% ± 5%, Photopériode 14h jour : 10h nuit). Au bout de 72 heures, le nombre d'œufs a été relevé sous stéréomicroscope pour chacun des rameaux.

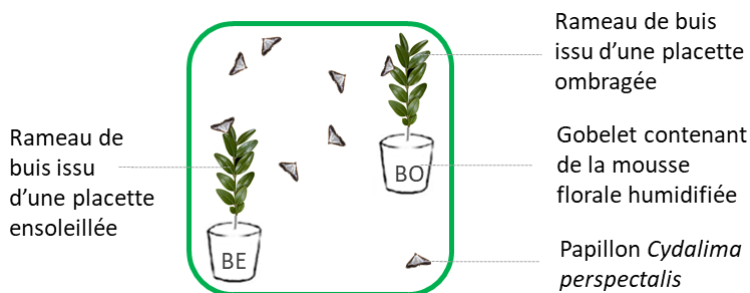


Figure 21 : Schéma d'une cage contenant un lot de 4 couples de papillons et des rameaux de buis à tester (BE : Buis ensoleillé, BO : Buis ombragé).

4. Analyses statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel libre R (version 3.5.1.), au seuil $\alpha=5\%$. Pour cette étude, le nombre d'œufs pondus a été comparé en fonction de l'exposition du buis au soleil à l'aide d'un modèle linéaire généralisé mixte intégrant le numéro de la cage comme effet aléatoire, sous la loi quasi Poisson (fonction glmmQPL du package MASS de R).

5. Résultats des tests de comportement de ponte

La Figure 22 présente le nombre d'œufs pondus par les femelles pyrales du buis en fonction du type de buis (« BE »/« BO »), du mois de prélèvement (juin/août), et de la provenance du buis (Jura/Ventoux).

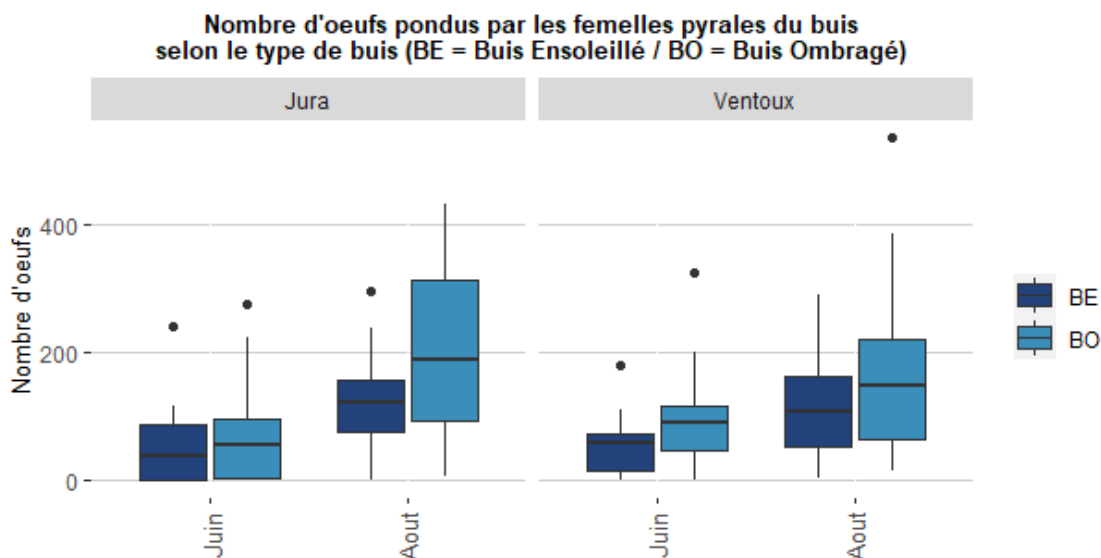


Figure 22 : Graphique présentant le nombre d'œufs pondus par les femelles de la pyrale du buis en fonction du type de buis (Ensoleillé « BE » / Ombragé « BO ») et du mois de prélèvement (Juin/Août), pour le Jura et le Mont- Ventoux.

Le nombre de répétitions est :

- Pour le Jura : juin = 17 cages, août = 23 cages
- Pour le Ventoux : juin = 14 cages, août = 16 cages

D'une manière générale, quelle que soit la provenance des buis, le nombre d'œufs pondus par les papillons femelles est significativement plus important sur les buis dits ombragés « **BO** » que sur les buis dits ensoleillés « **BE** » (GLMM, *loi quasi poisson*, effet « type de buis » : Jura : p-value = 0.02098 */ Ventoux : p-value = 0.02204 *).

Une différence significative a également été relevée selon le mois de prélèvement, et ce pour les deux provenances ; le nombre d'œufs pondus par les papillons femelles est significativement plus important au mois d'août par rapport au mois de juin (ANOVA 2 facteurs, effet « type de buis » : Jura : p-value = 5.954e-06 *** / Ventoux : p-value = 6.687e-05 ***) (Figure 23).

