

Développement d'une méthode de type "attract-and-kill" dans le cadre d'une stratégie de lutte biologique contre les taupins du genre *Agriotes* spp

Auteur : Smeets, Thibaut

Promoteur(s) : Verheggen, François

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : gestion des forêts et des espaces naturels, à finalité spécialisée

Année académique : 2021-2022

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/16119>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Développement d'une méthode de type
"attract-and-kill" dans le cadre d'une stratégie de lutte
biologique contre les taupins du genre *Agriotes* spp.

Thibaut Smeets

TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME
DE MASTER BIOINGÉNIEUR EN GESTION DES FORÊTS ET DES ESPACES
NATURELS

Année académique 2021-2022

Co-promoteurs : Verheggen François, Chacon Andrea

© Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique¹ de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

1. Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par le(s) promoteur(s) membre du personnel(s) enseignant de GxABT

Développement d'une méthode de type
"attract-and-kill" dans le cadre d'une stratégie de lutte
biologique contre les taupins du genre *Agriotes* spp.

Thibaut Smeets

TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME
DE MASTER BIOINGÉNIEUR EN GESTION DES FORÊTS ET DES ESPACES
NATURELS

Année académique 2021-2022

Co-promoteurs : Verheggen François, Chacon Andrea

Remerciements

Je tiens à remercier François Verheggen pour son aide précieuse, ses nombreux conseils et la patience dont il aura fait preuve dans le cadre de cette expérience. Je remercie également Andrea Chacon dont l'encadrement sans failles m'aura permis de mener à bien ce mémoire dans le calme et la sérénité ainsi que d'en apprendre beaucoup plus sur l'importance de la solidarité avec la Colombie. Merci également à Fanny Ruhland et Julie Bonnet sans l'aide de qui mes soirées au Terra se seraient probablement prolongées dans les petites heures de la nuit. Merci aussi à Clément Martin, Chloé Galland, Solène Travaillard, Antoine Boullis, Solène Blanchard et Nicolas Leroy pour les bons conseils et les pauses café enrichissantes passées ensemble. Finalement, merci à Yves Brostaux pour l'aide qu'il m'aura apportée dans l'analyse statistique de mes données.

Je voudrais également remercier mes parents qui m'auront donné la possibilité de réaliser 5 belles années au sein de ces vieux murs de Gembloux et le reste de ma famille pour leur soutien, qui m'aura aidé à traverser les moments de doute de cette partie de ma vie.

Finalement, merci à mes amis Théo Tran, Sylvain Volon, Arnaud Laurent, Gabriel Verbois et Jorge Ricardo Lai pour les innombrables soirées passées à rire, débattre, discuter, philosopher, rêver ou évoquer avec nostalgie les moments passés. Merci également à Xavier Saintmard, Rechul Arno, Alexandre Buche, Julien Denis, mes kokoteurs et mes amis qui m'auront permis de vivre 5 années plus belles les unes que les autres.

Résumé

Les larves de taupins du genre *Agriotes* spp. sont des ravageurs polyphages et telluriques des cultures. Ces insectes se nourrissent des parties souterraines des plantes et provoquent des dégâts économiques importants en agriculture. Pendant des années, divers produits phytopharmaceutiques comme les néonicotinoïdes ont permis de contrôler efficacement ces ravageurs. Les restrictions de plus en plus contraignantes sur l'utilisation de ces produits poussent cependant au développement de méthodes de lutte alternatives durables et respectueuses de l'environnement. Ce mémoire avait pour objectif de développer une méthode de lutte de type "attract-and-kill", une stratégie mettant en jeu des substances naturelles et attractives pour les insectes cibles, associées à des microorganismes devant les mettre à mort.

Un extrait naturel de pomme de terre a été encapsulé dans des billes d'alginate, ces dernières devant permettre la diffusion des odeurs dans le sol sur une longue durée. A l'aide d'olfactomètres à deux voies, nous avons démontré que cet extrait naturel est hautement attractif pour les larves, 76 % d'entre elles se sont dirigées vers les billes odorantes. Malheureusement, l'ajout de composés synthétiques tels que le 2-pentylfuran et le 2-undecanone n'a pas amélioré l'attractivité du leurre. Des prélèvements d'odeurs ont également été réalisés sur les billes d'alginate afin de caractériser les composés sémiocchimiques de l'extrait naturel effectivement émis par ces billes. Malgré une grande variabilité, nous avons mis en évidence que l'acétoïne était systématiquement émise en grandes quantités, et pourrait donc être responsable de l'attractivité des billes.

Ensuite, la virulence de onze souches de nématodes entomopathogènes et de deux insecticides naturels a été évaluée sur les larves de taupins. Quatre souches : HB e-nema (souche commerciale), HB1, HB2 et SI ont été très efficaces pour tuer les larves de taupins (88 %, 53 %, 53 % et 50 % de mortalité au bout de 6 semaines respectivement). Les insecticides naturels n'ont, quant à eux, pas atteint une efficacité significativement différente du contrôle au bout de 3 semaines.

Ce travail permet d'ouvrir la voie vers la co-encapsulation au sein de billes d'alginate de souches virulentes de nématodes et de composés attractants.

Abstract

Wireworms of the genus *Agriotes* spp. are polyphagous and telluric pests of crops. These insects feed on underground plant parts and cause significant economic damage in agriculture. For years, various plant protection products such as neonicotinoids have been effective in controlling these pests. However, the increasingly restrictive legislation on the use of these products urge the need to develop sustainable and environmentally friendly alternative control methods. The purpose of this work was to develop an "attract-and-kill" type of control method, a strategy involving natural substances that are attractive to target insects, associated with microorganisms that are meant to kill them.

A natural potato extract has been encapsulated in alginate beads, the latter allowing the diffusion of odours in the soil over a long period of time. Using two-way olfactometers, we have shown that this natural extract is highly attractive to larvae, 76 % of which have gone to the fragrant beads. Unfortunately, the addition of synthetic compounds such as 2-pentylfuran and 2-undecanone did not improve the lure's appeal. Odour sampling was also carried out on the alginate beads in order to characterize the semiochemical compounds of the natural extract actually emitted by these beads. Despite great variability, we have shown that acetoin is systematically emitted in large quantities, and could therefore be responsible for the attractiveness of the lure.

Then, the virulence of eleven strains of entomopathogenic nematodes and two natural insecticides was evaluated on wireworm larvae. Four strains : HB e-nema (commercial strain), HB1, HB2 and SI were very effective in killing wireworm larvae (88 %, 53 %, 53 % and 50 % mortality after 6 weeks respectively). Natural insecticides, on the other hand, have not achieved a significantly different efficacy from control after 3 weeks.

This work paves the way for co-encapsulation within alginate beads of virulent strains of nematodes and attractants.

Liste des abréviations

- **BEP** : Bactérie Entomopathogène
- **CCDS** : *Colony Collapse Disorder Syndrome*
- **CEP** : Champignon Entomopathogène
- **COV** : Composé Organique Volatil
- **CRE** : Capacité de Rétention d'Eau
- **GC-MS** : Gas chromatography-mass spectrometry
- **ILVO** : Institut de Recherche Flamand pour l'Agriculture, les Pêcheries et l'Alimentation
- **IRBAB** : Institut Royal Belge pour l'Amélioration de la Betterave
- **JI** : Juvénile Infectieux
- **NEP** : Nématode Entomopathogène
- **PPP** : Produit de Protection des Plantes

Table des matières

1 Synthèse bibliographique	1
1.1 Introduction	1
1.2 Les taupins	3
1.2.1 Diversité et description morphologique	3
1.2.2 Régime alimentaire et mécanismes d'attraction	4
1.2.3 Cycle biologique et milieu de vie	6
1.3 La problématique du taupin en agriculture et les méthodes de lutte chimique . .	8
1.3.1 Résurgence des taupins	8
1.3.2 Dégâts aux cultures	8
1.3.3 Produits chimiques actuellement employés	9
1.3.4 Situation en Belgique	11
1.4 Les méthodes de lutte alternatives	12
1.4.1 Méthodes non biologiques	12
1.4.2 Ennemis naturels et lutte biologique	14
1.5 La méthode attract-and-kill	17
2 Objectifs et hypothèses	20
3 Matériel et méthodes	21
3.1 Collecte et conservation du matériel vivant	21
3.1.1 Les taupins	21
3.1.2 Populations de nématodes entomopathogènes	22
3.2 Tests comportementaux	24
3.2.1 Formulation de billes d'alginate	24
3.2.2 Évaluation de l'attractivité de composés odorants	25
3.3 Caractérisation de l'odeur des billes d'alginate	27
3.3.1 Prélèvements d'odeurs	27
3.3.2 Analyse des odeurs	28
3.4 Évaluation de la virulence de 11 souches des nématodes entomopathogènes et sélection de souches prometteuses	29
3.5 Efficacité de deux insecticides naturels	30
3.6 Analyses statistiques	31
4 Résultats et discussion	33
4.1 Tests comportementaux	33
4.2 Caractérisation de l'odeur des billes d'alginate	36
4.3 Évaluation de la virulence de souches de nématodes entomopathogènes et sélec- tion de souches prometteuses	40
4.4 Efficacité de deux insecticides naturels	44
5 Conclusion et perspectives	46
6 Bibliographie	48
7 Annexes	59

Table des figures

1	(a) <i>Agriotes obscurus</i> L. adulte [41]; (b) Larve d' <i>Agriotes</i> sp. [42]	4
2	Cycle de développement d' <i>Agriotes obscurus</i> L. [73]	7
3	Méthodes alternatives de lutte contre les taupins avec, pour chaque groupe, quelques exemples. [19]	12
4	Cycle de vie généralisé du complexe nématodes entomopathogènes/bactérie dans une larve de lépidoptère [111].	16
5	Représentation de la méthode "attract-and-kill" combinant un attractant et des nématodes entomopathogènes dans une formulation d'alginate sous forme de bille [26]	17
6	Carte des zones et périodes de collectes de larves de taupins.	21
7	Boîte d'élevage utilisée pour conserver les taupins.	22
8	Dispositif de reproduction et collecte des nématodes entomopathogènes <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> Poinar.	24
9	Dispositif olfactométrique utilisé dans le cadre des tests comportementaux.	26
10	Dispositif de prélèvement des odeurs de billes d'alginate.	28
11	Observation à la loupe binoculaire de nématodes entomopathogènes suite à la dissection d'un taupin mort.	29
12	Boîtes dans lesquelles s'est déroulée l'expérience visant à évaluer l'effet biocide de deux produits insecticides sous forme de granulés	31
13	Résultat des tests comportementaux visant à évaluer l'attractivité du jus de pomme de terre dans des billes d'alginate. Le côté contrôle représente des billes sans odeurs (sans jus de pomme de terre).	33
14	Résultat des tests comportementaux visant à évaluer l'attractivité de différentes molécules synthétiques, en association avec du jus de pomme de terre, dans des billes d'alginate. (A) = odeur de pomme de terre, (B) = odeur de pomme de terre et 2-pentylfuran, (C) = odeur de pomme de terre et 2-undecanone, (D) = odeur de pomme de terre et 2-pentylfuran + 2-undecanone.	34
15	Partie de chromatogramme obtenu au cours des prélèvements de billes d'alginate contenant du jus de pomme de terre (24 heures de prélèvement, 2 grammes de billes et bain marie à 30 °C).	36
16	Résultat du prélèvement d'odeurs des billes de pomme de terre. Les quantités émises sont exprimées en ng.g ⁻¹ de billes.h ⁻¹ de prélèvement.	38
17	Évolution de la probabilité de survie des taupins du genre <i>Agriotes</i> spp. en fonction du temps après infection par des nématodes entomopathogènes. Contrôle = pas de nématodes, SF insectosphère, SC e-nema et HB e-nema = souches commerciales, SF = <i>Steinernema feltiae</i> Filipjev, SC = <i>Steinernema carpocapsae</i> Weiser, HB = <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> Poinar, SI = <i>Steinernema</i> sp., GBX.W = souche locale en cours d'identification.	41
18	Évolution de la probabilité de survie des larves d' <i>Agriotes</i> spp. en fonction du nombre de jours après l'application de la formulation. P1 = Pyrèthre naturel (8 g.Kg ⁻¹ de granulés), P2 = Pyrèthre naturel (16 g.Kg ⁻¹ de granulés), H1 = Huile essentielle (8 g.Kg ⁻¹ de granulés), H2 = Huile essentielle (16 g.Kg ⁻¹ de granulés), T- = Témoin négatif, T+ = Cyperméthrine (10 g.l ⁻¹), The = Mise en contact direct avec les granulés (16 g.Kg ⁻¹), Tpy = mise en contact direct avec les granulés (16 g.Kg ⁻¹).	44

19	Modèle vierge d'encodage des résultats des tests comportementaux en olfactomètres à deux voies.	59
20	Résultat des prélèvements d'odeurs de billes d'alginate pré-tests (1 gramme, 24 heures de prélèvement, 21 °C).	60
21	Partie de chromatogramme obtenu au cours des prélèvements de billes d'alginate contenant du jus de pomme de terre, du 2-pentylfuran et du 2-undecanone (1 grammes de billes, 2 heures de prélèvement, 21 °C).	60

Liste des tableaux

1	Liste des pesticides contre les taupins actuellement autorisés en Belgique, leur mode d'application et les cultures associées [94].	11
2	Espèces et souches des nématodes entomopathogènes utilisées dans le cadre de l'évaluation de leur pouvoir biocide sur les taupins du genre <i>Agriotes</i> spp.	23
3	Quantités émises de composés organiques volatiles identifiés lors du prélèvement de billes d'alginate contenant du jus de pomme de terre.	37
4	Table des cycles de reproduction des souches de nématodes entomopathogènes utilisées dans ce travail.	61
5	Tableau des probabilités de survie des larves d' <i>Agriotes</i> spp. par souche et en fonction du nombre de jours après l'infection pour le premier screening.	62
6	Tableau des probabilités de survie des larves d' <i>Agriotes</i> spp. par souche et en fonction du nombre de jours après l'infection pour le second screening.	63

1 Synthèse bibliographique

1.1 Introduction

Les néonicotinoïdes sont une classe d'insecticides neurotoxiques affectant le système nerveux central des insectes [1]. Pulvérisées ou appliquées en enrobage autour des graines [2], ces molécules, dérivées de la nicotine [3], provoquent la mort de l'insecte par paralysie [4, 5]. Utilisés depuis le début des années 1990 [6], ces produits phytopharmaceutiques ont commencé à faire débat dans la communauté scientifique lorsque le syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles (CCDS, "Colony Collapse Disorder Syndrome" en Anglais) leur a en partie été attribué. En 2013, suite aux récentes découvertes des effets létaux et sublétaux de ces produits sur les auxiliaires de cultures ainsi que sur leur persistance dans l'environnement [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13], la commission Européenne a limité leur utilisation pour les bannir complètement en 2018 de tout emploi en extérieur [14]. Aujourd'hui, cependant, certains pays Européens, dont la Belgique, accordent régulièrement des dérogations "en cas d'urgence" permettant l'utilisation de quatre molécules (clothianidine, thiaméthoxame, imidaclopride et acétamipride) dans le secteur de la betterave sucrière [14]. Ces dérogations, justifiées par le manque d'alternatives pertinentes aux néonicotinoïdes [15], compromettent les efforts de préservation de la diversité entomologique de nos régions et les nombreux services écosystémiques qui y sont associés et mettent en danger la santé d'espèces animales vertébrées, dont l'être humain [16, 17]. Il devient donc primordial de développer des méthodes de lutte alternatives efficaces et pertinentes pour la santé humaine et de l'environnement afin de, définitivement, mettre un terme à l'ère des néonicotinoïdes tout en réduisant le recours à des pesticides de synthèse, comme recherché par la directive européenne 2009/128/CE [15, 18].

Les larves de taupins (Coleoptera : Elateridae), ou vers fil de fer, sont des ravageurs polyphages provoquant des dégâts économiques importants à de nombreuses cultures. Présents partout en Europe, ils se nourrissent de graminées, de tubercules de pommes de terre, de racines de betterave, de plantes oléagineuses et autres légumineuses [19]. Ces insectes, évoluant dans le sol, se nourrissent exclusivement des racines et collets de jeunes plantules et organes souterrains de plantes plus âgées [20]. Leur long cycle de développement, étalé sur 2 à 6 ans les rend particulièrement difficiles à gérer. Historiquement, les populations de taupins ont été contrôlées par l'utilisation de divers produits phytosanitaires, combinés avec diverses méthodes de travail du sol. Cependant, l'interdiction progressive de ceux-ci et le manque de moyens de gestion efficaces ont provoqué une résurgence des attaques de taupins. De plus, l'augmentation des attentes du consommateur vis-à-vis de la qualité des produits et l'évolution des pratiques agricoles ont contribué à l'augmentation des pertes économiques liées aux taupins et ont mis les agriculteurs dans une situation délicate par rapport à la gestion de ces insectes [21, 22, 23, 24, 25]. Afin d'éviter une dégradation rapide de la situation, il est important de recourir aux méthodes de lutte actuellement disponibles et de continuer le développement de techniques efficaces face aux taupins.

A l'heure actuelle, la plupart des méthodes de lutte alternatives employées se concentrent sur les insectes adultes. Très peu d'études se sont déjà penchées sur la lutte contre les stades larvaires. La complexité de combattre un ravageur du sol, au cycle de développement pluri-annuel et multi-strates peut expliquer ce manque [26]. Parmi les rares méthodes de lutte contre les larves, l'une d'elles consiste à appliquer une solution contenant des nématodes entomopathogènes (NEPs) directement sur le sol. Ces nématodes, attirés par la présence de la larve pénètrent

par leurs orifices, libèrent une bactérie symbiotique qui tue la larve par toxémie ou septicémie et réalisent plusieurs générations à l'intérieur du cadavre. Un problème de cette technique est qu'elle nécessite d'asperger de grandes quantités de NEPs (500 millions.ha⁻¹ de culture [27]) à la bonne période de l'année et à la bonne profondeur. Pourtant reconnu en tant qu'agent de biocontrôle efficace contre les insectes telluriques [26], l'usage des NEPs pour la lutte contre les taupins doit encore faire l'objet d'optimisation.

Ce mémoire s'intègre donc dans un contexte de changement des régulations quant aux néonicotinoïdes et de manque d'alternatives efficaces. Afin de pallier aux problèmes cités ci-dessus, une méthode de lutte de type "attract-and-kill" est proposée et étudiée dans le cadre de ce mémoire. Elle consiste en l'association d'attractants et de nématodes entomopathogènes au sein de billes d'alginate, devant permettre d'optimiser la conservation des nématodes et leur accès aux larves de taupins.

1.2 Les taupins

1.2.1 Diversité et description morphologique

Les taupins (Coleoptera : Elateridae) font partie d'une des familles d'insectes les plus diversifiées. Près de 10 000 espèces ont été décrites à ce jour [28]. Leurs larves sont des ravageurs de cultures problématiques qui peuvent être difficiles à contrôler au sein de certains contextes agricoles [29]. En effet, leur grande diversité taxonomique, les variations d'occurrence et d'abondance des espèces, la grande variété de plantes hôtes mais aussi de comportements et les cycles de vie spécifiques à chaque espèce en font un groupe particulièrement délicat à appréhender [28, 29, 30].

Au sein des nombreuses espèces de taupins connues, toutes ne sont pas renseignées comme des ravageurs de cultures [31]. De plus, une espèce peut être nuisible dans une région mais pas une autre ou pour une plante mais pas l'autre [29]. En région Holarctique, une centaine d'espèces ont été recensées comme étant d'importance économique [29]. Parmi ces espèces, les larves du genre *Agriotes* sont connues pour être les plus dommageables en agriculture en Europe et au Canada [23, 29, 32, 33]. Ce genre est représenté par plus de 200 espèces à travers le monde [33] dont une vingtaine ont été observées dans des champs en Europe [29]. *Agriotes lineatus* L., *Agriotes obscurus* L., *Agriotes sputator* L. et *Agriotes sordidus* Illiger sont les quatre espèces de taupins les plus nuisibles [23, 30]. *Agriotes brevis* Candèze, *Agriotes ustulatus* Schaller, *Agriotes litigiosus* Rossi et *Agriotes rufipalpis* Brullé sont également considérés comme des ravageurs majeurs des cultures Européennes [34]. D'autres genres importants pour leur impact en agriculture sont *Melanotus*, *Athous*, *Conoderus*, *Ctenicera* et *Hypolythus* [22, 33, 35, 36].

Comme précisé précédemment, chaque espèce présente ses caractéristiques propres en termes de comportements, de plantes hôtes, et, plus généralement, de cycles biologiques. Cela rend la lutte contre ces organismes complexe étant donné que chaque espèce possède des sensibilités différentes aux méthodes de lutte existantes [29, 37, 38, 39]. En réponse à cette problématique, des auteurs se sont penchés sur la description des espèces et de leurs modes de vie, afin de permettre aux acteurs du milieu de mieux comprendre les taupins et d'optimiser la lutte contre ceux-ci. Furlan [40] a, par exemple, réalisé un excellent travail de description de *A. sordidus* et *A. ustulatus*. Ses recherches ont permis de connaître les caractéristiques morphologiques, le mode de vie, les préférences alimentaires et le cycle biologique de ces espèces. Malheureusement, encore peu d'espèces d'intérêt commercial ont été décrites, rendant plus complexe le développement d'outils pertinents et efficaces contre les taupins [29, 30].



(a)



(b)

FIGURE 1 – (a) *Agriotes obscurus* L. adulte [41]; (b) Larve d'*Agriotes* sp. [42]

Les caractéristiques morphologiques de la famille des Elateridae sont généralement très homogènes [40]. Cependant, l'adulte (figure 1a), stade de développement proportionnellement très éphémère chez les taupins, est assez caractéristique avec sa couleur généralement sombre. Leur forme est élancée, les angles postérieurs du prothorax sont très pointus et les élytres se terminent en ogive. Les Elateridae disposent d'une saillie prosternale logée dans un sillon qui leur donne la capacité de sauter avec un bruit métallique (d'où le nom de click beetle en Anglais). Les femelles sont généralement un peu plus grandes que les mâles mais il n'existe pas de dimorphisme sexuel. Les larves (figure 1b) sont tout aussi caractéristiques, allongées et cylindriques, elles sont de couleur brun clair ou jaunâtre, très agiles et complètement sclérifiées [43]. En outre, elles disposent de mandibules pour se nourrir [44]. Leur taille varie de quelques millimètres pour le premier stade larvaire à plus de 20 millimètres pour le dernier (figures 2) [40]. A l'instar des adultes, les larves disposent de regroupements de sensilles sur les palpes labiaux et maxillaires leur permettant de s'orienter et d'activer ou non le mécanisme de morsure [21]. Chez *A. sordidus*, les œufs sont ovoïdes mais irréguliers dans leur forme et leur taille [40].

1.2.2 Régime alimentaire et mécanismes d'attraction

Comprendre les préférences alimentaires des taupins est un point important dans le cadre de ce mémoire car certaines méthodes de lutte s'axent en partie autour du comportement de nutrition de ces insectes. Les plantes, via leurs organes souterrains (racines ou tubercules), émettent en effet des particules volatiles dans le sol que les taupins utilisent pour se diriger [19]. Connaître les plantes auxquelles ces nuisibles s'attaquent est donc nécessaire pour en déduire les volatils responsables du phénomène d'attraction et les inclure dans une stratégie de type "attract-and-kill".

Les préférences alimentaires des larves de taupins ont été étudiées dans un certain nombre d'articles. Il en ressort que ces organismes occupent généralement différents niveaux trophiques [28]. Les taupins adultes se nourrissent de matériel végétal mais ne sont, cependant, pas considérés comme des ravageurs de cultures. Les larves peuvent être phytophages, carnivores ou bien les deux. Traugott et al. [45] ont démontré que 10 % d'une population d'*A. obscurus* se nourrissait principalement de proies animales. Des cas de cannibalisme ont également été rapportés dans la littérature lorsque la densité de larves est importante et les ressources nutritives faibles [33, 45, 46, 47]. Finalement, la matière organique du sol a été proposée dans certaines études comme une source de nourriture probable pour les taupins [48, 49, 50]. Toutefois, des travaux

récents ont démontré que les jeunes stades larvaires d'*Agriotes* ne sont pas capables de survivre uniquement grâce à la matière organique et aucune preuve n'a pu être apportée pour corroborer l'idée que les taupins s'en nourrissent effectivement [33, 45, 51].

