

Mémoire

Auteur : Gustin, Lucas

Promoteur(s) : Francis, Frédéric; Noël, Grégoire

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biologie des organismes et écologie, à finalité approfondie

Année académique : 2024-2025

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/23843>

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.

Université de Liège, Faculté des Sciences
Département Biologie, Écologie, Évolution

Évaluation du potentiel des champignons entomopathogènes *Beauveria* *bassiana* et *Metarhizium brunneum* pour le biocontrôle de *Halyomorpha halys*



Lucas Gustin

TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE
L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTER EN BIOLOGIE DES
ORGANISMES ET ÉCOLOGIE, À FINALITÉ APPROFONDIE

Août 2025

Promoteur : Pr. Frédéric Francis

Encadrant : Grégoire Noël

Remerciements

À la clôture de cette ultime étape de mon parcours académique, je tiens à remercier celles et ceux qui m'ont accompagné tout au long de ce périple et sans qui rien de tout cela n'aurait été possible.

Pour commencer, je souhaite remercier le professeur Frédéric Francis de m'avoir donné la chance de réaliser mon mémoire au sein du laboratoire d'entomologie fonctionnelle et évolutive. Cette opportunité m'a permis d'explorer et d'en apprendre davantage sur des sujets qui me tiennent particulièrement à cœur.

Ensuite, je tiens à remercier Grégoire Noël pour son soutien en toutes circonstances. Qu'il s'agisse de conseils inspirants, de statistiques ou d'anecdotes, nos discussions ont toujours été enrichissantes. Ces échanges m'ont permis d'aller de l'avant et de remettre un travail à la hauteur de mes attentes.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble du personnel du laboratoire pour l'ambiance chaleureuse qui a régné durant mon passage dans l'équipe. Merci à Emilie Bera et Jeannine Bortel pour leur apport en matériel biologique ainsi que pour leur aide précieuse tout au long de mon travail. Merci à Ibtissem Ben Fekih et Laurane Guillaume pour leurs conseils et la formation éclair qui m'ont permis d'être plus à l'aise dès les premières semaines de laboratoire. Merci à Arnaud Segers, Lallie Glacet et Rodrigue Lugendo pour leur expertise et le temps qu'ils m'ont accordé dans l'élaboration de mon expérience de piégeage.

La réalisation de ce mémoire m'a aussi offert la chance de croiser la route de compagnons de galère, embarqués dans la même aventure que moi. Je parle bien évidemment de cette équipe iconique de patients zéro avec qui j'ai partagé des échanges aussi absurdes que mémorables. Merci d'avoir égayé ces quelques mois de dur labeur qui sont finalement passés très vite à vos côtés !

J'en profite pour remercier toutes les personnes fantastiques que j'ai eu la chance de rencontrer tout au long de ma vie étudiante. Je pense tout particulièrement aux copains de la Team Paimpont (Klara, Salomé, Thomas et Yannick) ainsi qu'aux MoniloBoys (Cyril, Daniela et Manon). Un immense merci pour tous les défis relevés, les barres de rire monumentales et les souvenirs inoubliables qu'on a vécus ensemble.

Pour terminer en beauté, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille. Merci à tous mes proches qui ont toujours su trouver les mots pour m'encourager tout au long de mes cinq

années d'études et me soutenir dans les moments difficiles. Je tiens surtout à exprimer ma gratitude à mes chers parents, grâce à qui j'ai pu vivre pleinement cette expérience universitaire. Je leur dédie ce mémoire de fin d'études.

Résumé

L'invasion de *Halyomorpha halys* représente une véritable menace pour l'agriculture en Europe. L'utilisation des champignons entomopathogènes représente une alternative durable aux pesticides. Cette étude a évalué le potentiel des champignons *Beauveria bassiana* (GHA) et *Metarhizium brunneum* (ARSEF4556) dans la lutte biologique contre la punaise diabolique.

Des essais biologiques portant sur la virulence des champignons ont d'abord été menés via trois méthodes d'application (endophytisme, pulvérisation et trempage) dans le but d'identifier la manière la plus efficace d'utiliser le pathogène. Un test d'endophytisme a aussi été réalisé en amont pour confirmer la présence endophyte des souches dans les tissus de *Vicia faba*. Ensuite, les mécanismes moléculaires de l'infection ont été étudiés lors d'une analyse des chitinases fongiques par spectrométrie de masse. Une piste d'application des champignons a finalement été testée en laboratoire sous la forme d'un test comportemental en présence d'un piège de type attract-&-infect.

L'ensemble des tissus de *V. faba* a été colonisé par les deux souches, avec une préférence significative pour les racines et les tiges par rapport aux feuilles. Les applications directes ont induit une mortalité des nymphes L3 entre 56 et 96 %, tandis que l'endophytisme ne dépassait pas les 20 %. L'analyse protéique a identifié des contraintes méthodologiques lors de l'extraction des chitinases fongiques. Les concentrations de phéromones testées n'ont pas augmenté le taux de contact des punaises adultes avec la poudre fongique du piège.

Ce travail prouve le potentiel élevé de mycoinsecticide des deux souches contre *H. halys* lors d'application directe, ouvrant ainsi une piste prometteuse pour une lutte biologique. Les stratégies d'endophytisme et le piège d'autodissémination nécessitent des optimisations supplémentaires pour révéler leur véritable performance.

Mots-clés : *Halyomorpha halys*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium brunneum*, champignon entomopathogène, lutte biologique, virulence, endophytisme.

Table des matières

INTRODUCTION	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	2
1. <i>Halyomorpha halys</i>	2
1.1. Taxonomie.....	2
1.2. Origine et distribution	2
1.2.1. À l'échelle mondiale	2
1.2.2. En Belgique	4
1.3. Biologie de l'espèce	4
1.3.1. Morphologie	5
1.3.2. Cycle biologique	7
1.3.3. Gamme de plantes hôtes.....	8
1.4. Dégâts et nuisances	8
1.5. Ecologie chimique.....	10
1.6. Méthodes de gestion du ravageur.....	11
1.6.1. Outils de surveillance	11
1.6.2. Stratégies de lutte	13
2. Champignons entomopathogènes.....	15
2.1. Généralités.....	15
2.2. <i>Beauveria bassiana</i>	16
2.3. <i>Metarhizium</i> spp.....	17
2.4. Utilisation des CEP en lutte biologique	17
OBJECTIFS	19
MATÉRIEL ET MÉTHODES	20
1. Matériel biologique	20
1.1. Élevage de <i>Halyomorpha halys</i>	20
1.2. Gestion des semis de <i>Vicia faba</i>	20
1.3. Souches fongiques.....	20
2. Essais biologiques de virulence des CEP	21
2.1. Préparation des solutions sporales.....	21

2.2. Préparation des cups expérimentales.....	22
2.3. Application des traitements	23
2.3.1. Méthode indirecte par endophytisme	23
2.3.2. Méthodes directes.....	24
2.3.3. Conditions d'incubation et suivi	24
3. Analyse des protéines fongiques par spectrométrie de masse.....	25
4. Évaluation de l'attractivité d'un piège attract-&-infect en conditions contrôlées.....	26
4.1. Conception et caractéristiques du prototype	26
4.2. Test comportemental	28
5. Analyses statistiques	28
RÉSULTATS	30
1. Préférences de colonisation des tissus végétaux par les CEP	30
2. Effet des méthodes de traitement et des CEP sur la survie et la mortalité	31
3. Analyse des chitinases impliquées dans le mécanisme d'infection	35
4. Effet des concentrations de phéromones sur l'attractivité du piège	36
DISCUSSION	38
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	41
BIBLIOGRAPHIE	42
ANNEXES	60

Liste des figures

Figure 1. Distribution actuelle de <i>H. halys</i> à l'échelle mondiale	3
Figure 2. Stades de développement et cycle de vie de <i>H. halys</i>	5
Figure 3. Caractères morphologiques permettant de différencier <i>H. halys</i> de <i>R. nebulosa</i>	6
Figure 4. Dégâts causés par les piqûres de <i>H. halys</i> sur des poires et des pommes.....	9
Figure 5. Piège pyramidal noir utilisé comme standard pour la surveillance de <i>H. halys</i>	12
Figure 6. <i>T. japonicus</i> sur le point de parasiter les œufs de <i>H. halys</i>	14
Figure 7. Modes de vie d'un champignon entomopathogène	15
Figure 8. Développement de <i>B. bassiana</i> sur <i>H. halys</i> après 2, 3 et 5 jours d'incubation.....	16
Figure 9. Cups en plastique préparées au suivi des punaises lors des essais biologiques.....	22
Figure 10. Mise en place du test d'endophytisme pour <i>V. faba</i>	23
Figure 11. Prototype de piège de type attract-&-infect contre <i>H. halys</i>	27
Figure 12. Leurre PHEROCON® BMSB Dual à deux composantes	27
Figure 13. Courbes de Kaplan-Meier de <i>H. halys</i> après traitement par endophytisme.....	31
Figure 14. Courbes de Kaplan-Meier de <i>H. halys</i> après traitement par pulvérisation	32
Figure 15. Courbes de Kaplan-Meier de <i>H. halys</i> après traitement par trempage	33
Figure 16. Pourcentage moyen de mortalité de <i>H. halys</i> après exposition à différents traitements et méthodes d'application	34
Figure 17. Comparaison de la pureté des échantillons protéiques avec et sans sonication.....	35
Figure 18. Courbes de Kaplan-Meier de la probabilité de contact avec le piège en fonction du temps pour les différentes concentrations de phéromones	36
Figure 19. Pourcentage de contact entre <i>H. halys</i> et le piège en fonction de la concentration de phéromones	37
Figure 20. Cage d'élevage de <i>H. halys</i>	60
Figure 21. Chambre de comptage de Bürker.....	60
Figure 22. Conidies de <i>B. bassiana</i> et de <i>M. brunneum</i>	60
Figure 23. Conidies germées de <i>B. bassiana</i> et de <i>M. brunneum</i>	61
Figure 24. <i>V. faba</i> en phase d'intégration endophytique de CEP.....	61
Figure 25. Développement de la souche ARSEF4556 endophyte	61
Figure 26. Cage et piège attract-&-infect utilisés lors des essais comportementaux	62
Figure 27. Comparaison par paires des risques de mortalité des punaises pour la méthode par endophytisme	62

Figure 28. Comparaison par paires des risques de mortalité des punaises pour la méthode par pulvérisation	62
Figure 29. Comparaison par paires des risques de mortalité des punaises pour la méthode par trempage	63
Figure 30. Comparaison par paires des risques de contact avec le piège pour les différentes concentrations en phéromones	63

Liste des tableaux

Tableau 1. Occurrences de <i>H. halys</i> recensées au sein des collections entomologiques des étudiants de Gembloux	4
Tableau 2. Quantités testées de la phéromone d'agrégation de <i>H. halys</i> (PHER) et de son synergiste (MDT)	28
Tableau 3. Pourcentage de fragments de <i>V. faba</i> colonisés 15 jours après pulvérisation des CEP	
Tableau 4. Résultat du test de Kruskal-Wallis comparant les taux de mortalité des traitements entre les différentes méthodes d'application.....	34

Liste des abréviations

AcN : acétonitrile

CEP : Champignon entomopathogènes

cm : centimètre

ES : erreur standard

HR : Hazard Ratio

IC : Intervalle de confiance

MDT : methyl (2E,4E,6Z)-2,4,6-decatrienoate

mL : millilitre

ng : nanogramme

PHER : phéromone d'agrégation de *Halyomorpha halys*

SDA : Sabouraud Dextrose Agar

SRSR : (3R,6S,7R,10S)-10,11-époxy-1-bisabolen-3-ol

SSRS : (3S,6S,7R,10S)-10,11-époxy-1-bisabolen-3-ol

Introduction

Au cours des deux derniers siècles, le taux d'introduction d'espèces exotiques a connu une forte augmentation dans le monde entier. Les insectes sont l'un des principaux taxons d'espèces invasives, avec plus de 7 000 espèces naturalisées en dehors de leur aire de répartition naturelle (Seebens et al., 2017). Tout comme l'ensemble des espèces exotiques, ces organismes sont principalement introduits dans d'autres régions en raison de l'augmentation des échanges internationaux à l'échelle mondiale (Hulme, 2021). Plus spécifiquement, l'augmentation du taux d'insectes non indigènes est liée à l'expansion du commerce de plantes d'intérêt ornemental (Eschen et al., 2015). Malgré les efforts mis en œuvre pour limiter l'introduction d'espèces exotiques, Seebens et al. (2021) ont démontré que le nombre d'invasions devrait continuer de croître dans le futur.

La prolifération rapide et efficace des insectes sur de nouveaux territoires est favorisée par l'absence de prédateurs naturels, associée à une tolérance écologique élevée, une forte capacité reproductive et une large gamme d'hôtes (Wan & Yang, 2016). Ces organismes ont le pouvoir de devenir invasifs et de provoquer des impacts environnementaux et socioéconomiques importants. Effectivement, bien que largement sous-estimés, les coûts liés aux invasions d'insectes en Europe sont évalués à plus de 3.6 milliards d'euros par an (Bradshaw et al., 2016). Un grand nombre de ces insectes invasifs représente un véritable problème pour l'agriculture et la foresterie. La destruction des végétaux à grande échelle qu'ils induisent compromet la sécurité alimentaire de l'humanité et met en péril des écosystèmes entiers (Clarke & McGeoch, 2023). La punaise diabolique, également connue sous le nom scientifique *Halyomorpha halys* (Stål, 1855), est l'un des principaux insectes ravageurs en Europe.

La recherche se tourne actuellement vers le développement de nouvelles stratégies de lutte contre ce ravageur, telles que les champignons entomopathogènes (CEP). Leur emploi représente une alternative bien plus durable que les insecticides chimiques (Vega, 2018). Les CEP *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., 1912 et *Metarhizium brunneum* Petch, 1935 ayant déjà fait leurs preuves contre de nombreux insectes ravageurs (Lacey & Shapiro-Ilan, 2008), leur virulence et l'optimisation de leur application doivent encore être précisées contre *H. halys*. Ce travail vise donc à évaluer le potentiel de souches de ces deux CEP pour le biocontrôle de la punaise diabolique.

Partie bibliographique

1. *Halyomorpha halys*

1.1. Taxonomie

Halyomorpha halys est un insecte de la famille des Pentatomidae appartenant à l'ordre des Hémiptères. Cette famille constitue le quatrième taxon d'Hétéroptères le plus diversifié en nombre d'espèces (Grazia et al., 2015), avec près de 5 000 espèces réparties en 940 genres. Bien que l'ensemble de ces espèces présente d'importantes variations morphologiques, le caractère monophylétique du taxon est bien supporté par les données moléculaires (Forero, 2008 ; Rider et al., 2018). Les Pentatomidae possèdent des pièces buccales de type piqueur-suceur typique des Hémiptères, un scutellum¹ imposant et subtriangulaire ainsi que des antennes à généralement cinq segments. Ils sont majoritairement phytophages et se nourrissent de la sève des différentes parties de leurs hôtes (Rider et al., 2018). Cette famille comprend d'ailleurs les principaux ravageurs de cultures les plus importants à l'échelle mondiale (Schaefer & Panizzi, 2000).