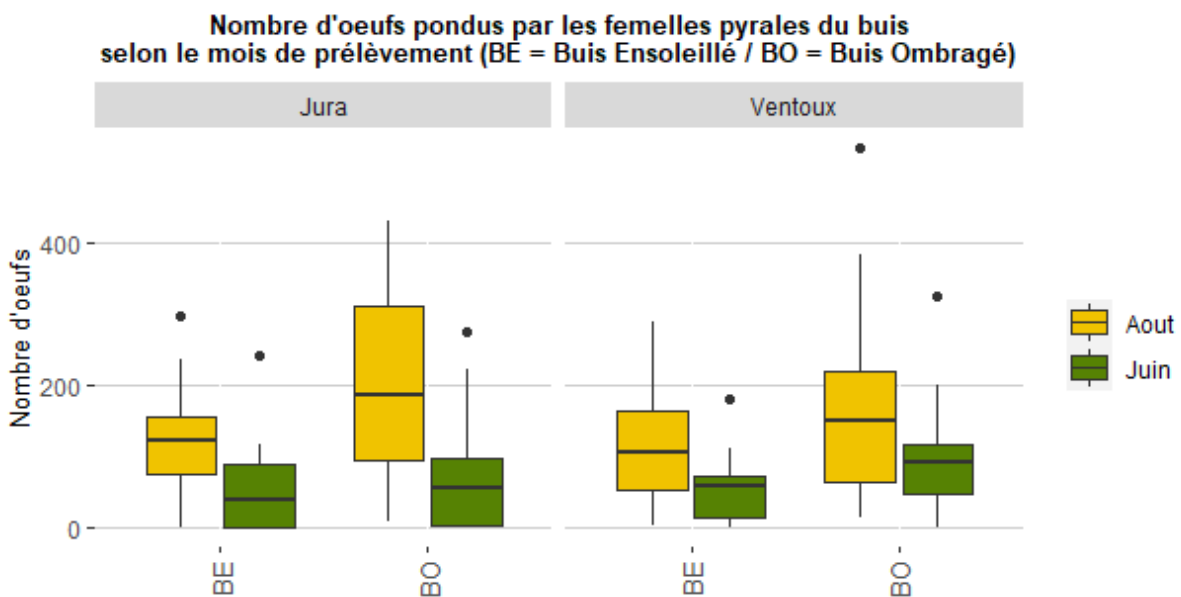


Figure 23 : Graphique présentant le nombre d'œufs pondus par les femelles de la pyrale du buis en fonction du mois de prélèvement (Juin/Août) et du type de buis (Ensoleillé « BE » / Ombragé « BO »), pour le Jura et le Mont- Ventoux.

6. Discussion

Les résultats obtenus permettent de conclure que l'exposition des buis a un impact significatif sur le nombre d'œufs pondus, plus important sur les buis dits « ombragés » que sur les buis dits « ensoleillés ». De plus, les pontes sont significativement plus importantes au mois d'août comparé au mois de juin pour les deux sites (Jura et Ventoux).

Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les chenilles ont une plus faible capacité de dispersion que les adultes et que le succès de leur développement dépend des qualités nutritives de la plante choisie par la mère pour la ponte (Renwick, 1989 ; Renwick et al. 1994 ; Thiéry et al. 2013b). Chez les insectes spécialistes, la capacité des femelles à localiser et à reconnaître la plante la plus appropriée pour la ponte dépend d'un processus séquentiel divisé en trois étapes consécutives : 1) la recherche de la plante hôte à distance menant l'insecte à se rapprocher et à atterrir sur la plante, via des stimuli olfactifs, visuels, acoustiques, mécaniques ; 2) la phase d'évaluation par contact de la plante

au bout de laquelle l'insecte accepte ou refuse le support d'atterrissage ; 3) le dépôt des œufs (Thiéry et al. 2013a). La sélection faite par les femelles aura tendance à maximiser la valeur sélective par une corrélation positive entre la préférence des femelles et la performance des larves (Jaenike, 1978). Cette corrélation, appelée « Mother knows best hypothesis », se traduit par le fait que les femelles influencent leur choix en fonction de la qualité de la plante hôte caractérisée par la teneur en nutriments, la teneur en eau et la quantité de composés toxiques qu'elle contient. Cette corrélation a été appuyée par de nombreuses études empiriques (Thompson, 1988 ; Gripenberg et al. 2010 ; García-Robledo & Horvitz 2012b). De plus, la pyrale du buis est une espèce spécialiste, au régime alimentaire monophage du genre *Buxus*. Les espèces spécialistes sont considérées comme plus adaptées à leur plante hôte, ce qui implique que les femelles effectuent une recherche ciblée plus efficace de leur plante hôte de sorte à la localiser plus rapidement (Bernays, 1998). Cette recherche ciblée est possible car la gamme d'hôtes restreinte de l'insecte diminue la quantité d'informations à intégrer. Cette faible quantité d'informations permet à ces espèces spécialistes d'être plus sensibles aux variations de qualité de leurs plantes hôtes pour ainsi mieux discriminer les différences intraspécifiques (West & Cunningham 2002).

Au regard des résultats obtenus dans notre étude, nous pouvons avancer l'hypothèse selon laquelle les buis dits « ombragés » sont privilégiés par les femelles pour pondre, du fait de leur exposition leur conférant des qualités avantageuses : un feuillage plus tendre susceptible de faciliter l'alimentation des chenilles et une humidité relative plus importante favorisant le développement des jeunes stades larvaires, sensibles à la sécheresse et au manque d'humidité.

En outre, l'environnement à l'échelle du paysage pourrait jouer un rôle dans le choix du site de ponte par les femelles pyrales du buis. En effet, les buis dits « ombragés » ont une répartition dans l'environnement plus homogène que les buis dits « ensoleillés », qui sont généralement implantés dans le paysage de manière individuelle et sporadique. Ce facteur de distribution au sein du paysage est connu dans la bibliographie comme déterminant pour le choix de la plante hôte. En effet, la probabilité de choisir une plante de qualité sera plus importante si elles sont distribuées de manière homogène dans le paysage plutôt que de manière hétérogène (Mayhew, 1997).

Les résultats ont également montré un effet de la saisonnalité sur la quantité d'œufs pondus par les femelles, qui est plus importante au mois d'août comparé au mois de juin, pour les deux sites d'études. Le cycle de développement de la pyrale du buis pourrait expliquer ces résultats, la génération d'adultes du mois d'août (dernière de l'année) générant une quantité plus importante de pontes, dans le but d'augmenter la densité de chenilles diapausantes dans le milieu et de pallier aux potentielles pertes dues aux conditions hivernales. Cette hypothèse reste bien sûr à vérifier.

Il est également possible que la qualité nutritive du buis puisse avoir un impact sur la stratégie de ponte des femelles. En effet, durant la période estivale, le stress hydrique est susceptible d'impacter la qualité nutritive du buis et d'induire une perte sur les premiers stades larvaires. Ainsi, augmenter le nombre d'œufs pondus afin d'assurer un minimum de descendant pourrait expliquer les résultats obtenus. Cette adaptation par la fécondité est appelée « egg limitation » (= limitation de ponte) par West et Cunningham (2002) ou « risk spreading » (= étalement du risque) par Jaenike (1990). Ainsi, l'insecte pourra maximiser sa valeur sélective en déposant une grande quantité d'œufs sur toutes les plantes, la survie des descendants étant proportionnelle à la qualité de la plante. Cela se rapporte à la notion de « bet hedging » (= plasticité non prédictive) qui explique qu'en présence d'une forte variabilité de plantes, le fait de répandre ses œufs permet d'assurer un minimum de descendants (Hopper, 1999).

7. Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus permettent de conclure que l'exposition des buis a un impact significatif sur le nombre d'œufs pondus, plus important sur les buis dits « ombragés » que sur les buis dits « ensoleillés ». D'une manière générale, plusieurs facteurs influent sur le choix du site de ponte des femelles, et les modifications physico-chimiques des plantes hôtes sous l'effet de l'ensoleillement direct et du stress hydrique pourraient expliquer les différences observées. Afin d'approfondir cette hypothèse, des analyses moléculaires complémentaires sur les composées volatiles permettraient d'identifier les molécules susceptibles d'avoir un effet attractif sur l'olfaction des femelles pyrales du buis. En parallèle, il serait intéressant d'étudier, en conditions contrôlées, l'impact du stress hydrique conféré aux plantes hôtes sur le comportement de ponte des femelles.

Conclusion et perspectives du projet FORBUIS

D'une manière générale, le projet FORBUIS a permis d'avancer sur la compréhension des facteurs biotiques et abiotiques en jeu dans le ralentissement de la progression de la pyrale du buis.

Ainsi, les résultats des campagnes de prélèvement de l'entomofaune ont permis de mettre en évidence des perspectives intéressantes, concernant notamment les parasitoïdes de la famille des Braconidae et des Ichneumonidae, et les prédateurs tel que *Chrysoperla carnea*. Ces derniers sont déjà commercialisés comme agents de biocontrôle sur d'autres ravageurs. Des études de prédation plus poussées représentent donc un levier pour le développement de méthode de biocontrôle de la pyrale du buis.

La faible pression exercée par la pyrale du buis dans le secteur de Saint-Claude sur les deux années du projet reste pour autant une limite importante de notre étude. En effet, l'analyse des résultats obtenus sur l'entomofaune inféodée au buis se base essentiellement sur les dires d'expert taxonomiste et sur nos recherches bibliographiques, avec toutes la difficulté que cela implique d'accéder à des informations plus précises dans la littérature quant à la biologie et à l'écologie des individus récoltés, au-delà de la description des familles voire des sous-familles. De même, la faible infestation des sites par la pyrale du buis n'a pas permis de favoriser les observations de prédation par l'avifaune.

A l'avenir, il serait intéressant d'envisager de réaliser de nouvelles campagnes de récoltes et d'observations, notamment sur des sites où la pyrale du buis est abondante, afin de suivre l'impact réel de l'entomofaune et de l'avifaune sur les populations de ce ravageur. Ainsi, l'idéal serait de récolter *in situ* des larves et chrysalides présentant des marques de parasitismes dans l'optique de valider les émergences des parasitoïdes et/ou hyperparasitoïdes au laboratoire. Egalement, de nouvelles observations de prédation et des points d'écoute de l'avifaune mériteraient d'être effectués de manière plus régulière entre mi-avril et début juin, période de l'année la plus propice pour observer des oiseaux.

L'étude sur les facteurs abiotiques pouvant influencer sur les propriétés physico-chimiques du buis et potentiellement sur la progression de la pyrale du buis, tels que l'exposition directe au soleil et le stress hydrique, a permis de mettre en évidence des résultats intéressants. Ainsi, les résultats de nos expérimentations en laboratoire ne montrent pas de différence significative d'alimentation des chenilles en fonction de l'emplacement de leur plante hôte, sous ensoleillement direct ou sous couvert végétal. Cela suggère que les chenilles pyrales du buis sont capables de s'alimenter sur des buis de diverses qualités sans que cela n'influe ni sur leur survie, ni sur leur croissance, et qu'elles arrivent à ingérer et exploiter les éléments dont elles ont besoin pour leur protection et leur développement. Ainsi, les différences de dégâts observées *in situ* entre les buis sous couvert végétal et ceux sous ensoleillement direct peuvent s'expliquer par le comportement de ponte des femelles et le choix de la plante hôte. C'est ce que mettent en évidence les résultats de nos expérimentations en laboratoire, avec un nombre d'œufs significativement plus important sur les buis dits « ombragés » que sur les buis dits « ensoleillés ».

Les analyses moléculaires ont déjà permis d'identifier des différences de répartition des métabolites en fonction de l'ensoleillement et du mois de collecte, pour les deux sites d'études, et mériteraient d'être approfondies. Notamment, des analyses moléculaires complémentaires sur les composées volatiles permettraient d'identifier les molécules susceptibles d'avoir un effet attractif sur l'olfaction des femelles pyrales du buis. En parallèle, il serait intéressant d'étudier également, en conditions contrôlées, l'impact du stress hydrique conféré aux plantes hôtes sur le comportement de ponte des femelles.

BIBLIOGRAPHIE

- Belokobylskij, S. A., & Gninenko, Yu. I. (2016). A solitary endoparasitoid (Hymenoptera: Braconidae: Microgastrinae) of the severe Buxus pest *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) in the North Caucasus of Russia. *Zoosystematica Rossica*, 25(2), 248–254. <https://doi.org/10.31610/zsr/2016.25.2.248>
- Bernays, E. A. (1998). The value of being a resource specialist: behavioral support for a neural hypothesis. *The American Naturalist*, 151(5), 451–464.
- Bird, S., Raper, C., Dale-Skey, N., & Salisbury, A. (2020). First records of two natural enemies of box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera : Crambidae), in Britain. *British Journal of Entomology & History*, 33(1), 67–70.
- Brinquin, A.-S., Muller, L., Correard, M., Gili, A., Buradino, M., & Penigot, W. (Submitted). Record of natural pupae parasitoids of the box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae) in France. *Annales de La Société Entomologique de France*.
- Brua, C. (2013). The box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859), exotic invasive species, details of its invasion dynamics in France and Europe, damage to box trees (*Buxus* spp.) and management strategies. *3e Conférence sur l'entretien des Zones Non Agricoles, Toulouse, France, 15-17 octobre 2013*, 365–377.
- Calatayud, P.-A., Desneux, N., & Le Gall, P. (2013). Caractéristiques chimiques des plantes. *Interactions Insectes-Plantes*, 217–228.
- Chen, H. L., Gao, Z. G., Zhou, J. M., & Chen, H. M. (2005). Bionomics of the box tree pyralis, *Diaphania perspectalis* (Walker). *Jiangxi Plant Protection*, 28, 1–4.
- Clausen, C. P. (1940). *Entomophagous insects*. McGraw-Hill book Company, Incorporated.
- Département de la Santé des Forêts. (2020a). *Compte-rendu de la tournée du 14 décembre 2020 consacrée aux défoliations dues à la pyrale du buis en 2020 sur le secteur du Haut-Jura*. 5 pages.
- Département de la Santé des Forêts. (2020b). *La pyrale du buis en forêt : un ravageur exotique très impactant*.
- Département de la Santé des Forêts. (2022). *Compte-rendu de la tournée des 25 et 26 janvier 2022 consacrée aux défoliations dues à la pyrale du buis en 2021 dans le secteur de Saint-Claude*. 11 pages.
- Di Domenico, F., Lucchese, F., & Magri, D. (2012). Buxus in Europe: Late Quaternary dynamics and modern vulnerability. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14(5), 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2012.07.001>