Une grande partie des larves de taupins sont des phytophages généralistes s'attaquant à une large gamme de plantes, provoquant des dégâts importants en agriculture [33, 52]. Ils se nourrissent des racines ou du collet des jeunes plantules, des organes souterrains des plantes plus âgées [33, 53] et de graines [54]. Les cultures touchées sont notamment les pommes de terre, les céréales (maïs, orge, froment...), les carottes, les betteraves, la canne à sucre, la laitue et certains fruits rouges [32, 55, 56, 57]. Dans une étude comparant quatre plantes (du maïs, une graminée, une légumineuse et une astéracée), Schalhart et al. [52] ont montré que les taupins présentent une préférence marquée pour les légumineuses et les graminées devant le maïs et l'astéracée. Ces résultats concordent avec ceux d'une étude réalisée par Fox [58] où des graminées et des trèfles (*Trifolium*) ont été préférés par les larves d'*A. obscurus* par rapport à des astéracées et autres herbacées. De manière plus générale, les larves de taupins préfèrent les plantes riches en nutriments et en sucres et pauvres en glycoalkaloïdes et autres éléments chimiques dissuasifs [52, 59]. Les taupins sont donc capables de se sustenter d'une large gamme de plantes mais présentent toutefois des préférences particulières pour certaines [53]. Lorsqu'ils en ont la possibilité, ils restent sur leur plante hôte jusqu'à ce que la source soit épuisée [53]. La distance entre un taupin et une plante influence aussi grandement son choix car ils ont tendance à rester à proximité du point où ils se trouvent afin de limiter les dépenses énergétiques [47]. Si besoin, les larves se nourriront donc de plantes moins attractives lorsque les alternatives sont trop éloignées.

Un autre élément essentiel rentre en compte dans l'attraction des larves de taupins vers une plante : les composés volatils présents dans le sol. La littérature évoque une séquence en trois étapes pour guider la larve vers sa source de nourriture [60]. La première étape est liée à un gradient de CO₂ [61]. Les larves sont en effet capables de détecter une source de CO₂ pour identifier de la nourriture [36, 60]. La seconde étape est liée aux composés organiques volatils (COVs) émis par les organes souterrains des plantes et qui permettent aux larves de détecter de manière spécifique une plante hôte adéquate [61]. La nature et la concentration de ces sémiochimiques rentre alors en compte dans le phénomène de discrimination ou de sélection des plantes [62, 63]. Afin d'identifier les molécules responsables du phénomène d'attraction chez les taupins, les profils odorants des racines ou tubercules de différentes plantes ont été caractérisés. Le pouvoir attractif de quatre aldéhydes a été mis en avant dans les racines de différentes variétés d'orge et de maïs : l'hexanal, le (E)-hex-2-éanal, le (E)-non-2-éanal et le (E,Z)-nona-2,6-diéanal [64]. Des tests comportementaux dans des olfactomètres à deux voies ont également été réalisés pour évaluer le caractère attractif du 2-pentylfuran, composé volatil identifié dans les racines d'orge, [64, 65] et du 2-undécanone, composé volatil identifié dans les tubercules de pomme de terre (*données non publiées*). Ces tests ont montré que les larves s'orientent de manière significative vers ces deux molécules. La dernière étape est liée à la morsure en elle-même. Les composés responsables de l'induction de la morsure chez les larves de taupins sont différents de ceux qui rentrent en compte dans le phénomène d'attraction [60] et correspondent à trois groupes majeurs : les carbohydrates, les graisses et les protéines [63]. Dans le groupe des carbohydrates, le glucose, le sucrose et le fructose, composés communément produits par les plantes, sont parmi les éliciteurs de morsure les plus actifs. En plus d'induire une morsure, ces composés retiennent la larve à proximité de leur source d'émission [60]. En outre, l'humidité

joue un rôle majeur dans le comportement de déplacement des larves de taupins. En effet, ils ont tendance à éviter les zones sèches et préfèrent des sols au contenu en eau compris entre 10 et 20 %. Très sensibles à la dessiccation, les larves meurent rapidement dans des milieux secs [66] et, inversement, une humidité trop importante semble inhiber l'activité musculaire et empêcher l'alimentation [60].

1.2.3 Cycle biologique et milieu de vie

Décrire le cycle de vie typique d'un taupin est hasardeux puisque les comportements de l'adulte et de la larve diffèrent largement entre les espèces et dépend de la ressource alimentaire ainsi que de facteurs environnementaux tels que la température du sol et l'humidité [29]. Néanmoins, les cycles biologiques d'*A. ustulatus*, d'*A. sordidus* et d'*A. obscurus* ont été décrits par Furlan (1996, 1998, 2004) et Miles (1942) [40, 46, 55, 67].

Les espèces de taupins peuvent être séparées en deux groupes en fonction de la durée de leur cycle de développement dans le sol : les espèces à cycle court (2-3 ans), dont fait partie l'espèce *A. sordidus* [40] et les espèces à cycle long (4-5 ans) dont font partie les espèces *A. obscurus*, *A. lineatus* et *A. sputator* [20, 21, 55, 68]. Le développement classique des espèces à cycle long est décrit dans la figure 2.

Les femelles adultes de l'espèce *A. ustulatus* pondent leurs œufs principalement en juillet et les premières larves éclosent dès mi-août [67]. La période d'oviposition de *A. obscurus* et *A. sordidus* est moins tardive et dure de mai à juin [40, 55, 68]. Les œufs sont déposés directement sous la surface du sol, en groupes proches les uns des autres [67] et sous la protection d'un tapis végétal pour empêcher la dessiccation [21]. Généralement, les prairies sont préférées pour la ponte par rapport aux cultures du fait d'un manque de couvert végétal aux périodes clés [69]. Le développement embryonnaire pour *A. ustulatus* dure en moyenne 4 à 6 semaines [21, 40, 46, 55] et est inversement proportionnel à la température : A 15°C, il faut 45 jours avant l'éclosion contre 13 jours à 29°C. A l'inverse, les larves d'*A. sordidus* apparaissent plus rapidement dans les populations du Nord de l'Italie (26 jours en moyenne) que celles du Sud (40 jours en moyenne) [40].

Les premiers stades larvaires doivent se nourrir de tissus végétaux vivants pour se développer. Dans le cas contraire, les individus meurent dans les 40 jours [40]. La résistance au stress alimentaire augmente cependant au cours du développement larvaire. Les larves du dernier stade sont ainsi capables de survivre 1 an (à 20°C) sans se nourrir. En moyenne, selon les conditions environnementales, les larves d'*Agriotes* complètent entre 9 et 13 stades larvaires avant la nymphose. Le cycle complet des stades larvaires dure entre 4 à 6 ans pour les espèces de cycle long [55, 68]. Pour *A. sordidus*, par contre, la totalité du cycle est complétée entre 24 et 36 mois, selon la latitude [40].

Durant l'année, les larves remontent à la surface deux fois afin de se nourrir. Une première fois en automne, de septembre à octobre et une seconde fois au printemps, de mars à avril [21, 70]. En dehors de ces périodes, les larves s'enfouissent jusqu'à 60 cm dans le sol, afin de fuir des températures trop élevées en été ou trop basses en hiver [67]. La phase de nutrition correspond au seul moment où la larve provoque des dégâts aux cultures et représente 25 % de la durée totale du cycle. Le reste du temps est passé dans des phases de durcissement des mandibules et de pré-mue [40].

Lorsque la larve est mature, elle s'enfonce dans le sol et se nymphose dans une cellule de terre compacte [21, 55]. La nymphose commence en juillet et se termine 3 à 4 semaines plus tard [46]. Les adultes ne remontent toutefois en surface qu'au début du printemps. La période d'activité des adultes dure tout le printemps et se prolonge en été et l'oviposition débute quelques jours seulement après l'émergence des adultes [40, 67]. Ce faisant, les périodes idéales de lutte contre cet insecte correspondent aux périodes d'activité des adultes et aux phases de nutrition des larves, seules périodes où ils sont suffisamment accessibles.

Finalement, les prairies représentent des réservoirs importants de larves de taupins [55, 71]. En effet, la stabilité de ces milieux est favorable au développement des larves et permet à celles-ci de se nourrir durant presque toute la saison de végétation. Leur répartition spatiale est généralement hétérogène et localisée [21]. Leur schéma de répartition se répète d'année en année et dépend des taux d'humidité et de la température du sol [72].

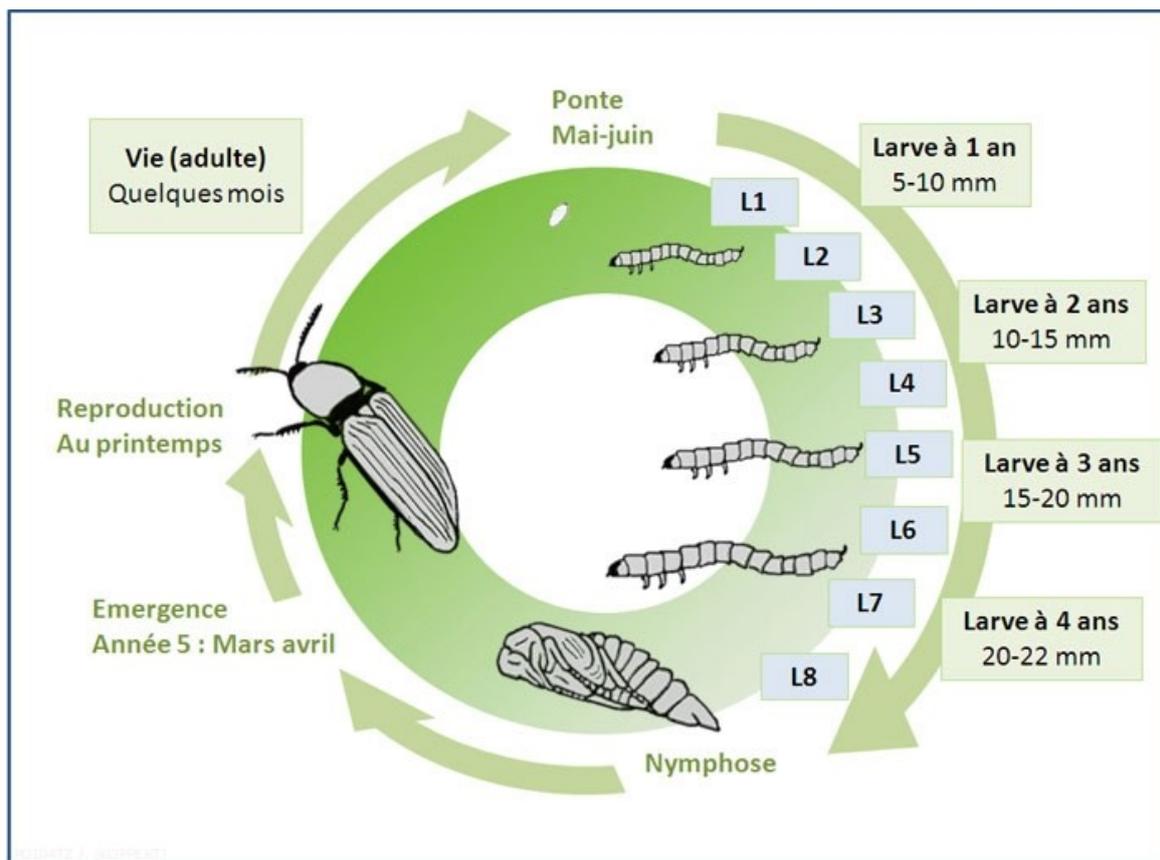


FIGURE 2 – Cycle de développement d'*Agriotes obscurus* L. [73]

1.3 La problématique du taupin en agriculture et les méthodes de lutte chimique

1.3.1 Résurgence des taupins

L'intérêt porté aux ravageurs de cultures souterrains que sont les taupins n'a pas toujours été le même qu'aujourd'hui, mais a fluctué avec les grands événements agronomiques des dernières décennies [29]. C'est durant les première et seconde guerres mondiales qu'ils sont considérés pour la première fois comme des nuisibles de première importance [74]. En effet, la demande croissante de nourriture va provoquer une conversion massive des prairies en cultures de céréales et de pommes de terre [75]. Les prairies étant un habitat privilégié des taupins, les dégâts provoqués aux cultures nouvellement installées vont rapidement devenir une urgence. En réaction à cette problématique, de nombreuses recherches vont être menées en Europe et aux États-Unis, aboutissant aux insecticides organochlorés utilisés dès la fin des années 1940. Ces produits vont pratiquement anéantir les populations de taupins et seront suivis, dès leur abandon dans les années 70 et 80, par des produits organophosphorés et des carbamates très efficaces. Pendant des années, les taupins seront ainsi considérés comme des nuisibles secondaires. Au début des années 1990, les taupins vont cependant passer d'un statut de ravageurs mineurs à majeurs. En cause, la disparition des résidus d'organochlorés dans les sols (capables de perdurer au moins 6 ans dans les sols [21]), la perte progressive de tous les insecticides efficaces contre les taupins, l'adoption de plus en plus fréquente de systèmes de rotation des cultures favorables aux taupins, de techniques de moindre labour et autres pratiques culturales favorisant les populations de ce ravageur [21, 76, 77, 78].

1.3.2 Dégâts aux cultures

Les dégâts des taupins aux cultures consistent principalement en des morsures au niveau des graines, racines, tubercules, collets, parties cultivables des jeunes plantules (3-6 feuilles) et aux organes souterrains développés des plantes plus âgées [33]. Les tubercules de pommes de terre font partie des cultures les plus sensibles aux attaques [21]. Les taupins y creusent des trous et tunnels longs de plusieurs millimètres qui peuvent dévaluer une production et la rendre presque invendable [32]. Les plants de maïs, également sensibles, lorsque infectés, présentent une ou plusieurs feuilles centrales flétries. Une attaque trop intense peut aussi provoquer la mort du plant [79]. Selon l'Institut Royal Belge pour l'Amélioration de la Betterave (IRBAB) [80], les taupins peuvent provoquer des dégâts importants mais localisés aux cultures de betterave en rongant et sectionnant les radicelles, les plants étant sensibles jusqu'au stade 4 feuilles. En plus de la dépréciation directe des productions agricoles (contamination des cultures, croissance réduite, cosmétique des parties attaquées altérée [21, 29, 30, 33, 81]), les morsures de taupins favorisent la détérioration des plantes par des pathogènes secondaires comme des champignons [82, 83].

La présence de taupins dans une culture n'est cependant dommageable qu'au-delà d'un certain seuil d'infestation qui dépend à la fois de l'espèce et de la sensibilité de la culture aux attaques [33, 84]. Par exemple, Parker [85] a observé, pour des densités de moins de 100 000 taupins.ha⁻¹, que 20 à 80 % des tubercules de pommes de terre dans leurs essais étaient attaqués. L'importante variabilité peut s'expliquer par les erreurs associées aux techniques d'échantillonnage utilisées. Dès 150 000 taupins.ha⁻¹, les dégâts liés aux attaques peuvent s'avérer significatifs voire sévères [29]. Dans une autre étude reprenant sept parcelles agricoles, il a été montré que 80 % des tubercules, en moyenne, étaient touchés lorsqu'aucun traitement n'est utilisé [21, 86].

Concernant d'autres cultures, il a été montré dans une étude que, pour du maïs planté avant le 1^{er} mai et des densités comprises entre 50 000 et 100 000 taupins.ha⁻¹, 30 % des plants étaient détruits [33]. Des observations similaires ont été faites en Roumanie où des densités de 50 000 à 100 000 taupins.ha⁻¹ et 700 000 à 1 000 000 taupins.ha⁻¹ ont attaqué 31,6 % des plants de blé, 22,5 % des plants d'orge, 42,8 % des graines de maïs, 54 % des collets des plants de maïs, 64 % des graines de tournesol et 53 % des collets des plants de tournesol [33]. En outre, des données récoltées en Italie pendant 15 ans ont montré une corrélation positive entre le nombre de taupins capturés dans un piège à appâts et le degré de dégâts sur des plants de maïs pour *A. brevis*, *A. sordidus* et *A. ustulatus* [84]. Lorsque la population est supérieure à 5 larves/piège (un piège tous les 20x10 mètres), *A. ustulatus* affecte de manière importante les parcelles en s'attaquant aux graines. *A. brevis*, le plus nuisible dans cette étude, provoque une baisse de rendement significative dès 1 larve/piège. *A. sordidus* présente un risque intermédiaire puisqu'il faut 2 larves/piège avant que l'espèce ne cause une réduction de rendement. A noter que le risque de pertes de rendement n'est important qu'au-dessus de 25 % de plants de maïs attaqués et qu'en-dessous de 15 %, il est presque nul [79].

1.3.3 Produits chimiques actuellement employés

A l'heure actuelle 449 pesticides, phytoprotecteurs et phytorégulateurs sont approuvés à l'utilisation en Europe parmi lesquels 282 sont autorisés en Belgique [87]. Chaque année, entre 420 000 et 500 000 tonnes de ces produits sont utilisées par les professionnels et les amateurs [88, 89]. Cependant, les substances approuvées en Europe peuvent rester toxiques pour l'être humain et l'environnement. En effet, près de 50 % des substances actives approuvées comme PPPs (Produits de Protection des Plantes) sur le marché européen sont bioaccumulatrices et 25 % d'entre elles sont persistantes dans les sols [90]. Selon le Règlement du Parlement Européen relatif à la classification, l'étiquetage et l'emballage [91], 30 % des PPPs approuvés sont hautement toxiques pour les milieux aquatiques et 28 sont suspectés d'être cancérigènes. Par exemple, le fosthiazate, une substance active utilisée dans le cadre de la lutte contre les taupins en Belgique, est considérée comme hautement toxique, dangereuse pour les milieux aquatiques et comme pouvant provoquer des problèmes respiratoires et cutanés. Selon la base de données sur les propriétés des pesticides de l'Université de l'Hertfordshire [90], mise à jour le 18/03/2022, ce composé serait fortement toxique pour les abeilles, les oiseaux et les mammifères.

Dans le cadre de la lutte face aux taupins, les néonicotinoïdes ont longtemps représenté un outil indispensable pour les agriculteurs [6]. Cependant, l'évolution récente de la législation sur ces insecticides a bouleversé le monde agricole. Les néonicotinoïdes sont une classe d'insecticides neurotoxiques affectant le système nerveux central des insectes [1]. Ces dérivés de la molécule de nicotine [3] se fixent sur les récepteurs post-synaptiques des insectes, provoquant

l'hyperexcitation de leur système nerveux, leur paralysie et, *in fine*, leur mort [4, 5]. Depuis leur introduction au début des années 1990, ces produits phytosanitaires ont rencontré un franc succès et se sont imposés sur le marché des insecticides [6]. En effet, leur action systémique [6, 92] les rend efficaces contre une large gamme d'insectes phytophages et permet de protéger une majorité de cultures [2]. Cependant, malgré le fait qu'ils aient longtemps été considérés comme inoffensifs pour l'environnement et la santé humaine grâce à leur haut degré de spécificité par rapport aux insectes, un nombre grandissant d'études évoque les effets létaux et sublétaux de ces produits phytopharmaceutiques sur les auxiliaires de cultures [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]. L'exemple le plus récurrent dans la littérature est celui des pollinisateurs. Les néonicotinoïdes sont considérés comme en partie responsables du syndrome de l'effondrement des colonies d'abeilles au cours de ces dernières années (ou "Colony Collapse Disorder Syndrome", CCDS en Anglais) [14]. En conséquence de ces récentes découvertes, l'utilisation de ces produits a d'abord été limitée en 2013 par la commission Européenne pour ensuite être complètement bannie en extérieur en 2018. Seule la molécule d'acétamipride a fait l'objet d'un renouvellement d'autorisation à l'échelle européenne et est toujours approuvée [93].

Toutefois, malgré leur bannissement et le renforcement de la législation appelant à réduire l'utilisation des pesticides [18], plusieurs néonicotinoïdes, parmi les plus dangereux, sont régulièrement employés en Europe [15]. La disparition de la plupart des insecticides efficaces contre les taupins et la résurgence récente de ces ravageurs dans nos régions ont été utilisées comme justifications pour autoriser l'utilisation de plusieurs néonicotinoïdes (imidaclopride, clothianidine et thiaméthoxame) malgré leur bannissement. Les autorisations exceptionnelles mentionnées ci-dessus, octroyées notamment en Belgique comme dans les pays voisins chaque année depuis leur interdiction, s'appuient sur la possibilité donnée dans la loi sur les pesticides de suspendre l'interdiction en cas d'urgence [15]. Ces exceptions sont données dans le cadre de la culture de la betterave sucrière qui risque d'être une cible privilégiée des attaques de taupins en dehors de traitements phytosanitaires [33]. Selon un rapport de l'IRBAB réalisé en 2002 [80], les taupins ont en effet été recensés comme des ravageurs de la betterave au début des années 1990. L'importance des dégâts à cette culture est d'ailleurs, toujours selon le même document, comparable à celle des pucerons à une fréquence, cependant, bien moindre.

1.3.4 Situation en Belgique

En Belgique, aucun produit phytosanitaire contenant des néonicotinoïdes n'est à l'heure actuelle approuvé [93]. Les trois molécules citées précédemment ainsi que l'acétamipride font cependant l'objet d'autorisations exceptionnelles. Ces molécules sont donc toujours utilisées en enrobage des semences de betterave. D'autres molécules, appartenant à des groupes de substances actives différents, sont également utilisées mais leur nombre reste réduit [94]. Les insecticides encore autorisés en Belgique dans le cadre de la lutte contre les taupins sont listés dans le tableau 1 :

TABLE 1 – Liste des pesticides contre les taupins actuellement autorisés en Belgique, leur mode d'application et les cultures associées [94].

Famille chimique	Substance active	Produit commercial	Application	Cultures
Organophosphorés	Fosthiazate 10 %	NEMATHORIN 10 G	Granulés à appliquer avant ou pendant la plantation.	Pommes de terre
Pyréthroïdes	Téfluthrine	FORCE	Suspension de capsules appliquée aux semences.	Maïs
		FORCE 200 CS		Betterave
		FORCE EVO	Granulés à appliquer lors du semis ou de la plantation.	Pommes de terre, Maïs
		SOILGUARD 0.5 GR	Granulés à appliquer lors du semis.	Maïs
	Cyperméthrine	INTERCYP 0,8 GR	Granulés à appliquer avant le semis.	Pommes de terre, Maïs, Colza
	LANGIS	Émulsion pour le traitement des semences.	Froment, Orge, Seigle, Avoine, Triticale, Epeautre	
	SHERPA 0,8 GR	Granulés à incorporer avec le semis.	Pommes de terre, Maïs, Colza	

1.4 Les méthodes de lutte alternatives

Il existe un panel d'alternatives aux pesticides destinées à prévenir les dégâts économiques dus aux attaques de taupins (figure 3). Ces méthodes ont été résumées dans plusieurs études [28, 29, 33, 95] et leur applicabilité a été étudiée par Jactel et al. [2]. Si dans la première moitié des années 1900, la gestion du taupin incluait des pratiques culturales (rotation des cultures, cultures de détournement, paillage, périodes de plantation adaptées...), physiques (labour...) et l'utilisation d'insecticides, plusieurs méthodes étant déployées en même temps, la recherche s'est rapidement orientée vers l'utilisation de pesticides hautement efficaces [28]. Les produits organochlorés, organophosphorés et les carbamates se sont rapidement imposés sur les marchés avant que la démonstration de leurs effets antagonistes sur les auxiliaires de cultures et sur la santé humaine ne force leur retrait. Aujourd'hui, il est donc nécessaire de revenir à des schémas de gestion intégrée, en incluant tous les outils disponibles dans le cadre de la lutte face aux taupins. Selon l'étude de Jactel et al. [2], il existe au moins une alternative non chimique pour remplacer les néonicotinoïdes, récemment bannis, dans 78 % des couples plante-insecte étudiés.