1.2. Origine et distribution

1.2.1. À l'échelle mondiale

La punaise marbrée est native de l'Asie de l'Est, plus spécifiquement de la Chine, la Corée du Sud, le Japon et Taiwan (Lee, Short, et al., 2013). Cependant, les activités humaines ainsi que son comportement lui ont permis de se propager efficacement au-delà des océans. En effet, les objets stockés à l'extérieur ou proches des plantes hôtes peuvent constituer des sites d'hivernage pour *H. halys* durant la fin de l'automne (Duthie et al., 2012). De plus, les adultes évitent la lumière du soleil en journée et restent souvent immobiles dans des endroits ombragés lors de la saison de la reproduction (Toyama et al., 2011). En conséquence, cela conduit à la présence d'un grand nombre d'individus dans les cargaisons, les véhicules et les bagages personnels (Duthie et al., 2012). L'espèce est à présent recensée dans la majorité des régions du monde (Figure 1), avec une prédominance en Amérique du Nord et en Europe (Leskey & Nielsen, 2018).

¹ Plaque de l'exosquelette située sur la face dorsale du thorax des insectes, entre les bases des ailes.

Historiquement, les premières observations certifiées du ravageur en dehors de son aire de distribution naturelle datent de 1996 et viennent d'Amérique du Nord en Pennsylvanie (Hoebel & Carter, 2003). L'analyse génétique des populations ont déterminé que les individus à l'origine de son introduction aux États-Unis proviendraient de Beijing, en Chine (Xu et al., 2014). En 2021, l'espèce était présente dans presque l'entièreté des États-Unis, engendrant d'importants problèmes agricoles dans dix états et des nuisances dans 21 autres (StopBMSB, 2021). De surcroît, la présence de la punaise marbrée au Canada découle du déplacement des populations nord américaines bien établies (Gariepy et al., 2014). Dans le cas de l'Europe, la première population établie de *H. halys* est originaire de Suisse et date de 2007 (Wermelinger et al., 2008). Cependant, ses premières mentions proviennent du Liechtenstein (Arnold, 2009) et de la Suisse en 2004 (Haye, Wyniger, et al., 2014). De nouveaux événements d'invasion ont eu lieu par la suite, ce qui a favorisé une expansion continue de l'espèce à travers les pays européens (Gariepy et al., 2015).

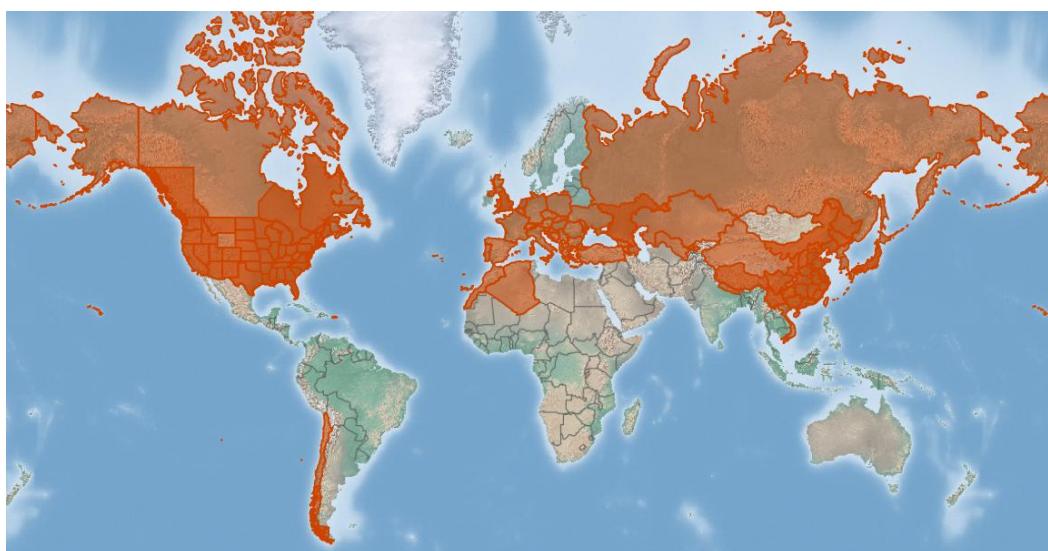


Figure 1. Distribution actuelle de *H. halys* à l'échelle mondiale (CABI, 2024).

Les modèles bioclimatiques indiquent que la punaise marbrée dispose encore d'un large potentiel d'expansion à l'échelle mondiale et sur l'ensemble des continents. Les régions de l'hémisphère sud ayant un climat méditerranéen tropical humide, subtropical ou tempéré chaud sont considérées comme des zones particulièrement vulnérables (Kriticos et al., 2017). L'expansion du ravageur est conditionnée par sa capacité à s'adapter aux conditions hivernales défavorables et pourrait continuer à s'étendre vers l'Europe de l'est (Afonin & Musolin, 2024). En Amérique du Nord, il occupe une plus grande portion de sa niche écologique potentielle qu'en Europe, mais il bénéficie encore de conditions favorables à une expansion supplémentaire

vers les états centraux et méridionaux des États-Unis (Kriticos et al., 2017 ; Afonin & Musolin, 2024).

1.2.2. En Belgique

Le tout premier individu de Belgique est découvert en 2011 dans une collection entomologique réalisée par une étudiante de l'Université de Mons qui l'a récolté dans le Hainaut (Claerebout et al., 2018). L'ensemble des données d'occurrences en provenance de différentes recherches ont prouvé l'établissement de la punaise diabolique en Belgique (Berteloot et al., 2024 ; Noël et al., 2024). De plus, l'étude haplotypique de gènes mitochondriaux a permis de mettre en lumière la diversité génétique élevée de la population de *H. halys* en Belgique. Son invasion du territoire belge résulterait ainsi de multiples introductions successives, à la fois depuis sa région d'origine et depuis d'autres pays européens déjà colonisés (Berteloot et al., 2024).

L'analyse des collections entomologiques d'étudiants, réalisée dans le cadre de ce travail, a permis de confirmer la présence de la punaise marbrée en Région wallonne et en Région de Bruxelles-Capitale (*Tableau 1*). En effet, les différents individus capturés lors de recherches non ciblées par les étudiants appuient l'hypothèse selon laquelle l'espèce est désormais commune en Belgique.

Nom scientifique	Province	Commune	Date	Stade	Determinateur
Halyomorpha halys	Brabant wallon	Jodoigne	01-12-2023	Ad.	Claerebout S., det. 2024
		Rixensart	06-04-2024	Ad.	Claerebout S., det. 2024
	Bruxelles	Bruxelles-ville	09-04-2023	Ad.	Claerebout S., det. 2023
		Bruxelles-ville	12-05-2024	Ad.	Claerebout S., det. 2024
		Uccle	20-07-2018	Ad.	Claerebout S., det. 2019
	Hainaut	Uccle	20-07-2018	Ad.	Claerebout S., det. 2019
		Uccle	29-04-2024	Ad.	Claerebout S., det. 2024
		Courcelles	30-04-2023	Ad.	Claerebout S., det. 2023
	Liège	Chaudfontaine	01-05-2024	Ad.	Claerebout S., det. 2024
		Liège	15-10-2022	Ad.	Claerebout S., det. 2023
		Liège	11-05-2024	Ad.	Claerebout S., det. 2024
		Seraing	13-05-2023	Ad.	Claerebout S., det. 2023
		Seraing	11-08-2024	L.	Claerebout S., det. 2024

Tableau 1. Occurrences de *H. halys* recensées au sein des collections entomologiques des étudiants de Gembloux, entre 2018 et 2024.

1.3. Biologie de l'espèce

La punaise diabolique est une espèce de piqueur-suceur phytophage ayant un haut niveau de polyphagie (Lee, Short, et al., 2013). Avant d'atteindre le stade adulte, les individus doivent passer par cinq stades nymphaux afin de compléter leur cycle de développement (*Figure 2*).

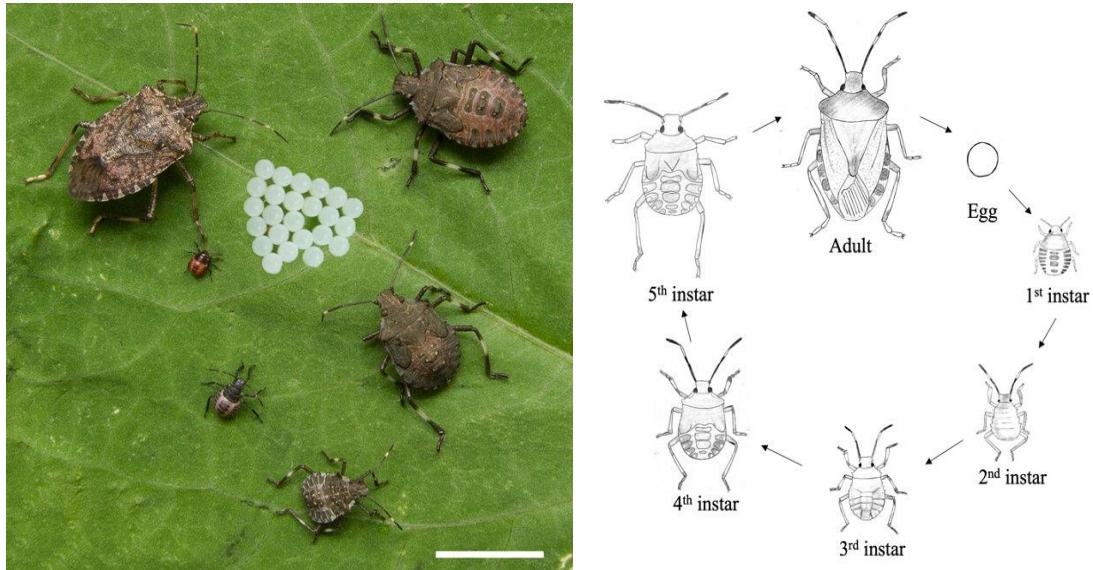


Figure 2. Stades de développement de *H. halys* (Ioannidis et al., 2014). Illustration du cycle de vie de *H. halys* (Khan, 2022).

1.3.1. Morphologie

La description morphologique des différents stades de développement de l'espèce qui est présentée ci-dessous se base principalement sur le travail de Hoebeke & Carter (2003).

Les œufs de *H. halys* sont pondus en amas, ou ooplaques, de 20 à 32 et ne mesurent environ que 1.3 mm de diamètre et 1.6 mm de longueur. Ils présentent une surface lisse et un opercule noirâtre en forme de triangle, tandis que leur couleur évolue progressivement du bleu clair au blanc au cours de leur développement. Après leur éclosion, les nymphes du premier stade L1 ont un corps plutôt sphérique, une tête triangulaire et ne font que 2.4 mm de long. Elles présentent une tête noire, des yeux sombres rougeâtres ainsi qu'un abdomen aux teintes rouges orangées, orné de marques noires (Hoebeke & Carter, 2003 ; Rice et al., 2014).

Dès la première mue, les nymphes s'allongent, adoptant une forme corporelle ovoïde et aplatie dorso-ventralement. Les nymphes L2 mesurent désormais approximativement 3,7 mm et leurs membres commencent à montrer des motifs plus clairs. Elles perdent leur coloration rouge-orangé, adoptant des tons plus sombres sur la face dorsale et plus clairs sur la face ventrale. En outre, des structures ressemblant à des épines apparaissent sur leur tête rectangulaire et le long de leur pronotum. Les stades nymphaux L3 et L4 s'en distinguent par une morphologie en forme de poire, avec des individus mesurant respectivement entre 5.5 mm et 8.5 mm. Juste avant de devenir adulte, les L5 mesureront environ 12 mm et ressembleront davantage aux imagos, bien qu'elles ne possèdent pas encore d'ailes fonctionnelles (Hoebeke & Carter, 2003).

En ce qui concerne les adultes, ceux-ci font entre 12 et 17 mm de long et de 7 à 10 mm de large. Leur corps est caractérisé par une dense ponctuation, avec une teinte brun marbré sur la face dorsale, tandis que la face ventrale présente une nuance plutôt jaunâtre. De plus, les épines qui caractérisaient le corps des nymphes se sont résorbées et les couleurs du connexivum alternent entre le blanc et le noir (Hoebeke & Carter, 2003). Les mâles se différencient des femelles par la présence d'un clasper situé sur le segment terminal de leur abdomen, une structure impliquée dans l'accouplement (Rice et al., 2014). De plus, les mâles sont généralement plus petits et possèdent une teinte rouge marquée au niveau du sternum (Pajač Živković et al., 2022).

En Europe, *Halyomorpha halys* est fréquemment confondue avec *Raphigaster nebulosa* (Poda, 1761), une autre espèce de Pentatomidae, en raison de leur morphologie similaire et de leur tendance commune à se regrouper dans les habitations durant l'hiver (Claerebout et al., 2018). Certains caractères distinctifs, mis en évidence par Claerebout et al. (2018), permettent cependant de les différencier aisément (*Figure 3*). La punaise marbrée s'en distingue notamment par l'absence d'une épine médiane ventrale. De plus, les taches sur les membranes de ses hémelytres sont plus allongées, tandis que celles du connexivum² adoptent une forme triangulaire. Enfin, ses tarses postérieurs sont entièrement blancs et ses antennes ne semblent comporter que deux anneaux blancs (Claerebout et al., 2018).

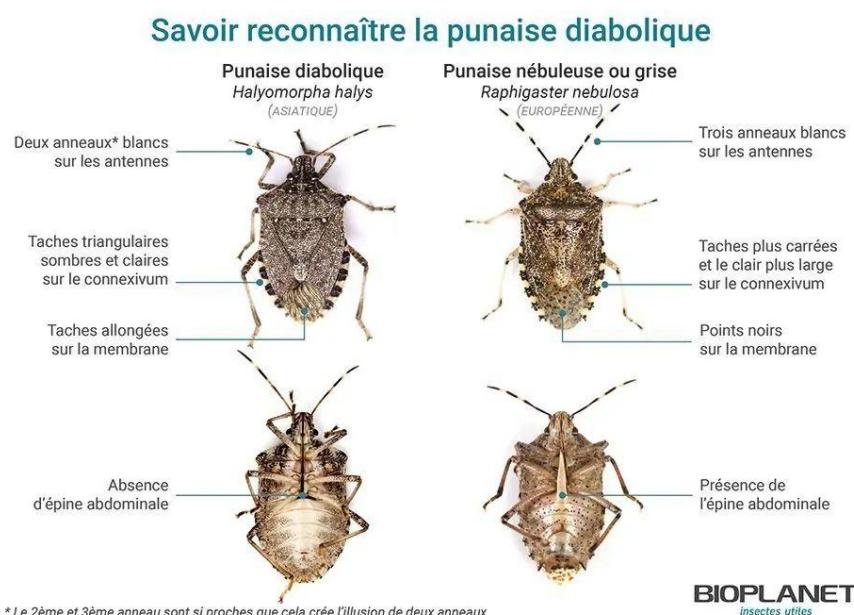


Figure 3. Principaux caractères morphologiques permettant de différencier *H. halys* de *R. nebulosa* (Bioplanet, s.d.).

² Bordure aplatie de l'abdomen des punaises, dépassant latéralement sous leurs hémelytres.

1.3.2. Cycle biologique

Le développement et le voltinisme de la punaise marbrée varient selon les conditions environnementales telles que la photopériode et la température (Lee, Short, et al., 2013). Dans les zones en climat semi-tropical, les populations effectuent généralement plusieurs générations par an. En effet, il est fréquent d'observer jusqu'à six générations annuelles au Sud de la Chine (Hoffman, 1933). En parallèle, la punaise diabolique présente plutôt un cycle de vie univoltin ou bivoltin en Europe et en Amérique du Nord (Leskey & Nielsen, 2018). La suite de cette section détaille les spécificités du cycle univoltin des populations de *H. halys* en Suisse, d'après Nielsen et al. (2008).