- DRAAF Auvergne - Rhône-Alpes. (2019). La pyrale du buis, un invasif impactant. *Service Régional de l'Alimentation - Pôle Santé des Forêts, Actuaitilté sylvosanitaires n°87*, 3.
- Duvigneaud, J. (1969). Compléments à l'écologie et à la distribution du buis (*Buxus sempervirens* L.) en Belgique. *Bulletin de La Société Royale de Botanique de Belgique*, 102(1), 79–88.
- Espluga, G., & Garcia-Reàdigos, M.-A. (2020). Invasive box-tree moth *Cydalima perspectalis*, a new food resource for Great Spotted Cuckoo *Clamator glandarius*. *Revista Catalana d'Ornitologia*, 36, 70–73.
- Farahani, S., Salehi, M., Farashiani, M., Gilasian, E., Terujeni, S. K., & Ahangaran, Y. (2018). *Compsilura concinnata* (Meigen), parasitoid of box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker) from Iran. *Iranian Journal of Forest and Range Protection Research*, 16(1), 102–105.
- Ferracini, C., Pogolotti, C., Mancardi, P., Miglio, M., Bonelli, S., & Barbero, F. (2022). The Box Tree Moth: An Invasive Species Severely Threatening *Buxus* Natural Formation in NW Italy. *Forests*, 13(2), 178.
- FIBOIS. (2018). *Relevé de décisions de la réunion "pyrale du buis" organisée le 27 septembre 2018 à la Maison de la Forêt et du Bois*. 3 pages.
- García-Robledo, C., & Horvitz, C. C. (2012). Parent–offspring conflicts, “optimal bad motherhood” and the “mother knows best” principles in insect herbivores colonizing novel host plants. *Ecology and Evolution*, 2(7), 1446–1457.
- Göttig, S. (2017). *Development of eco-friendly methods for monitoring and regulating the box tree pyralid, Cydalima perspectalis (Lepidoptera: Crambidae), an invasive pest in ornamentals* [Technische Universität Darmstadt]. <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/id/eprint/6855>
- Göttig, S., & Herz, A. (2016). Are egg parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) promising biological control agents for regulating the invasive Box tree pyralid, *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae)? *Biocontrol Science and Technology*, 26(11), 1471–1488. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1211990>
- Gripenberg, S., Mayhew, P., Parnell, M., & Roslin, T. (2010). A meta-analysis of preference–performance relationships in phytophagous insects. *Ecology Letters*, 13(3), 383–393.
- Herz, A. (2013). 1000 Arten für den Pflanzenschutz–die Vielfalt der Nützlinge schützen, fördern und nutzen! *Julius-Kühn-Archiv*, 436, 54.
- Hopper, K. R. (1999). Risk-spreading and bet-hedging in insect population biology. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 535–560.
- Hulujan, B., Florian, T., Florian, C., & Oltean, I. (2021). Zoophagous entomofauna and entomopathogenic agents reported on *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) in north-western of Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(1), 11786.
- Jaenike, J. (1978). On optimal oviposition behavior in phytophagous insects. *Theoretical Population Biology*, 14(3), 350–356. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(78\)90012-6](https://doi.org/10.1016/0040-5809(78)90012-6)

- Jaenike, J. (1990). Host specialization in phytophagous insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 243–273.
- Kenis, M., Nacambo, S., Leuthardt, F. L. G., Domenico, F. di, & Haye, T. (2013). The box tree moth, *Cydalima perspectalis*, in Europe: horticultural pest or environmental disaster? *Aliens: The Invasive Species Bulletin*, 33, 38–41.
- Lenoble, F., & Broyer, C. (1945). Sur la distribution du *Buxus sempervirens* L. en France. *Bulletin de La Société Botanique de France*, 92(7–8), 118–131. <https://doi.org/10.1080/00378941.1945.10834422>
- Leuthardt. (2010). Ausbreitung des Buchsbaumzünslers *Diaphania perspectalis* (Lepidoptera, Pyralidae) in der Region Basel—eine für die Schweiz neue Schädlingsart. *Entomo Helvetica*, 3(1), 51–57.
- Leuthardt, & Baur, B. (2013). Oviposition preference and larval development of the invasive moth *Cydalima perspectalis* on five European box-tree varieties. *Journal of Applied Entomology*, 137(6), 437–444. <https://doi.org/10.1111/jen.12013>
- Leuthardt, Glauser, G., & Baur, B. (2013). Composition of alkaloids in different box tree varieties and their uptake by the box tree moth *Cydalima perspectalis*. *Chemoecology*, 23(4), 203–212. <https://doi.org/10.1007/s00049-013-0134-1>
- López, C., Las Heras, S., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E., & Eizaguirre, M. (2022). Survey of Natural Enemies of the Invasive Boxwood Moth *Cydalima perspectalis* in Southwestern Mediterranean Europe and Biocontrol Potential of a Native *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. Strain. *Insects*, 13(9), 781.
- Mally, R., & Nuss, M. (2010). Phylogeny and nomenclature of the box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) comb. n., which was recently introduced into Europe (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae: Spilomelinae). *European Journal of Entomology*, 107(3), 393–400.
- Marinkovic, M., & Kraak, M. (2010). Development of an easily made artificial sediment that reduces experimental variability. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting*, 21, 95–101.
- Martini, A., Vitantonio, C.-D., & Dindo, M.-L. (2019). Acceptance and suitability of the box tree moth *Cydalima perspectalis* as host for the tachinid parasitoid *Exorista larvarum*. *Bulletin of Insectology*, 72(1), 150–160.
- Mayhew, P. (1997). Adaptive patterns of host-plant selection by phytophagous insects. *Oikos*, 417–428.
- Mitchell, R., Chitanava, S., Dbar, R., Kramarets, V., Lehtijärvi, A., Matchutadze, I., Mamadashvili, G., Matsiakh, I., Nacambo, S., & Papazova-Anakieva, I. (2018). Identifying the ecological and societal consequences of a decline in *Buxus* forests in Europe and the Caucasus. *Biological Invasions*, 20(12), 3605–3620. <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1799-8>