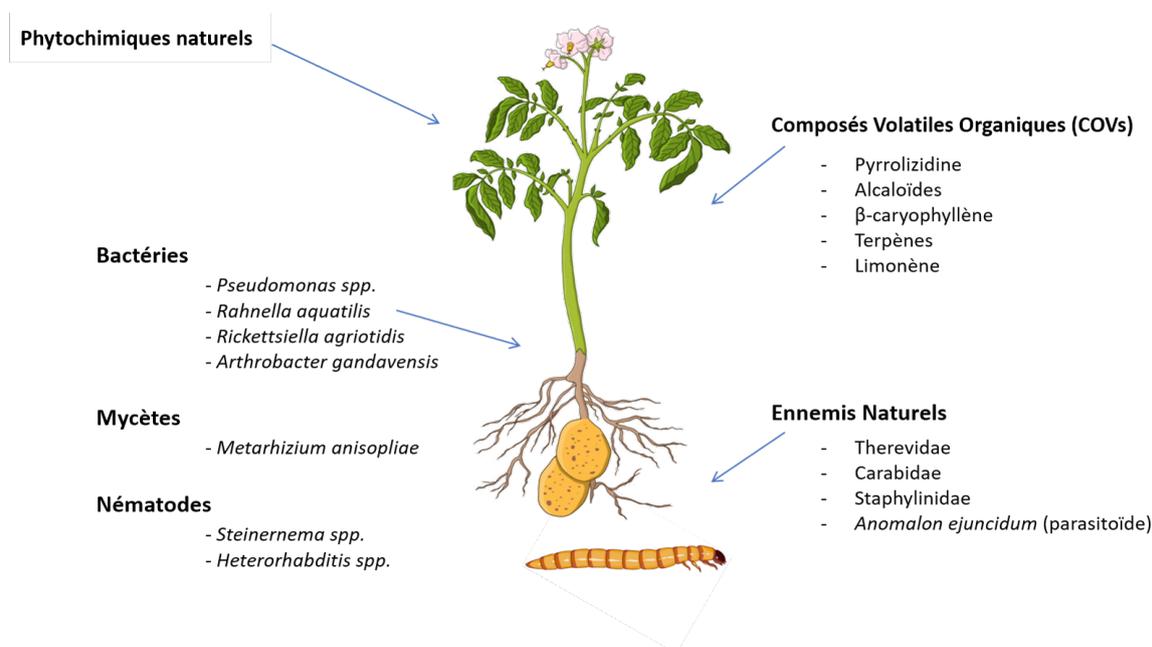


FIGURE 3 – Méthodes alternatives de lutte contre les taupins avec, pour chaque groupe, quelques exemples. [19]

1.4.1 Méthodes non biologiques

L'évaluation des risques est la première étape dans la lutte intégrée et une alternative efficace contre l'utilisation de pesticides [95]. Cette technique préventive consiste en l'évaluation des facteurs qui favorisent l'infestation d'une parcelle et les dégâts aux cultures. Elle représente en quelque sorte la base des différentes méthodes de lutte alternatives puisqu'elle permet de faire des décisions adaptées au niveau et au type de l'attaque. Évaluer les risques signifie identifier la menace et son niveau en établissant des seuils d'infestation au-delà desquels des pertes économiques sont très probables. Les facteurs clés sont l'espèce des larves de taupins, le milieu, le type de culture, les conditions édaphiques et météorologiques. Grâce à ces connaissances, il

est possible de se servir de méthodes de cultures adaptées permettant de réduire les populations d'œufs ou de larves. Par exemple, lorsqu'il est approprié, le travail du sol peut endommager mécaniquement les œufs et les larves. De plus, modifier les dates d'ensemencement peut permettre de désynchroniser les phases d'activité des larves et les périodes de sensibilité des cultures aux dégâts.

Différentes **pratiques culturales** peuvent être mobilisées afin de réduire les populations de taupins ou leurs dégâts [95]. La rotation des cultures est une stratégie importante dans la lutte contre *Agriotus* spp.. Placer les cultures sensibles aux attaques de taupins après des cultures non sensibles ou repoussantes peut, en effet, réduire les dégâts. Par exemple, la moutarde, le chou, le trèfle et le lin sont peu sensibles aux attaques et les pois et les haricots les tolèrent. Les cultures intercalaires et les cultures de couverture intensément labourées ou les cultures à effet biocide (ex., *Brassica juncea* L., [96]) peuvent fortement réduire les populations de taupins [95]. Planter des lignes de blé 8 jours avant des lignes de fraises peut, par exemple, réduire la mortalité des graines due à *Agriotus* spp. de 43 % dans des parcelles non protégées à 5,3 % dans les parcelles avec du blé en interculture [33]. Les attaques se concentrent en effet sur la culture intercalaire qui protège la culture cible. Certaines variétés de cultures, comme le maïs ou la pomme de terre, sont également moins sujettes aux dégâts de taupins [32, 59, 97]. Planter des variétés moins sensibles aux attaques peut donc réduire les pertes économiques liées à ces ravageurs. Le paillage présente également des avantages quant à la gestion des taupins [98]. Premièrement, il offre des habitats pouvant abriter des prédateurs naturels de ce ravageur. Ensuite, cette barrière physique réduit les probabilités d'émergence ou de nymphose des larves. Enfin, les propriétés chimiques des plantes utilisées peuvent contribuer à réduire les populations de cet insecte via l'émission de molécules repoussantes ou biocides (ex., quinine [62]). Finalement, les taupins étant sensibles aux variations d'humidité, assécher les sol ou l'inonder peut permettre de réguler leurs populations [95].

L'effet du **travail du sol** et du **labour** peut également aider à réduire significativement les populations larvaires [95]. En effet, le labour endommage les œufs pondus, remonte les larves à la surface du sol et les expose à la dessiccation et à la prédation. Seal et al. [99] ont montré que labourer trois fois en été réduisait les larves collectées dans des pièges de 1,75 larves/piège à 0,2 larve/piège, en comparaison à des parcelles non labourées où aucune différence n'a été observée. Il est cependant important de prendre en compte l'espèce et son cycle biologique afin de labourer au moment idéal. Toutes les espèces ne pondent pas au même moment et les périodes d'activité larvaire dépendent de l'espèce [95].

Les pièges à phéromones sont des dispositifs de lutte uniquement dédiés à la gestion des populations adultes de taupins. Depuis les années 1970, des mélanges synthétiques imitant la composition des phéromones d'espèces d'intérêt commercial ont été développés [95]. Ces mélanges ont ouvert la voie à de nouvelles méthodes de gestion incluant la perturbation des comportements sexuels des adultes (empêcher la copulation) ou le piégeage de masse (utilisation de molécules attractives). Au Japon, six ans de piégeage de masse, à raison de 10 pièges.ha⁻¹, ont réduit les populations adultes de *Melanotus okinawensis* Ohira de près de 90 %. Cependant, le faible rayon d'attraction des pièges à phéromones pour les espèces du genre *Agriotus* requiert un réseau dense de pièges et pose un obstacle important pour réduire efficacement les populations. Hicks et Blackshaw [100] ont évalué le coût économique pour éradiquer une population d'*Agriotus* à 2755 €.ha⁻¹.an⁻¹ pendant quatre ans, à raison de 10 pièges.ha⁻¹ pour

A. lineatus, 15 pièges.ha⁻¹ pour *A. obscurus* et 142 pièges.ha⁻¹ pour *A. sputator*. Les méthodes sémiochimiques ne sont donc pas encore parfaitement au point et nécessitent d'être améliorées pour représenter des options de lutte économiquement viables.

Les produits **phytochimiques** naturels représentent également une alternative pertinente aux produits chimiques synthétiques [101]. Utilisés depuis des années en agriculture organique, les extraits naturels de plantes présentent l'avantage d'être sans danger pour l'homme et d'avoir démontré leur efficacité sur différents ravageurs (*Leptinotarsa decemlineata* Say [102], *Diabrotica vergifera vergifera* LeConte...[103]). L'huile essentielle de romarin, du citronellal, du thymol et de l'eugénol ont également démontré un effet insecticide sur *A. obscurus* [101].

1.4.2 Ennemis naturels et lutte biologique

La lutte biologique correspond dans le domaine de l'agronomie à "toute forme d'utilisation d'organismes vivants ayant pour but de limiter la pullulation et/ou la nocivité des divers ennemis de cultures. Rongeurs, insectes et acariens, nématodes, agents des maladies des plantes et mauvaises herbes sont justiciables d'une telle lutte, qui est basée sur des relations naturelles entre individus ou entre espèces, mises à profit par l'Homme de diverses manières. L'organisme vivant utilisé comme agent de lutte est un "auxiliaire" de l'Homme." [104]. En général, la lutte biologique passe par l'exploitation des relations hôte/parasites et proie/prédateur entre organismes de niveaux trophiques successifs.

Les taupins possèdent de nombreux ennemis naturels comme les oiseaux, certains mammifères et arthropodes [95]. Cependant ces **prédateurs** n'étant pas spécialisés, les prélèvements de taupins restent trop occasionnels pour avoir un impact. D'autres insectes ont été observés comme prédateurs de taupins mais les connaissances dans ce domaine restent relativement faibles. Par exemple, des larves de diptères de la famille des Therevidae sont connues pour consommer différents stades larvaires de taupins. Les informations concernant les **parasitoïdes** de taupins sont, elles, presque inexistantes dans la littérature [19]. La difficulté de trouver des organismes parasitoïdes dans le sol ou des momies d'hôtes infectés en sont probablement les causes. Certains hyménoptères sont connus pour être des parasitoïdes de taupins en Europe mais le nombre de larves infectées découvertes dans des parcelles en Angleterre et en Allemagne est extrêmement faible. De ce fait, il est assez peu probable d'imaginer les parasitoïdes comme des agents de biocontrôle probants pour la lutte contre les taupins [95].

Les **micro-organismes** sont les ennemis naturels des taupins les mieux étudiés et les plus utilisés dans la lutte intégrée [19]. Les champignons, bactéries et nématodes entomopathogènes représentent tous trois des biocides prometteurs contre les nuisibles de cultures. Le contrôle microbien des taupins est encore assez peu développé mais des recherches sont actuellement en cours. De plus, *Metarhizium brunneum* Petch (Hypocreales : Clavicipitaceae) et *Beauveria bassiana* Vuill (Hypocreales : Clavicipitaceae), des champignons entomopathogènes, sont déjà proposés dans le commerce.

Les **champignons entomopathogènes (CEPs)** sont les organismes les plus fréquemment utilisés en biocontrôle [19]. L'application se fait généralement par aspersion directement sur le sol d'une solution contenant des conidies. Leur succès est lié à la facilité d'application de la solution, à son mode de fonctionnement (surface-actif) et à la faible quantité d'inoculum nécessaire pour être efficace. Cependant, malgré une efficacité démontrée en laboratoire de *M.*

brunneum, les résultats sur le terrain sont assez mitigés. L'efficacité de la solution dépend en effet de facteurs comme la température du sol, le type de sol [105], le temps d'exposition aux conidies ou la santé de l'hôte [19]. De plus, lorsque les larves deviennent trop grandes, les champignons seuls ne sont pas capables de contrôler une infestation. Enfin, il a été observé que les larves sont capables de migrer dans le sol lorsque les quantités de conidies deviennent trop importantes. Les **bactéries entomopathogènes (BEPs)** sont par contre moins étudiées. Il existe cependant des potentialités liées à l'utilisation de bactéries du genre *Pseudomonas* mais l'efficacité de telles méthodes est encore peu connue.

Les **nématodes entomopathogènes (NEPs)** sont les organismes d'intérêt dans ce travail. Utilisés depuis des années par aspersion en solution, ils représentent un potentiel d'avenir important dans la lutte biologique contre les larves de taupins [19]. Les NEPs appartenant aux genres *Heterorhabditis* et *Steinernema*, en particulier, sont utilisés pour contrôler les ravageurs d'une large variété de cultures. Les nématodes de ces deux genres sont des parasites obligatoires d'insectes. Ils sont associés à des bactéries pathogènes symbiotiques des genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* qui provoquent la mort des insectes par toxémie ou septicémie en 24 à 72 heures. Les taupins meurent donc de l'action combinée des nématodes et des bactéries. Les juvéniles, seul stade infectieux, sont attirés par les taupins et rentrent via la bouche, l'anus ou les stigmates, pénètrent l'hémocoèle et libèrent la bactérie symbiotique. Ils se reproduisent ensuite dans l'insecte pour que, deux semaines plus tard, des milliers de juvéniles infectieux (JIs) en sortent, prêts à infecter un nouvel hôte. En l'absence d'hôtes, les nématodes sont capables de survivre plusieurs mois dans le sol sans se nourrir [106]. L'avantage d'utiliser les NEPs est qu'ils sont très actifs et tuent rapidement leurs hôtes [19]. Cependant, leur application présente des limites environnementales. En effet, les nématodes doivent être protégés des ultra-violets, nécessitent des conditions d'humidité appropriées et requièrent des régimes de températures adaptés. De plus, des champignons nématophages ou des nématodes bactériophages vivant dans le sol peuvent représenter des compétiteurs importants des NEPs. En conséquence, l'efficacité sur le terrain des nématodes n'a pas encore pu être mise en avant. Différentes études montrent que l'application d'une solution de nématodes n'a pas été apte à protéger les cultures contre *Agriotes* [105, 107]. Toba et Turner [108] ont observé une réduction de 29 % des individus dans une population de *Limonius californicus* Mannerheim suite à l'application d'une solution de *Steinernema feltiae* Filipjev et en ont conclu qu'il serait économiquement non viable de chercher à atteindre le seuil de létalité requis. Selon la Forgia et al. [97], la cuticule très résistante et imperméable des taupins aux nématodes ainsi que leur système immunitaire développé pourraient expliquer la faible efficacité de ces solutions.

Une réponse possible à ce problème serait d'associer les nématodes et un attractant dans une formulation solide protectrice afin d'améliorer la probabilité de survie des NEPs et d'augmenter les chances de contact entre les NEPs et les taupins.

Le cycle de vie typique des NEPs, présenté en figure 4, consiste en un stade œuf, quatre stades juvéniles (J1, J2, J3, J4) et un stade adulte [109]. Les JIs (J3), seul stade présent librement dans le sol, pénètrent dans leur hôte, se développent en J4 qui muent en adultes (première génération, F1). Dans leur hôte, ces adultes pondent des œufs qui réalisent un cycle complet de développement pour donner une nouvelle génération d'adultes (seconde génération, F2). Un second cycle est réalisé, mais cette fois, les J3 n'évoluent pas en J4 : ils sortent de l'hôte pour en infecter un nouveau. Au total, le processus dure de 8 à 10 jours. Lorsque la disponibilité

alimentaire est faible ou que la densité de nématodes est trop importante, un seul cycle est réalisé et les juvéniles issus de la première génération d'adultes deviennent déjà infectieux en J3 [110]. La durée du cycle n'est alors plus que de 6 à 7 jours.

Comme expliqué précédemment, les nématodes sont associés à des bactéries symbiotiques du genre *Photorhabdus* pour *Heterorhabditis* et *Xenorhabdus* pour *Steinernema* [110]. La relation qui les unit est mutualiste. Une fois libérée dans l'hémocoèle de l'insecte, la bactérie produit des molécules antibiotiques qui protègent les nématodes, leur sert de nourriture et tue l'insecte par toxémie ou septicémie. Les nématodes servent principalement de vecteur aux bactéries mais produisent également des toxines qui affaiblissent le système immunitaire de l'hôte [110]. Ces bactéries ne sont donc pas capables de survivre en dehors de leur symbiote. En outre, leur virulence envers les insectes est moindre lorsque directement ingérées par ceux-ci [109, 110].

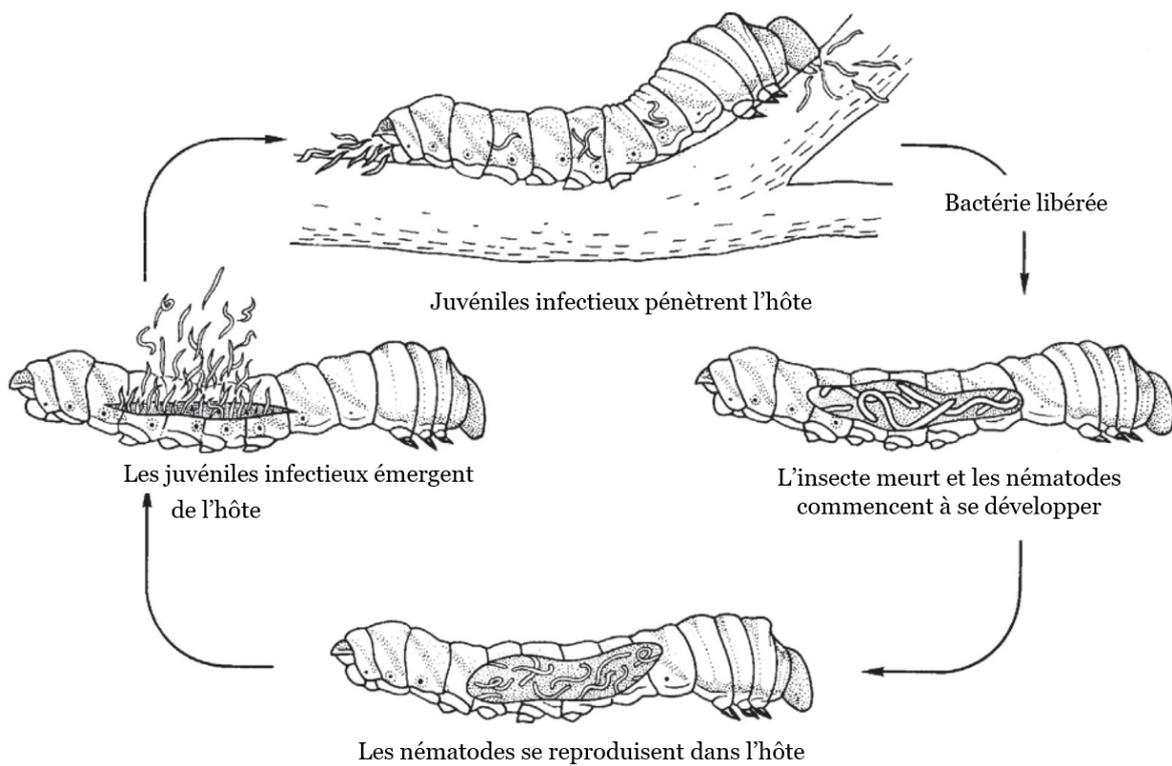


FIGURE 4 – Cycle de vie généralisé du complexe nématodes entomopathogènes/bactérie dans une larve de lépidoptère [111].

1.5 La méthode attract-and-kill

Dans le point précédent, des méthodes de lutte alternatives et des agents de contrôle biologiques ont été présentés. L'utilisation de nématodes entomopathogènes se révélait posséder un véritable potentiel d'avenir mais, se heurtant à divers obstacles, était encore inefficace contre les taupins. Les facteurs environnementaux comme la température, les ultra-violets et l'humidité peuvent provoquer de la mortalité chez les nématodes et limitent l'efficacité des applications directes de solutions contenant ceux-ci [19]. De plus, l'épaisse cuticule des taupins, imperméable aux NEPs et leur système immunitaire impactent significativement l'efficacité de ces biocides.

Afin de contrer ces obstacles, nous étudions dans ce mémoire un attractant et différentes population de NEPs, spécifiques et virulentes pour les larves de taupins, dans le but de les co-encapsuler au sein de billes d'alginate. Cela permettrait aux nématodes de pénétrer directement dans le système digestif des taupins et d'augmenter l'efficacité en termes de mortalité (figure 5). Un tel système fonctionnerait selon le schéma d'attraction puis de mise à mort, en anglais reconnu sous l'appellation "attract-and-kill".

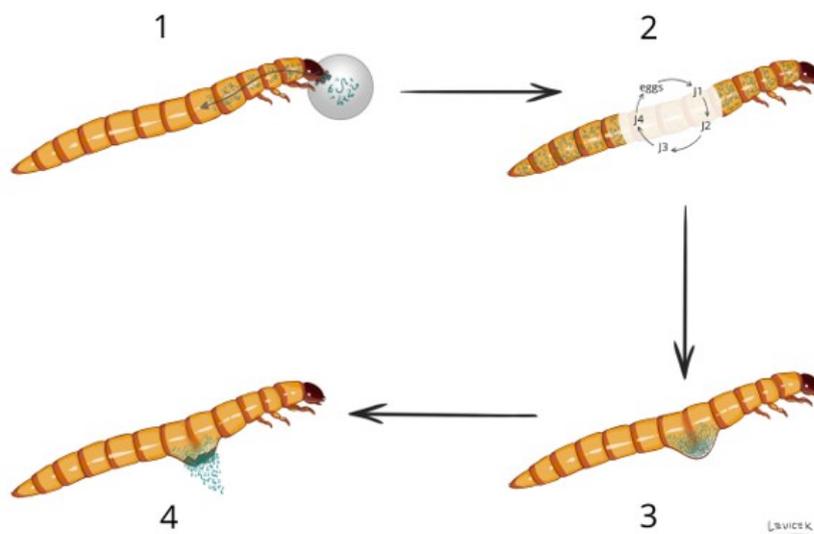


FIGURE 5 – Représentation de la méthode "attract-and-kill" combinant un attractant et des nématodes entomopathogènes dans une formulation d'alginate sous forme de bille [26]

L'intérêt de l'**attractant** dans une telle méthode est qu'il permet d'amener les taupins directement aux biocides. En effet, à cause des migrations verticales des taupins dans le sol, les nématodes ont des difficultés à les atteindre s'ils ne sont pas appliqués à la bonne profondeur [26]. Lorsque les conditions dans le sol deviennent favorables, les larves remontent pour se nourrir et s'orientent via des composés volatils attractifs émis par les organes souterrains des plantes. Sur cette base, il est possible d'inclure une formulation qui émet des molécules attractives afin de diriger les taupins vers les nématodes contenus dans la formulation. Différentes molécules, citées précédemment, ont été identifiées comme attractives et sont donc envisageables dans une telle méthode. En outre, les structures endogées de plantes de maïs ou de pommes de terre se sont également avérées attractives pour les taupins (*données non publiées*). Finalement, les larves de taupins sont aussi attractives et semblent induire un comportement d'agrégation chez

l'insecte [112]. Dans le cadre de ce travail, le jus de pomme de terre, le 2-undécanone et le 2-pentylfuran seront étudiés en tant qu'attractants. En effet, le jus de pomme de terre est facile à obtenir et se prête bien à la formulation de billes d'alginate et les deux composés synthétiques ont déjà été identifiés individuellement comme étant attractifs.

Les **gels d'alginate** ont plusieurs avantages et semblent être une alternative pertinente à l'application inondative des NEPs. Leurs caractéristiques hydrophiles, biocompatibles et biodégradables permettraient de favoriser la survie des NEPs en milieu naturel [113]. Le fait d'ajouter du glycérol dans les billes favoriserait également la survie des nématodes et les plongerait dans un état de quiescence permettant leur rétention au sein de la bille. Une telle formulation, sans attractants, a été proposée dans une étude réalisée par Kim et al. [113]. Des NEPs ont été encapsulés dans des billes formulées avec du gel d'alginate afin de les protéger de la lumière UV, de la dessiccation et de leurs prédateurs naturels. Du glycérol a été ajouté afin de plonger les NEPs en état de quiescence et contrôler leur émission une fois les billes appliquées dans le sol. En rentrant en contact avec de l'eau, les NEPs contenus dans les billes se réveillent et en sortent. L'efficacité de cette formulation pour réduire les dégâts aux racines de maïs de *D. virgifera virgifera* est comparable à l'application d'une solution contenant des NEPs directement sur le sol.

Les méthodes de lutte de type "attract-and-kill" sont connues et étudiées pour un certain nombre de ravageurs. En 2015, des chercheurs ont évalué la possibilité d'associer des composés attractifs avec des CEPs dans des granulés afin de tuer des taupins adultes d'*A. obscurus*. Leur formulation a permis de réduire drastiquement les populations visées, leur suggérant que les tactiques attract-and-kill pourraient représenter une nouvelle approche dans la gestion des taupins [114]. Brandl et al. [115] ont également développé une méthode attract-and-kill en associant un biocide (*M. brunneum*) et une source de CO₂ (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen) dans des billes d'alginate distinctes. L'application d'un mélange de billes contenant le biocide et d'autres billes contenant la source de CO₂ dans des champs de pommes de terre, au moment de la plantation, a permis de réduire de 37 à 75 % les dégâts par rapport aux parcelles non traitées. Une formulation identique est d'ailleurs vendue comme produit contre les taupins en Allemagne. Selon Küppers et al. [116], ce produit réduirait effectivement les dégâts aux tubercules de pommes de terre pour des taux d'infestation bas à moyens. En 2020, la Forgia et al. [117] ont testé la co-encapsulation de NEPs avec des extraits naturels de pommes de terre dans des billes d'alginate. Les taux de mortalité observés sur les larves de taupins d'*A. sordidus* correspondaient à 16,7 et 41,7 % pour *Steinernema feltiae* Filipjev et *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar respectivement, après 8 semaines, et des effets importants sur les performances alimentaires ont été observés. Cette étude est la première à mettre en évidence un effet à long terme sur le développement et l'alimentation des taupins de nématodes entomopathogènes via une méthode attract-and-kill. Plus récemment, *Steinernema carpocapsae* Weiser et *S. feltiae* co-encapsulés dans des billes d'alginate contenant des extraits naturels de pomme de terre se sont montrés plus efficaces pour réduire les performances alimentaires et la survie d'*A. obscurus* par rapport à des billes contenant les nématodes sans extraits naturels [26].