Les adultes terminent leur diapause et sortent de leur abri durant le mois d'avril, lorsque la photopériode est suffisamment élevée. À leur émergence, les individus ne sont pas capables de se reproduire et nécessitent plusieurs semaines avant d'atteindre la maturité sexuelle (Nielsen et al., 2008). Tout au long de leur vie, les femelles synovigéniques³ vont être capables de se reproduire avec plusieurs partenaires et vont pondre en moyenne 79 œufs. La période d'oviposition se déroule entre mi-juin et septembre, avec un pic de ponte observé au début du mois de juillet (Haye, Abdallah, et al., 2014). Les œufs pondus seront principalement déposés sur la face inférieure des feuilles des hôtes, sous forme d'ooplaques comprenant un nombre médian de 28 œufs (Nielsen et al., 2008).

Les nymphes se développent à l'intérieur des œufs pendant une période de 3 à 6 jours avant d'émerger et restent ensuite agrégées à proximité de l'ooplaque pour se nourrir des coquilles (Medal et al., 2013 ; Rice et al., 2014). Ce comportement constitue une étape importante de leur développement car il permet d'acquérir leur endosymbionte bactérien (*Pantoea carbekii*) que les femelles ont transféré à la surface des œufs (Bansal et al., 2014 ; Taylor et al., 2014). En l'absence de ces symbiotes intestinaux, Taylor et al. (2014) ont démontré que la fitness des individus était significativement réduite par rapport à leurs congénères. Il faut compter 3 à 5 jours de plus avant que les néonates ne muent en second stade nymphal. À partir de ce stade, les individus deviennent mobiles et s'alimentent des plantes hôtes à l'aide de leur rostre. Le troisième stade nymphal apparaît 12 ou 13 jours après l'éclosion des œufs, tandis que la mue des nymphes en L4 et L5 se produit respectivement entre 19 et 20 jours et entre 26 et 27 jours après l'éclosion (Rice et al., 2014). L'émergence de la nouvelle génération annuelle d'adultes ne se produit pas avant mi-août, lorsque la photopériode est déjà inférieure à 15 heures (Haye,

³ Mode de reproduction chez les insectes caractérisé par une production continue d'ovocytes chez les femelles tout au long de leur vie.

Abdallah, et al., 2014). Or, Yanagi & Hagihara (1980) avaient estimé que ce seuil représentait la durée critique du jour nécessaire à l'induction de la diapause chez *H. halys*. Par conséquent, ces nouveaux adultes n'entrent pas en phase de reproduction avant l'année suivante (Haye, Abdallah, et al., 2014).

Au total, pour un seuil de température de 12.2 °C, le modèle de Haye, Abdallah, et al. (2014) a estimé que le cycle complet de la punaise marbrée nécessitait 588 degrés-jour. Sous une température optimale de 30°C, les populations suisses ont besoin d'approximativement 33.2 jours pour passer de l'œuf à l'imago (Haye, Abdallah, et al., 2014). Le développement complet de *H. halys* n'est d'ailleurs possible que dans une plage de températures comprises entre 17 et 33 °C (Nielsen et al., 2008).

1.3.3. Gamme de plantes hôtes

H. halys est une espèce hautement polyphage et ce caractère généraliste est à la base de son importante capacité à coloniser de nouveaux territoires (D. H. Lee, Short, et al., 2013). Sa large gamme d'hôtes englobe à la fois des espèces sauvages et des plantes cultivées, notamment des arbres fruitiers et des plantes ornementales (Rice et al., 2014 ; Bakken et al., 2015). On y retrouve un grand nombre d'espèces à haute valeur économique telles que le poirier, le soja ou encore le blé (Rice et al., 2014). Dans son aire de répartition naturelle, Lee, Short, et al. (2013) ont identifié la présence de 106 espèces végétales réparties en 45 familles dans son régime alimentaire, tandis qu'en Europe, on y retrouve 51 hôtes dans 42 familles (Haye, Abdallah, et al., 2014). Le développement normal des individus nécessite qu'ils se nourrissent de différentes plantes (Acebes-Doria et al., 2016). De plus, les nymphes et les adultes ont tendance à se nourrir sur les fruits et les graines en développement plutôt que sur les autres parties végétales. Ces comportements alimentaires sont donc en partie responsables des immenses dégâts commis par l'espèce (Martinson et al., 2015).

1.4. Dégâts et nuisances

Les dégâts infligés aux plantes hôtes résultent de l'activité des adultes et des nymphes qui piquent les tissus végétaux, injectent des enzymes digestives et absorbent les fluides de la plante (Rice et al., 2014). Les dommages causés par son alimentation se présentent sous forme de modifications morphologiques, dont la nature varie selon les plantes hôtes et leur stade de développement (*Figure 4*). On observe par exemple la présence de parties décolorées, spongieuses ou liégeuses sur les fruits et légumes prêts à être récoltés (Lee, Short, et al., 2013).

Plus tôt dans la saison, les piqûres vont induire l'avortement des fleurs et des fruits en développement (Nielsen & Hamilton, 2009). Dans le cas des cultures agricoles, des phénomènes de « stay green » sont fréquemment observés en raison des dispersions agrégatives du ravageur. En effet, il arrive d'observer des champs dont la périphérie présente une sénescence retardée à cause de la présence de l'espèce (Rice et al., 2014). La punaise diabolique influence également les cultures en transmettant les pathogènes contenus dans la salive qu'elle injecte dans les tissus végétaux lors des piqûres. Elle est identifiée comme un vecteur de la maladie phytoplasmatique du balai de sorcière, affectant *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud., 1841 en Asie (Hoebel & Carter, 2003), et pourrait également être impliquée dans la transmission d'autres phytoplasmes (Jones & Lambdin, 2009).



*Figure 4. Dégâts causés par les piqûres de *H. halys* sur des poires (Bariselli et al., 2016) et des pommes (Bergh, s.d.).*

À ce jour, *H. halys* figure parmi les ravageurs les plus menaçants pour de nombreuses cultures agricoles. Sa grande mobilité lui permet de se répandre efficacement sur ses plantes hôtes. Plusieurs études ont notamment démontré que les adultes pouvaient effectuer des déplacements largement supérieurs à 5 km par jour (Lee & Leskey, 2015 ; Wiman et al., 2015). De plus, elle a tendance à provoquer des dommages majeurs sur les structures reproductrices de ses hôtes, ce qui compromet leur développement ainsi que leur rendement (Lee, 2015). Les récoltes qui présentent des dégâts infligés par la punaise diabolique ne sont généralement pas commercialisables (Costi et al., 2017). Son impact sur la qualité du vin avec l'apport en tridécane et (E)-2-décénal a aussi été mis en évidence (Mohekar et al., 2017).

En plus de son statut de ravageur et de vecteur de maladies, *H. halys* constitue une véritable nuisance domestique lors de sa période de diapause. Les individus profitent des infrastructures humaines pour s'y agréger et ainsi survivre aux conditions climatiques défavorables de l'hiver. De nombreux témoignages évoquent la présence de l'espèce en masse dans des vêtements, des

matelas ou encore des placards (Lee, Short, et al., 2013). Même si la punaise n'est pas agressive envers l'Homme et qu'aucune maladie ne peut être transmise, plusieurs cas de réaction allergique à certains composés qu'elle produit ont déjà été notifiés (Amin & Nahin, 2024). De plus, les phéromones qu'elle émet en cas de stress peuvent être assez désagréables pour les propriétaires des habitations envahies (Weber et al., 2017).

1.5. Ecologie chimique

Chez les espèces de Pentatomidae, les individus libèrent une grande diversité d'aldéhydes, d'hydrocarbures, d'oxo-aldéhydes et d'autres composés organiques volatils en quantité importante. Ces différentes substances sont émises par les glandes abdominales dorsales chez les nymphes et par les glandes métathoraciques chez les adultes (Weber et al., 2017).

Les mâles de la famille des Pentatomidae émettent des phéromones pouvant soit attirer uniquement les femelles, soit les individus des deux sexes ainsi que les nymphes. La phéromone d'agrégation de la punaise diabolique (PHER) est constituée des stéréoisomères (3S,6S,7R,10S)-10,11-époxy-1-bisabolen-3-ol et (3R,6S,7R,10S)-10,11-époxy-1-bisabolen-3-ol, désignés respectivement par SSRS et RSRS (Khrimian et al., 2014). Les mâles adultes commencent à émettre le mélange de ces deux stéréoisomères à un âge moyen de 13 jours, avec un ratio de 3.5:1. L'émission de phéromones est principalement observée chez les individus isolés, avec un pic de production au cours de la journée (Harris et al., 2015). Les phéromones d'agrégation des Pentatomidae peuvent aussi présenter des phénomènes d'attraction interspécifiques entre les espèces du taxon (Tillman et al., 2010). La punaise diabolique est significativement attirée par le methyl (2E,4E,6Z)-2,4,6-decatrienoate (MDT), la phéromone d'agrégation de la punaise *Plautia stali* Scott, 1874 (Sugie et al., 1996 ; Aldrich et al., 2007). L'hypothèse la plus probable derrière cette attraction interspécifique serait que *H. halys* exploiterait les signaux chimiques émis par *P. stali* pour repérer ses propres plantes hôtes (Funayama, 2008). En cas de danger, les deux sexes ainsi que les nymphes de troisième stade vont émettre un liquide jaunâtre nauséabond composé de (E)-2-décénal. Ce composé est considéré comme une phéromone d'alarme pour l'espèce et une allomone visant à dissuader les prédateurs généralistes (Harris et al., 2015). Outre son rôle dans la communication sémiochimique, il présente aussi des propriétés antifongiques et antibactériennes (Sagun et al., 2016).

En matière de recherche alimentaire, l'impact des stimuli olfactifs émis par les plantes hôtes demeure encore peu exploré. Il est évident que la punaise marbrée se sert de l'olfaction pour

localiser ses plantes hôtes puisque certains composés végétaux se sont avérés attractifs ou répulsifs. Cependant, des études antérieures ont suggéré que d'autres stimuli, notamment visuels et gustatifs, seraient impliqués dans la localisation des plantes hôtes (Morrison et al., 2018). Un individu qui consomme ou pond sur une plante hôte va modifier qualitativement et quantitativement les composés qu'elle émet (Peterson et al., 2022). Zhou et al. (2016) ont effectivement observé que les fruits ayant déjà été en partie consommés étaient moins attractifs que les fruits intacts, en raison de la modification du profil d'émission induite par les congénères.

Les composés déposés dans l'environnement par la punaise diabolique peuvent servir de kairomones en étant exploités par ses parasitoïdes et ses prédateurs (Weber et al., 2017). En Asie, les principales espèces parasitoïdes de *H. halys* font partie des Tachinidae ou du genre *Trissolcus* (Leskey, Hamilton, et al., 2012). Ce dernier se compose de guêpes parasitoïdes des œufs capables de les localiser à partir des empreintes laissées par les femelles sur leur site de ponte (Weber et al., 2017). Effectivement, l'étude de Jones et al. (2014) a démontré que les œufs pondus naturellement sont plus fortement parasités que les masses d'œufs sentinelles artificiellement placées et issues de laboratoire. Des parasitoïdes d'œufs ont également été capables de tirer parti des herbivore-induced plant volatiles produits par les plantes attaquées afin de localiser les œufs du ravageur (Rondoni et al., 2017).

1.6. Méthodes de gestion du ravageur

1.6.1. Outils de surveillance

Étant donné l'impact significatif des dégâts causés par *H. halys*, il est essentiel de développer des méthodes efficaces permettant de localiser et d'estimer avec précision la densité de ses populations au cours du temps.

Pour le suivi des populations lors de leur période d'activité, la surveillance se base principalement sur l'utilisation de pièges équipés de stimuli attractifs à l'espèce (Lee, Short, et al., 2013). L'utilisation de pièges à lumière noire repose sur des signaux visuels et reste efficace de la fin de la diapause jusqu'en septembre. Puisque cette technique attire l'ensemble des insectes volants nocturnes, elle était donc surtout privilégiée en l'absence de stratégies de surveillance plus spécifiques (Nielsen et al., 2013). La mise en évidence de l'attraction de la punaise diabolique pour le MDT a conduit à la conception des premiers pièges sémiochimiques et spécifiques à l'espèce (Aldrich et al., 2007). Cependant, cette approche ne permet pas

d'assurer une capture efficace des imagos tout au long de la saison, que ce soit dans leur aire native ou dans leur zone d'invasion (Leskey, Wright, et al., 2012 ; Morrison et al., 2017). La découverte de la PHER à deux composantes (SSRS et RSRS) de l'espèce a permis de remédier à cette limitation en associant les deux composés (Khrimian et al., 2014). Le piège pyramidal noir (*Figure 5*), associé à des composantes attractives et létale, constitue actuellement le standard pour la surveillance de la punaise marbrée (Leskey, Wright, et al., 2012). Les pièges à phéromones sont déployés en bordure des vergers car les dégâts sont généralement plus importants dans leur rayon d'action (Carnio et al., 2024).



Figure 5. Piège pyramidal noir utilisé comme standard pour la surveillance de *H. halys* (Leskey, Short, et al., 2012).

L'estimation de la densité des populations en diapause repose sur l'utilisation de pièges passifs reproduisant les structures potentielles d'hivernation. Ces pièges vont être stratégiquement installés en périphérie de sites connus pour abriter les adultes pendant l'hiver (Lee, Short, et al., 2013).

Outre le piégeage, d'autres méthodes de surveillance telles que le fauchage, l'échantillonnage par battage et les occurrences visuelles sont également utilisées pour suivre les populations de *H. halys* (Lee, Short, et al., 2013). De plus, la participation citoyenne dans le cadre d'appels à observation est fréquemment sollicitée afin de détecter la présence de l'espèce de manière précoce ou de compléter les données d'occurrence (Claerebout et al., 2018).

1.6.2. Stratégies de lutte

Insecticides

L'utilisation de produits chimiques est l'une des méthodes de lutte contre *H. halys* les plus répandues. De nombreux tests en laboratoires et sur le terrain ont été menés afin d'évaluer l'efficacité de plusieurs insecticides contre cette espèce (Leskey, Lee, et al., 2012 ; Kuhar & Kamminga, 2017). Néanmoins, ces produits présentent rarement une efficacité concluante et possèdent de nombreux inconvénients. Par exemple, les composés efficaces face à la punaise marbrée incluent des insecticides à large spectre d'action, dont l'utilisation peut perturber les pollinisateurs ainsi que les ennemis naturels (Lee, Wright, et al., 2013 ; Leskey, Lee, et al., 2012). De plus, la faible persistance de ces insecticides sur les feuilles et les fruits impose une fréquence d'application accrue. En résulte une diminution de l'efficacité des stratégies de lutte intégrées et une augmentation des populations de ravageurs secondaires (Lee, Wright, et al., 2013).

Dans le cadre d'une gestion du ravageur plus durable, des stratégies combinant une utilisation raisonnée des insecticides et du comportement naturel de l'insecte ont émergées (Rice et al., 2014). L'une de ces tactiques exploite les fréquentes dispersions de l'espèce en pulvérisant uniquement des insecticides sur le bord des cultures (Blaauw et al., 2015). Le comportement de fuite par chute de *H. halys* est également exploité en traitant le sol après avoir battu les arbres hôtes, permettant ainsi de neutraliser les individus dérangés (Lee, Wright, et al., 2013). Enfin, Morrison et al. (2019) ont prouvé l'efficacité des méthodes d'attract-&-kill pour la lutte intégrée contre la punaise marbrée. Ces stratégies consistent à attirer les individus à l'aide de la PHER et du MDT synergique vers des zones traitées avec des pesticides (Morrison et al., 2019).