- Moreau, J., & Thiéry, D. (2013). *Qualité de la plante hôte et succès reproducteur*. Editions Quae IRD Editions.
- Mostini, L. (2018). Bird predation on larvae of the box tree moth, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859). *Rivista Italiana Di Ornitologia*, 88(2), 45–46.
- Nacambo, S. (2012). *Parasitisme, développement, modèle climatique et impact de Cydalima perspectalis en Europe* [MSc-thesis]. University of Neuchatel, Switzerland.
- Renwick, J. A. A. (1989). Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. *Experientia*, 45(3), 223–228.
- Renwick, J. A. A., & Chew, F. S. (1994). Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 377–400.
- Savill, P. (2013). *Buxus sempervirens L.-box*. Ed. 2, 48–51. <https://doi.org/10.1079/9781780640266.0048>
- She, D., & Feng, F. (2006). Bionomics and Control of *Diaphania perspectalis*. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology*, 26(6), 47.
- Shi, H., & Hu, K. (2007). Occurrence regulation and control techniques of *Diaphania perspectalis*. *Hubei Agric Sci*, 46, 76–78.
- Shima, H. (1973). New host records of Japanese Tachinidae (Diptera:Calyptrata). *Sieboldia*, 4, 153–160.
- Thiéry, D., Derridj, S., Calatayud, P.-A., Maher, N., & Marion-Poll, F. (2013a). L'insecte au contact des plantes. *Interactions Insectes-Plantes*, 4, 347–368.
- Thiéry, D., Brévault, T., Quilici, S., Dormont, L., & Schatz, B. (2013b). Recherche de la plante hôte à distance. *Interactions Insectes-Plante*, 4, 319–346.
- Thompson, J. (1988). Evolutionary ecology of the relationship between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 47(1), 3–14. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1988.tb02275.x>
- UEFM - INRAE. (2019). *Compte rendu Projet BIOPYR*.
- Vachnadze, N. S., Vachnadze, V. Y., Jakeli, E. Z., & Tsakadze, D. M. (2009). Alkaloids of *Buxus colchica*, *B. sempervirens*, and *B. balearica* growing in Georgia. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(6), 936–938.
- Venard, M., Formez, N., Rocher, F., Colombel, E., Correard, M., Gilg, O., Baubet, O., Thevenet, J., Brinquin, A.-S., & Martin, J.-C. (2019). Réguler la pyrale du buis en milieu naturel. *Phytoma*, 723, 28–33.

- Wan, H., Haye, T., Kenis, M., Nacambo, S., Xu, H., Zhang, F., & Li, H. (2014). *Biology and natural enemies of *Cydalima perspectalis* in Asia: Is there biological control potential in Europe?* *138*(10), 715–722. <https://doi.org/10.1111/jen.12132>
- West, S., & Cunningham, J. (2002). A General Model for Host Plant Selection in Phytophagous Insects. *Journal of Theoretical Biology*, *214*(3), 499–513. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2001.2475>
- Zhao, P. B., Ren, A. Z., & Du, X. L. (2004). Studies on regularity of outbreak and control of *Diaphania perspectalis* (Walter). *Shandong Agric. Sci*, 43–44.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Fiches descriptives des sites d'études dans le Jura.

ANNEXE 2 : Fiches descriptives des sites d'études sur le Mont Ventoux.

ANNEXE 3 : Tableau récapitulatif des méthodes d'échantillonnage de l'entomofaune associée au buis, utilisées sur les différents sites d'études pour les périodes de juin et d'août 2021 et 2022.

ANNEXE 4 : Tableau récapitulatif de l'évolution de l'état sanitaire des buis et de la pression de la *Cydalima perspectalis* sur les différents sites d'études pour les périodes de juin et d'août 2021 et 2022.

ANNEXE 5 : Exemple de boîtes d'élevage utilisées au cours de l'étude.

ANNEXE 6 : Les différents stades de développement de la pyrale du buis, *Cydalima perspectalis*.

ANNEXE 7 : Fiche de relevés utilisé pour les points d'écoute avifaune.

ANNEXE 8 : Définitions des fonctions écologiques et des régimes alimentaires des Arthropodes échantillonnés.

ANNEXE 9 : Conditions expérimentales des analyses moléculaires réalisées par l'Université de Toulouse III (Plateau MetaboHUB – MetaToul – AgromiX).

ANNEXE 1 : Fiches descriptives des sites d'études dans le Jura.

JURA	Type d'observations et de prélèvements effectués :	Années :
Site 2	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements de l'entomofaune associée au buis par battages (juin et août) 	2021
	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements de l'entomofaune associée au buis par l'utilisation de filets (août uniquement) 	2022

The image block contains four photographs arranged in a 2x2 grid. The top-left photo shows a forest with trees showing autumnal colors (yellow and orange) against a blue sky. The top-right photo shows a person in a blue shirt and dark pants using a white net to catch insects in a dense forest. The bottom-left photo shows a view of a forest with a road and hills in the background under a cloudy sky. The bottom-right photo shows a forest with trees showing autumnal colors, similar to the top-left photo.