Cependant, les connaissances sur cette méthode de lutte restent encore très superficielles. Il reste de nombreux éléments à tester et optimiser afin de concevoir un produit efficace sur le terrain, viable économiquement et capable de remplacer durablement l'utilisation d'insecticides chimiques et néfastes pour l'environnement. Peu de souches locales de nématodes ont actuelle-

ment été testées, le profil odorant des billes à long terme n'est pas connu, la densité optimale des nématodes dans les billes doit encore être évaluée et l'efficacité de la formulation sur plusieurs semaines mérite encore d'être étudiée. Ce travail se concentrera sur la partie attractant et biocide de la méthode "attract-and-kill" afin de fournir le matériel adéquat pour répondre à ces manquements et à l'élaboration d'une formulation efficace.

2 Objectifs et hypothèses

L'objectif de ce mémoire est de participer au développement d'une méthode de type "attract-and-kill" destinée à lutter contre les taupins du genre *Agriotes*. Deux formulations à base d'huile essentielle et de pyrèthre naturel seront également évaluées en tant que méthodes de lutte alternatives. Ce travail s'organise en deux parties, chacune avec son objectif et ses hypothèses associées.

Partie 1 - Attractant de taupins

Objectif : Évaluer l'impact de billes d'alginate formulées avec des extraits naturels et des composés synthétiques sur le comportement de recherche de nourriture des larves de taupins.

- Hypothèse : Les larves de taupins sont attirées par des billes d'alginate contenant des extraits naturels de pomme de terre.
- Hypothèse : L'ajout de composés synthétiques, découverts dans les COVs de parties endogées de plantes, dans des billes d'alginate contenant des extraits naturels de pomme de terre permet d'améliorer leur attractivité par rapport à des billes ne contenant que des extraits naturels de pomme de terre.

Partie 2 - Nématodes entomopathogènes et insecticides naturels

Objectif : Identifier les souches de nématodes entomopathogènes les plus virulentes envers les larves de taupins.

- Hypothèse : Des différences significatives de virulence entre les souches testées permettront d'identifier une ou plusieurs souches efficaces.

Objectif : Évaluer le pouvoir biocide de deux formulations, sous forme de granulés, sur les larves de taupins.

- Hypothèse : Les formulations évaluées affecteront de manière significative la probabilité de survie des larves de taupins mises au contact des granulés.

3 Matériel et méthodes

3.1 Collecte et conservation du matériel vivant

3.1.1 Les taupins

Les larves de taupins utilisées dans les différents essais ont été collectées sur des parcelles sous culture biologique n'utilisant plus de pesticides depuis au moins 2 années. Les collectes ont été réalisées au printemps 2022. Les zones de collectes sont reprises dans la figure 6. Un échantillon de larves de taupins a été envoyé à l'ILVO (Institut de Recherche Flamand pour l'Agriculture, les Pêcheries et l'Alimentation) pour identification par analyse moléculaire (Dr. Johan Witters, ILVO). Ces analyses ont permis de déterminer qu'un mélange de deux espèces, *A. obscurus* et *A. lineatus*, étaient majoritairement présentes au sein des zones de collecte.

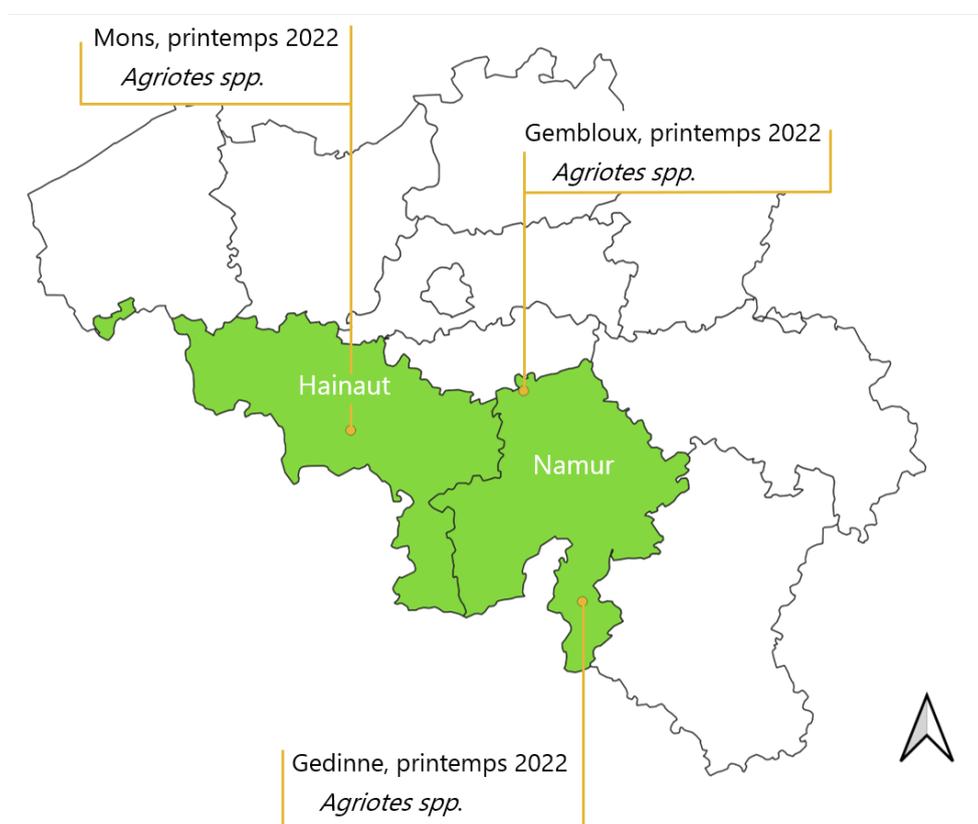


FIGURE 6 – Carte des zones et périodes de collectes de larves de taupins.

Après récolte, les larves de taupins ont été ramenées au laboratoire, mesurées, puis séparées par stade larvaire dans des boîtes d'élevage en plastique. Afin d'éviter des comportements cannibales, les boîtes contenaient un maximum de 10 taupins. En outre, 1,7 g d'un mélange de graines d'orge, de blé et de froment et 400 ml d'un substrat humide composé en quantités égales de terreau (La plaine Chassart, Belgique) tamisé à 5 mm et de vermiculite (Hermie, Pays-Bas) a été ajouté dans les boîtes (figure 7). Après une semaine, lorsque les graines ont germé, 10 taupins ont été ajoutés et un couvercle percé a été utilisé pour fermer les boîtes. Les boîtes d'élevage ont été conservées dans un laboratoire à température ambiante régulée (21 °C) et ont été renouvelées toutes les trois semaines pour remplacer les plantes flétries.



FIGURE 7 – Boite d'élevage utilisée pour conserver les taupins.

Les taupins utilisés dans cette étude correspondaient à un mélange de larves issues des différentes zones de collectes et d'une population constituée à 59 % d'*A. obscurus* et 41 % d'*A. lineatus* (population désormais désignée comme *Agriotes* spp.). Afin de standardiser les essais, tous les individus utilisés étaient au même stade larvaire (L5-L6) [63]. Pour les analyses comportementales, les individus présentant des marques de pré-mue (lignes blanches transversales), de mue ou de post-mue (larves blanches) ont systématiquement été écartées des tests afin d'éviter un biais lié à leur état physiologique. En effet, les larves en cours de mue ne se nourrissent pas. Il est donc probable de ne pas obtenir de réponse de la part de ces larves lors de tests comportementaux [40]. Finalement, les taupins n'ont été utilisés qu'une seule fois au cours des différents essais comportementaux.

Une semaine avant chaque test comportemental, les individus nécessaires à l'essai ont été mis à jeûner [63] dans des boites en plastique individuelles de 5,8 x 4,4 x 4,5 cm contenant de la vermiculite humidifiée à 60 % de sa capacité de rétention en eau (CRE). Les taupins isolés ont été conservés dans le noir, dans une pièce à température ambiante régulée (21 °C).

3.1.2 Populations de nématodes entomopathogènes

Un total de 11 souches de NEPs ont été testées dans cette étude afin d'évaluer leur virulence envers les larves de taupins (tableau 2). Neuf de ces souches appartiennent à trois espèces (*H. bacteriophora*, *S. feltiae* et *S. carpocapsae*) et deux souches sont en cours d'identification. Parmi les onze souches, trois sont commerciales (vendues pour la lutte contre les taupins et autres larves de coléoptères), une a été isolée en Belgique en mai 2022 dans le site de collecte de taupins de Gembloux et le reste a été obtenu via un laboratoire partenaire basé en Espagne, l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin.

TABLE 2 – Espèces et souches des nématodes entomopathogènes utilisées dans le cadre de l'évaluation de leur pouvoir biocide sur les taupins du genre *Agriotes* spp.

Espèce	Souche	Origine	Répétitions
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> Poinar	HB e-nema	Commerciale	30
	HB1		30
	HB2		30
<i>Steinernema feltiae</i> Filipjev	SF insectosphère	Commerciale	30
	SF1		30
	SF2		30
<i>Steinernema carpocapsae</i> Weiser	SC e-nema	Commerciale	30
	SC1		30
	SI		30
En cours d'identification	GBX.W	Gembloux, Belgique	30
Contrôle			20

Les populations de NEPs ont été reproduites tous les 4 mois dans des larves de fausses teignes de la cire, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera : Pyralidae). Pour chaque souche, cinq *G. mellonella* ont été placées sur un papier filtre, dans une boîte de Petri de 8,8 cm de diamètre. Les larves ont ensuite été infectées à l'aide de 750 μL d'une solution contenant 1 nématode. μL^{-1} . Dès leur mort, les *G. mellonella* ont été transférées dans des dispositifs de collecte des JIs (figure 8). Les *G. mellonella* ont été placées sur un papier filtre légèrement humidifié dans une boîte de Petri de 5,5 cm de diamètre. Cette boîte de Petri a été mise à flotter dans une autre boîte de 8,8 cm de diamètre contenant 30 ml d'eau. Cette disposition permet de récupérer les JIs dans l'eau, sans résidus biologiques provenant des larves. En effet, dès leur émergence, les nématodes migrent dans la boîte contenant de l'eau. Le papier filtre a été humidifié tous les jours afin d'éviter sa dessiccation. Les JIs ont été collectés dès leur émergence (entre 6 à 13 jours, selon leur cycle de vie, annexe 4) et placés dans des flasques de culture Falcon de 40 ml (VWR). Les flasques ont été conservées à 14 °C afin de plonger les nématodes dans un état de quiescence [26]. Dans le cadre des infections sur taupins, chaque souche de NEPs a préalablement été reproduite dans *G. mellonella* et les nématodes ont été utilisés au plus tard 7 jours après émergence.



FIGURE 8 – Dispositif de reproduction et collecte des nématodes entomopathogènes *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar.

3.2 Tests comportementaux

Afin d'évaluer le pouvoir attractif du jus de pomme de terre encapsulé dans des billes d'alginate, des tests comportementaux en olfactomètres à deux voies ont été réalisés :

- (a) Jus de pomme de terre *versus* contrôle (billes sans odeur)

Une seconde expérience a été réalisée afin d'évaluer si l'ajout de molécules spécifiques dans la bille permet d'augmenter l'attractivité du leurre. Deux molécules selon trois modalités ont été testées :

- (b) Jus de pomme de terre + 2-pentylfuran *versus* jus de pomme de terre
- (c) Jus de pomme de terre + 2-undécanone *versus* jus de pomme de terre
- (d) Jus de pomme de terre + 2-pentylfuran + 2-undécanone *versus* jus de pomme de terre

3.2.1 Formulation de billes d'alginate

Les billes d'alginate ont été réalisées selon une méthodologie développée par Barsics et al. [65] et adaptée aux besoins de l'étude.

Pour chaque modalité, une solution d'alginate concentrée à 4 % (p/v) a été réalisée. Pour cela, de la poudre d'alginate de sodium (Sigma-Aldrich) a été ajoutée à de l'eau déminéralisée, mélangée à l'aide d'une plaque agitatrice à 750 rpm (Heidolph, MR 2002) et chauffée à 50 °C jusqu'à dissolution complète de la poudre. Durant cette phase, la solution a perdu de l'eau par

évaporation. Celle-ci a donc été pesée à l'ajout de la poudre et après sa dissolution afin d'ajuster le volume d'eau perdu. Après dissolution de la poudre, la solution a été mise à refroidir sur une autre plaque agitatrice en maintenant la vitesse de rotation. Lorsque la température est redescendue, de l' α -tocophérol (Sigma-Aldrich) a été ajouté (1,5 % p/v). En parallèle, des pommes de terre Monalisa (Wallonie, Belgique) issues de l'agriculture biologique, ne présentant ni germes ni blessures, ont été mixées et pressées à froid dans un extracteur de jus (Easehold 600W).

Les billes de la modalité **(a)** ont été réalisées en ajoutant un volume de jus de pomme de terre équivalent à celui de la solution d'alginate afin d'obtenir une solution contenant du jus de pomme de terre (50 % v/v), de l'alginate (2 % p/v) et de l' α -tocophérol (0,75 % p/v). Afin d'éviter l'oxydation du jus de pomme de terre, celui-ci a été ajouté immédiatement après sa production dans l'alginate sous agitation magnétique. Les billes contrôle ont été réalisées selon les mêmes modalités, en remplaçant le jus de pomme de terre par de l'eau déminéralisée.

Les billes d'alginate des modalités **(b)**, **(c)** et **(d)** ont été produites en ajoutant de l'huile de tournesol contenant $0,1 \mu\text{L}\cdot\text{ml}^{-1}$ de 2-pentylfuran pur (Thermo scientific) ou de 2-undécanone pur (Sigma-Aldrich) ou $0,05 \mu\text{L}\cdot\text{ml}^{-1}$ de chaque composé à du jus de pomme de terre et une solution d'alginate. La formulation a ainsi été adaptée pour atteindre un taux d'émission proche de $1 \text{ ng de composé}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de billes, qui correspond à un taux testé par Barsics et al. [65]. La solution finale a ensuite été émulsionnée avec un homogénéiseur à haute vitesse (JTYL, FSH-2A) à 24 000 rpm, jusqu'à l'obtention d'une émulsion blanchâtre homogène. Les billes contrôle ont été réalisées selon les mêmes modalités, sans ajout de molécules odorantes volatils.

Les mélanges ont ensuite été aspirés grâce à une pompe péristaltique (Shenchen LabS3) (6 rpm) et extrudés à travers une seringue de $1,2 \times 40 \text{ mm}$ (Romed HOLLAND). Les gouttes formées sont tombées dans une solution de CaCl_2 de 0,1 M sous agitation magnétique (150 rpm). Une distance de 20 cm a été maintenue entre la tête de la seringue et la surface de la solution de chlorure de calcium afin de produire des billes sphériques. Les billes ont été stabilisées 30 minutes dans la solution puis séchées pendant 20 minutes sous hotte. Elles ont finalement été transférées dans des contenants en verre et conservées en chambre froide ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) pendant 24 h avant analyse. Il a en effet été démontré que le taux d'émission d'odeur des billes est plus important 24 heures après leur production (*données non publiées*).

Le matériel utilisé pour la production des billes a systématiquement été plongé pendant 24 heures, entre chaque modalité, dans un bain de détergent alcalin (RBS T 105, Chemical Products R. Borghraef s.a., Belgique) afin d'éliminer les odeurs et éviter les contaminations.

3.2.2 Évaluation de l'attractivité de composés odorants

L'attractivité du jus de pomme de terre a été évaluée dans un système olfactométrique à deux branches comme présenté dans la figure 9. Ce dispositif est composé d'un tube en verre, un olfactomètre, de 20 cm de long et 3 cm de diamètre interne. L'olfactomètre dispose d'une tubulure centrale longue de 3 cm et large de 1 cm. En outre, les deux extrémités latérales sont ouvertes.

Le dispositif a été connecté à deux flacons Schotts en borosilicate de 100 ml (VWR) remplis de vermiculite légèrement tassée, à 60 % de sa CRE. Dans un des flacons, un gramme de billes d'alginate sans attractant a été déposé à la surface de la vermiculite. Dans l'autre flacon, un gramme de billes chargées de l'odeur de pomme de terre a été déposé à la surface de la vermiculite. Les billes ont ensuite été recouvertes de vermiculite et un morceau de moustiquaire carré (8 x 8 cm) a été déposé sur le goulot des flacons afin d'empêcher les taupins d'accéder aux billes. Un connecteur (Bola GL45, VWR) muni d'un joint en silicone (GL45, VWR) couvert de Téflon a finalement été ajouté sur les flacons. La zone odeur s'est vue attribuer aléatoirement un côté (gauche - droite). L'odeur a ensuite été laissée diffuser pendant 15 minutes. Un taupin unique a été ajouté dans le dispositif via l'ouverture centrale et un bouchon Schott GL14 (VWR) y a été déposé. Le dispositif a été mis au noir dans une pièce à température ambiante régulée (21 °C) et le taupin a disposé d'une heure pour réaliser un choix. De multiples copies de ce dispositif ont été réalisées dans le cadre des essais, en fonction du nombre de larves testées.

A la fin de l'expérience, la position du taupin dans les olfactomètres a été enregistrée dans une feuille de prise de note (annexe 19). Les flacons ont été déconnectés des tubes en verre et la vermiculite a été évacuée à l'aide d'une brochette en bois. Les 3 premiers centimètres de chaque côté de la tubulure centrale ont été définis comme une zone "neutre" : les taupins présents dans cette zone ont été considérés comme n'ayant pas effectué de choix. Afin d'évaluer le potentiel attractif du jus de pomme de terre, un total de 104 répétitions (104 larves d'*Agriotes* spp.), réparties sur 5 jours, ont été réalisées.

Des billes chargées de l'odeur de pomme de terre ainsi que du 2-pentylfuran, du 2-undécanone et un mélange des deux molécules ont également été testées dans ces dispositifs olfactométriques. Des billes contenant uniquement l'odeur de pomme de terre ont été utilisées en tant que contrôle. Respectivement, 64, 63 et 65 répétitions réparties sur 2 jours, ont été réalisées pour les modalités (b), (c) et (d).



FIGURE 9 – Dispositif olfactométrique utilisé dans le cadre des tests comportementaux.

3.3 Caractérisation de l'odeur des billes d'alginate

3.3.1 Prélèvements d'odeurs

Afin de caractériser le profil odorant des billes d'alginate réalisées avec le jus de pomme de terre, des prélèvements sous flux d'air dynamique ont été réalisés (figure 10). Deux grammes de billes produites 24 heures avant les tests ont été insérés dans des dispositifs de prélèvement en verre en forme de Y, plongés jusqu'à hauteur des billes dans un bain marie chauffé à 30 °C. Ces modalités ont été adoptées suite à des tests préliminaires réalisés avec un gramme de billes et à température ambiante (21 °C). Aucun pic attribuable à l'odeur de la formulation n'avait en effet été observé.

Les dispositifs de prélèvement consistent en un tube long de 11,5 cm, de 1 cm de diamètre et ouvert d'un côté. Un second tube situé à 4 cm de la première ouverture forme un angle de 45 degrés avec le premier et permet l'insertion de cartouches de prélèvement d'odeurs. Avant les tests, les tubes ont été plongés 24 heures dans des bains de RBS T 105, rincés à l'eau déminéralisée puis séchés en étuve à 80 °C durant 24 heures. Une pompe de prélèvement Gilian (GilAir plus, Sensidyne, LP, Allemagne) a aspiré de l'air filtré à travers une cartouche de charbon actif pendant 24 heures. Le flux d'air a été fixé à 200 ml.min⁻¹. Les composés organiques volatils ont été capturés dans des cartouches de thermodésorption Tenax/Carbograph (Markes International Ltd., Royaume-Uni) préalablement conditionnées sous un flux d'azote de 50 ml.min⁻¹ pendant 24 heures à 310 °C (TC-20, Markes International Ltd., Royaume-Uni). Une seconde cartouche de percée a été ajoutée afin de vérifier la perte éventuelle de composés volatils. Les cartouches ont été connectées à l'aide de tubes en Téflon. Après collecte, les cartouches ont été conservées à 4 °C avant analyse. Dans le cadre de ces prélèvements, 5 répétitions ont été réalisées. Un prélèvement contrôle de tube vide, selon les mêmes modalités, a été effectué afin d'observer les éventuelles odeurs non attribuables à la formulation.

Un prélèvement a également été réalisé sur les billes contenant l'odeur de pomme de terre et le 2-pentylfuran, le 2-undécanone et le mélange des deux odeurs afin de s'assurer que ces molécules étaient émises par les billes. La durée du prélèvement, déterminée via des tests préliminaires, a été fixée à deux heures afin d'observer les molécules d'intérêt sans expérimenter de percée. Dans le cadre de ces prélèvements, 3 répétitions ont été réalisées ainsi qu'un prélèvement contrôle (tube vide).

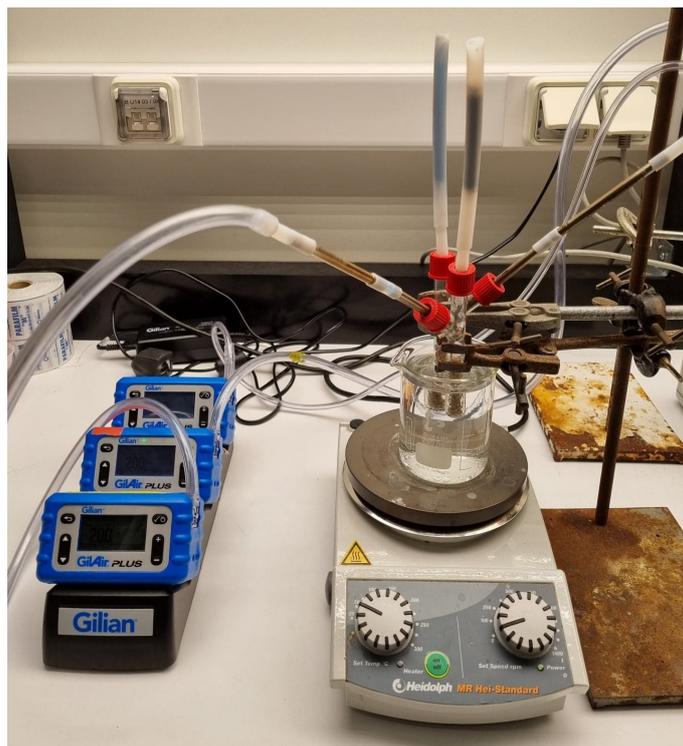


FIGURE 10 – Dispositif de prélèvement des odeurs de billes d’alginate.

3.3.2 Analyse des odeurs

Les cartouches contenant les odeurs collectées lors des différents prélèvements ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse (GCMS-QP2020 NX, Shimadzu, Japon). Les composés volatils ont été désorbés à 280 °C pendant 8 minutes ($60 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) dans un désorbeur thermique automatique (TD-30R, Shimadzu, Japon). Les composés thermodésorbés ont ensuite été piégés par effet Peltier à - 20 °C puis chauffés à 280 °C pour être injectés dans une colonne chromatographique HP5-ms (30 m X 0,25 mm de diamètre interne, épaisseur de la paroi : $0,50 \mu\text{m}$, Agilent). Un split ratio de 3 a été appliqué et l’hélium a été utilisé comme gaz porteur selon un flux constant de $1.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Le programme de température du four a commencé à 40 °C et la température a été maintenue durant 3 minutes. La température a ensuite été montée selon un taux de $5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ à 200 °C puis à 300 °C à $20 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. La température finale a été maintenue durant 15 minutes. Le spectre de masse a été enregistré à partir de 4 minutes après le début de l’injection jusqu’à la fin du programme de température. Le mode d’impact des électrons a été fixé à 0,1 kV (source à 200 °C, ligne de transfert à 230 °C, plage de masse analysée : 35 à 300 $\text{m}\cdot\text{Z}^{-1}$). L’identification des composés détectés a été réalisée grâce à l’interprétation des temps de rétention et la comparaison de leur masse spectrale avec des bibliothèques spectrales (NIST17 et FFNSC 3, selon un minimum de similarité de 90 %). Des indices de rétention linéaires ont été calculés, selon la relation de Van Den Dool et Kratz [118], via le temps de rétention d’un standard de n-alcane (C7 à C30, $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ dans du n-hexane, Sigma-Aldrich) et comparés avec les indices de rétention fournis dans les bibliothèques. Tous les composés ont été quantifiés à l’aide du n-butylbenzene (pureté : 99 %, Sigma-Aldrich) comme standard interne ($5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$).

3.4 Évaluation de la virulence de 11 souches des nématodes entomopathogènes et sélection de souches prometteuses

L'efficacité biocide de 11 souches de NEPs sur des larves du genre *Agriotes* spp. a été évaluée selon un protocole adapté de Campos-Herrera et al. [119].

Les larves de taupins ont été placées individuellement dans des boîtes en plastique circulaires (4 cm de diamètre) contenant 20 g de sable sec (Cobo garden, Belgique). Le sable a été humidifié à 90 % de sa CRE avec une solution de NEPs permettant d'atteindre une concentration de 500 JIs.cm⁻². Chaque boîte a été fermée à l'aide d'un couvercle percé.