Certaines solutions à base de composés d'origine naturelle sont aussi utilisées en agriculture biologique en dernier recours, bien qu'elles soient moins développées que les insecticides conventionnels (Kuhar & Kamminga, 2017). Les biopesticides qui ont déjà été évalués présentent une large diversité de natures : composés bactériens, extraits végétaux et substances minérales (Lee et al., 2014 ; Chierici et al., 2025). Plusieurs d'entre eux ont montré une mortalité significative lors d'essais en laboratoire et doivent encore être expérimentés sur le terrain (Morehead & Kuhar, 2017 ; Chierici et al., 2025).

Biologique

Les programmes de lutte biologique se basent sur la régulation des populations de *H. halys* par l'action de micro et macroorganismes jouant le rôle d'ennemis naturels. Les différentes études suggèrent que le taux de préation et de parasitisme en Europe et en Amérique du Nord demeure globalement faible (Abram et al., 2017). Étant donné que les zones envahies ne comptent pas d'antagonistes spécifiques à la punaise diabolique, des études sont régulièrement menées pour évaluer le potentiel d'antagonistes généralistes (Bulgarini, Badra, et al., 2021). Des tests en laboratoire ont notamment révélé que la fourmi commune *Lasius niger* (Linnaeus, 1758) était prédatrice des nymphes de stade L2 et L3 (Bulgarini, Castracani, et al., 2021). Stahl et al. (2019) ont également étudié *Anastatus bifasciatus* (Geoffroy, 1785), une espèce européenne capable de parasiter les œufs de *H. halys*, mais dont la large gamme d'hôtes constitue un frein à son utilisation.

En Asie, il existe plus d'une dizaine d'ennemis naturels de la punaise marbrée répertoriés par Lee, Short, et al. (2013). Parmi elles, la guêpe parasitoïde des œufs *Trissolcus japonicus* (Ashmead, 1904) (Figure 6) est considérée comme le principal antagoniste spécifique dans la lutte biologique contre la punaise marbrée (Zhang et al., 2017), avec un taux de parasitisme moyen de 50 % en Chine (Yang et al., 2009). Des modèles climatiques prévoient que *T. japonicus* pourrait s'établir dans l'ensemble des régions où la punaise diabolique est présente, renforçant ainsi son potentiel en tant que candidat pour la lutte biologique (Avila & Charles, 2018). Diverses études ont donc été menées afin d'évaluer le risque biologique associé à la présence et au lâcher de la guêpe *T. japonicus* dans le cadre de la lutte contre *H. halys* (Haye et al., 2020 ; Sabbatini-Peverieri et al., 2021).

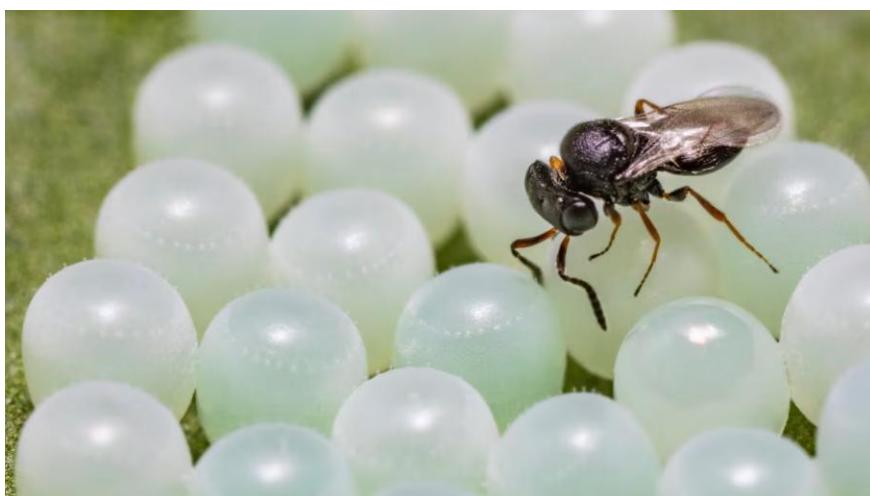


Figure 6. *T. japonicus* sur le point de parasiter les œufs de *H. halys* (Wong, 2024).

À une échelle microscopique, des nématodes hébergeant des bactéries entomopathogènes ont été capable d'infecter *H. halys* (Burjanadze et al., 2020). Les premières utilisations de CEP face à l'espèce ont aussi obtenu des résultats probants (Parker et al., 2015). Les protéases que ces champignons sécrètent dégradent la cuticule des insectes, favorisant leur invasion et conduisant à la mort des hôtes parasités (St. Leger et al., 1992).

2. Champignons entomopathogènes

2.1. Généralités

Les champignons entomopathogènes sont un groupe non monophylétique de microorganismes qui infectent et tuent les arthropodes en perforant leur cuticule pour se développer à l'intérieur de leur corps (Araújo & Hughes, 2016 ; Litwin et al., 2020). Ces organismes participent à la régulation des populations de ravageurs dans les écosystèmes du monde entier (Lovett & St. Leger, 2017). Les CEP sont pour la plupart des saprophytes facultatifs (Figure 7), ils peuvent aussi survivre dans le sol et sur la matière en décomposition (Skinner et al., 2014). De plus, nombre d'entre eux sont aptes à coloniser les tissus des végétaux de manière endophyte, sans pour autant être nuisibles à leur hôte (Ownley et al., 2010). Les CEP endophytes sont susceptibles d'apporter d'importants bénéfices à la plante hôte tels qu'une croissance accrue et de meilleures défenses contre les pathogènes (Lopez & Sword, 2015 ; Ríos-Moreno et al., 2016).

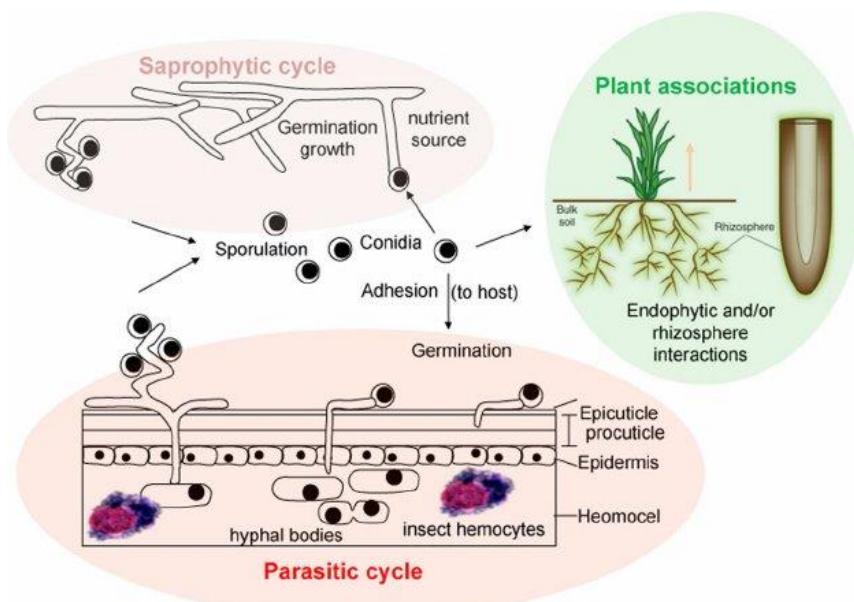


Figure 7. Modes de vie d'un champignon entomopathogène : saprophyte, endophyte et parasite (Ortiz-Urquiza et al., 2015).

Le cycle infectieux des CEP se compose de six étapes clés : l'adhésion, la germination, la formation de l'appressorium, la pénétration, la colonisation de l'hémolymphé et l'émergence (Aw & Hue, 2017). Le processus débute lorsqu'une spore entre en contact avec la cuticule d'un insecte hôte qu'elle s'y accroche grâce à un mécanisme de reconnaissance cellulaire (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013). Lorsque les conditions environnementales sont favorables, la conidie germe et forme un appressorium. Ce dernier va permettre la pénétration des hyphes dans le tégument de l'hôte en produisant l'ensemble des enzymes hydrolytiques nécessaires (Ortiz-Urquiza et al., 2015). Au niveau de l'hémolymphé, les hyphes vont se différencier en blastopores unicellulaires pour exploiter efficacement le liquide riche en nutriments et s'y développer. La colonisation des tissus internes est accompagnée par la production de différents métabolites toxiques servant à supprimer les défenses immunitaires de l'hôte (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013). Une fois les ressources épuisées, le champignon perce la cuticule de l'intérieur afin de faire émerger ses conidiophores et de relarguer les nouvelles spores à la surface (Ortiz-Urquiza et al., 2015). Les infections suivantes se produisent par contact direct avec le cadavre ou par dispersion des conidies par le vent et la pluie (Wang et al., 2021).

2.2. *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana (Hypocreales : Cordycipitaceae) est une espèce de champignon cosmopolite et ubiquitaire (Mascarin & Jaronski, 2016). Il est l'agent pathogène responsable de la muscardine blanche, une maladie fongique entraînant la mort de l'insecte (Figure 8). Les victimes adoptent un aspect momifié et sont recouvertes d'une couche blanche de conidies (James & Li, 2012). Ce champignon possède une large gamme d'hôtes, affectant plus de 700 espèces d'insectes réparties au sein de tous les principaux ordres (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2016).



Figure 8. Développement de *B. bassiana* sur *H. halys* après 2, 3 et 5 jours d'incubation (de gauche à droite).

D'un point de vue taxonomique, *B. bassiana* constitue la forme asexuée du champignon, tandis que la forme sexuée correspond à *Cordyceps bassiana* (Li et al., 2001). Cependant, le téléomorphe est rarement observé en milieu naturel et reste difficile à cultiver en laboratoire (Zheng et al., 2013). Son mycélium est à même de produire des structures résistantes, nommées microsclérotes, qui permettent de survivre lors de conditions environnementales défavorables (Hai, 2011).

2.3. *Metarhizium* spp.

Le genre *Metarhizium* (Hypocreales : Clavicipitaceae) est un clade de CEP capables de coloniser la rhizosphère et les racines de manière endophyte (St. Leger & Wang, 2020). Lors de leur croissance, ces espèces forment d'abord un mycélium blanc avant d'arborer une couleur verdâtre caractéristique de leurs conidies (Bischoff et al., 2009). Les champignons de ce taxon possèdent chacun un certain degré de spécificité pour leur spectre d'hôtes, *M. brunneum* étant l'une des espèces les plus généralistes (Hu et al., 2014).

Des analyses génétiques ont mis à jour la taxonomie du genre et ont permis de reconnaître plusieurs espèces, dont *M. brunneum*, qui étaient morphologiquement similaires (Driver et al., 2000 ; Bischoff et al., 2009). Les téléomorphes reliés aux espèces du genre *Metarhizium* sont des champignons appartenant au genre *Metacordyceps* (Sung et al., 2007).

2.4. Utilisation des CEP en lutte biologique

Les biopesticides sont actuellement au centre de l'attention du monde scientifique avec la demande croissante pour une agriculture plus durable (Daraban et al., 2023). Les CEP sont d'excellents candidats pour la lutte intégrée car leur action reste généralement spécifique aux arthropodes ravageurs et leur impact sur les écosystèmes est minimal. De plus, leur capacité d'infection par simple contact facilite grandement leur application (Skinner et al., 2014).

Les mycoinsecticides actuellement commercialisés sont produits principalement à partir de CEP des genres *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* et *Lecanicillium* (De Faria & Wraight, 2007). L'intérêt de ces taxons est qu'ils regroupent des espèces avec un large spectre d'infection qui sont saprophytes facultatives, ce qui permet leur production sur des milieux artificiels (Skinner et al., 2014). La production en masse de conidies commence par la fermentation des champignons sur un substrat solide ou dans un milieu de culture liquide (Jaronski, 2013). Les conidies récoltées sont ensuite soumises à des processus de formulation servant à faciliter leur application et à améliorer leur efficacité. Ces procédés offrent aussi une protection contre les

stress abiotiques, renforçant ainsi la performance et la persistance des mycoinsecticides (Mascarin & Jaronski, 2016).

Les poudres et les granules commercialisés étaient initialement appliqués en grande quantité sur l'insecte cible et son habitat naturel. Cependant, des stratégies ont vu le jour afin d'optimiser leur application en utilisant de plus petites quantités de produit tout en maximisant leur efficacité (Mascarin & Jaronski, 2016). Par exemple, les dispositifs de type attract-&-infect exploitent des signaux chimiques pour attirer les nuisibles et les contaminer par exposition à des spores (Lopes et al., 2014). Une autre stratégie testée consiste à inoculer les CEP endophytes dans les tissus des plantes hôtes afin de leur conférer une protection accrue contre les pathogènes et les ravageurs (Ownley et al., 2008 ; Lopez & Sword, 2015).

Objectifs

Ce travail s'inscrit dans le cadre du développement de nouvelles stratégies de lutte intégrée contre *Halyomorpha halys*. L'objectif principal est d'évaluer le potentiel de deux souches de champignons entomopathogènes, *Beauveria bassiana* (souche GHA) et *Metarhizium brunneum* (souche ARSEF4556), pour le contrôle biologique de la punaise diabolique. La recherche se divise en quatre sous-objectifs plus spécifiques :

1. Évaluer la capacité endophytique des souches de *B. bassiana* et *M. brunneum* à coloniser les différents tissus (racines, tiges, feuilles) de *Vicia faba* L., 1753.
2. Comparer la virulence des souches ARSEF4556 et GHA contre *H. halys* via trois méthodes d'application (endophytisme, pulvérisation, trempage).
3. Analyser l'expression et les séquences des chitinases issues de souches de *B. bassiana* et *M. brunneum* en action lors du processus d'infection de *H. halys*.
4. Explorer une piste applicative en évaluant l'attractivité d'un prototype de piège de type "attract-and-infect" en conditions contrôlées.

Les hypothèses de ce mémoire sont que (I) les souches de *B. bassiana* et *M. brunneum* testées colonisent l'ensemble des tissus de *V. faba* ; (II) les traitements à base de CEP causent une diminution de la survie et une augmentation de la mortalité chez *H. halys* ; (III) les méthodes d'application directe (pulvérisation et trempage) induisent une virulence plus élevée des CEP contre *H. halys* que l'endophytisme ; (IV) les différentes concentrations de phéromones influencent la probabilité de contact avec le piège et le temps de réponse de *H. halys*.

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Élevage de *Halyomorpha halys*

L'élevage des punaises utilisé lors de ce mémoire provient du laboratoire d'entomologie fonctionnelle et évolutive de la faculté Agro-Bio Tech de Gembloux (*cf. figure 19 en annexe*). Sa maintenance a été assurée personnellement entre les mois de février et août 2025. L'environnement dans lequel est maintenu l'élevage se caractérise par une température d'environ 25 °C, d'une humidité proche de 60 % et d'une photopériode de 16 h de lumière. Les cages d'élevage en nylon BugDorm® de 45 × 45 × 45 cm, produites par MegaView Science Co., Ltd. (Taichung, Taïwan), contiennent chacune deux bacs de *V. faba* et trois coupelles de graines de tournesol pour subvenir à l'alimentation des punaises.

Les plantes sont arrosées quotidiennement et remplacées toutes les deux semaines, tandis que les graines sont renouvelées chaque semaine. Lorsque l'élevage nécessite une augmentation de son effectif, les œufs sont prélevés et déposés sur du papier humide à l'intérieur de boîtes en plastique. Ces boîtes sont maintenues dans les mêmes conditions environnementales que le reste de l'élevage. Les jeunes larves sont ensuite réintroduites dans les cages dès leur émergence, accompagnées de leur coquille d'œuf.