JURA	Type d'observations et de prélèvements effectués :	Années :
Site 3	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements de l'entomofaune associée au buis par battages (juin et août) 	2021
	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements de l'entomofaune associée au buis par l'utilisation de filets (juin et août) 	2022



JURA	Type d'observations et de prélèvements effectués :	Années :
Site 4	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements de l'entomofaune associée au buis par battages (juin et août) - Prélèvements de l'entomofaune associée au buis par l'utilisation de filets (août uniquement) 	2021
	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements de l'entomofaune associée au buis par l'utilisation de filets (juin et août) 	2022



JURA	Type d'observations et de prélèvements effectués :	Années :
	- /	2021
Site 5	- Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Point d'écoute et observations pour l' <u>avifaune</u> prédatrice de la pyrale du buis (juin) - Prélèvements de l'entomofaune associée au buis par l'utilisation de <u>filets</u> (juin et août)	2022



JURA	<i>Type d'observations et de prélèvements effectués :</i>	<i>Années :</i>
Site BE	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements des rameaux de buis ensoleillé (BE) pour les essais en laboratoire sur l'alimentation des chenilles <i>Cydalima perspectalis</i> 	2021
	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements des rameaux de buis ensoleillé (BE) pour les essais en laboratoire sur le comportement de ponte des papillons femelles <i>Cydalima perspectalis</i> 	2022



JURA	Type d'observations et de prélèvements effectués :	Années :
Site BO	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements des rameaux de buis ombragé (BO) pour les essais en laboratoire sur l'alimentation des chenilles <i>Cydalima perspectalis</i> 	2021
	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements des rameaux de buis ombragé (BO) pour les essais en laboratoire sur le comportement de ponte des papillons femelles <i>Cydalima perspectalis</i> 	2022



ANNEXE 2 : Fiches descriptives des sites d'études sur le Mont Ventoux.

VENTOUX	Type d'observations et de prélèvements effectués :	Années :
Site BE	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements des rameaux de buis ensoleillé (BE) pour les essais en laboratoire sur l'alimentation des chenilles <i>Cydalima perspectalis</i> 	2021
	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements des rameaux de buis ensoleillé (BE) pour les essais en laboratoire sur le comportement de ponte des papillons femelles <i>Cydalima perspectalis</i> 	2022



VENTOUX	Type d'observations et de prélèvements effectués :	Années :
Site BO	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements des rameaux de buis ombragé (BO) pour les essais en laboratoire sur l'alimentation des chenilles <i>Cydalima perspectalis</i> 	2021
	<ul style="list-style-type: none"> - Observations de l'état sanitaire des buis - Observations du niveau d'infestation des buis par <i>Cydalima perspectalis</i> - Prélèvements des rameaux de buis ombragé (BO) pour les essais en laboratoire sur le comportement de ponte des papillons femelles <i>Cydalima perspectalis</i> 	2022



ANNEXE 3 : Tableau récapitulatif des méthodes d'échantillonnage de l'entomofaune associée au buis, utilisées sur les différents sites d'études pour les périodes de juin et d'août 2021 et 2022.

Date de campagne	Sites	Méthodes d'échantillonnage	Nombre d'arbres échantillonnés	Nombre de passages par arbre
Juin 2021 (14/06/2021)	Jura (39) Site 2	Battage	2	3
	Jura (39) Site 3	Battage	3	3
	Jura (39) Site 4	Battage	3	3
Août 2021 (31/08/2021)	Jura (39) Site 2	Battage	3	3
	Jura (39) Site 3	Battage	3	3
	Jura (39) Site 4	Battage Filet	3 8	3 1
Juin 2022 (13/06/2022)	Jura (39) Site 2	NA	NA	NA
	Jura (39) Site 3	Filet	10	1
	Jura (39) Site 4	Filet	6	1
	Jura (39) Site 5	Filet	10	1
Août 2022 (22/08/2022)	Jura (39) Site 2	Filet	10	3
	Jura (39) Site 3	Filet	10	3
	Jura (39) Site 4	Filet	10	3
	Jura (39) Site 5	Filet	10	3

ANNEXE 4 : Tableau récapitulatif de l'évolution de l'état sanitaire des buis et de la pression de la *Cydalima perspectalis* sur les différents sites d'études pour les périodes de juin et d'août 2021 et 2022.

Département / Site	Date observation	OBSERVATIONS PYRALES DU BUIS		OBSERVATIONS BUIS	
		Pression pyrale	Commentaires pyrale	Etat des buis	Commentaires buis
Jura (39) Site 2	14/06/2021	Faible à Moyen	Attaque faible de cette année, pression d'alimentation plus forte en l'année N-1. Observation d'une pré-nymphe, l'émergence des papillons ont déjà eu lieu.	En repousse	Buis peu touchés cette année, mais très touchés par les attaques précédentes. Globalement les individus sont en repousse.
Jura (39) Site 3	14/06/2021	Faible	Faible attaque de cette année, observation de 3 pyrales au stade L5L6.	En repousse	Buis peu touchés par des dégâts d'alimentation de cette année. Buis en sous- étage globalement peu feuillus.
Jura (39) Site 4	14/06/2021	Forte	Attaque forte de cette année. Observation de nombreuses chenilles stade L5L6. Absence de chrysalides/	Très attaqués	Buis très touchés par les attaques des années précédentes. En préfoliation depuis cette année.
Jura (39) Site 2	30/08/2021	Faible	Faible attaque de cette année. Observation de deux individus au stade L4. Les chenilles sont rabougries (peut-être dû au buis sec).	En repousse	Buis peu touchés par les attaques de cette année. Belle repousse sur l'ensemble des individus.
Jura (39) Site 3	30/08/2021	Faible	Faible attaque de cette année. Absence d'observation de pyrale. Observation et prélèvement d'un potentiel parasitoïde.	En repousse	Buis peu touchés par les dégâts d'alimentation. Un individu (A2) est plus touché par la pyrale que les autres arbres échantillonnés.
Jura (39) Site 4	30/08/2021	Forte	Forte attaque de pyrale sur les repousses des buis. Observation de pyrale au stade L2L3. Prélèvement de potentiels parasitoïdes.	Très attaqués	La plupart des buis sont mort par les attaques précédentes de la pyrale. Des dégâts d'alimentation de cette année sont présents sur les repousses.
Jura (39) Site 2	13/06/2022	Absence	Absence d'attaque d'alimentation de la pyrale	Bon	Buis en bonne santé.