Chaque traitement a été répliqué 15 fois. Les contrôles ont été réalisés selon les mêmes modalités, sans ajouter de nématodes et ont été répliqués 10 fois. L'ensemble de l'expérience a été répétée deux fois avec de nouveaux insectes, des NEPs à nouveau reproduits dans *G. mellonella* et un nouveau substrat. Lors du second screening, les NEPs ont cependant été utilisés immédiatement après leur émergence. Afin de valider la méthode utilisée, 5 *G. mellonella* par souche de NEPs ont aussi été infectées suivant les mêmes modalités. Durant toute la durée de l'expérience, les insectes ont été conservés dans le noir, dans une pièce maintenue à 21 °C.

Chaque semaine, les boîtes ont été pesées et leur CRE a été ajustée. Un suivi de mortalité a été réalisé après 24 heures, 48 heures, 72 heures, 1 semaine puis chaque semaine pendant 6 semaines. La mortalité a été évaluée en observant les mouvements des taupins dans les boîtes. Les taupins ont été considérés comme vivants lorsque des signes évidents d'activité ont été observés : mouvements du corps ou des pattes et ouverture des pièces buccales. Les larves considérées comme mortes ont été conservées pendant 10 jours avant d'être disséquées pour observer la présence de nématodes et confirmer que la mort était bien due à ceux-ci (figure 11). Les différentes souches et espèces testées sont reprises dans le tableau 2.



FIGURE 11 – Observation à la loupe binoculaire de nématodes entomopathogènes suite à la dissection d'un taupin mort.

3.5 Efficacité de deux insecticides naturels

L'efficacité biocide de deux formulations sur des larves du genre *Agriotes* spp. a été évaluée selon un protocole adapté d'une étude de Elberson et al. [120]. Les formulations incluent une huile essentielle et un pyrèthre naturel. Elles ont été fournies par la société Xavagri (Belgique) et incluent deux dosages.

Les insectes ont été placés individuellement dans des boîtes en plastique (25 cm²) contenant du sol collecté durant les captures de taupins (profondeur de 0 à 20 cm). Ce sol a été caractérisé : il s'agit d'un sol limoneux de pH 5 (pH KCL) et de teneur en carbone organique de 69 g.Kg⁻¹, sous culture biologique (sans utilisation de pesticides). La terre prélevée a été tamisée à 2 mm et stérilisée par autoclave puis mise à sécher en étuve durant 24 heures à 85 °C. Chaque boîte a été fermée par un couvercle.

Dans chaque boîte, 24,1 g de sol amené à 60 % de sa CRE (20 g de sol sec), une larve de taupin et un morceau de pomme de terre rectangulaire de 1 x 2 cm de côté ont été mis. Diverses modalités ont été testées. Ainsi ont été ajoutés, soit :

- 3,7 mg de granulés de l'une des quatre formulations (fournis par Xavagri)
- 6 microlitres d'un insecticide (Edialux insecticide 10 ME) contenant de la cyperméthrine (10 g.l⁻¹) (témoin positif)
- aucun ajout de produit (témoin négatif/contrôle)

Chaque semaine, les boîtes ont été pesées et leur CRE a été ajustée. Un suivi de mortalité a été réalisé après 24 heures, 48 heures, 72 heures, 1 semaine, 2 semaines et 3 semaines. La mortalité a été évaluée en sortant le taupin de sa boîte et en le plaçant dans une boîte de Petri. Les taupins ont été considérés comme vivants lorsque des signes évidents d'activités ont été observés : mouvements du corps ou des pattes et ouverture des pièces buccales.

Les modalités testées incluent (figure 12) :

- Modalité H1 : Huile essentielle (8 g.Kg⁻¹ de granulés), 20 répétitions
- Modalité H2 : Huile essentielle (16 g.Kg⁻¹ de granulés), 20 répétitions
- Modalité P1 : Pyrèthre naturel (8 g.Kg⁻¹ de granulés), 20 répétitions
- Modalité P2 : Pyrèthre naturel (16 g.Kg⁻¹ de granulés), 20 répétitions
- Modalité T+ : Témoin positif, 15 répétitions
- Modalité T- : Témoin négatif (contrôle), 15 répétitions

Ces essais ont été complétés par deux modalités supplémentaires pour lesquelles des taupins ont été placés directement en contact avec les granules pendant 2 minutes, avant d'être replacés en boîte microcosme :

- Modalité The : Contact direct sur granules contenant de l'huile essentielle (16 g.Kg⁻¹ de granulés), 10 répétitions
- Modalité Tpy : Contact direct sur granules contenant le pyrèthre naturel (16 g.Kg⁻¹ de granulés), 10 répétitions

Durant toute la durée de l'expérience, les taupins ont été conservés dans le noir, dans une pièce maintenue à 21 °C.



FIGURE 12 – Boîtes dans lesquelles s'est déroulée l'expérience visant à évaluer l'effet biocide de deux produits insecticides sous forme de granulés

3.6 Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées dans le logiciel R Studio (version 4.1.2).

Un modèle général linéaire mixte a été ajusté afin d'évaluer si de l'attraction ou du rejet était observé chez les larves de taupins pour les billes contenant du jus de pomme de terre et pour les billes contenant du jus de pomme de terre et des composés synthétiques. L'éventuel impact de la date des essais sur le choix des insectes a été testé en l'incluant en tant que facteur aléatoire dans les modèles. L'effet de ce facteur a été évalué en comparant la distribution des résidus du modèle nul (intersect seulement) et du modèle contenant le facteur aléatoire avec une distribution χ^2 .

Dans le cas de l'identification des odeurs, seules les molécules présentes dans trois prélèvements ou plus ont été prises en compte et les composés également identifiés dans le blanc ont été retirés. Pour chaque molécule, la médiane et les quartiles ont été calculés afin de les représenter sous forme de box-plots. La quantité relative moyenne (ng.g^{-1} de billes. h^{-1} de prélèvement), la quantité moyenne (ng.g^{-1} de billes. h^{-1} de prélèvement) et les écarts-types associés ont également été calculés. Dans chaque cas, les données aberrantes ont été identifiées via la méthode ROUT (Q = 1 %) [121] et supprimées.

Des régressions de Cox ont été ajustées sur les données issues des tests de virulence des souches de NEPs en utilisant la souche la plus virulente comme référence. L'effet du facteur souche et groupe de screening sur la probabilité de survie des larves de taupins a été évalué en comparant la distribution des résidus du modèle nul (intersect seulement) et du modèle contenant le facteur d'intérêt (souche ou groupe) avec une distribution χ^2 . Finalement, des courbes de survies de Kaplan-Meier ont été dressées et un test Log-Rank de Mantel-Cox a été

utilisé pour déterminer si l'évolution de la probabilité de survie en fonction du facteur souche suit des tendances similaires ou non. Ces tests ont été reproduits lors de l'analyse des données issues de l'évaluation de l'efficacité de deux insecticides naturels en utilisant le témoin positif comme référence.

4 Résultats et discussion

4.1 Tests comportementaux

Attractivité de l'extrait de pomme de terre

Comme attendu, le jus de pomme de terre formulé dans les billes d'alginate s'est montré attractif pour les larves d'*Agriotes* spp.. Sur les 104 larves testées, 87 ont réalisé un choix et 17 sont restées dans la zone centrale de l'olfactomètre (zone "neutre"). Les larves ayant répondu se sont préférentiellement dirigées vers le côté contenant le jus de pomme de terre par rapport au côté contenant les billes contrôles ($z = 3,39$; $p < 0,001$) (figure 13). Le facteur aléatoire testé (la date de l'analyse) n'a pas eu d'impact sur les résultats ($\chi^2 = 0,82$; $p = 0,37$).

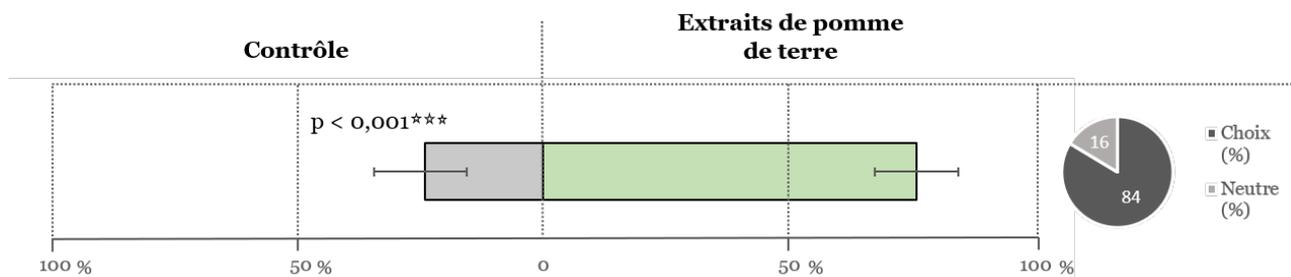


FIGURE 13 – Résultat des tests comportementaux visant à évaluer l'attractivité du jus de pomme de terre dans des billes d'alginate. Le côté contrôle représente des billes sans odeurs (sans jus de pomme de terre).

Ajout de composés synthétiques à l'extrait de pomme de terre

Sur les 64 larves testées pour le 2-pentylfuran (B), 42 larves ont répondu. Pour le 2-undecanone (C) et le mélange des deux composés (D), respectivement 46 larves sur les 63 testées et 46 larves sur les 65 testées ont effectué un choix. Les larves ayant effectué un choix n'ont pas montré de préférence pour le 2-pentylfuran ($z = 1,53$; $p = 0,13$), le 2-undecanone ($z = -1,92$; $p = 0,06$) et le mélange des deux composés ($z = -0,92$; $p = 0,36$). A nouveau, le facteur aléatoire (la date des essais) n'a pas eu d'impact sur les résultats ($\chi^2 = 1,04$; $p = 0,31$).

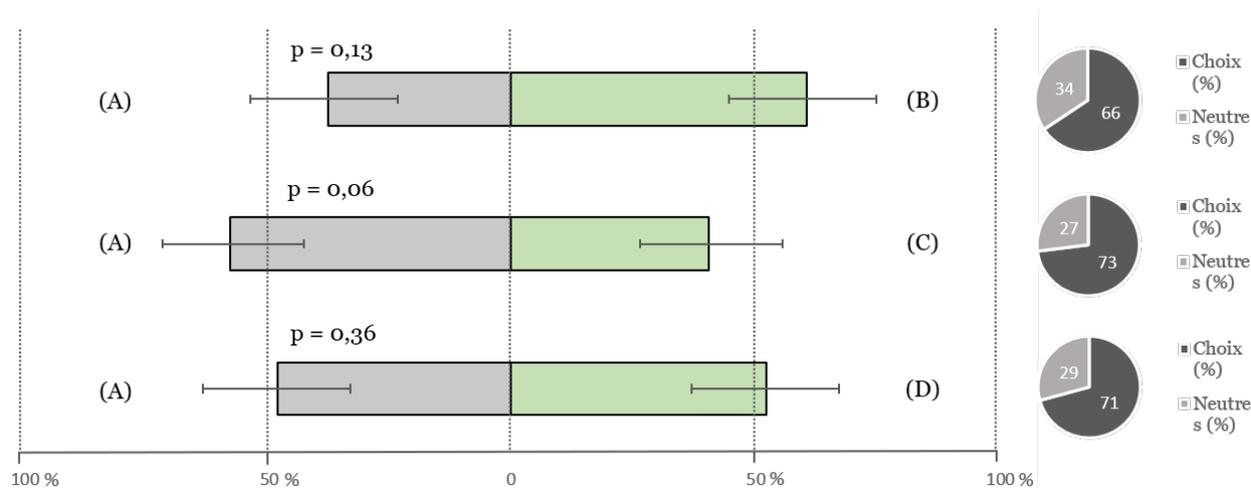


FIGURE 14 – Résultat des tests comportementaux visant à évaluer l’attractivité de différentes molécules synthétiques, en association avec du jus de pomme de terre, dans des billes d’alginate. (A) = odeur de pomme de terre, (B) = odeur de pomme de terre et 2-pentylfuran, (C) = odeur de pomme de terre et 2-undecanone, (D) = odeur de pomme de terre et 2-pentylfuran + 2-undecanone.

Les essais comportementaux confirment l’hypothèse selon laquelle des extraits naturels de pomme de terre encapsulés dans des billes d’alginate sont attractifs et justifient leur utilisation en tant qu’attractants au sein d’un dispositif de type "attract-and-kill". En effet, le jus de pomme de terre, utilisé dans la production des billes, est obtenu très facilement en broyant et pressant des tubercules et ne nécessite aucune transformation supplémentaire avant son incorporation dans une solution d’alginate. Le jus de pomme de terre présente donc cet avantage d’être obtenu facilement et en grandes quantités dans les tubercules mais également d’être un produit naturel non toxique pour l’environnement. En outre, l’attractivité de la pomme de terre est largement évoquée dans la littérature et plusieurs articles ont étudié son potentiel en tant qu’appât pour la production de pièges [85, 122, 123, 124]. En 2017, La Forgia et Verheggen [19] ont montré que des morceaux de pommes de terre (variété Grenaille), introduits dans des dispositifs olfactométriques identiques à ceux utilisés dans ce travail étaient attractifs pour les larves de taupins. Cette étude est cependant la seule ayant tenté d’évaluer l’attractivité des tubercules de pommes de terre dans ce type de dispositif. Les résultats obtenus dans ce mémoire sont donc les premiers à démontrer le pouvoir attractif de billes d’alginate contenant du jus de pomme de terre.

L’ajout de composés synthétiques dans la formulation n’a pas permis d’augmenter l’attractivité du leurre naturel. Étant donné que le 2-pentylfuran [65] et le 2-undecanone (*données non publiées*) seuls ont été identifiés comme attractifs, il est possible que l’interaction entre ces composés et les COVs émis par le jus de pomme de terre ne soit pas optimale pour attirer les larves de taupins. En fonction du stade de développement des racines la proportion des différents COVs émis par une plante peut varier, résultant en des mélanges porteurs d’information avec un impact variable sur l’orientation des taupins [64]. Il a, de plus, été observé qu’en trop grandes quantités, les COVs peuvent impacter l’orientation des taupins et rendre un mélange répulsif. Dans une étude ayant étudié l’attractivité d’un mélange de COVs (hexanal, (E)-hex-2-éнал, (E)-non-2-éнал et (E,Z)-nona-2,6-diéнал), il a été observé que les taupins de l’espèce *A. sordidus* étaient attirés par les doses les plus faibles du mélange et montraient une tendance à

être repoussés par la dose la plus élevée [64]. Cela pourrait d'ailleurs expliquer pourquoi l'ajout de 2-undécanone s'est avéré presque répulsif pour les taupins (41 % de choix). Cette molécule étant naturellement présente dans les tubercules de pommes de terre (*données non publiées*), la dose totale, après avoir ajouté une quantité supplémentaire ($34,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de billes), pourrait s'avérer être répulsive pour les taupins. Dans le cas de l'essai faisant intervenir un mélange de 2-pentylfuran et de 2-undécanone, la quantité de chaque molécule ajoutée a été divisée par deux, ce qui peut expliquer pourquoi la formulation ne s'est pas montrée répulsive. En comparaison aux extraits naturels de plantes, les composés synthétiques présentent l'avantage de posséder une composition constante et maîtrisable, il est donc intéressant de continuer l'étude de mélanges de COVs afin d'élaborer une formulation attractive efficace. Les COVs identifiés dans les billes d'alginate conçues au cours de ce travail, et discutés plus loin, pourraient servir de base pour le développement d'un mélange potentiellement attractif pour les larves fil de fer.

Les taupins n'ont pas été autorisés à accéder et goûter les billes au cours des essais. Cependant, les larves sont connues pour ne pas rester à proximité d'une source odorante si elles ne peuvent l'atteindre [64], de la même manière que lorsqu'elles rencontrent une source de nourriture non adaptée [125]. Il est donc possible qu'elles se soient dirigées vers l'autre source attractive au cours de l'expérimentation. Des observations plus fréquentes pourraient permettre de connaître la durée appropriée des essais afin qu'ils ne dépassent pas le temps nécessaire aux larves pour atteindre un appât.

Il est utile de rappeler que le CO_2 est un élément majeur dans l'attraction des taupins [64]. La présence d'un gradient indique une source de nourriture et peut provoquer un déplacement de la part de l'insecte. Des composés spécifiques apportent quant à eux un complément d'information pouvant indiquer la présence d'une plante hôte adaptée [61]. Malgré le fait que les COVs sont capables d'attirer les taupins même en l'absence de CO_2 [64], il a été observé qu'un mélange synthétique composé uniquement de COVs issus de racines d'orge (hexanal, (E)-hex-2-éanal, (E)-non-2-éanal et (E,Z)-nona-2,6-diéanal) n'était pas aussi attractif que des racines de cette plante [64]. Selon l'étude ayant réalisé cette observation, la différence pourrait s'expliquer par l'absence de CO_2 dans le mélange synthétique. Dès lors, des billes plus attractives pourraient être imaginées grâce à l'association d'extraits de pomme de terre et d'une source de CO_2 (*S. cerevisiae* [115]). Un autre élément à noter est l'importance de la variété de pomme de terre utilisée dans les essais comportementaux. Comme démontré par plusieurs études [32, 59, 97], certaines variétés de maïs et de pommes de terre sont moins sensibles aux dégâts de taupins. Ces différences, observées sur le terrain et en laboratoire, peuvent résulter de la variabilité de la composition chimique des variétés (taux en glycoalkaloïdes et sucres notamment [59]) et du mélange de COVs émis [97]. Il serait donc possible d'influer sur l'attractivité du leurre en sélectionnant la variété de pomme de terre la plus adaptée.

En définitive, la formulation attractive incluse dans les billes d'alginate mérite d'être encore étudiée via l'évaluation de l'ajout d'une source de CO_2 ainsi que par la comparaison entre les niveaux d'attractivité de mélanges de composés synthétiques par rapport à des extraits naturels issus de variétés attractives. Les COVs identifiés dans la suite de ce travail peuvent servir de base pour l'élaboration d'une formulation attractive.

4.2 Caractérisation de l'odeur des billes d'alginate

Afin de caractériser les odeurs émises par les billes d'alginate contenant du jus de pomme de terre, et ainsi faciliter l'identification des composés responsables du phénomène d'attraction précédemment observé, des prélèvements de COVs ont été réalisés sur ces billes. Lors de la mise au point de la méthode de prélèvement, nous avons constaté qu'un prélèvement d'une durée de 24 heures réalisé sur des billes à température ambiante ne permettait pas d'identifier de composés odorants en dehors du composé servant de standard interne (annexe 20). Les prélèvements suivants ont donc été réalisés en chauffant les billes au bain marie. Au total, 9 molécules ont pu être identifiées et 8 ont été quantifiées (figure 15). Les quantités moyennes (ng.g^{-1} de billes. h^{-1} de prélèvement) de ces molécules sont reprises dans la table 3. Le 3-hydroxy-2-butanone (acétoïne) est la molécule la plus émise par les billes ($16,74 \pm 4,14 \text{ ng.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). En moyenne, les billes ont émis entre 19 et 1674 fois plus d'acétoïne que le reste des molécules. Les molécules contenant des fonctions alcool ont été émises en quantités globalement plus importantes que les aldéhydes et le dodécane. Le 3-méthyl-1-butanol est d'ailleurs la molécule la plus importante après l'acétoïne, ayant été émise, en moyenne, à raison de $0,87 \text{ ng.g}^{-1}$ de billes. h^{-1} de prélèvement. Le 3-méthylbutanal est la molécule la moins émise au sein des billes, $0,01 \text{ ng.g}^{-1}$ de billes ont été émis, en moyenne, sur une heure de prélèvement. L'hexanal a également été identifié dans chaque prélèvement mais n'a pas pu être quantifié, sa quantité émise étant systématiquement inférieure à la limite de quantification.

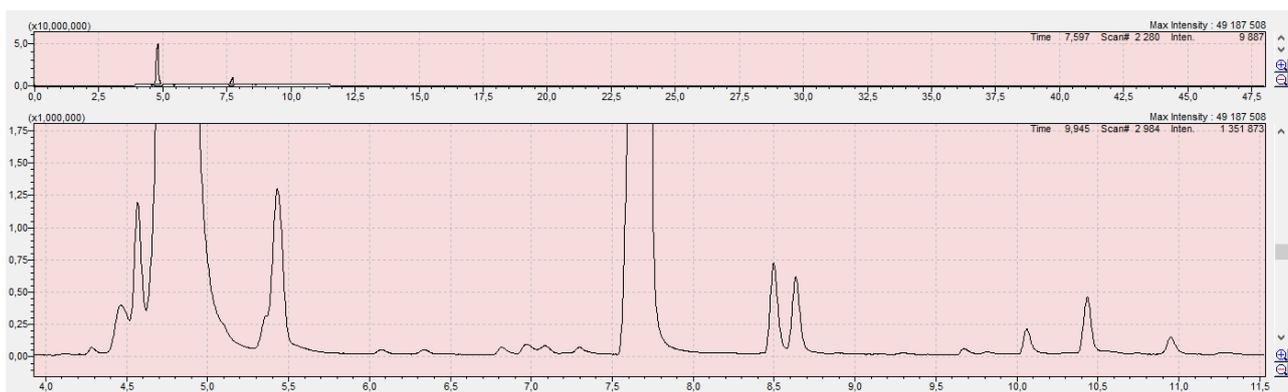


FIGURE 15 – Partie de chromatogramme obtenu au cours des prélèvements de billes d'alginate contenant du jus de pomme de terre (24 heures de prélèvement, 2 grammes de billes et bain marie à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Le tableau 3 montre également les quantités relatives moyennes émises pour chaque molécule. Comme attendu, l'acétoïne constitue la fraction majoritaire de chaque prélèvement. Le 2-méthyl-1-butanol représente également une fraction importante de chaque prélèvement mais l'écart-type associé à cette fraction étant grand, la variabilité entre les prélèvements doit être très importante. Le 3-méthylbutanal, le (E)-2-octénal et le dodécane sont les composés constituant, en moyenne, la fraction la plus faible des molécules émises.

La figure 16 représente la médiane, les valeurs minimales et maximales et les premier et troisième quartiles des quantités émises pour chaque molécule durant le prélèvement. Cette figure permet d'appréhender la variabilité des taux d'émission au sein des différents échantillons. Le taux d'émission du 2-méthyl-1-butanol est relativement variable, la quantité maximale émise

pour cette molécule est largement supérieure à la médiane. Le 3-méthyl-1-butanol et le 2,3-butanediol possèdent, eux, des valeurs équitablement réparties autour de la médiane. Il est utile de remarquer que l'échelle des valeurs de l'acétoïne est différente de celle des autres molécules. La fourchette des quantités émises pour cette molécule varie de 12,96 à 23,37 ng.g⁻¹ de billes par heure de prélèvement.

La présence du 2-pentylfuran et du 2-undécanone dans les billes formulées avec ces composés a été vérifiée et confirmée lors des prélèvements (annexe 21). En moyenne, le 2-pentylfuran possède un taux d'émission 18 fois plus important que le 2-undécanone dans les billes d'alginate.

TABLE 3 – Quantités émises de composés organiques volatiles identifiés lors du prélèvement de billes d'alginate contenant du jus de pomme de terre.