1.2. Gestion des semis de *Vicia faba*

Les semis de *V. faba* utilisés dans le cadre des essais biologiques en laboratoire proviennent de graines issues de l'agriculture biologique (variété : FANFARE). De nouvelles graines sont semées chaque semaine dans des pots remplis avec du terreau universel en provenance de La plaine Chassart. Les semis en croissance sont entreposés dans des cages en nylon à l'abri des ravageurs et sont arrosés tous les jours.

1.3. Souches fongiques

Beauveria bassiana GHA

La souche GHA correspond à l'ingrédient actif du mycoinsecticide commercial BotaniGard® 22WP, produit par Certis (Columbia, MD, USA). L'isolat a été obtenu à partir d'une souche de laboratoire conservée dans une solution de glycérol à 10 %, stockée à -80 °C

dans des cryotubes. La culture fongique a été réactivée sur un milieu Sabouraud Dextrose Agar (SDA), puis incubée à une température constante de 23 °C pendant 14 jours, jusqu'à sporulation complète.

Metarhizium brunneum ARSEF4556

La souche ARSEF4556 a été fournie par le Département de biosciences de la Faculté des sciences et de l'ingénierie de l'Université de Swansea, au Royaume-Uni. La souche a été cultivée sur du milieu SDA-peptone et était stockée dans un incubateur à 23 °C.

2. Essais biologiques de virulence des CEP

Dans le but d'évaluer la virulence des souches ARSEF4556 et GHA contre *H. halys*, plusieurs méthodes d'applications ont été testées sur des nymphes de stade L3.

2.1. Préparation des solutions sporales

La préparation des solutions sporales a été réalisée sous une hottte à flux laminaire. La première étape consiste en la solubilisation des spores hydrophobes des champignons par ajout d'une solution de Tween 80 (0.03 %). Le volume de Tween 80 ajouté était adapté à la solubilité des deux souches : 8 mL pour ARSEF4556 et 10 mL pour GHA. Les spores ont ensuite été raclées à l'aide d'un râteau en plastique, de sorte à homogénéiser l'ensemble. Une fois les spores solubilisées, la solution obtenue a été filtrée dans un entonnoir muni d'un filtre d'un maillage adapté à l'élimination des congolérats et des structures fongiques.

Afin de connaître la concentration en spores du filtrat fongique, celui-ci a été passé au vortex et 100 µL lui ont été prélevés. Ce volume a ensuite été dilué cent fois avec la même solution de Tween 80 afin de simplifier l'étape de comptage des spores. À l'aide d'une chambre de comptage de Bürker (cf. *Figure 20 en annexe*), les spores ont été comptées au binoculaire dans dix carrés afin de déterminer la moyenne du nombre de spores par carré (cf. *Figure 21 en annexe*). Une fois cette moyenne déterminée, la formule suivante a permis de calculer la concentration en spore/ml.

$$C = X \times 2.5 \times 10^5 \times 100$$

Avec « X » le nombre moyen de spores par carré, « 2.5×10^5 » le facteur lié aux dimensions de la plaque du Bürker et « 100 » le facteur de dilution.

Après avoir pris connaissance de la concentration du filtrat fongique, une dilution appropriée a finalement été déterminée à la solution mère afin d'obtenir une solution sporale à une concentration finale de 1×10^8 spores/mL.

Afin de contrôler la qualité des solutions sporales, un volume de 100 μL de la solution finale a été prélevé et dilué mille fois pour atteindre une concentration de 1×10^5 spores/mL. Cette nouvelle solution a ensuite été déposée sur une boîte de culture contenant du SDA, puis incubée pendant 24 h. Trois carrés de gel de 1 cm de côté ont été découpés afin de déterminer le nombre de conidies germées et non germées (*cf. Figure 22 en annexe*). Seules les solutions sporales qui avaient un pourcentage de germination supérieur ou égal à 95 % ont été utilisées pour les essais biologiques.

2.2. Préparation des cups expérimentales

Lors des essais biologiques en laboratoire, l'ensemble des punaises a été placé dans des cups en plastique tout au long de leur suivi (*Figure 9*).



Figure 9. Cups en plastique préparées au suivi des punaises lors des essais biologiques.

Une solution d'agar 1.5 % a initialement été préparée avec de l'eau distillée. Cette solution a ensuite été passée à l'autoclave pour bien solubiliser l'agar et la stériliser. À l'intérieur de chaque cup, une couche d'environ un centimètre d'agar fondu a été coulée, puis laissée à figer avant d'y planter une feuille de semis de *V. faba*. Ainsi, les feuilles, et par conséquent les insectes qui s'en nourrissent, étaient maintenus dans un environnement hydraté. De plus, trois graines de tournesol ont aussi été ajoutées à l'intérieur des cups pour subvenir à leur régime alimentaire et éviter une potentielle source de stress impactant les résultats.

2.3. Application des traitements

2.3.1. Méthode indirecte par endophytisme

Cette première méthode se basait sur le caractère endophyte de *B. bassiana* et *M. brunneum* et avait pour cible les feuilles de fève plantées à l'intérieur des cups. Les insectes n'ont donc pas été en contact direct avec des solutions sporales.

L'intégration des champignons au sein de *V. faba* a débuté par la pulvérisation de 2 mL de solution sur chacun des douze pots de semis choisis par condition. Les plantes et la terre ont été pulvérisées de façon homogène pour une inoculation générale des tissus. Une fois traités, les pots ont été munis de tuteurs puis emballés dans des sacs en plastique destinés à maintenir un taux d'humidité favorable au développement des champignons (*cf. Figure 23 en annexe*). Après deux jours, les sacs ont été retirés et les feuilles des semis ont été prélevées après dix jours supplémentaires, le temps que les champignons puissent coloniser les différentes parties de leur plante. Dix répétitions par traitement ont été effectuées à partir des feuilles présentant les CEP.

Afin de vérifier la présence des champignons dans l'ensemble des tissus de *V. faba* durant l'essai biologique, un test d'endophytisme (*Figure 10*) a été réalisé suivant la méthodologie adaptée de Dessauvages et al. (2024).



Figure 10. Mise en place du test d'endophytisme pour *V. faba*.

Pour chacun des deux traitements fongiques, cinq plantes ont été choisies aléatoirement parmi les douze traitées. Trois fragments de feuilles (3 × 3 cm), de racines (2 cm) et de tiges (2 cm) leur ont été prélevés à l'aide de ciseaux stériles. L'ensemble des tissus a été stérilisé en surface par immersion pendant 3 minutes dans de l'éthanol à 70 % puis du NaClO à 2 %. Les tissus

végétaux collectés ont ensuite été rincés à l'eau distillée stérile avant d'être séchés sur du papier filtre. Chaque fragment stérilisé en surface a été taillé (feuilles : 0.5 cm ; racines : 1 cm ; tiges : 0.5 cm) avec un scalpel stérile avant d'être partiellement planté dans un milieu SDA. Afin d'empêcher d'autres organismes de s'y développer, ce milieu de culture a été enrichi de plusieurs antibiotiques : streptomycine (400 mL de milieu à 0.6 mg/mL), tétracycline (400 mL de milieu à 0.05 mg/mL) et cycloheximide (400 mL de milieu à 0.1 mg/mL). Finalement, les cinq boîtes de Pétri ont été incubées à 25 °C dans l'obscurité durant 15 jours (*cf. Figure 24 en annexe*). Les morceaux de tissus végétaux présentant du mycélium ont été recensés quotidiennement.

2.3.2. Méthodes directes

Traitement par pulvérisation

Dans ce cas-ci, les différentes solutions sporales ont été pulvérisées directement sur les punaises. Le traitement contrôle correspondait à des pulvérisations de solution de Tween 80 à 0.03 %.

Pour chaque traitement, les insectes ont été placés sur un support en verre par groupe de cinq punaises. Tous les groupes ont reçu 1 ml de solution pulvérisée à l'aide d'un pulvérisateur placé à une distance de 20 cm. Les individus ont finalement été transférés sur du papier filtre avant d'être placés dans leur cup respective. Au total, dix cups ont été mises en place pour chacun des trois traitements.

Traitement par trempage

Pour cette dernière méthode, les individus ont soit été trempés dans une solution sporale, soit dans une solution de Tween 80 à 0.03 %. Ce dernier constituait le traitement contrôle et avait pour but de faire également subir le stress du trempage comme les deux autres traitements.

Après avoir été immersés durant cinq secondes, les insectes ont été déposés sur du papier filtre afin de leur enlever l'excédent de solution. Les punaises ont été placées par groupe de cinq dans chaque cup avant d'être incubées. L'expérience a été répliquée 19 fois pour chaque traitement.

2.3.3. Conditions d'incubation et suivi

En fonction de la méthode et du traitement subis, les punaises ont été groupées par cinq dans chaque cup. Les cups ont ensuite été rassemblées par condition dans des bacs dont le fond a été recouvert d'un papier absorbant Tork® (Essity AB, Stockholm, Suède). Le dessus des

bacs a aussi été recouvert d'un second papier. Le tout a été stocké dans un incubateur à 23 °C avec une photopériode de 16 heures. Les punaises ont été suivies durant les 10 jours (12 jours pour le trempage) suite à leur mise en cup. Chaque jour, à la même heure, les insectes morts ont été enregistrés puis retirés.

Afin de maintenir un milieu propice à la croissance des espèces fongiques pendant toute la durée des essais biologiques, les papiers Tork® placés au fond des bacs contenant les cups ont été humidifiés chaque jour. Toutes les feuilles des cups ont été changées tous les trois jours. De plus, les graines de tournesol des punaises ont été remplacées par de nouvelles tous les deux jours.

3. Analyse des protéines fongiques par spectrométrie de masse

Dans l'objectif de caractériser davantage les mécanismes liés à l'infection de *H. halys* par les CEP, une extraction et une analyse des protéines à la surface de punaises traitées avec ARSEF4556 et GHA ont été réalisées.

Le traitement des nymphes de stade L3 a suivi le protocole de trempage et d'incubation décrit précédemment. La durée d'incubation des punaises a ensuite été ajustée en fonction de la LT25⁴ propre à chaque souche fongique, déterminée à partir des résultats du premier essai de trempage. Les individus ont ensuite été instantanément congelés à l'aide d'azote liquide afin de préserver l'intégrité des protéines fongiques sur leur cuticule lorsque ces dernières étaient exprimées de manière optimale.

Deux méthodes d'extraction ont été évaluées lors de cette expérience. La première méthode a débuté par une sonication (40 kHz) des tubes Eppendorf contenant chacun 15 cadavres en suspension dans 300 mL de bicarbonate d'ammonium à 50 mM (TD50) pendant 7.5 minutes pour détacher les protéines de leur surface. Les échantillons ont ensuite été centrifugés (12 000 g à 4 °C) pendant 10 minutes, puis les cadavres ont été retirés avant la digestion. Pour la seconde méthode, la digestion des protéines a directement été réalisée sur les cadavres. La solution contenant les protéines digérées a ensuite été pipetée pour retirer les cadavres. Dans les deux cas, un mélange constitué de 300 mL de TD50 et de 2 µL de trypsine (100 ng/µL) a été ajouté au surnageant afin de digérer les protéines. Après une incubation de trois heures sur plaque d'agitation à 37 °C, les échantillons des deux méthodes ont été centrifugés (12 000 g à 4 °C) pendant 10 minutes pour éliminer les spores et autres particules indésirables dans le culot.

⁴ Le temps nécessaire pour provoquer la mort de 25 % d'une population d'organismes exposés à un agent donné

L'ajout de 2 μ L d'acide trifluoroacétique (TFA) 1 % a permis de dénaturer la trypsine et d'interrompre son activité enzymatique. Les échantillons digérés ont finalement été conservés à 4 °C durant la nuit. Au total, trois échantillons ont été digérés pour chaque combinaison traitement – méthode d'extraction.

La filtration et la purification des échantillons peptidiques ont été effectuées à l'aide de ZipTip® de 10 μ L (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne). Ces dispositifs sont constitués d'une colonne C18 permettant la rétention des peptides. Le conditionnement et l'humidification de la colonne ont été réalisés par le passage successif de 20 μ L de tampon B (TFA 91 %), puis de 20 μ L de tampon A composé de TFA 0.1 % et d'acétonitrile (AcN) 80 %. Les échantillons ont ensuite été passés une dizaine de fois dans le tip afin de concentrer les peptides dans la matrice interne. La colonne a été lavée avec 10 μ L de tampon A, puis les peptides ont finalement été élués dans un tube Eppendorf à l'aide de 10 μ L de tampon B. L'ensemble des échantillons a été passé au SpeedVac™ à 45 °C pour évaporer le solvant et ne garder que les peptides concentrés. La préparation des échantillons pour l'analyse en spectroscopie de masse s'est terminée par l'ajout de 10 μ L d'un mélange d'acide formique 0.1 % et d'AcN 2 % aux peptides.

4. Évaluation de l'attractivité d'un piège attract-&-infect en conditions contrôlées

Un prototype de piège de type attract-&-infect a été conçu suite aux résultats concluants de l'application directe des CEP sur *H. halys*. L'expérience avait pour but d'observer la capacité du dispositif à provoquer un contact entre les punaises adultes et la source de conidies en présence d'unurre phéromonal.

4.1. Conception et caractéristiques du prototype

Le prototype a été basé sur le piège pyramidal noir de Leskey, Short, et al. (2012). Les modifications ont été réalisées au niveau de l'entonnoir collecteur à l'apex du piège (*Figure 11*). Des ouvertures ont été intégrées au sommet du pourtour en plastique transparent afin de limiter la rétention des individus infectés. Deux plateformes en polypropylène alvéolaire ont aussi été ajoutées à l'intérieur de la partie de stockage. La première ($R = 7.4$ cm ; $r = 1.8$ cm) est située au niveau de l'extrémité interne de l'entonnoir collecteur et sert de support à la poudre fongique destinée à contaminer les punaises lorsqu'elles le franchissent. La seconde, plus petite ($R = 5.5$ cm), est suspendue au plafond du piège à l'aide d'un tube en polychlorure de vinyle de 3 cm et permet le libre passage vers les ouvertures latérales ajoutées. L'ajout de cette dernière

avait pour but d'augmenter le temps de passage des insectes dans la zone contenant la poudre fongique.



Figure 11. Prototype de piège de type attract-&-infect contre *H. halys*.

La composante attractive du piège d'autodissémination est constituée d'un leurre PHEROCON® BMSB Dual de la marque Trécé© (Adair, OK, USA), diffusant du MDT ainsi que les stéréoisomères RSRS et SSRS de la PHER (Figure 12). Le leurre solide a été stocké sous la plateforme supérieure du piège dans un tube Eppendorf criblé de trous. Une quantité de 10 mg de poudre du produit BotaniGard® 22 WP (4.4×10^{13} conidies/kg) a été disposée sur la plateforme inférieure du piège.



Figure 12. Leurre PHEROCON® BMSB Dual (Trécé©) à deux composantes. La composante située à gauche diffuse le MDT, tandis que celle de droite diffuse la PHER.

4.2. Test comportemental

Le comportement des adultes de *H. halys* face au piège attract-&-infect a été analysé afin d'en évaluer l'attractivité. Un prototype combinant la composante attractive et la poudre fongique a été placé à l'une des extrémités d'une cage de 120 × 50 × 50 cm (cf. *Figure 25 en annexe*). Le piège a été placé sur une pyramide en polypropylène (22 cm de haut et 20 cm à sa base) afin de reproduire le stimulus visuel du piège pyramidal utilisé en extérieur. Des adultes non sexés ont été déposés sur l'autre extrémité de la cage et ont été suivis pendant 10 min. Le temps nécessaire aux punaises pour atteindre le dispositif et pour y entrer a été enregistré. Les adultes ayant été en contact direct avec la poudre fongique ont aussi été recensés.