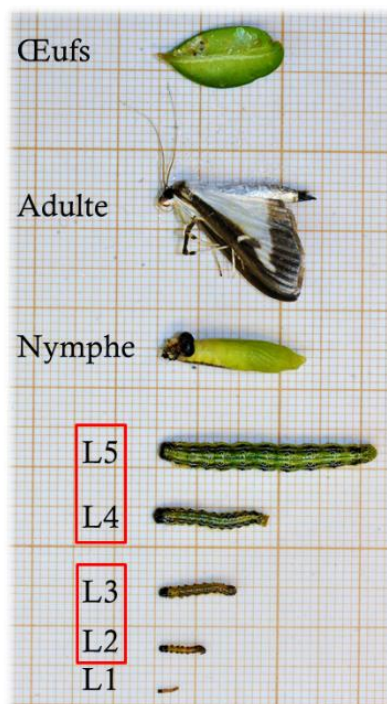
Jura (39) Site 3	13/06/2022	Faible	Très faibles traces d'alimentation. Absence d'observation de pyrale.	En repousse	Belles repousses des buis, en bon état général. Végétation environnante (ronce s'est beaucoup développé).
Jura (39) Site 4	13/06/2022	Faible à moyen	Faibles dégâts d'alimentation. Absence d'observation de pyrale.	En repousse	Belles repousses sur certains individus de buis.
Jura (39) Site 5	13/06/2022	Faible	Faibles dégâts d'alimentation. Absence d'observation de pyrale.	En repousse	Belles repousses sur certains individus de buis.
Jura (39) Site 2	22/08/2022	Faible	Très faibles dégâts d'alimentation. Pas de pyrales observées mais quelques crottes sur rameaux de l'année.	Bon	Sur zone d'échantillonnage, bon état (à l'ombre), mais aux alentours, les buis ensoleillés ont souffert de la sécheresse (encore feuillés mais entièrement jaunes).
Jura (39) Site 3	22/08/2022	Faible	Faibles dégâts d'alimentation. Présence de crottes vertes de chenilles L1-L2, notamment près du tronc sur les feuilles humides en contact avec les mousses, mais pas de pyrales observées.	Bon	En bon état général.
Jura (39) Site 4	22/08/2022	Faible	Faibles dégâts d'alimentation. Absence d'observation de pyrale.	En repousse	Belles repousses sur certains individus de buis. D'autres plants de buis sont complètement secs.
Jura (39) Site 5	22/08/2022	Faible	Faibles dégâts d'alimentation. Absence d'observation de pyrale. Présence de crottes sèches	En repousse	Belles repousses de l'année, bien vertes.

ANNEXE 5 : Exemple de boîtes d'élevage utilisées au cours de l'étude.

Dès éclosion, les chenilles sont mises en élevage avec du feuillage frais, les rameaux étant piqués dans un pain d'oasis bien humidifié. Un film alimentaire étirable aura été placé au préalable dans la boîte d'élevage afin que les chenilles ne se retrouvent pas en contact direct avec l'eau stagnante du fond. Les couvercles sont percés et grillagés, laissant l'air circuler dans les boîtes.



ANNEXE 6 : Les différents stades de développement de la pyrale du buis, *Cydalima perspectalis*.



ANNEXE 7 : Fiche de relevés utilisée pour les points d'écoute avifaune.

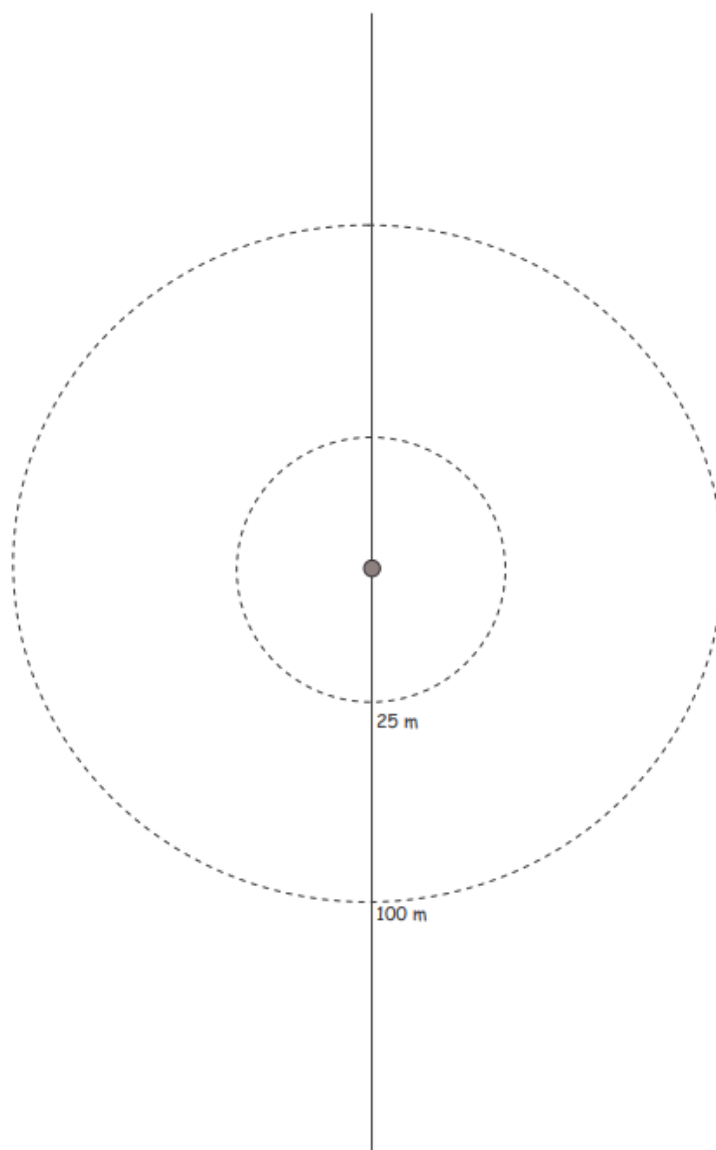
N° site :

Opérateur :

Date : / /

Heure :

Météo :



ANNEXE 8 : Définitions des fonctions écologiques et des régimes alimentaires des Arthropodes échantillonnés.