Molécule	Formule	Quantité relative moyenne ± écart-type (%)	Quantité moyenne ± écart-type (ng.g ⁻¹ .h ⁻¹)
3-Méthylbutanal	C5H10O	1,69 ± 1,85	0,01 ± 0,03
(E)-2-Octéanal	C8H14O	1,63 ± 2,61	0,07 ± 0,03
Nonanal	C9H18O	2,81 ± 2,77	0,18 ± 0,06
Hexanal	C6H12O	/	/
3-Méthyl-1-butanol	C5H12O	4,77 ± 0,70	0,87 ± 0,05
2-Méthyl-1-butanol	C5H12O	17,99 ± 29,29	0,74 ± 0,37
2,3-Butanediol	C4H10O2	1,74 ± 0,52	0,34 ± 0,15
Dodécane	C12H26	1,67 ± 1,83	0,07 ± 0,01
Acétoïne	C4H8O2	88,22 ± 3,14	16,74 ± 4,14

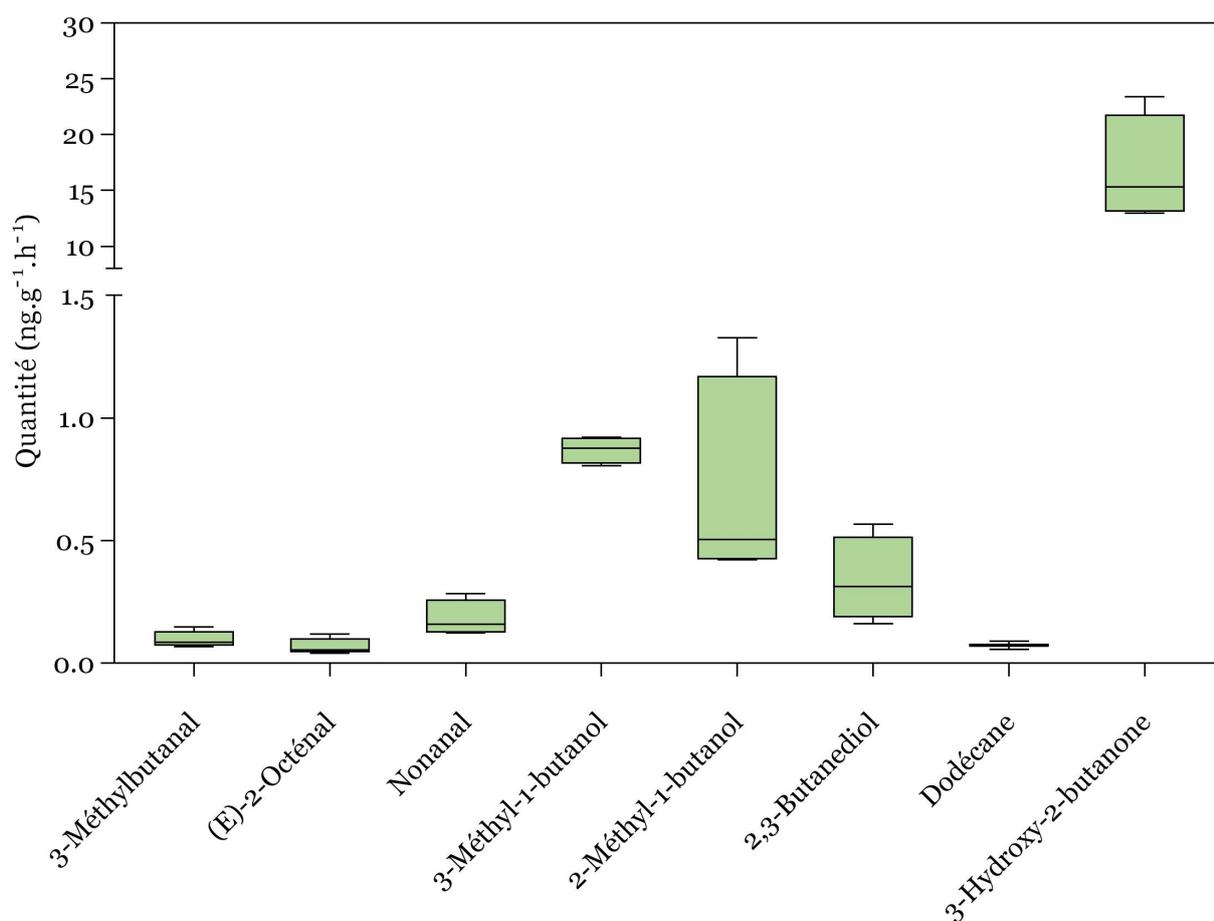


FIGURE 16 – Résultat du prélèvement d'odeurs des billes de pomme de terre. Les quantités émises sont exprimées en $\text{ng.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de billes de prélèvement.

Les pré-tests réalisés avec 1 gramme de billes et sans bain-marie n'ont pas permis d'obtenir des pics analysables. L'absence de ces pics montre que les COVs du jus de pomme de terre sont fortement retenus par la matrice d'alginate, pourtant poreuse [126], puisqu'il a fallu chauffer et doubler le poids des billes pour obtenir des pics analysables. Au vu de ces observations, il est remarquable que les taupins soient capables de s'orienter vers 1 gramme de billes, émettant pendant seulement 1 heure, non chauffées et noyées dans un substrat odorant (la vermiculite). Cela semble signifier que le seuil de sensibilité des larves soit largement inférieur à celui de la GC-MS. Cependant, le dispositif utilisé dans nos essais comportementaux ne permet pas de conclure que les COVs émis par le jus de pomme de terre soient, seuls, responsables de l'attraction des larves d'*Agriotes* spp.. Il se peut que les billes émettent du CO_2 (non détecté en GC-MS) via la fermentation du jus de pomme de terre ou l'installation de champignons. Il serait intéressant de réaliser des enregistrements électrophysiologiques afin de comprendre quels composés (et en quelle quantité) induisent une transmission neuronale mesurable chez les larves de taupins [127]. Analyser le taux d'émission de CO_2 des billes permettrait également de vérifier si ce dernier rentre en compte dans l'attractivité de celles-ci et permettrait d'orienter la recherche d'un attractant de manière plus efficace.

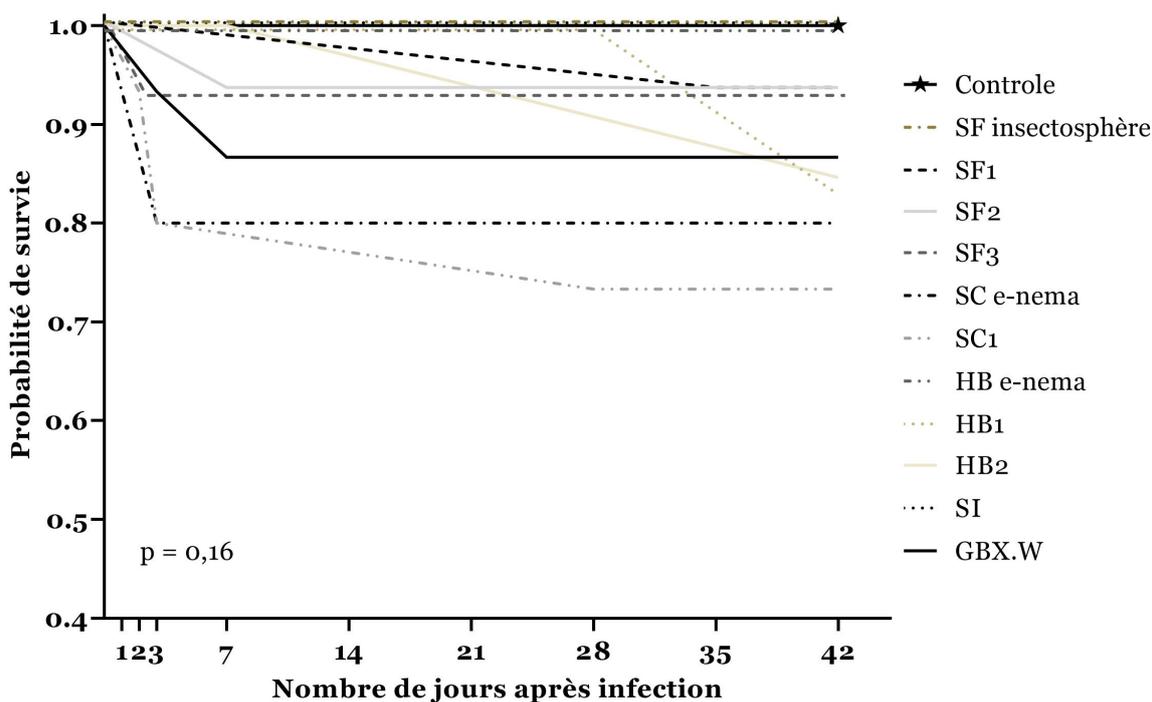
Les prélèvements réalisés dans ce travail révèlent la présence de 9 molécules : le 3-méthylbutanal, le (E)-2-octéanal, le nonanal, l'hexanal, le 3-méthyl-1-butanol, le 2-méthyl-1-butanol, le 2,3-butanediol, le dodécane et le 3-hydroxy-2-butanone (acétoïne). Parmi ces différentes molécules le (E)-2-octéanal, l'hexanal et le 2-méthyl-1-butanol ont été identifiés dans des extraits de pomme de terre crues (variété Bintje) [128]. Le (E)-2-octéanal, le nonanal, le 3-méthyl-1-butanol et le 2-méthyl-1-butanol ont aussi été identifiés dans des émissions d'odeurs de pommes de terre (variété Russet Burbank) [129, 130]. Des prélèvements réalisés dans le laboratoire d'accueil sur des pommes de terre de la variété Monalisa révèlent également la présence du 3-méthylbutanal et du nonanal (*données non publiées*). Certaines molécules ont été identifiées à plusieurs reprises dans les différents articles ayant étudié le profil odorant des pommes de terre mais n'ont pas été retrouvées dans les billes analysées dans ce travail. C'est notamment le cas du 1-octen-3-ol, du 2-pentylfuran, du phénylacétaldéhyde, du benzaldéhyde et de l'heptanal. A l'inverse, plusieurs molécules ont été identifiées dans ce travail sans toutefois être présentes dans d'autres prélèvements d'odeurs de pommes de terre. C'est le cas des molécules de 2,3-butanediol, dodécane et 3-hydroxy-2-butanone, la molécule la plus présente dans les prélèvements de billes.

Le **3-méthylbutanal** est un métabolite présent chez les plantes et chez *S. cerevisiae* [131]. Il est également produit par des bactéries lors de la dégradation de la leucine [132] et est utilisé comme agent aromatisant dans le commerce [133]. Le **(E)-2-octéanal** est un composé retrouvé dans diverses espèces végétales, dont le maïs [97]. Il possède un effet antifongique : il inhibe la croissance et la reproduction des champignons [131]. Un effet attractant a également été identifié pour cette molécule chez *Lygus lucorum* Meyer-Dür (Heteroptera : Miridae) [134]. Le **nonanal** est un métabolite très répandu chez les plantes et divers microorganismes [134, 135]. Selon une étude récente, ce composé serait particulièrement attractif pour les abeilles mellifères [135]. L'**hexanal** est également commun chez les plantes et a été identifié comme étant attractif pour divers insectes (*Delia radicum* L. (Diptera : Anthomyiidae) [136] et *Halyomorpha halys* Stal. (Heteroptera : Pentatomidae) [137]). Le **3-méthyl-1-butanol** et le **2-méthyl-1-butanol** sont tous deux des COVs présents chez de nombreuses plantes et sont des métabolites observés chez *S. cerevisiae* [131]. Le 3-méthyl-1-butanol est également un antifongique [131]. Le **dodécane** est une molécule produite par le métabolisme des plantes. Finalement, le **3-hydroxy-2-butanone**, l'acétoïne, est le composé le plus présent dans ce relevé. Ce COV est produit chez de nombreux organismes, tels que les plantes, les micro organismes ou certains animaux [138]. Il a été identifié, avec le **2,3-butanediol**, comme étant un éliciteur de croissance des feuilles ou racines des plantes [139, 140] et peut également servir de source d'énergie lorsqu'il est transformé à partir du **2,3-butanediol** par fermentation microbienne [139]. La présence du **2,3-butanediol**, semble donc coïncider avec celle de l'acétoïne car les deux composés co-existent au sein de cascades enzymatiques et peuvent être obtenus l'un à partir de l'autre [141]. L'acétoïne et le 2,3-butanediol sont également utilisés par de nombreux insectes et autres animaux comme un signal de fermentation et de présence de source de nourriture riche en sucre [138]. L'acétoïne joue donc probablement un rôle important dans l'attractivité des billes de jus de pomme de terre pour les larves de taupins. A ce stade, il est difficile d'émettre des conclusions quant au rôle des autres molécules dans l'attractivité des billes. Un essai comportemental basé sur le mélange de COVs identifiés dans ce travail et en faisant varier les quantités de chaque élément pourrait apporter des informations sur leur rôle respectif.

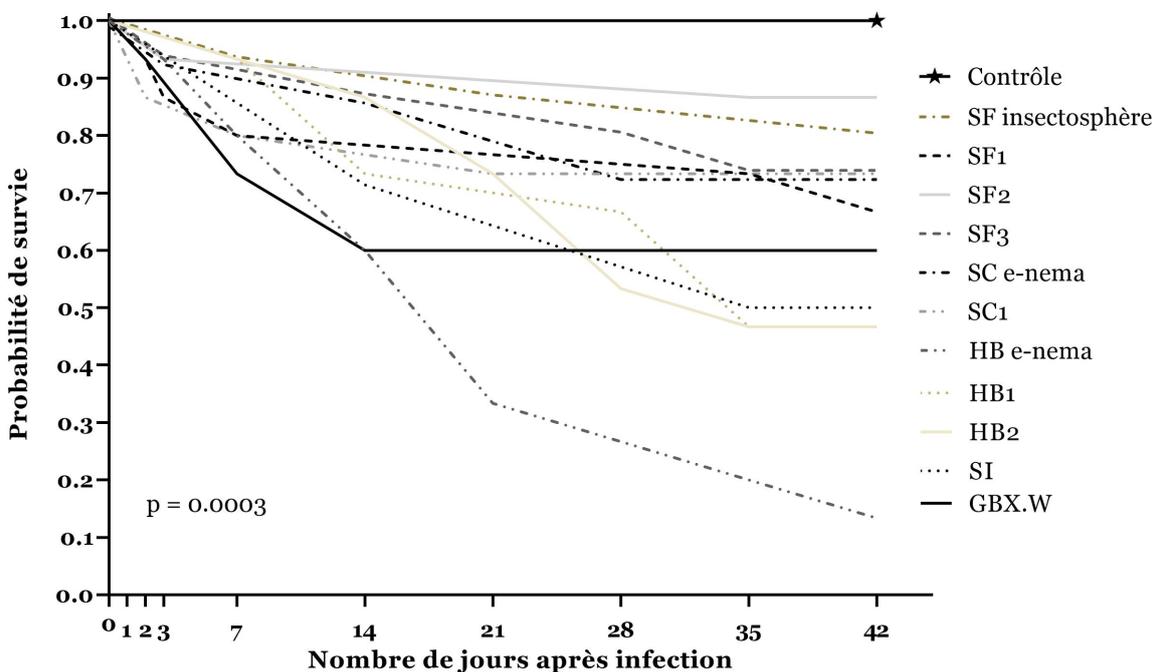
La méthode de prélèvement utilisée dans ce travail n'est probablement pas parvenue à identifier tous les composés volatils émis par les billes. Le nombre de molécules identifiées apparentées à l'odeur de la pomme de terre, à savoir 6 molécules, est relativement faible en comparaison de son spectre total des volatils [128, 129, 130, 142]. De plus, il est possible que le fait de chauffer les billes durant 24 heures, même à des températures faibles, ait modifié le profil d'odeur en produisant de nouveaux volatils par dégradation de leurs précurseurs [128, 129, 142]. Afin d'obtenir un profil complet, il est probablement nécessaire de réaliser de nouveaux tests. Utiliser un dispositif de prélèvement plus grand permettrait de prélever un plus grand nombre de billes afin d'augmenter la quantité de COVs émis par ces billes mais également d'homogénéiser les prélèvements afin de diminuer la grande variabilité observée dans les résultats.

4.3 Évaluation de la virulence de souches de nématodes entomopathogènes et sélection de souches prometteuses

Onze souches de nématodes entomopathogènes ont été évaluées dans ce travail afin de sélectionner les plus virulentes sur les taupins du genre *Agriotes* spp.. Deux répétitions ont été réalisées sur l'ensemble de l'expérience et un impact significatif de la répétition sur les probabilités de survie des larves a été observé ($\chi^2 = 41,06$, $p < 0,001$), le second screening étant le plus impactant (64 taupins sont morts contre seulement 16 lors du premier screening). La figure 17a montre les probabilités de survie pour le premier screening et la figure 17b montre les probabilités associées au second screening. Aucune larve contrôle n'est morte durant la durée des essais. Dans le cas du premier screening, la souche SC1 a été la plus efficace, 27 % des taupins ayant été tués. HB e-nema a été la souche la plus virulente pour le second screening. Elle a tué 87 % des larves mais aucune dans le cas du premier screening. Cependant, la souche GBX.W est celle ayant tué le plus rapidement, avec 27 % des insectes morts au bout d'une semaine. Dans le cas du premier screening, aucune souche ne s'est distinguée en termes de virulence ($\chi^2 = 15,51$, $p = 0,16$). Les résultats du second screening ont cependant permis d'identifier quatre souches particulièrement efficaces : HB1 ($z = -1,80$, $p = 0,07$), HB2 ($z = -1,81$, $p = 0,07$) et SI ($z = -1,75$, $p = 0,08$) présentent des niveaux d'efficacité comparables à HB e-nema. La probabilité de survie des taupins étant, après 6 semaines, de 0,47 et 0,5 pour HB1 et HB2 et SI respectivement (annexe 6).



(a) Courbes de survies réalisées sur les données issues du premier screening uniquement.



(b) Courbes de survies réalisées sur les données issues du second screening uniquement.

FIGURE 17 – Évolution de la probabilité de survie des taupins du genre *Agriotes* spp. en fonction du temps après infection par des nématodes entomopathogènes. Contrôle = pas de nématodes, SF insectosphère, SC e-nema et HB e-nema = souches commerciales, SF = *Steinernema feltiae* Filipjev, SC = *Steinernema carpocapsae* Weiser, HB = *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, SI = *Steinernema* sp., GBX.W = souche locale en cours d'identification.

Le second screening a offert des niveaux d'efficacité sensiblement plus élevés que le premier. Lors du premier screening, les NEPs sont passés par un état de quiescence avant leur utilisation ce qui a possiblement affecté leur capacité à pénétrer et infecter les larves. De plus, au moment de l'ajout de la solution de NEPs dans les pots en plastique, le sable s'est compacté nous forçant à le remuer pour permettre aux taupins de se mouvoir facilement dans le milieu. Il est possible que cette opération ait affecté leur état physiologique ainsi que leur survie. Lors du second screening, les NEPs ont été utilisés immédiatement après leur émergence et le sable n'a été remué que légèrement. Ces changements pourraient expliquer les différences observées. Il est nécessaire de réaliser un troisième screening afin de valider les résultats du second en suivant ces deux recommandations :

- Il est utile de connaître la durée du cycle de reproduction des NEPs (annexe 4) afin de décaler dans le temps l'infection des *G. mellonella* et ainsi récolter les JIs au même moment. Cela permet d'infecter les insectes dès leur émergence et éviter de les conserver au frigo.
- Lors de l'application de la solution de NEPs, il faut éviter au maximum de remuer le sable afin d'éviter de les écraser.

La différence entre les niveaux d'efficacité de HB e-nema et SI entre le premier et le second screening peut interpeller. Ces deux souches n'ont en effet tué aucun taupin lors du premier screening mais ont été les plus virulentes lors du second. Il est possible que ces deux souches soient plus fragiles que les autres et qu'elles aient été fortement affectées par le passage au frigo et le fait que le sable ait été remué. Malgré une efficacité plus faible, les souches SC e-nema et SC1 ont toutefois préservé un niveau d'efficacité constant entre les deux screenings (entre 20 et 27 % de mortalité, annexes 5 et 6). Ces éléments sont également à prendre en compte pour le choix des souches de NEPs les plus prometteuses. Si Hb e-nema et SI sont plus fragiles que les autres souches, il est possible que leur efficacité, une fois appliqués sur le terrain, soit fortement réduite. De ce fait, il serait intéressant d'évaluer les capacités de survie des différentes souches de NEPs testées une fois encapsulés au sein de billes d'alginate afin de sélectionner les souches à la fois les plus virulentes mais également les plus résistantes.

Les taupins possèdent des barrières naturelles très efficaces contre les NEPs ce qui explique des taux de mortalité généralement faibles dans ce genre d'essais [26]. Une étude ayant comparé 10 souches de NEPs (*H. bacteriophora* et *Steinernema* spp.) a démontré que le taux de pénétration de JIs dans des larves de *L. californicus* ne dépassait pas 33 % [143]. La souche commerciale HB e-nema a cependant été capable de tuer 87 % des insectes dans nos tests. Trois autres souches seulement ont été capables de tuer plus de 50 % des larves : HB1, HB2 et SI. Pour le reste, les taux de mortalité varient entre 13 % pour la souche la moins efficace (SF2) et 40 % pour la souche GBX.W. Ces résultats contrastent avec une étude récente où une population de *S. feltiae* (SF AM25) et une population SC e-nema avaient été plus efficaces qu'une population de HB e-nema, causant respectivement 50 %, 28 % et 10 % de mortalité après 8 semaines, en conditions de laboratoire [26]. Dans nos essais, aucune souche de *S. feltiae* n'a réussi à provoquer plus de 27 % de mortalité. Sandhi et al. [143] ont comparé la virulence de plusieurs souches de NEPs sur *L. californicus* et montré que *Steinernema* spp. étaient systématiquement plus efficaces que *H. bacteriophora* : 60-70 % de mortalité en 4 semaines pour les premiers (25-200 JIs.cm⁻²) contre 50-60 % de mortalité pour les seconds à 200 JIs.cm⁻². Toutefois, Campos-Herrera et Gutiérrez [105] ont observé qu'une souche de *S. feltiae* n'avait pas tué plus de 10 % d'une population de *A. sordidus* en douze jours, confirmant des observations antérieures [144]. Finalement, une étude a trouvé des taux de mortalité similaires aux nôtres

pour une souche de *H. bacteriophora* (UWS1), soit 67 % de mortalité chez *A. lineatus* trois semaines après l'infection [145].

Tous ces résultats évoquent une grande variabilité dans les chiffres proposés par ces études. En plus de différentes méthodologies, concentrations de JIs et temps d'observation utilisés dans ces travaux, il est utile de souligner l'impact que l'espèce ou la population des taupins peut avoir sur les résultats de screenings. Si la souche HB e-nema s'est montrée la plus virulente dans notre cas, cette conclusion pourrait ne pas être généralisable et ne s'appliquer qu'aux espèces de taupins testées. De ce fait, il serait intéressant d'étudier la virulence des différentes souches utilisées dans ce travail pour d'autres espèces de taupins. En définitive, les tests réalisés ici représentent une étape vers l'élaboration d'une méthode de type "attract-and-kill" et devraient être utilisés pour la sélection d'une souche potentiellement efficace dans ce cadre. L'objectif final étant d'optimiser la virulence des souches sélectionnées et leur durée de vie [26, 113].

4.4 Efficacité de deux insecticides naturels

L'efficacité de produits phytosanitaires naturels a été évaluée sur des larves d'*Agriotes* spp.. Aucun des traitements fournis par la société Xavagri n'a impacté significativement la probabilité de survie des taupins ($\chi^2 = 4,67$, $p = 0,70$). Le témoin positif a tué 13 % des taupins en 3 semaines, H2, P2, The et Tpy en ont tués 10 %. Le traitement P1 a provoqué la mort de 5 % des taupins et seuls le contrôle et H1 n'ont tué aucun taupin en 3 semaines.

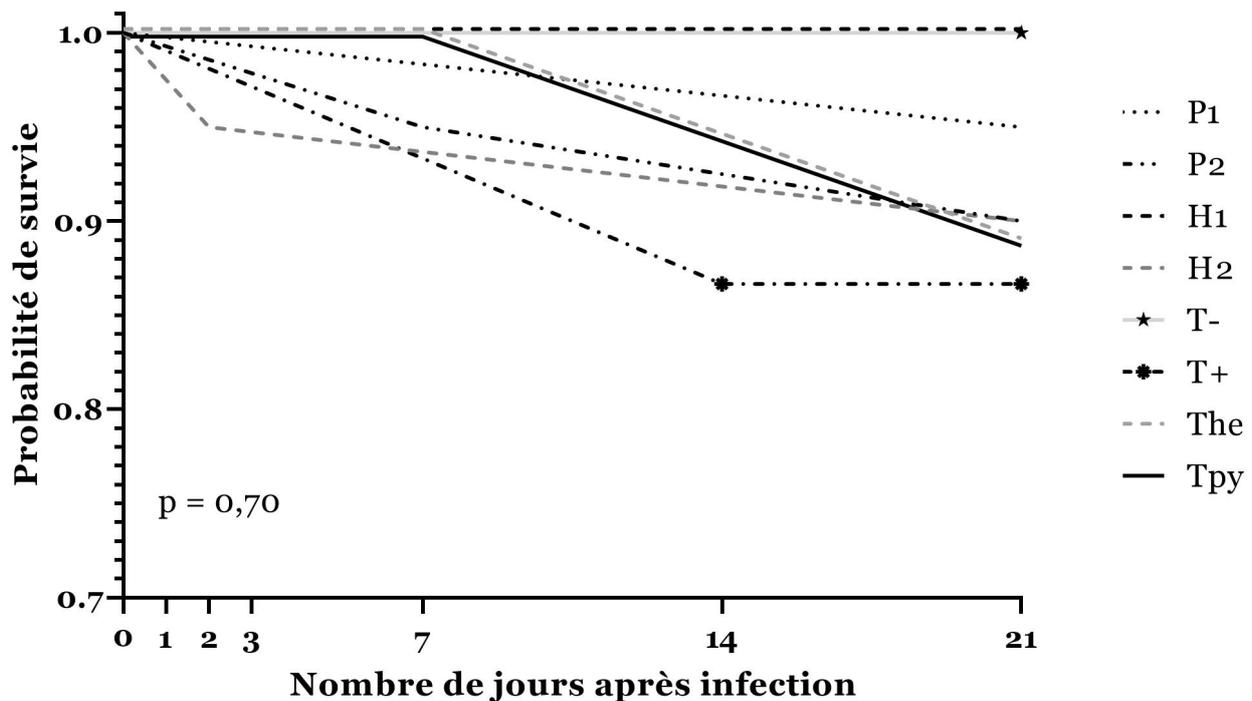


FIGURE 18 – Évolution de la probabilité de survie des larves d'*Agriotes* spp. en fonction du nombre de jours après l'application de la formulation. P1 = Pyrèthre naturel (8 g.Kg⁻¹ de granulés), P2 = Pyrèthre naturel (16 g.Kg⁻¹ de granulés), H1 = Huile essentielle (8 g.Kg⁻¹ de granulés), H2 = Huile essentielle (16 g.Kg⁻¹ de granulés), T- = Témoin négatif, T+ = Cyperméthrine (10 g.l⁻¹), The = Mise en contact direct avec les granulés (16 g.Kg⁻¹), Tpy = mise en contact direct avec les granulés (16 g.Kg⁻¹).