Dans le but de maximiser l'attractivité du prototype, plusieurs quantités de phéromones ont été testées (*Tableau 2*). Le rapport PHER:MDT de 1:10, tel que présenté dans leurre commercial, a été conservé pour chaque dose. Chaque concentration a été testée avec une population de 30 adultes. Les cages ont été nettoyées avec du RBS T105 (20 mL/L) après chaque individu pour éliminer les hydrocarbures laissés par leur passage.

Phéromones	Contrôle	Dose faible	Dose moyenne	Dose forte
PHER	0	1 mg	5 mg	10 mg
MDT	0	10 mg	50 mg	100 mg

Tableau 2. Quantités testées de la phéromone d'agrégation de *H. halys* (PHER) et de son synergiste (MDT), sous forme solide, présente dans chaque dose.

5. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été effectué à partir du logiciel RStudio 4.3.0.

Pour le test d'endophytisme, le package "lme4" a servi à produire un modèle linéaire généralisé mixte (GLMM) à distribution binomiale pour l'analyse des données d'occurrence de la présence de CEP (Bates et al., 2015). Les souches fongiques et les parties de plante étaient considérées comme des effets fixes, tandis que le numéro des plantes était inclus comme effet aléatoire.

Dans le cadre des essais biologiques, l'effet des traitements sur la survie des individus a été évalué à l'aide d'un modèle de Cox stratifié et du package "survival" (Therneau, 2001). Les temps de survie et les occurrences de mortalité ont été combinés grâce à la fonction "surv". Un test de log-rang et la LT50 de chaque traitement ont été calculés avec la fonction "ggsurvplot" du package "survminer" (Kassambara et al., 2016). Les Hazard ratio (HR) des traitements ont

été estimés à l'aide de la fonction "coxph", en tenant compte du numéro des cups comme facteur de stratification. La fonction "emmeans" du package éponyme (Lenth, 2017) a permis la comparaison multiple entre chaque paire de HR. En parallèle, la fonction "survfit" a été utilisée pour ajuster le modèle de Kaplan–Meier qui estime les courbes de survie selon les différents traitements.

Les différences de mortalité entre les traitements ont été déterminées à l'aide d'une analyse de médiane pour chaque méthode d'application avec un test de Kruskal-Wallis. En cas de significativité, un test post-hoc de Dunn était ensuite réalisé pour les comparaisons multiples avec la fonction "dunn.test" du package du même nom (Dinno, 2014).

Pour les tests comportementaux, l'attractivité du piège en fonction de la concentration en phéromones a été analysée de la même manière que pour la survie lors des essais biologiques : le temps de survie et les occurrences de mortalité ont été remplacés par le temps et le nombre de contacts avec le piège. Les analyses ont inclus un test du log-rank, la production des courbes de Kaplan-Meier et la comparaison par paires des HR.

Le nombre d'insectes ayant été en contact avec le piège a été comparé entre les différentes concentrations de phéromones à l'aide d'un test du Khi carré d'indépendance.

Résultats

1. Préférences de colonisation des tissus végétaux par les CEP

Lors du test d'endophytisme de *V. faba*, les 10 plantes ont été colonisées par les CEP suite au traitement par pulvérisation. L'analyse GLMM a indiqué que la souche ARSEF4556 avait tendance à coloniser davantage que GHA (*Tableau 3*), bien que l'effet soit marginalement significatif (LRT : $\chi^2 = 3.28$; ddl = 1 ; p = 0.07). L'absence d'interaction significative entre la souche et la partie de la plante (LRT : $\chi^2 = 0.47$; ddl = 2 ; p = 0.79) a montré que les deux souches ont présenté un schéma de colonisation similaire dans les tissus végétaux. L'analyse par partie a révélé une colonisation significativement plus faible des feuilles par rapport aux tiges (p = 0.005) et aux racines (p = 0.02), tandis qu'aucune différence significative n'a été observée entre les tiges et les racines (p = 0.823).

Traitements	Racines	Tiges	Feuilles
GHA	50.6% (25-75.9) abc	59.4% (31.9- 82) bc	15.8% (5-40.2) a
ARSEF4556	79.4% (52.7-93) bc	84.6% (60.1-95.2) c	41.4% (18.1-69.2) ab

Tableau 3. Pourcentage (+IC à 95 %) de fragments de tissus de *V. faba* colonisés 15 jours après pulvérisation des CEP. Les lettres indiquent les groupes statistiquement différents déterminés par le test post-hoc des moyennes marginales estimées (emmeans). N = 5 plantes par traitement.

2. Effet des méthodes de traitement et des CEP sur la survie et la mortalité

D'après le test de log-rank et les courbes de Kaplan-Meier (*Figure 13*), la survie des 50 punaises ayant subi la méthode par endophytisme semble avoir différé significativement entre le groupe témoin et les traitements fongiques. La comparaison par paires des HR entre les deux traitements fongiques n'a effectivement pas présenté de variation significative (HR = 1.56 ; IC 95 % : 0.45 – 5.37 ; p = 0.681). Cependant, l'absence de mortalité dans la population témoin n'a pas permis de calculer des HR exploitables avec les traitements fongiques. Aucun des trois traitements n'a atteint sa LT50 sur les dix jours de suivi.

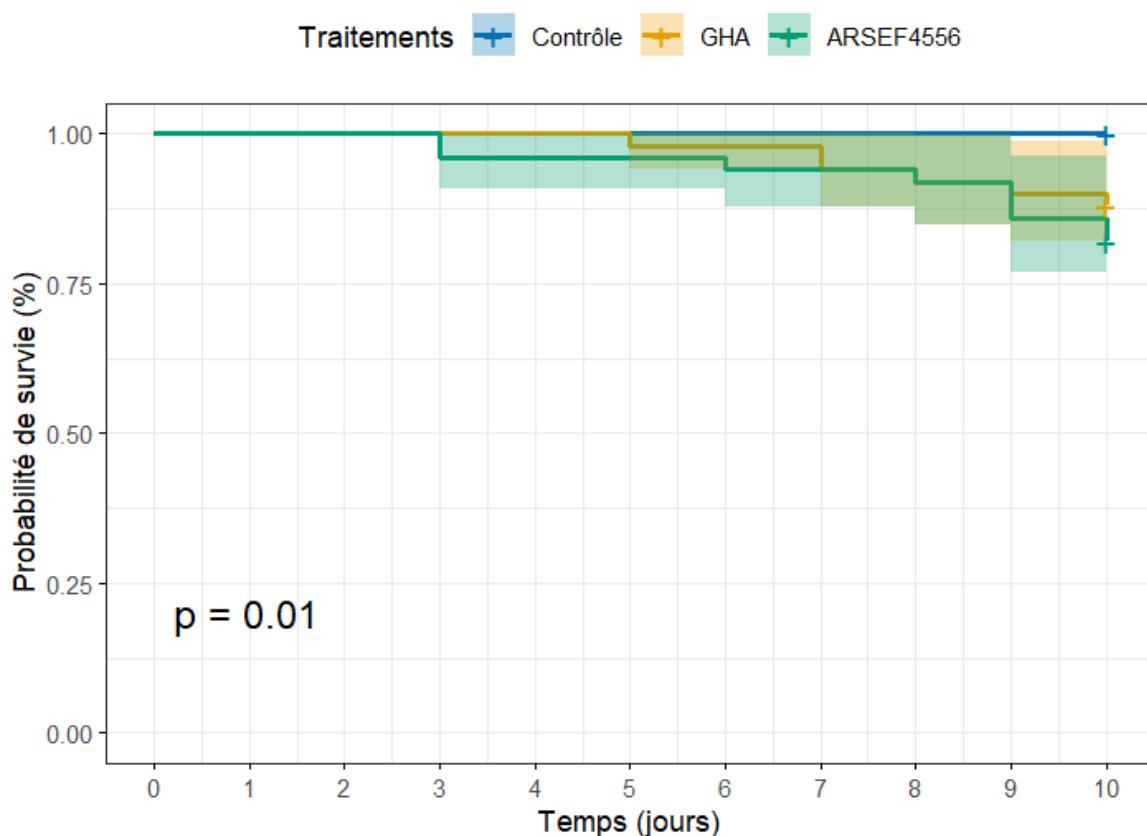


Figure 13. Courbes de Kaplan-Meier (+ IC à 95%) de *H. halys* après traitement par endophytisme. La p-valeur provient du test de log-rank. N = 50 punaises par traitement.

Pour la méthode par pulvérisation, les trois courbes de survie des 50 punaises testées ont différé de manière significative (*Figure 14*). Le risque de mortalité des punaises exposées à la souche ARSEF4556 a augmenté significativement de 19 fois par rapport au traitement contrôle (IC 95 % : 6.75 – 53.96 ; $p < 0.001$) et de 2.7 fois comparé au traitement GHA (IC 95 % : 1.49 – 4.95 ; $p < 0.001$). La souche GHA avait aussi 7 fois plus de risque de mortalité que le traitement contrôle (IC 95 % : 2.40 – 20.63 ; $p < 0,001$). La moitié des individus traités avec ARSEF4556 sont morts après 5.5 jours, tandis que la LT50 de GHA n'a été atteinte qu'au dixième jour.

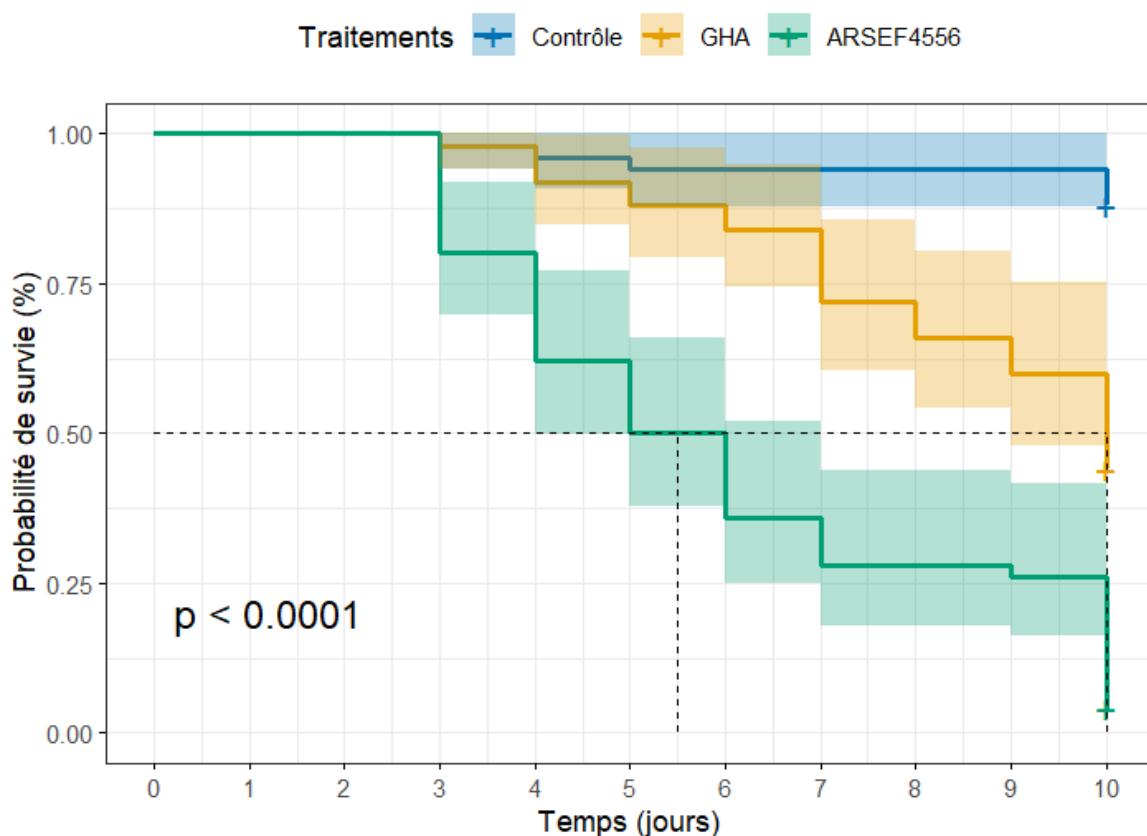


Figure 14. Courbes de Kaplan-Meier (+ IC à 95 %) de *H. halys* après traitement par pulvérisation. Les lignes verticales en pointillés indiquent la LT50 de chaque traitement et la p -valeur provient du test de log-rank. $N = 50$ punaises par traitement.

Les traitements fongiques par trempage ont aussi eu un effet significativement négatif sur la survie des 95 punaises testées (Figure 15). L’analyse des HR a révélé que les souches ARSEF4556 et GHA augmentaient respectivement le risque de mortalité d'un facteur 12.2 (IC 95 % : 5.83 – 25.65 ; $p < 0.001$) et 7.1 (IC 95 % : 3.36 – 15.13 ; $p < 0.001$) par rapport au témoin. La souche ARSEF4556 a aussi montré un effet significativement plus élevé que GHA sur la survie (HR = 1.72 ; IC 95 % : 1.12 – 2.64 ; $p = 0.009$). La LT50 de GHA a été atteinte après 9 jours, tandis que celle de ARSEF4556 a été atteinte après 6 jours.

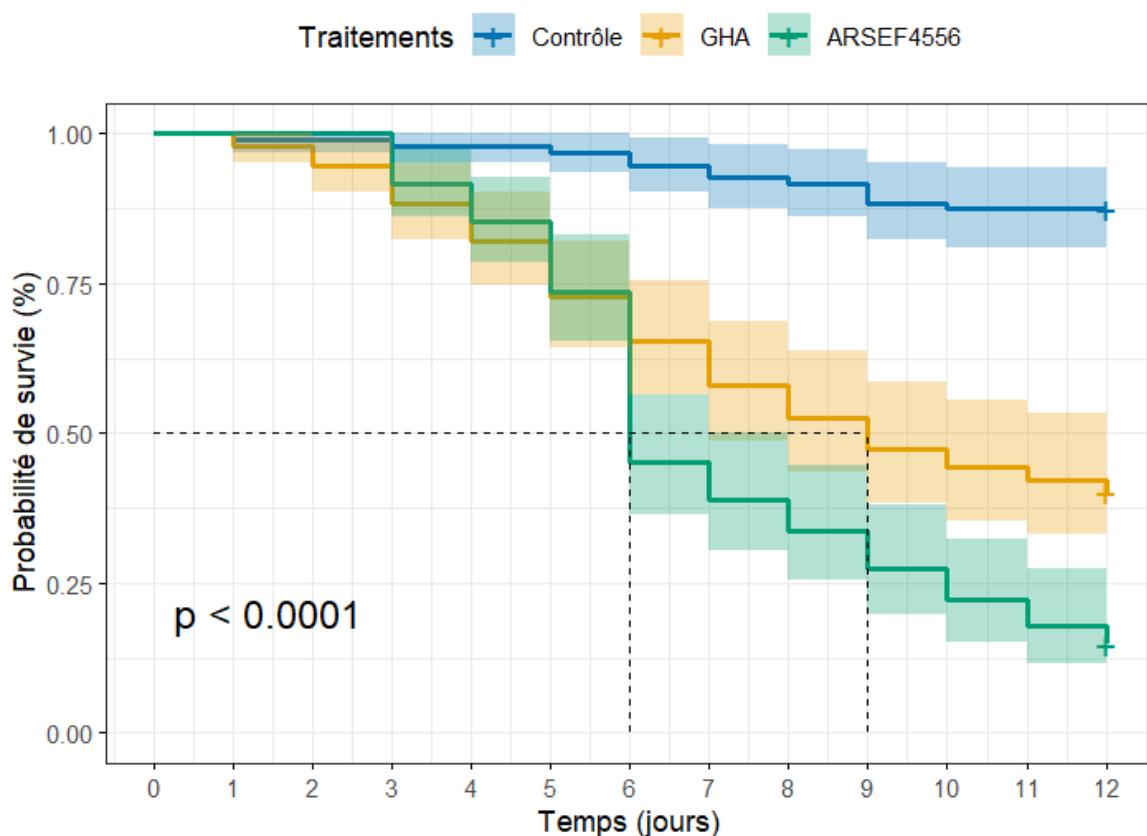


Figure 15. Courbes de Kaplan-Meier (+ IC à 95 %) de *H. halys* après traitement par trempage. Les lignes verticales en pointillés indiquent la LT50 de chaque traitement et la p -valeur provient du test de log-rank. $N = 95$ punaises par traitement.