Carpophage : *organisme se nourrissant des fructifications des végétaux.*

Hématophage : *organisme se nourrissant principalement de sang.*

Microphage : *organisme se nourrissant de particules alimentaires de très petite taille.*

Mycétophage : *organisme se nourrissant de champignons (mycètes, spores).*

Nectarivore : *organisme se nourrissant de nectar.*

Nécrophage : *organisme se nourrissant de cadavres et de matières animales en décomposition.*

Parasitoïde : *organisme qui se développe sur ou à l'intérieur d'un autre organisme (son hôte) et entraîne toujours la mort de l'hôte.*

Phytophage : *organisme se nourrissant de matières végétales (feuilles, graines, fruits, nectar, bois...).*

Polyphage (définition spécifique de notre étude) : *organisme se nourrissant d'aliments variés mais n'incluant pas la prédation de Lépidoptères dans son régime alimentaire de manière ni opportuniste ni spécialiste.*

Potentiel prédateur (définition spécifique de notre étude) : *organisme polyphage incluant dans son régime alimentaire la prédation de Lépidoptères de manière opportuniste ou spécialiste.*

Prédateur : *organisme se nourrissant exclusivement de proies.*

Saprophage : *organisme se nourrissant de matières d'origine végétale ou animale déjà transformées ou en voie de décomposition.*

Xylophage : *Qui se nourrit de tissus ligneux (bois).*

ANNEXE 9 : Conditions expérimentales des analyses moléculaires réalisées par l'Université de Toulouse III (Plateau MetaboHUB – MetaToul – AgromiX).

a) Conditions expérimentales



Analyses LC-MS

Les analyses ont été réalisées par LC-HRMS avec un spectromètre de masse Q-Exactive Plus (ThermoScientific) couplé à une chaîne U-HPLC (Vanquish modèle H, Thermo Scientific).

- Colonne: Phenomenex Luna Omega Polar C18 1.6 µm, 150 × 2.1 mm
- T° colonne: 40 °C
- Débit : 400 µL/min
- Solvant A: Eau+ 0.05 % Acide Formique
- Solvant B: Acétonitrile + 0.05 % Acide Formique
- Volumes d'injection: 2 µL

Gradient LC :

Temps	%A	%B
0	98	2
0.5	98	2
8	30	70
9	2	98
12	2	98
12.1	98	2
14	98	2

Acquisitions :

- ∅ Spectromètre de masse (QExactive plus, ThermoScientific),
 - Ionisation HESI en mode positif et négatif.
 - Acquisition en mode Full MS (100 à 1500 Da)
 - Fragmentation en mode CID avec rampe de collision d'énergie de 20 à 60 eV des 6 ions majoritaires de chaque scan
- ∅ Acquisitions contrôlées par le logiciel Xcalibur

b) Traitement des chromatogrammes

Les profils LCMS ont été traités à l'aide du logiciel MS-DIAL ver.4.90 [3]. Le traitement des profils comprend plusieurs étapes successives permettant d'obtenir une liste de l'ensemble des pics (m/z × RT) détectés dans les échantillons ainsi que leurs aires respectives. MSCleanR a été utilisé pour la concaténation des données ESI pos et ESI neg et l'obtention de la liste de pic finale (MSCleanR v1.0 [4]). Les pics ont été annotés en se basant sur leurs masses exactes (Δppm = 5) et leurs empreintes de fragmentation MS/MS :

- Soit à l'aide des bases de données de spectres expérimentaux acquis sur les standards analytiques du plateau ou disponible sur internet (Annotation niveau 2) ;
- Soit à l'aide de la base interne au plateau-AgromiX comprenant 500 000 composés.

Les composés ou familles de classes chimiques retrouvés dans le genre *Buxus* ont été priorisés suivis par ceux de la famille des *Buxaceae* puis ceux appartenant aux bases de données génériques des plantes (KnapSack, UNPD, CheBi, HMDB). L'annotation est basée sur un classement de la structure la plus probable en fonction de sa masse exacte et de son empreinte de fragmentation HRMS/MS ($\Delta ppm = 15$) par rapport à une empreinte théorique du produit candidat calculé *in silico* à l'aide du logiciel MSFinder v 3.52 [5] (Annotation niveau 3). Un score d'annotation supérieur à 10 est considéré comme une annotation très probable qui a matché dans la base de données du genre.

c) Contrôle qualité

Critère	Conformité	Résultat
Instrument contrôlé et calibré	ok	OK
Contrôle de la variation de pression entre 2 injections successives	< 80 bars	OK
Différence de RT entre 2 injections successives	< 0.5 min	OK
Effet mémoire	Pas de variation de pics de blanc (S/N<3)	OK

d) Bibliographie

- Chervin, J.; Perio, P.; Martins-Froment, N.; Pharkeovilay, C.; Reybier, K.; Nepveu, F.; Fabre, N.; Talou, T.; Bonzon-Ponnet, V.; Marti, G. Dereplication of Natural Products from Complex Extracts by Regression Analysis and Molecular Networking: Case Study of Redox-Active Compounds from *Viola Alba* Subsp. *Dehnhardtii*. *Metabolomics* 2017, 13, doi:10.1007/s11306-017-1227-6.
- Phakeovilay, C.; Bourgeade-Delmas, S.; Perio, P.; Valentin, A.; Chassagne, F.; Deharo, E.; Reybier, K.; Marti, G. Antileishmanial Compounds Isolated from *Psidium Guajava* L. Using a Metabolomic Approach. *Molecules* 2019, 24, 4536, doi:10.3390/molecules24244536.
- Tsugawa, H.; Cajka, T.; Kind, T.; Ma, Y.; Higgins, B.; Ikeda, K.; Kanazawa, M.; VanderGheynst, J.; Fiehn, O.; Arita, M. MS-DIAL: Data-Independent MS/MS Deconvolution for Comprehensive Metabolome Analysis. *Nat. Methods* 2015, 12, 523–526, doi:10.1038/nmeth.3393.
- Fraisier-Vannier, O.; Chervin, J.; Cabanac, G.; Puech-Pages, V.; Fournier, S.; Durand, V.; Amiel, A.; Andre, O.; Benamar, O.A.; Tsugawa, H.; et al. MS-CleanR: A Feature-Filtering Workflow for Untargeted LC-MS Based Metabolomics. *Anal. Chem.* 2020, doi:10.1021/acs.analchem.0c01594.
- Tsugawa, H.; Kind, T.; Nakabayashi, R.; Yukihiro, D.; Tanaka, W.; Cajka, T.; Saito, K.; Fiehn, O.; Arita, M. Hydrogen Rearrangement Rules: Computational MS/MS Fragmentation and Structure Elucidation Using MS-FINDER Software. *Anal. Chem.* 2016, doi:10.1021/acs.analchem.6b00770.