Les niveaux de mortalité observés pour l'huile essentielle et le pyrèthre naturel dans cette étude sont relativement faibles et aucune différence significative entre le contrôle et les formulations n'a pu être observée. Dans une étude réalisée par Waliwitiya et al., du thymol, du citronellal et de l'eugénol ont réussi à tuer, en 24 heures, 50 % des *A. obscurus* testés pour des doses de 196, 405 et 517 $\mu\text{g.larve}^{-1}$ respectivement [101]. Pour tuer 50 % des larves de *D. vergifera vergifera* en 48 heures, par contre, il n'a fallu que 20 $\mu\text{g.larve}^{-1}$ de thymol, 87 $\mu\text{g.larve}^{-1}$ d'eugénol et 146 $\mu\text{g.larve}^{-1}$ de citronellal [103]. Selon Waliwitiya et al. [101], cette différence entre les résultats obtenus pour *A. obscurus* et *D. vergifera vergifera* pourrait s'expliquer par l'épaisse cuticule des taupins, limitant l'absorption des molécules et par la capacité des larves à métaboliser et excréter les composés. Il pourrait être intéressant de ré-évaluer les formulations testées dans ce mémoire à différentes doses, la quantité de produit utilisé étant corrélée aux taux de mortalités observés [101]. Le faible taux d'efficacité de l'insecticide commercial utilisé

en tant que témoin positif pourrait s'expliquer par le fait que les larves de taupins ne sont pas les cibles initialement visées pour ce produit.

Les formulations les plus efficaces ont tué 10 % des insectes au bout de trois semaines. En comparaison, la souche la plus virulente de NEPs en a tué 67 % et la souche la moins efficace en a tué 13 % pour la même période de temps.

5 Conclusion et perspectives

Ce travail avait pour objectif de développer une méthode de lutte de type "attract-and-kill" contre les taupins du genre *Agriotes* spp.. Dans ce cadre, deux objectifs ont été étudiés à l'aide de différentes expérimentations :

L'**identification d'un attractant** efficace et prometteur pour cette méthode a été réalisée via l'évaluation de plusieurs formulations encapsulées dans des billes d'alginate. Les essais réalisés ont permis d'identifier que le jus de pomme de terre était attractif pour les larves de taupins. Le fait qu'il soit facile à obtenir et naturel en fait un candidat sérieux pour cette partie de la méthode. La tentative d'améliorer l'attractivité d'une formulation d'alginate contenant du jus de pomme de terre grâce à l'ajout de composés synthétiques s'est toutefois révélée infructueuse. Ni l'association du 2-pentylfuran, du 2-undécanone ou du mélange des deux molécules avec le jus de pomme de terre ne se sont montrées plus attractives que le jus de pomme de terre seul. Les résultats obtenus dans ce mémoire ont permis d'identifier plusieurs pistes de travaux futurs, celles-ci comprenaient :

- L'évaluation de l'attractivité de jus de différentes variétés de pommes de terre.
- L'évaluation du taux d'émission de CO² par les billes d'alginate et éventuellement l'évaluation de l'attractivité des billes d'alginate contenant une source de CO² (ex. : *S. cerevisiae*).

La **caractérisation des odeurs** des billes contenant du jus de pomme de terre a permis d'identifier différents composés organiques volatils généralement présents dans des pommes de terres et d'obtenir une vision plus claire sur les éléments volatils responsables de l'attractivité des billes. Cependant, seule une petite fraction des COVs des tubercules a pu être identifiée, indiquant le faible taux d'émission de la matrice d'alginate des billes. Les prélèvements réalisés n'ont donc probablement pas été capables de caractériser entièrement le profil d'odeur des billes. Cette partie du travail a également permis d'identifier plusieurs possibilités pour la suite du développement de la méthode "attract-and-kill" :

- La réalisation de nouveaux prélèvements en multipliant la quantité de billes prélevées.
- La réalisation d'un mélange de VOCs issu des odeurs prélevées sur les billes d'alginate et l'évaluation de son attractivité.

L'**identification** de souches de NEPs prometteuses contre *Agriotes* spp. a également été réalisée et a permis d'identifier 4 souches efficaces : *H. bacteriophora* e-nema, HB1 et HB2 et *Steinernema* sp. (SI). Cependant, des différences importantes entre les niveaux d'efficacité des différentes souches entre le premier et le second screening ont été observées, et ce, particulièrement pour HB e-nema et SI. Sur base de ces observations, des pistes de travaux futurs ont également été évoquées dans le cadre de ce travail, elles comprenaient notamment :

- La réalisation d'un nouveau test de virulence destiné à confirmer les observations faites lors du second essai, selon les mêmes modalités.
- L'évaluation des capacités de survie des souches de NEPs au sein de billes d'alginate.
- L'évaluation de la virulence des souches de NEPs sur d'autres espèces dommageables de taupins.

L'impact de **produits phytosanitaires naturels** sur la survie des larves de taupins a également été évaluée au sein de ce travail. Les résultats ont montré un faible taux d'efficacité de ces produits, phénomène probablement lié à la capacité des taupins à métaboliser et excréter les molécules insecticides de ces formulations. La possibilité de réaliser de nouveaux essais selon des doses plus importantes a été proposée.

En conclusion de ce travail, il est important de rappeler que les méthodes abordées dans ces lignes ne sont pas étudiées pour remplacer toutes les techniques de lutte actuellement existantes mais bien pour s'intégrer dans cet écosystème déjà bien en place. Toutes ces méthodes sont donc complémentaires, la diversité et la richesse représentant les fondations solides d'un écosystème de gestion des ravageurs stable et durable.

6 Bibliographie

- [1] Maloney, E., Taillebois, E., Gilles, N., Morrissey, C., Liber, K., Servent, D., & Thany, S. (2021). Binding properties to nicotinic acetylcholine receptors can explain differential toxicity of neonicotinoid insecticides in Chironomidae. *Aquatic Toxicology*, 230, 105701. doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105701
- [2] Jactel, H., Verheggen, F., Thiéry, D., Escobar-Gutiérrez, A., Gachet, E., & Desneux, N. (2019). Alternatives to neonicotinoids. *Environment International*, 129, 423-429. doi: 10.1016/j.envint.2019.04.045
- [3] Matsuda, K., Buckingham, S., Kleier, D., Rauh, J., Grauso, M., & Sattelle, D. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends In Pharmacological Sciences*, 22(11), 573-580. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01820-4
- [4] Tomizawa, M., & Casida, J. (2005). Neonicotinoids : insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptor. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 45(1), 247-268. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930
- [5] Costa, L., Gennaro, G., Guizzetti, M., & Vitalone, A. (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers In Bioscience*, 13(4), 1240-1249. doi: 10.2741/2758
- [6] Nauen, R., & Denholm, I. (2005). Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. *Archives Of Insect Biochemistry And Physiology*, 58(4), 200-215. doi: 10.1002/arch.20043
- [7] Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review Of Entomology*, 52(1), 81-106. doi: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091440
- [8] Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J., & Aupinel, P. et al. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348-350. doi: 10.1126/science.1215039
- [9] Whitehorn, P., O'Connor, S., Wackers, F., & Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079), 351-352. doi: 10.1126/science.1215025
- [10] Suryanarayanan, S., & Kleinman, D. (2013). Be(e)coming experts: The controversy over insecticides in the honey bee colony collapse disorder. *Social Studies Of Science*, 43(2), 215-240. doi: 10.1177/0306312712466186
- [11] Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., & Desneux, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. *Environment International*, 89-90, 7-11. doi: 10.1016/j.envint.2016.01.009
- [12] Jactel, H., Imler, J., Lambrechts, L., Failloux, A., Lebreton, J., & Maho, Y. et al. (2021). Insect decline: immediate action is needed. *Comptes Rendus. Biologies*, 343(3), 267-293. doi: 10.5802/crbiol.37

- [13] Rezende-Teixeira, P., Dusi, R., Jimenez, P., Espindola, L., & Costa-Lotufo, L. (2022). What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments. *Environmental Pollution*, 300, 118983. doi: 10.1016/j.envpol.2022.118983
- [14] Epstein, Y., Chapron, G., & Verheggen, F. (2021). EU Court to rule on banned pesticide use. *Science*, 373(6552), 290-290. doi: 10.1126/science.abj9226
- [15] Epstein, Y., Chapron, G., & Verheggen, F. (2022). What is an emergency? Neonicotinoids and emergency situations in plant protection in the EU. *Ambio*, 51(8), 1764-1771. doi: 10.1007/s13280-022-01703-5
- [16] Zhao, Y., Yang, J., Ren, J., Hou, Y., Han, Z., Xiao, J., & Li, Y. (2020). Exposure level of neonicotinoid insecticides in the food chain and the evaluation of their human health impact and environmental risk: An overview. *Sustainability*, 12(18), 7523. doi: 10.3390/su12187523
- [17] Laubscher, B., Diezi, M., Renella, R., Mitchell, E., Aebi, A., Mulo, M., & Glauser, G. (2022). Multiple neonicotinoids in children's cerebro-spinal fluid, plasma, and urine. *Environmental Health*, 21(1). doi: 10.1186/s12940-021-00821-z
- [18] Official Journal of the European Union. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides (Text with EEA relevance). (2009).
- [19] la Forgia, D., & Verheggen, F. (2019). Biological alternatives to pesticides to control wireworms (Coleoptera: Elateridae). *Agri Gene*, 11, 100080. doi: 10.1016/j.aggene.2018.100080
- [20] Ferrier, J., & Espagnacq, L. (2012). *Fiche taupin, Toutes cultures légumières..* Presentation.
- [21] Parker, W., & Howard, J. (2001). The biology and management of wireworms (*Agriotes* spp.) on potato with particular reference to the U.K. *Agricultural And Forest Entomology*, 3(2), 85-98. doi: 10.1046/j.1461-9563.2001.00094.x
- [22] Jedlička, P., & Frouz, J. (2007). Population dynamics of wireworms (Coleoptera, Elateridae) in arable land after abandonment. *Biologia*, 62(1), 103-111. doi: 10.2478/s11756-007-0017-4
- [23] Pic, M., Eric, P., Martinez, M., Genson, G., Rasplus, J., & Albert, H. (2011). Les taupins du genre *Agriotes* démasqués par leurs empreintes génétiques. In 9. *Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture*. Montpellier, France.
- [24] Vernon, R., Van Herk, W., Tolman, J., Ortiz Saavedra, H., Clodius, M., & Gage, B. (2008). Transitional sublethal and lethal effects of insecticides after dermal exposures to five economic species of wireworms (Coleoptera: Elateridae). *Journal Of Economic Entomology*, 101(2), 365-374. doi: 10.1093/jee/101.2.365
- [25] Adhikari, A., & Reddy, G. (2017). Evaluation of trap crops for the management of wireworms in spring wheat in Montana. *Arthropod-Plant Interactions*, 11(6), 755-766. doi: 10.1007/s11829-017-9533-5

- [26] La Forgia, D., Bruno, P., Campos-Herrera, R., Turlings, T., & Verheggen, F. (2021). The lure of hidden death : development of an attract-and-kill strategy against *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae) combining semiochemicals and entomopathogenic nematodes. *Turkish Journal Of Zoology*, 45(SI-1), 347-355. doi: 10.3906/zoo-2106-38
- [27] Nématodes sf anti taupins. (2021). Retrieved March 2022, from <https://www.insectosphere.fr/nematodes-sf-anti-taupins>
- [28] Traugott, M., Benefer, C., Blackshaw, R., van Herk, W., & Vernon, R. (2015). Biology, ecology, and control of elaterid beetles in agricultural land. *Annual Review Of Entomology*, 60(1), 313-334. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-021035
- [29] Vernon, R., & Van Herk, W. (2013). Chapter 5 - Wireworms as pests of potato. In A. Alyokhin, C. Vincent & P. Giordanengo, *Insect Pests of Potato: Global Perspectives on Biology and Management* (pp. 103-164). Academic Press.
- [30] Ritter, C., & Richter, E. (2013). Control methods and monitoring of *Agriotes* wireworms (Coleoptera: Elateridae). *Journal Of Plant Diseases And Protection*, 120(1), 4-15. doi: 10.1007/bf03356448
- [31] Macleod, G., & Rawlins, W. (1935). A comparative study of wireworms in relation to potato tuber injury. *Journal Of Economic Entomology*, 28(1), 192-195. doi: 10.1093/jee/28.1.192
- [32] Johnson, S., Anderson, E., Dawson, G., & Griffiths, D. (2008). Varietal susceptibility of potatoes to wireworm herbivory. *Agricultural And Forest Entomology*, 10(2), 167-174. doi: 10.1111/j.1461-9563.2008.00372.x
- [33] Barsics, F., Haubruge, E., & Verheggen, F. (2013). Wireworms' management : An overview of the existing methods, with particular regards to *Agriotes* spp. (Coleoptera: Elateridae). *Insects*, 4(1), 117-152. doi: 10.3390/insects4010117
- [34] Furlan, L., Miklós, t., Venyamin, Y., & Istvan, U. (2011). *The project to implement IPM strategies against Agriotes species in Europe: what has been done and what is still to be done*. Lecture.
- [35] Lafrance, J., & Cartier, J. (1964). Distribution of wireworm population (Coleoptera: Elateridae) in unfrozen and frozen organic soils of southwestern Quebec. *Phytoprotection*, 45(2), 83-87.
- [36] Doane, J., Lee, Y., Klingler, J., & Westcott, N. (1975). The orientation response of *Ctemcera destructor* and other wireworms (Coleoptera : Elateridae) to germinating grain and to carbon dioxide. *The Canadian Entomologist*, 107(12), 1233-1252. doi: 10.4039/ent1071233-12
- [37] Lange, W., Carlson, E., & Leach, L. (1949). Seed treatments for wireworm control with particular reference to the use of lindane. *Journal Of Economic Entomology*, 42(6), 942-955. doi: 10.1093/jee/42.6.942
- [38] Carpenter, C., & Scott, D. (1972). Sugarbeet wireworm control in potatoes in Idaho. *Journal Of Economic Entomology*, 65(3), 773-775. doi: 10.1093/jee/65.3.773

- [39] Van Herk, W., Vernon, R., Clodius, M., Harding, C., & Tolman, J. (2022). Mortality of five wireworm species (Coleoptera: Elateridae), following topical application of clothianidin and chlorpyrifos. *Journal Of The Entomological Society Of British Columbia*, 104, 55-64.
- [40] Furlan, L. (2004). The biology of *Agriotes sordidus* Illiger (Col., Elateridae). *Journal Of Applied Entomology*, 128(9-10), 696-706. doi: 10.1111/j.1439-0418.2004.00914.x
- [41] Friedrich, M. (2012). *Agriotes obscurus* - arthropodafotos.de. Retrieved February 2022, from https://arthropodafotos.de/dbsp.php?lang=deu&sc=1&ta=t_35_coleo_pol_ela&sci=Agriotes&scisp=obscurus
- [42] Biocontrol - *Agriotes* sp. (Taupins). (2014). Retrieved February 2022, from <http://ephytia.inra.fr/fr/C/20004/Biocontrol-Agriotes-sp-Taupins>
- [43] Leseigneur, L. (1972). Coléoptères Elateridae de la faune de France continentale et de Corse. *Bulletin Mensuel De La Société Linnéenne De Lyon*, 41(2), 3-382. doi: 10.3406/linly.1972.10023
- [44] Eidt, D. (1959). Mode of feeding of the larva of *Ctenicera aeripennis destructor* (Brown) (Coleoptera: Elateridae). *The Canadian Entomologist*, 91(2), 97-101. doi: 10.4039/ent9197-2
- [45] Traugott, M., Schallhart, N., Kaufmann, R., & Juen, A. (2008). The feeding ecology of elaterid larvae in central European arable land: New perspectives based on naturally occurring stable isotopes. *Soil Biology And Biochemistry*, 40(2), 342-349. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.08.013
- [46] Furlan, L. (1998). The biology of *Agriotes ustulatus* Schaller (Col., Elateridae). II. Larval development, pupation, whole cycle description and practical implications. *Journal Of Applied Entomology*, 122(1-5), 71-78. doi: 10.1111/j.1439-0418.1998.tb01464.x
- [47] Chaton, P., Liégeois, M., Meyran, J., Ravanel, P., & Tissut, M. (2003). Feeding behaviour as a limiting step in insecticide absorption for the wireworm *Agriotes* sp. (Coleoptera: Elateridae). *Pesticide Biochemistry And Physiology*, 77(3), 106-114. doi: 10.1016/s0048-3575(03)00096-8
- [48] Langenbuch, R. (2009). Beiträge zur kenntnis der biologie von *Agriotes lineatus* L. und *Agriotes obscurus* L. *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 19(2), 278-300. doi: 10.1111/j.1439-0418.1932.tb00310.x
- [49] Schaerffenberg, B. (1942). Der Einfluß von humusgehalt und feuchtigkeit des bodens auf die fraßtätigkeit der Elateriden larven. *Anzeiger Für Schädlingskunde*, 18(12), 133-136. doi: 10.1007/bf02360840
- [50] Hemerik, L., & de Fluiter, R. (1999). No preference of the wireworm, *Agriotes lineatus* (L.), for four grass species. *Proceedings Of The Section Experimental And Applied Entomology Of The Netherlands Entomological Society*, 10, 175-181.
- [51] Traugott, M., Pázmándi, C., Kaufmann, R., & Juen, A. (2007). Evaluating 15N/14N and 13C/12C isotope ratio analysis to investigate trophic relationships of elaterid larvae (Coleoptera: Elateridae). *Soil Biology And Biochemistry*, 39(5), 1023-1030. doi: 10.1016/j.soilbio.2006.11.012

- [52] Schallhart, N., Tusch, M., Wallinger, C., Staudacher, K., & Traugott, M. (2012). Effects of plant identity and diversity on the dietary choice of a soil-living insect herbivore. *Ecology*, 93(12), 2650-2657. doi: 10.1890/11-2067.1
- [53] Hemerik, L., Gort, G., & Brussaard, L. (2003). Food preference of wireworms analyzed with multinomial logit models. *Journal Of Insect Behavior*, 16(5), 647-665. doi: 10.1023/b:joir.0000007701.04296.45
- [54] Furlan, L. (2005). An IPM approach targeted against wireworms: what has been done and what has to be done. *IOBC/WPRS Bulletin*, 28(2), 91-100.
- [55] Miles, H. (1942). Wireworms and agriculture, with special reference to *Agriotes obscurus* L. *Annals Of Applied Biology*, 29(2), 176-180. doi: 10.1111/j.1744-7348.1942.tb07585.x
- [56] Blot, Y., Brunel, E., & Courbon, R. (1999). Survey on the infestation of wheat and maize by larvae of wireworms of the genera *Agriotes* and *Athous* (Coleoptera: Elateridae) in some areas of western France. *Annales De La Societe Entomologique De France* 35: 453-457, 35, 453-457.
- [57] Vernon, R., Kabaluk, T., & Behringer, A. (2000). Movement of *Agriotes obscurus* (Coleoptera : Elateridae) in strawberry (Rosaceae) plantings with wheat (Graminae) as a trap crop. *The Canadian Entomologist*, 132(2), 231-241. doi: 10.4039/ent132231-2
- [58] Fox, C. (1973). Influence of vegetation on the distribution of wireworms in grassland: observations on *Agriotes obscurus* (L.) (Coleoptera: Elateridae). *Phytoprotection*, 54(2), 69-71.
- [59] Jonasson, T., & Olsson, K. (1994). The influence of glycoalkaloids, chlorogenic acid and sugars on the susceptibility of potato tubers to wireworm. *Potato Research*, 37(3), 205-216. doi: 10.1007/bf02360510
- [60] Barsics, F., Fiers, M., Fauconnier, M., Jijakli, M., Frédéric, F., Haubruge, E., & Verheggen, F. (2014). Assessing the foraging behavior of *Agriotes sordidus* wireworms in dual-choice olfactometers. *Communications In Agricultural And Applied Biological Sciences*, 79(2), 151-156.
- [61] Johnson, S., & Nielsen, U. (2012). Foraging in the dark – Chemically mediated host plant location by belowground insect herbivores. *Journal Of Chemical Ecology*, 38(6), 604-614. doi: 10.1007/s10886-012-0106-x
- [62] Crombie, A., & Darrah, J. (1947). The chemoreceptors of the wireworm (*Agriotes* Spp.) and the relation of activity to chemical constitution. *Journal Of Experimental Biology*, 24(1-2), 95-109. doi: 10.1242/jeb.24.1-2.95
- [63] Thorpe, W., Crombie, A., Hill, R., & Darrah, J. (1947). The behaviour of wireworms in response to chemical stimulation. *Journal Of Experimental Biology*, 23(3-4), 234-266. doi: 10.1242/jeb.23.3-4.234
- [64] Barsics, F., Delory, B., Delaplace, P., Francis, F., Fauconnier, M., Haubruge, É., & Verheggen, F. (2016). Foraging wireworms are attracted to root-produced volatile aldehydes. *Journal Of Pest Science*, 90(1), 69-76. doi: 10.1007/s10340-016-0734-y

- [65] Barsics, F., Latine, R., Gfeller, A., Laloux, M., Lognay, G., & Wathelet, P. et al. (2012). Do root-emitted volatile organic compounds attract wireworms?. *Communications In Agricultural And Applied Biological Sciences*, 77(4), 561-565.
- [66] Campbell, R. (1937). Temperature and moisture preferences of wireworms. *Ecology*, 18(4), 479-489. Doi : 10.2307/1930574
- [67] Furlan, L. (1996). The biology of *Agriotes ustulatus* Schaller (Col., Elateridae). I. Adults and oviposition. *Journal Of Applied Entomology*, 120(1-5), 269-274. doi: 10.1111/j.1439-0418.1996.tb01605.x
- [68] Evans, A., & Gough, H. (1942). Observations on some factors influencing growth in wireworms of the genus *Agriotes* Esch. *Annals Of Applied Biology*, 29(2), 168-175. doi: 10.1111/j.1744-7348.1942.tb07584.x
- [69] Gough, H., & Evans, A. (1942). Some notes on the biology of the click beetles *Agriotes obscurus* L. and *A. sputator* L. *Annals Of Applied Biology*, 29(3), 275-279. doi: 10.1111/j.1744-7348.1942.tb07594.x
- [70] Gratwick, M., & Ridgman, W. (1990). Potato Pests. *The Journal Of Agricultural Science*, 114(1), 125-125. doi: 10.1017/S0021859600071148
- [71] Fryer, J. (1944). Wireworms and Food Production. A Wireworm Survey of England and Wales, 1939-42.
- [72] Salt, G., & Hollick, F. (1946). Studies of Wireworm Populations : II. Spatial Distribution. *Journal Of Experimental Biology*, 23(1), 1-46.
- [73] Poidatz, J. (2015). Biocontrol - Biologie. Retrieved March 2022, from <http://ephytia.inra.fr/fr/C/20006/Biocontrol-Biologie>
- [74] Roberts, A. (1921). On the life history of "wireworms" of the genus *Agriotes*, Esch., with some notes on that of *Athous haemorrhoidalis*. *Annals Of Applied Biology*, 8(3-4), 193-215. doi: 10.1111/j.1744-7348.1921.tb05546.x
- [75] Miles, H., & Cohen, M. (1941). *Investigations on Wireworms and their Control. Report for the Years 1939 and 1940.*
- [76] Jansson, R., & Seal, D. (1991). *Biology and management of wireworm on potato.* Lecture, Jacksonhole, Wyoming.
- [77] Horton, D., & Landolt, P. (2002). Orientation response of Pacific coast wireworm (Coleoptera: Elateridae) to food baits in laboratory and effectiveness of baits in field. *The Canadian Entomologist*, 134(3), 357-367. doi: 10.4039/ent134357-3
- [78] Vernon, R., Van herk, W., Clodius, M., & Harding, C. (2009). Wireworm Management I: Stand protection versus wireworm mortality with wheat seed treatments. *Journal Of Economic Entomology*, 102(6), 2126-2136. doi: 10.1603/029.102.0616
- [79] Furlan, L., Contiero, B., Chiarini, F., Colauzzi, M., Sartori, E., & Benvegnù, I. et al. (2016). Risk assessment of maize damage by wireworms (Coleoptera: Elateridae) as the first step in implementing IPM and in reducing the environmental impact of soil insecticides. *Environmental Science And Pollution Research*, 24(1), 236-251. doi: 10.1007/s11356-016-7692-z