Les tests de Kruskal-Wallis effectués pour chaque méthode ont mis en évidence des différences entre les taux de mortalité des traitements (*Tableau 4*). Dans le cadre de la méthode par endophytisme, les trois traitements fongiques n'ont induit qu'une mortalité maximale de 18 % \pm 6 % (*Figure 16*). Les CEP endophytes ont augmenté significativement la mortalité des punaises d'un taux minimum de 12 \pm 4 % ($p = 0.015$). Aucune différence significative de virulence n'a été observée entre les traitements GHA et ARSEF4556 par endophytisme (différence : 6 \pm 10 % ; $p = 0.276$).

Méthodes	Chi-carré	ddl	p-valeur
Endophytisme	8.403	2	0.015
Pulvérisation	18.146	2	< 0.001
Trempage	36.172	2	< 0.001

Tableau 4. Résultat du test de Kruskal-Wallis comparant les taux de mortalité des traitements entre les différentes méthodes d'application. Le tableau reprend les valeurs de Khi-carré, les degrés de liberté et les p-valeurs associées.

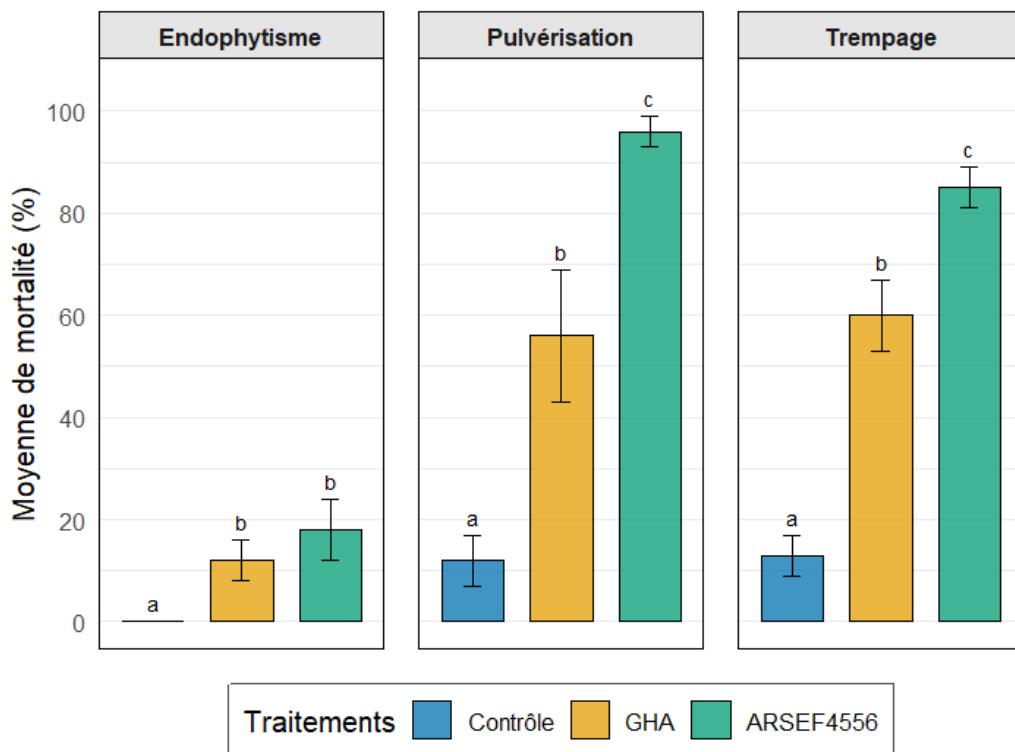


Figure 16. Pourcentage moyen de mortalité (+ ES) de *H. halys* après exposition à différents traitements et méthodes d'application. Pour chaque méthode séparément, les lettres indiquent les groupes statistiquement différents entre les traitements. $N = 50$ punaises (95 pour le trempage) par traitement.

Les traitements fongiques par pulvérisation et trempage ont induit des taux de mortalité compris entre $56 \pm 4\%$ et $96 \pm 3\%$. L'application directe des CEP a augmenté significativement le taux de mortalité des punaises, avec un effet minimal de $44 \pm 18\%$ pour la pulvérisation ($p = 0.007$) et de $47 \pm 11\%$ pour le trempage ($p < 0.001$). La souche ARSEF4556 a induit une mortalité significativement plus élevée que la souche GHA lors des méthodes directes, avec une augmentation de $40 \pm 16\%$ pour la pulvérisation ($p = 0.036$) et de $25 \pm 11\%$ pour le trempage ($p = 0.021$).

Les détails des tests statistiques (p-valeurs, valeur de HR) associés aux comparaisons par paires des risques de mortalité sont présentés dans les *Figures 27 - 30 en annexe*.

3. Analyse des chitinases impliquées dans le mécanisme d'infection

Lors de l'extraction des échantillons pour la digestion, la sonication appliquée dans la seconde méthode d'extraction a provoqué la rupture des cadavres de nymphes. En conséquence, les 9 échantillons ont été contaminés par le contenu interne des insectes et se sont révélés impropres à l'analyse par spectrométrie de masse (*Figure 17*). Les 9 échantillons non soniqués ont été correctement analysés, mais seule une faible dose d'albumine a été identifiée dans les échantillons.



Figure 17. Comparaison de la pureté des échantillons protéiques avec (à gauche) et sans sonication (à droite).

4. Effet des concentrations de phéromones sur l'attractivité du piège

La concentration faible (5 mg PHER + 50 mg MDT) et l'intermédiaire (1 mg PHER + 10 mg MDT) ont montré une augmentation plus rapide de la probabilité de contact dans les deux premières minutes par rapport au contrôle et au traitement 10 mg PHER + 100 mg MDT (*Figure 18*). Cependant, le test de log-rank n'a pas mis en évidence de différence significative entre les concentrations au niveau du temps nécessaire aux 120 punaises testées pour atteindre le piège.

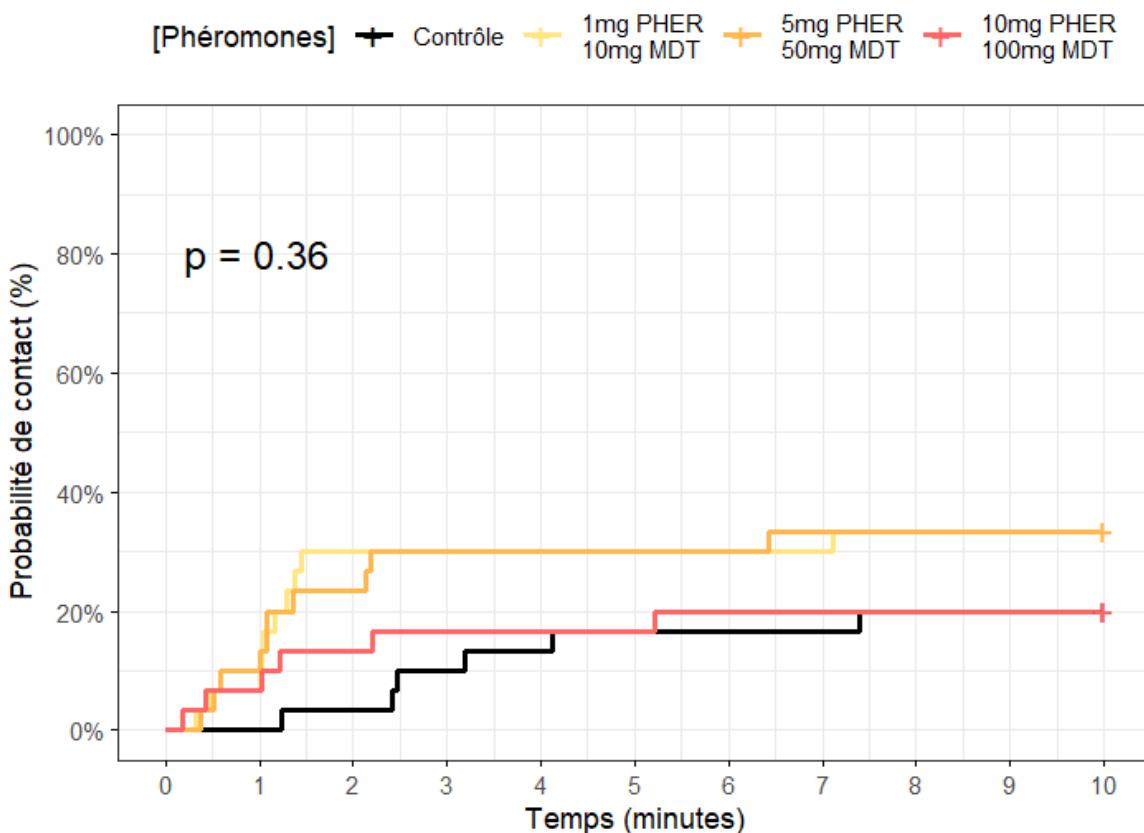


Figure 18. Courbes de Kaplan-Meier de la probabilité de contact avec le piège en fonction du temps pour les différentes concentrations de la phéromone d'agrégation de *H. halys* (PHER) et de son synergiste (MDT). $N = 30$ punaises par concentration.

Le résultat du test du Khi carré d'indépendance a démontré que l'attractivité ne diffère pas significativement en fonction de la quantité de phéromones à l'intérieur du piège ($\chi^2 = 2.727$; $ddl = 3$; $p = 0.436$). Aucune des concentrations de phéromones testées n'a induit un taux de contact avec le piège supérieur à 40 % (Figure 19). Sur un total de 120 punaises testées, seuls deux individus ont été en contact avec la poudre fongique à l'intérieur du piège : un avec la concentration faible de phéromones (1 mg PHER + 10 mg MDT) et l'autre avec la concentration intermédiaire (5 mg PHER + 50 mg MDT).

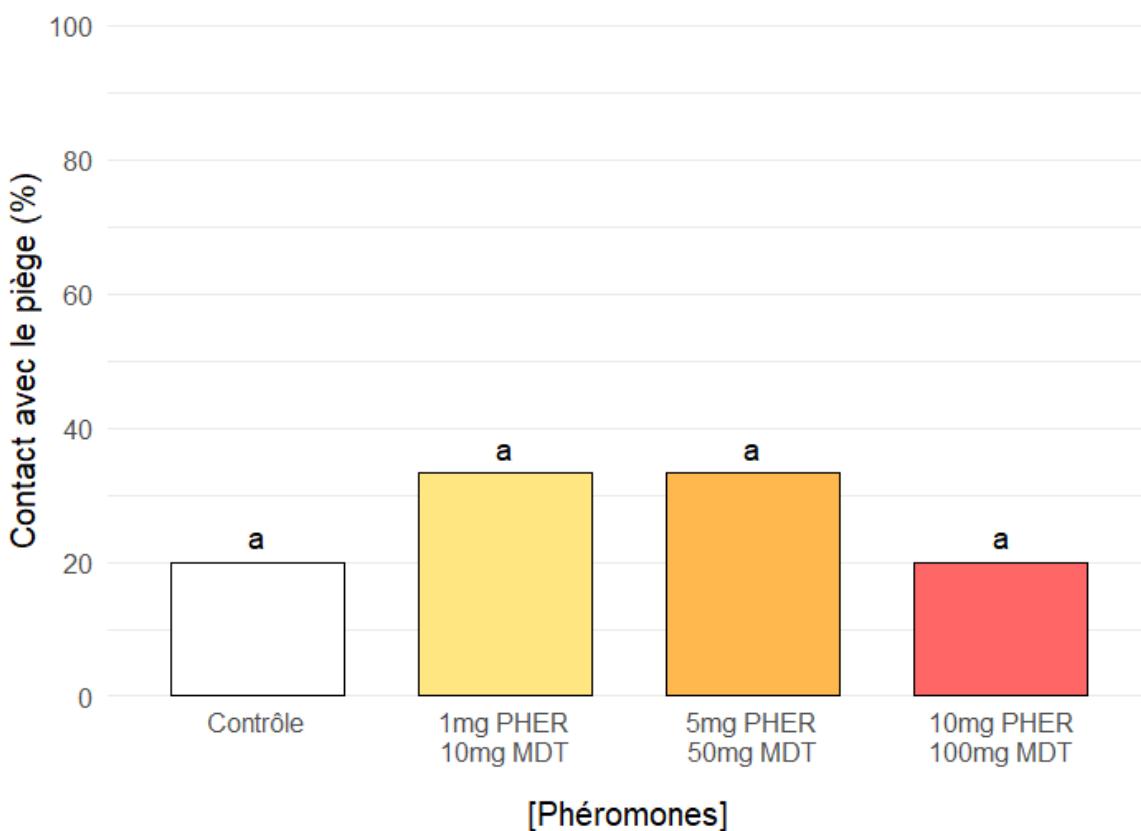


Figure 19. Pourcentage de contact de *H. halys* avec le piège en fonction de la concentration de phéromone d'agrégation de l'espèce (PHER) et de son synergiste (MDT). Les lettres indiquent les groupes statistiquement différents entre les traitements pour chaque méthode. $N = 30$ punaises par concentration.

Discussion

Les souches ARSEF4556 et GHA ont montré leur potentiel à coloniser l'entièreté des tissus de *V. faba*, ce qui confirme les propos de Jaber & Enkerli (2016) sur d'autres souches. Bien qu'une pulvérisation uniforme ait été appliquée sur tous les tissus végétaux, la colonisation des deux souches a été plus importante dans les tiges et les racines que dans les feuilles. Ces résultats vont en faveur d'une affinité naturelle des CEP endophytes vis-à-vis de certains tissus végétaux. Ils doivent néanmoins être interprétés avec prudence compte tenu du faible nombre de répétitions réalisées. Conformément à son adaptation à la rhizosphère (Hu & St. Leger, 2002 ; St. Leger, 2008), la souche ARSEF4556 a montré un haut taux de colonisation des racines. Cependant, la présence élevée de la souche ARSEF4556 au sein des tiges va à l'encontre de ce qui est décrit dans la littérature. En effet, les expériences en conditions contrôlées ou naturelles ont surtout observé une localisation restreinte du genre *Metarhizium* au sein des racines (Behie et al., 2015 ; Clifton et al., 2018). La pulvérisation globale appliquée sur les plantes de *V. faba* pourrait être responsable d'une colonisation transitoire de l'intégralité de ses tissus végétaux (Resquín-Romero et al., 2016). *B. bassiana* a déjà démontré sa capacité à coloniser l'ensemble des tissus végétaux grâce à la colonisation du liquide apoplasmique des plantes hôtes, mais de manière hétérogène et variable selon les hôtes (Akutse et al., 2013 ; Biswas et al., 2012). Les résultats du test d'endophytisme de ceux de Jaber & Enkerli (2016) concordent en effet pour une préférence de *B. bassiana* pour les tiges de *V. faba*. Le test d'endophytisme a donc permis de confirmer la présence des deux souches dans la plante hôte lors des essais biologiques, tout en mettant en évidence leur affinité tissulaire et en soulignant l'influence du mode d'inoculation sur le schéma de colonisation.