- [80] Hermann, O., & Wauters, A. (2002). *Ravageurs et maladies en culture de betterave sucrière belge*. Institut Royal Belge pour l'Amélioration de la Betterave (IRBAB/KBIVB).
- [81] Van Herk, W., & Vernon, R. (2014). Click Beetles and Wireworms (Coleoptera: Elateridae) of Alberta, Saskatchewan, and Manitoba. In D. Giberson & H. Cárcamo, *Arthropods of Canadian Grasslands (Volume 4) : Biodiversity and Systematics Part 2*. (1st ed., pp. 87-117). Biological Survey of Canada.
- [82] Keiser, A., Häberli, M., & Stamp, P. (2012). Drycore Appears to Result from an Interaction between *Rhizoctonia solani* and Wireworm (*Agriotes* spp.)—Evidence from a 3-Year Field Survey. *Potato Research*, 55(1), 59-67. doi: 10.1007/s11540-012-9207-8
- [83] Traugott, M., Schallhart, N., Staudacher, K., & Wallinger, C. (2013). Understanding the ecology of wireworms and improving their control: a special issue. *Journal Of Pest Science*, 86(1), 1-2. doi: 10.1007/s10340-013-0482-1
- [84] Furlan, L. (2014). IPM thresholds for *Agriotes* wireworm species in maize in Southern Europe. *Journal Of Pest Science*, 87(4), 609-617. doi: 10.1007/s10340-014-0583-5
- [85] Parker, W. (1994). Evaluation of the use of food baits for detecting wireworms (*Agriotes* spp., Coleoptera: Elateridae) in fields intended for arable crop production. *Crop Protection*, 13(4), 271-276. doi: 10.1016/0261-2194(94)90014-0
- [86] Hancock, M., Lane, A., Mathias, P., Port, C., & Tones, S. (1986). Evaluation of insecticides to replace aldrin for the control of wireworms on potato. *Annals Of Applied Biology*, 108(S1), 28-29. doi: 10.1111/aab.1986.108.s1.28
- [87] EU Pesticides Database (v.2.2) Search Active substances, safeners and synergists. (2022). Retrieved June 2022, from https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/active-substances/index.cfm?event=search.as&s=3&a_from=&a_to=&e_from=&e_to=&additionalfilter__class_p1=&additionalfilter__class_p2=&string_tox_1=&string_tox_1=&string_tox_2=&string_tox_2=&string_tox_3=&string_tox_3=&string_tox_4=&string_tox_4=
- [88] Silva, V., Alaoui, A., Schlünssen, V., Vested, A., Graumans, M., & van Dael, M. et al. (2021). Collection of human and environmental data on pesticide use in Europe and Argentina: Field study protocol for the SPRINT project. *PLOS ONE*, 16(11), e0259748. doi: 10.1371/journal.pone.0259748
- [89] Eurostat Data Browser. Retrieved June 2022, from <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do>
- [90] PPDB Insecticide Index. (2022). Retrieved June 2022, from http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz_insect.htm#D
- [91] Journal officiel de l'Union européenne. Règlement (CE) N°1272/2008 du Parlement Européen et du Conseil relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n°1907/2006 (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) (2008).
- [92] Jeschke, P., & Nauen, R. (2008). Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science*, 64(11), 1084-1098. doi: 10.1002/ps.1631

- [93] Néonicotinoïdes. (2015). Retrieved July 2022, from <https://fytoweb.be/fr/produits-phytopharmaceutiques/usage/utilisateur-professionnel/neonicotinoides>
- [94] Consulter autorisations de produits phytopharmaceutiques. (2015). Retrieved July 2022, from <https://fytoweb.be/fr/produits-phytopharmaceutiques/consulter-autorisations-de-produits-phytopharmaceutiques>
- [95] Poggi, S., Le Cointe, R., Lehmus, J., Plantegenest, M., & Furlan, L. (2021). Alternative strategies for controlling wireworms in field crops : a review. *Agriculture*, 11(5), 436. doi: 10.3390/agriculture11050436
- [96] Furlan, L., Bonetto, C., Finotto, A., Lazzeri, L., Malaguti, L., Patalano, G., & Parker, W. (2010). The efficacy of biofumigant meals and plants to control wireworm populations. *Industrial Crops And Products*, 31(2), 245-254. doi: 10.1016/j.indcrop.2009.10.012
- [97] la Forgia, D., Thibord, J., Larroudé, P., Francis, F., Lognay, G., & Verheggen, F. (2020). Linking variety-dependent root volatile organic compounds in maize with differential infestation by wireworms. *Journal Of Pest Science*, 93(2), 605-614. doi: 10.1007/s10340-019-01190-w
- [98] Alyokhin, A., Nault, B., & Brown, B. (2019). Soil conservation practices for insect pest management in highly disturbed agroecosystems – a review. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 168(1), 7-27. doi: 10.1111/eea.12863
- [99] Seal, D., Chalfant, R., & Hall, M. (1992). Effects of cultural practices and rotational crops on abundance of wireworms (Coleoptera : Elateridae) affecting sweetpotato in Georgia. *Environmental Entomology*, 21(5), 969-974. doi: 10.1093/ee/21.5.969
- [100] Hicks, H., & Blackshaw, R. (2008). Differential responses of three Agriotes click beetle species to pheromone traps. *Agricultural And Forest Entomology*, 10(4), 443-448. doi: 10.1111/j.1461-9563.2008.00397.x
- [101] Waliwitiya, R., Isman, M., Vernon, R., & Riseman, A. (2005). Insecticidal activity of selected monoterpenoids and rosemary oil to Agriotes obscurus (Coleoptera : Elateridae). *Journal Of Economic Entomology*, 98(5), 1560-1565. doi: 10.1093/jee/98.5.1560
- [102] Hough-Goldstein, J. (1990). Antifeedant effects of common herbs on the Colorado potato beetle (Coleoptera : Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 19(2), 234-238. doi: 10.1093/ee/19.2.234
- [103] Lee, S., Tsao, R., Peterson, C., & Coats, J. (1997). Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera : Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari : Tetranychidae), and house fly (Diptera : Muscidae). *Journal Of Economic Entomology*, 90(4), 883-892. doi: 10.1093/jee/90.4.883
- [104] Jourdheuil, P., Grison, P., & Fraval, A. (1991). La lutte biologique : un aperçu historique. *Courrier De La Cellule Environnement, INRA*, 15(15), 37-60.
- [105] Campos-Herrera, R., & Gutiérrez, C. (2009). Screening Spanish isolates of steinernematid nematodes for use as biological control agents through laboratory and greenhouse microcosm studies. *Journal Of Invertebrate Pathology*, 100(2), 100-105. doi: 10.1016/j.jip.2008.11.009

- [106] Bedding, R., Molyneux, A., & Akhurst, R. (1983). Heterorhabditis spp., Neoaplectana spp., and Steinernema kraussei : Interspecific and intraspecific differences in infectivity for insects. *Experimental Parasitology*, 55(2), 249-257. doi: 10.1016/0014-4894(83)90019-x
- [107] Ester, A., & H., H. (2007). Controlling wireworms (Agriotes spp.) in a potato crop with biologicals. *IOBC/WPRS Bulletin*, 30(1), 189-196.
- [108] Toba, H., Lindegren, J., Turner, J., & Vail, P. (1983). Susceptibility of the Colorado potato beetle and the sugarbeet wireworm to Steinernema feltiae and S. glaseri. *Journal Of Nematology*, 15(4), 597-601.
- [109] Nguyen, K., & Smart Jr., G. (1992). Life Cycle of Steinernema scapterisci Nguyen & Smart, 1990. *Journal Of Nematology*, 24(1), 160-169.
- [110] Capinera, J. (2008). *Encyclopedia of entomology* (2nd ed., pp. 4279-4283). Dordrecht: Springer.
- [111] Garcia-del-Pino, F., Morton, A., & Shapiro-Ilan, D. (2018). Chapter 12 - Entomopathogenic nematodes as biological control agents of tomato pests. In W. Waqas, G. Brust & T. Perring, *Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato* (1st ed., pp. 269-282). Academic Press.
- [112] La Forgia, D., Martin, C., Turlings, T., & Verheggen, F. Deciphering the olfaction-based mechanisms of wireworms aggregation behavior.
- [113] Kim, J., Hiltbold, I., Jaffuel, G., Sbaiti, I., Hibbard, B., & Turlings, T. (2021). Calcium-alginate beads as a formulation for the application of entomopathogenic nematodes to control rootworms. *Journal Of Pest Science*, 94(4), 1197-1208. doi: 10.1007/s10340-021-01349-4
- [114] Todd Kabaluk, J., Lafontaine, J., & Borden, J. (2015). An attract and kill tactic for click beetles based on Metarhizium brunneum and a new formulation of sex pheromone. *Journal Of Pest Science*, 88(4), 707-716. doi: 10.1007/s10340-015-0661-3
- [115] Brandl, M., Schumann, M., Przyklenk, M., Patel, A., & Vidal, S. (2016). Wireworm damage reduction in potatoes with an attract-and-kill strategy using Metarhizium brunneum. *Journal Of Pest Science*, 90(2), 479-493. doi: 10.1007/s10340-016-0824-x
- [116] Küppers, R., Neuhoff, D., & Stumm, C. (2017). *Einfluss des biologischen insektizids ATTRACAP® auf den drahtwurmbefall von speisekartoffeln* (Ph.D). Universität Bonn.
- [117] La Forgia, D., Jaffuel, G., Campos-Herrera, R., Verheggen, F., & Turlings, T. (2020). Efficiency of an attract-and-kill system with entomopathogenic nematodes against wireworms (Coleoptera: Elateridae). *Microbial And Nematode Control Of Invertebrate Pests*, 150, 91-95.
- [118] Babushok, V., Linstrom, P., & Zenkevich, I. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal Of Physical And Chemical Reference Data*, 40(4), 043101. doi: 10.1063/1.3653552

- [119] Campos-Herrera, R., Vicente-Díez, I., Galeano, M., Chelkha, M., del Mar González-Trujillo, M., & Puellas, M. et al. (2021). Intraspecific virulence of entomopathogenic nematodes against the pests *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) and *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal Of Nematology*, 53(1), 1-14. doi: 10.21307/jofnem-2021-102
- [120] Elberson, L., Borek, V., McAffrey, J., & Morra, M. (1996). Toxicity of rapeseed meal-amended soil to wireworms, *Limonius californicus* (Coleoptera: Elateridae). *Journal Of Agricultural And Urban Entomology*, 13(4), 323-330.
- [121] Motulsky, H., & Brown, R. (2006). Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics*, 7(1). doi: 10.1186/1471-2105-7-123
- [122] Simmons, C., Pedigo, L., & Rice, M. (1998). Evaluation of Seven Sampling Techniques for Wireworms (Coleoptera: Elateridae). *Environmental Entomology*, 27(5), 1062-1068. doi: 10.1093/ee/27.5.1062
- [123] Toba, H., & Turner, J. (1983). Evaluation of baiting techniques for sampling wireworms (Coleoptera: Elateridae) infesting wheat in Washington. *Journal Of Economic Entomology*, 76(4), 850-855. doi: 10.1093/jee/76.4.850
- [124] Apablaza, J., Keaster, A., & Ward, R. (1977). Orientation of corn-Infesting species of wireworms toward baits in the laboratory. *Environmental Entomology*, 6(5), 715-718. doi: 10.1093/ee/6.5.715
- [125] Schallhart, N., Tusch, M., Staudacher, K., Wallinger, C., & Traugott, M. (2011). Stable isotope analysis reveals whether soil-living elaterid larvae move between agricultural crops. *Soil Biology And Biochemistry*, 43(7), 1612-1614. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.03.024
- [126] Kim, C., & Lee, E. (1992). The controlled release of blue dextran from alginate beads. *International Journal Of Pharmaceutics*, 79(1-3), 11-19. doi: 10.1016/0378-5173(92)90088-j
- [127] Barsics, F., Francis, F., & Verheggen, F. (2014). The role of olfaction in wireworms : A review on their foraging behavior and sensory apparatus. *Biotechnology, Agronomy, Society And Environment*, 18(4), 524-535.
- [128] Petersen, M., Poll, L., & Larsen, L. (1998). Comparison of volatiles in raw and boiled potatoes using a mild extraction technique combined with GC odour profiling and GC-MS. *Food Chemistry*, 61(4), 461-466. doi: 10.1016/s0308-8146(97)00119-2
- [129] Buttery, R., Seifert, R., & Ling, L. (1970). Characterization of some volatile potato components. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 18(3), 538-539. doi: 10.1021/jf60169a044
- [130] Mazza, G., & Pietrzak, E. (1990). Headspace volatiles and sensory characteristics of earthy, musty flavoured potatoes. *Food Chemistry*, 36(2), 97-112. doi: 10.1016/0308-8146(90)90094-k
- [131] Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI). (2022). Retrieved August 2022, from <https://www.ebi.ac.uk/chebi>

- [132] Marshall, A., DeSouza, M., & Morgan, M. (1985). Plasma 3-methylbutanal in man and its relationship to hepatic encephalopathy. *Clinical Physiology*, 5(1), 53-62. doi: 10.1111/j.1475-097x.1985.tb00746.x
- [133] Dionisio, K., Phillips, K., Price, P., Grulke, C., Williams, A., & Biryol, D. et al. (2018). The Chemical and Products Database, a resource for exposure-relevant data on chemicals in consumer products. *Scientific Data*, 5(1), 180125. doi: 10.1038/sdata.2018.125
- [134] PubChem. (2022). Retrieved August 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- [135] Liu, Y., Zeng, Z., Barron, A., Ma, Y., He, Y., & Liu, J. et al. (2022). The involvement of a floral scent in plant-honeybee interaction. *The Science Of Nature*, 109(3), 30. doi: 10.1007/s00114-022-01802-z
- [136] Košťál, V. (1992). Orientation behavior of newly hatched larvae of the cabbage maggot *Delia radicum* (L.) (Diptera: Anthomyiidae), to volatile plant metabolites. *Journal Of Insect Behavior*, 5(1), 61-70. doi: 10.1007/bf01049158
- [137] Noge, K. (2019). Hexanal, a major volatile found in fresh peanut seed, elicits foraging behavior in the laboratory-reared brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Heteroptera : Pentatomidae). *Journal Of Pesticide Science*, 44(1), 15-19. doi: 10.1584/jpestics.d18-053
- [138] Xiao, Z., & Lu, J. (2014). Generation of acetoin and its derivatives in foods. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 62(28), 6487-6497. doi: 10.1021/jf5013902
- [139] Wright, M., Klasson, K., & Kimura, K. (2019). Production of acetoin from sweet sorghum syrup and beet juice via fermentation. *Sugar Tech*, 22(2), 354-359. doi: 10.1007/s12355-019-00764-3
- [140] Sharifi, R., & Ryu, C. (2018). Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Annals Of Botany*, 122(3), 349-358. doi: 10.1093/aob/mcy108
- [141] Pathway : pyruvate fermentation to (R)-acetoin I. (2022). Retrieved August 2022, from <https://metacyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-5938>
- [142] Jansky, S. (2010). Potato Flavor. *American Journal Of Potato Research*, 87(2), 209-217. doi: 10.1007/s12230-010-9127-6
- [143] Sandhi, R., Shapiro-Ilan, D., Sharma, A., & Reddy, G. (2020). Efficacy of entomopathogenic nematodes against the sugarbeet wireworm, *Limonius californicus* (Mannerheim) (Coleoptera: Elateridae). *Biological Control*, 143, 104190. doi: 10.1016/j.biocontrol.2020.104190
- [144] Eidt, D., & Thurston, G. (1995). Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworms (Coleoptera : Elateridae) and other soil insects. *The Canadian Entomologist*, 127(3), 423-429. doi: 10.4039/ent127423-3
- [145] Ansari, M., Evans, M., & Butt, T. (2009). Identification of pathogenic strains of entomopathogenic nematodes and fungi for wireworm control. *Crop Protection*, 28(3), 269-272. doi: 10.1016/j.cropro.2008.11.003

7 Annexes

TESTS COMPORTEMENTAUX							
Remarque :							
Date du début :							
Date de fin :							
Durée :							
Mise à jeûn :							
Odeur testée :							
Date	Taupin		Odeur testée		Heure début	Durée test	Taupin retrouvé dans zone
	Taille	Origine	Côté A	Côté B			
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							

FIGURE 19 – Modèle vierge d’encodage des résultats des tests comportementaux en olfactomètres à deux voies.

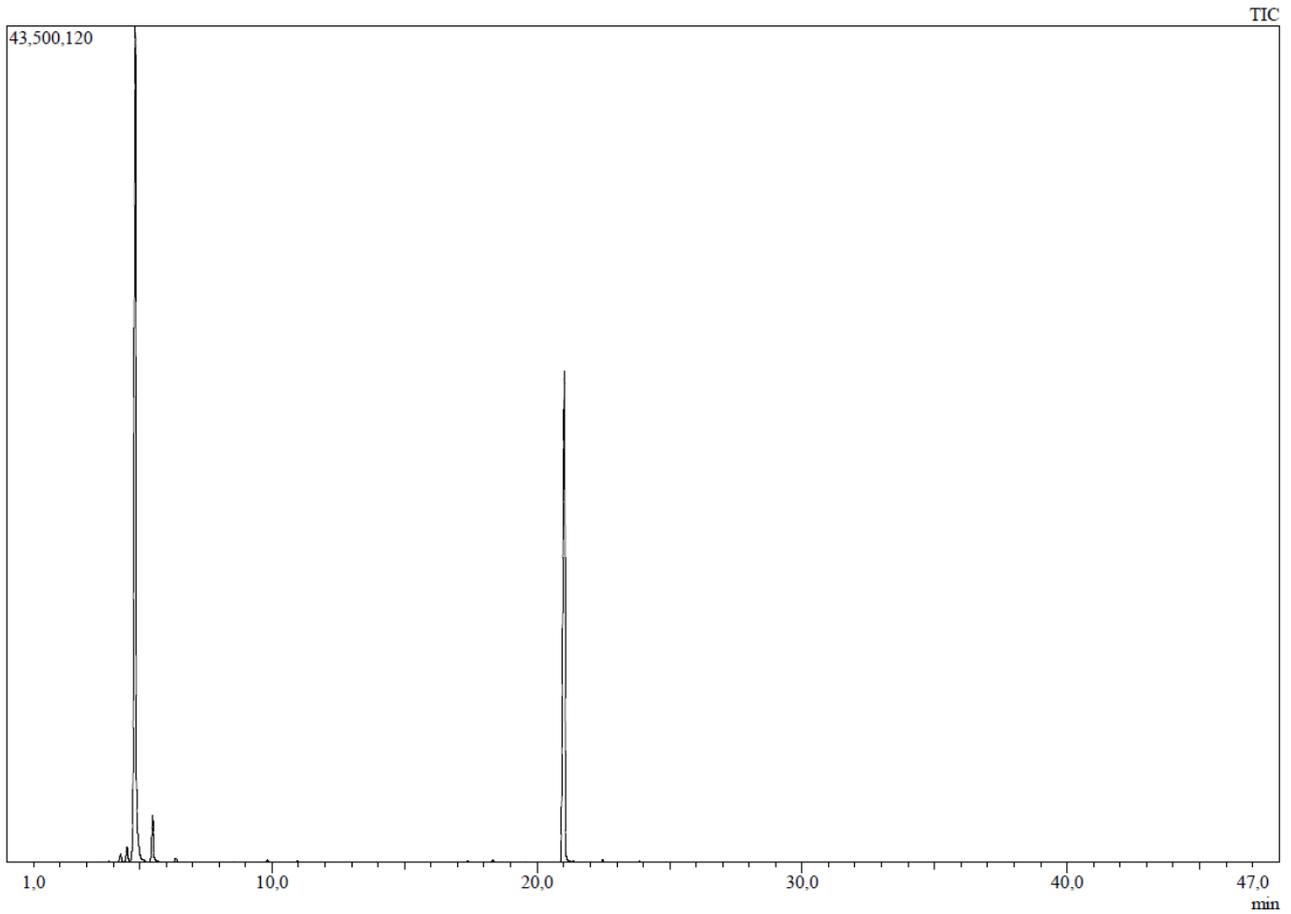


FIGURE 20 – Résultat des prélèvements d’odeurs de billes d’alginate pré-tests (1 gramme, 24 heures de prélèvement, 21 °C).



FIGURE 21 – Partie de chromatogramme obtenu au cours des prélèvements de billes d’alginate contenant du jus de pomme de terre, du 2-pentylfuran et du 2-undecanone (1 grammes de billes, 2 heures de prélèvement, 21 °C).

TABLE 4 – Table des cycles de reproduction des souches de nématodes entomopathogènes utilisées dans ce travail.

Souche	Infection	Mort	Emergence	Durée du cycle
HB e-nema	10/05/2022	12/05/2022	23/05/2022	13 jours
HB1	10/05/2022	12/05/2022	20/05/2022	10 jours
HB2	10/05/2022	12/05/2022	23/05/2022	13 jours
SF insectosphère	10/05/2022	12/05/2022	23/05/2022	13 jours
SF1	10/05/2022	12/05/2022	20/05/2022	10 jours
SF2	10/05/2022	12/05/2022	22/05/2022	12 jours
SF3	10/05/2022	12/05/2022	19/05/2022	9 jours
SC e-nema	10/05/2022	12/05/2022	23/05/2022	13 jours
SC1	10/05/2022	12/05/2022	23/05/2022	13 jours
SI	10/05/2022	12/05/2022	16/05/2022	6 jours
GBX.W	22/05/2022	24/05/2022	03/06/2022	12 jours

TABLE 5 – Tableau des probabilités de survie des larves d'*Agriotes* spp. par souche et en fonction du nombre de jours après l'infection pour le premier screening.

Souche Nombre de jours après l'infection	SF insectosphère	SF1	SF2	SF3	SC e-nema	SC1	HB e-nema	HB1	HB2	SI	GBX.W
1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
2	1,00	1,00	1,00	0,93	0,87	0,93	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
3	1,00	1,00	1,00	0,93	0,8	0,8	1,00	1,00	1,00	1,00	0,93
7	1,00	1,00	0,93	0,93	0,8	0,8	1,00	1,00	1,00	1,00	0,87
14	1,00	1,00	0,93	0,93	0,8	0,73	1,00	1,00	1,00	1,00	0,87
21	1,00	0,93	0,93	0,93	0,8	0,73	1,00	1,00	1,00	1,00	0,87
28	1,00	0,93	0,93	0,93	0,8	0,73	1,00	1,00	1,00	1,00	0,87
35	1,00	0,93	0,93	0,93	0,8	0,73	1,00	1,00	1,00	1,00	0,87
42	1,00	0,93	0,93	0,93	0,8	0,73	1,00	0,83	0,85	1,00	0,87

TABLE 6 – Tableau des probabilités de survie des larves d'*Agriotes* spp. par souche et en fonction du nombre de jours après l'infection pour le second screening.

Souche Nombre de jours après l'infection	SF insectosphère	SF1	SF2	SF3	SC e-nema	SC1	HB e-nema	HB1	HB2	SI	GBX.W
1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
2	1,00	0,93	1,00	1,00	1,00	0,87	1,00	1,00	1,00	1,00	0,93
3	1,00	0,87	0,93	0,93	0,93	0,87	0,93	1,00	1,00	1,00	0,93
7	0,93	0,80	0,93	0,93	0,93	0,80	0,80	0,93	0,93	0,86	0,73
14	0,93	0,80	0,93	0,87	0,87	0,80	0,60	0,73	0,87	0,71	0,60
21	0,87	0,80	0,93	0,87	0,80	0,73	0,33	0,73	0,73	0,64	0,60
28	0,87	0,80	0,93	0,80	0,73	0,73	0,33	0,67	0,53	0,57	0,60
35	0,87	0,73	0,87	0,73	0,73	0,73	0,20	0,47	0,47	0,50	0,60
42	0,80	0,67	0,87	0,73	0,73	0,73	0,13	0,47	0,47	0,50	0,60