Lors des essais biologiques, la survie des punaises dépendait à la fois de la méthode d'application et du traitement associé. Par exemple, les méthodes d'application directes (pulvérisation et trempage) ont entraîné une mortalité nettement plus élevée que l'endophytisme. La contribution de facteurs de stress expérimentaux aux taux de mortalité ne peut pas être exclue à cause de l'absence de quantification de la sporulation sur les cadavres (Lugendo et al., 2025). En parallèle, les résultats ont également confirmé l'hypothèse d'un effet négatif des souches fongiques sur la survie de *H. halys*. Leur impact est resté limité lorsqu'ils étaient présents dans les tissus végétaux. Le mode d'action des CEP endophytes ne semble pas passer par l'infection directe des ravageurs, comme en témoigne l'absence de momies dans la littérature après ingestion de tissus colonisés (Jaber & Ownley, 2018). Leur effet proviendrait

plutôt de l'induction des défenses de la plante ou de la production de métabolites fongiques (Lopez & Sword, 2015 ; Ríos-Moreno et al., 2016). Le protocole utilisé n'a cependant pas permis d'évaluer d'autres paramètres biologiques affectés par les CEP endophytes chez d'autres ravageurs dans des travaux antérieurs (Panwar & Szczepaniec, 2024). Par exemple, la présence endophytique de *B. bassiana* et *M. brunneum* a induit une diminution de la fécondité chez *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Jaber & Araj, 2018). Les effets des CEP endophytes varient donc entre chaque interaction tri-trophique plante-insecte-endophyte (Panwar & Szczepaniec, 2024). Les méthodes d'application par pulvérisation et par trempage n'ont pas montré de différence d'efficacité pour les différents traitements fongiques. Cette observation est surprenante car l'immersion totale des insectes lors du trempage devait théoriquement garantir un contact plus important avec la cuticule que pour la pulvérisation. L'action rapide et la létalité de ARSEF4556 en font la souche la plus virulente lorsqu'elle est appliquée directement sur l'insecte. Les taux de mortalité obtenus sont cohérents avec ceux rapportés par Resquín-Romero et al. (2020) sur les nymphes d'*Euschistus heros* (Fabricius, 1798), une autre espèce de Pentatomidae. Cela semble confirmer la pertinence de l'utilisation de la souche ARSEF4556 contre les punaises ravageuses. Les résultats obtenus avec *B. bassiana* restent aussi prometteurs et confirment la vulnérabilité de l'espèce face à la souche GHA. Ces propos sont appuyés par le travail de Parker et al. (2015) qui ont observé une mortalité des nymphes de la punaise marbrée de 100 % en 12 jours avec cette même poudre. L'ensemble de ces données justifie le choix d'intégrer le BotaniGard® 22WP comme composante létale dans le piège de type attract-and-infect.

L'analyse des protéines extraites lors de l'infection de *H. halys* n'a pas permis d'identifier l'expression et la séquence de chitinases chez *B. bassiana* et *M. brunneum*. Malgré la mise en place de deux méthodes distinctes d'extraction, aucune identification n'a pu être obtenue. Les limites du protocole observées reflètent le caractère pionnier de cette analyse des chitinases de CEP chez *H. halys*. Cependant, l'approche sans sonication a semblé être la plus adaptée car les échantillons obtenus présentaient une qualité nettement supérieure. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer l'absence de résultats. Pour commencer, le nombre d'insectes par échantillon pourrait ne pas être suffisant pour détecter efficacement les protéines fongiques lors de l'analyse. Swaney et al. (2010) ont aussi démontré que la digestion par la trypsine pouvait générer des peptides de taille insuffisante pour une détection optimale par spectrométrie de masse. Enfin, le pouvoir solubilisant du TD50 pourrait ne pas avoir été suffisant pour rompre efficacement les interactions entre la surface de la cuticule et les chitinases fongiques. Ce

constat s'appuie sur les propriétés d'adhésion démontrées chez d'autres protéines nécessaires durant l'infection. Par exemple, les hydrophobines de *B. bassiana* et *Metarhizium* spp. forment des liaisons hydrophobes stables avec la couche lipidique externe de la cuticule des hôtes (Pedrini et al., 2007).

L'évaluation de l'attractivité du piège attract-and-infect n'a mis en évidence qu'une réponse limitée de *H. halys* aux différentes concentrations de phéromones testées. Les doses faibles et intermédiaires (1 mg PHER + 10 mg MDT et 5 mg PHER + 50 mg MDT) ont semblé accélérer légèrement la probabilité de contact au cours des premières minutes d'observation. En revanche, aucun effet significatif n'a été observé sur le nombre total de punaises ayant atteint le dispositif ou la poudre fongique en son sein. Ces résultats n'ont donc pas permis de valider l'hypothèse de l'influence des concentrations de PHER et MDT sur l'attractivité du piège. Plusieurs études menées sur le terrain ont pourtant montré que l'augmentation de la dose de phéromones est généralement corrélée à un nombre plus élevé de punaises diaboliques piégées (Acebes-Doria et al., 2018 ; Weber et al., 2020). La différence au niveau des résultats pourrait provenir de l'utilisation de ceurre solide en milieu contrôlé. L'efficacité du leurre PHEROCON® BMSB Dual pour la capture de *H. halys* a été démontrée à de nombreuses reprises sur le terrain (Acebes-Doria et al., 2020 ; Bosco et al., 2020). Cependant, comme la répartition des phéromones dans ce leurre n'est pas connue, le fait de le découper en morceaux afin de moduler les concentrations a probablement entraîné une libération inégale ou imprévisible des substances attractives. Les différentes quantités de leurre testées ont potentiellement pu être excessives, au point d'en saturer l'espace et de désorienter les punaises. Le manque d'information sur la véritable concentration des phéromones expliquerait alors l'homogénéité des résultats. La position du leurre à l'intérieur du piège, placé dans un tube Eppendorf perforé, a aussi pu limiter la diffusion des phéromones et ainsi réduire la probabilité de contact entre les insectes et la poudre fongique. Cette hypothèse est étayée par les travaux de Rice et al. (2018) qui ont prouvé que le positionnement externe du leurre sur les pièges pyramidaux augmentait significativement les captures en vergers. L'éventualité d'un effet répulsif de la poudre fongique sur *H. halys* ne peut être exclue. Les résultats négatifs obtenus lors de cette expérience semblent donc davantage liés à des limites techniques qu'à une inefficacité des attractifs.

Conclusion et perspectives

Les expériences menées dans ce travail permettent de conclure que *B. bassiana* et *M. brunneum* possèdent chacun un potentiel élevé en tant que mycoinsecticides contre *H. halys*, bien que leur virulence soit étroitement liée à la méthode d'application. Les applications directes de ces deux CEP sont à privilégier sur l'endophytisme qui a démontré ses limites chez *V. faba*. Puisque la souche ARSEF4556 s'est imposée comme la plus prometteuse, son développement en tant que mycoinsecticide pourrait constituer un tournant dans la lutte contre la punaise diabolique.

Étant donné que la colonisation endophytique de *V. faba* par les souches ARSEF4556 et GHA s'est avérée possible dans l'ensemble des tissus, il serait intéressant d'approfondir les recherches sur cette interaction tri-trophique pour identifier les effets potentiels des CEP endophytes sur la punaise diabolique et la plante hôte.

L'analyse pionnière non concluante des chitinases a mis en évidence des défis méthodologiques majeurs, comme lors de l'extraction des protéines fongiques. La révision du protocole, par exemple avec l'ajout de SDS pour une solubilisation accrue des protéines, pourrait amener à une meilleure compréhension des mécanismes infectieux de la punaise diabolique par ces CEP.

Le piège d'autodissémination constitue une application des CEP théoriquement prometteuse au vu de leur virulence sur *H. halys*, mais son attractivité n'a pas été démontrée dans le cadre de cette étude. Avant toute expérimentation en conditions naturelles, les futures recherches sont invitées à réévaluer le principe du piège de type attract-&-infect en laboratoire en revoyant la composante "attract" pour améliorer sa performance. Il serait ensuite intéressant de tester la virulence de la composante "infect" par contact direct et transmission horizontale.

Ainsi, ce mémoire apporte des preuves de l'existence d'agents de biocontrôle performants contre *H. halys*. De plus, il contribue plus largement à une meilleure compréhension des modalités d'action des CEP en posant les bases nécessaires à leur déploiement optimisé en milieu agricole.

Bibliographie

- Abram, P. K., Hoelmer, K. A., Acebes-Doria, A., Andrews, H., Beers, E. H., Bergh, J. C., Bessin, R., Biddinger, D., Botch, P., Buffington, M. L., Cornelius, M. L., Costi, E., Delfosse, E. S., Dieckhoff, C., Dobson, R., Donais, Z., Grieshop, M., Hamilton, G., Haye, T., ... Wiman, N. G. (2017). Indigenous arthropod natural enemies of the invasive brown marmorated stink bug in North America and Europe. In *Journal of Pest Science* (Vol. 90, Numéro 4, p. 1009-1020). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0891-7>
- Acebes-Doria, A. L., Agnello, A. M., Alston, D. G., Andrews, H., Beers, E. H., Bergh, J. C., Bessin, R., Blaauw, B. R., Buntin, G. D., Burkness, E. C., Chen, S., Cottrell, T. E., Daane, K. M., Fann, L. E., Fleischer, S. J., Guédot, C., Gut, L. J., Hamilton, G. C., Hilton, R., ... Leskey, T. C. (2020). Season-long monitoring of the brown marmorated stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) throughout the United States using commercially available traps and lures. *Journal of Economic Entomology*, 113(1), 159-171. <https://doi.org/10.1093/jee/toz240>
- Acebes-Doria, A. L., Leskey, T. C., & Bergh, J. C. (2016). Host plant effects on *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) nymphal development and survivorship. *Environmental Entomology*, 45(3), 663-670. <https://doi.org/10.1093/ee/nvw018>
- Acebes-Doria, A. L., Morrison, W. R., Short, B. D., Rice, K. B., Bush, H. G., Kuhar, T. P., Duthie, C., & Leskey, T. C. (2018). Monitoring and biosurveillance tools for the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae). *Insects*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/insects9030082>
- Afonin, A. N., & Musolin, D. L. (2024). The Potential of Distribution of the Brown Marmorated Stink Bug *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae) in Europe Determined on the Basis of the Comparative Analysis of the Ecogeographical Borders of Its Range. *Russian Journal of Biological Invasions*, 15(1), 11-25. <https://doi.org/10.1134/S207511172401003X>
- Akutse, K. S., Maniania, N. K., Fiaboe, K. K. M., Van den Berg, J., & Ekesi, S. (2013). Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life-history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Fungal Ecology*, 6(4), 293-301. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.01.003>

Aldrich, J. R., Khrimian, A., & Camp, M. J. (2007). Methyl 2,4,6-decatrienoates attract stink bugs and tachinid parasitoids. *Journal of Chemical Ecology*, 33(4), 801-815. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9270-9>

Amin, M. A., & Nahin, S. (2024). A case of Halyomorpha halys-related dermatitis. *JEADV Clinical Practice*. <https://doi.org/10.1002/jvc2.499>

Araújo, J. P. M., & Hughes, D. P. (2016). *Diversity of Entomopathogenic Fungi* (p. 1-39). <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.001>

Arnold, K. (2009). Halyomorpha halys (Stål, 1855), eine für die europäische Fauna neu nachgewiesene Wanzenart (Insecta: Heteroptera: Pentatomidae: Cappaeini). *Mitteilungen des Thüringer Entomologen Verbandes e.V.*, 16.

Avila, G. A., & Charles, J. G. (2018). Modelling the potential geographic distribution of *Trissolcus japonicus*: a biological control agent of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*. *BioControl*, 63(4), 505-518. <https://doi.org/10.1007/s10526-018-9866-8>

Aw, K. M. S., & Hue, S. M. (2017). Mode of infection of *metarhizium* spp. Fungus and their potential as biological control agents. In *Journal of Fungi* (Vol. 3, Numéro 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jof3020030>

Bakken, A. J., Schoof, S. C., Bickerton, M., Kamminga, K. L., Jenrette, J. C., Malone, S., Abney, M. A., Herbert, D. A., Reisig, D., Kuhar, T. P., & Walgenbach, J. F. (2015). Occurrence of brown marmorated stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) on wild hosts in Nonmanaged Woodlands and soybean fields in North Carolina and Virginia. *Environmental Entomology*, 44(4), 1011-1021. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv092>

Bansal, R., Michel, A. P., & Sabree, Z. L. (2014). The crypt-dwelling primary bacterial symbiont of the polyphagous pentatomid pest *halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology*, 43(3), 617-625. <https://doi.org/10.1603/EN13341>

Bariselli, M., Bugiani, R., & Maistrello, L. (2016). Distribution and damage caused by *Halyomorpha halys* in Italy. *EPPO Bulletin*, 46(2), 332-334. <https://doi.org/10.1111/epp.12289>

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1). <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>

- Behie, S. W., Jones, S. J., & Bidochka, M. J. (2015). Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology*, 13, 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.08.001>
- Bergh, C. (s.d.). Dégâts de la punaise marbrée sur une pomme [Photographie]. Université d'État de l'Utah. <https://extension.usu.edu/planthealth/invasives/invasive/>
- Berteloot, O. H., Kuhn, A., Peusens, G., Beliën, T., Hautier, L., Van Leeuwen, T., & De Clercq, P. (2024). Distribution and genetic diversity of the invasive pest *Halyomorpha halys* (Hemiptera, Pentatomidae) in Belgium. *NeoBiota*, 90, 123-138. <https://doi.org/10.3897/neobiota.90.113421>
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530. <https://doi.org/10.3852/07-202>
- Biswas, C., Dey, P., Satpathy, S., & Satya, P. (2012). Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as a season long endophyte in jute (*Corchorus olitorius*) and its rapid detection using SCAR marker. *BioControl*, 57(4), 565-571. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9424-0>
- Blaauw, B. R., Polk, D., & Nielsen, A. L. (2015). IPM-CPR for peaches: Incorporating behaviorally-based methods to manage *Halyomorpha halys* and key pests in peach. *Pest Management Science*, 71(11), 1513-1522. <https://doi.org/10.1002/ps.3955>
- Bosco, L., Nardelli, M., & Tavella, L. (2020). First insights on early host plants and dispersal behavior of *halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) from overwintering to crop colonization. *Insects*, 11(12), 1-21. <https://doi.org/10.3390/insects11120866>
- Bioplanet. (s.d.). Savoir reconnaître la punaise diabolique [Image]. Insectes Utiles. <https://www.insectesutiles.fr/42-punaises-diaboliques>
- Bradshaw, C. J. A., Leroy, B., Bellard, C., Roiz, D., Albert, C., Fournier, A., Barbet-Massin, M., Salles, J. M., Simard, F., & Courchamp, F. (2016). Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12986>
- Bulgarini, G., Badra, Z., Leonardi, S., & Maistrello, L. (2021). Predatory ability of generalist predators on eggs, young nymphs and adults of the invasive *Halyomorpha halys* in

southern Europe. *BioControl*, 66(3), 355-366. <https://doi.org/10.1007/s10526-020-10066-3>

Bulgarini, G., Castracani, C., Mori, A., Grasso, D. A., & Maistrello, L. (2021). Searching for new predators of the invasive *Halyomorpha halys*: the role of the black garden ant *Lasius niger*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(9), 799-806. <https://doi.org/10.1111/eea.13075>

Burjanadze, M., Gorgadze, O., De Luca, F., Troccoli, A., Lortkipanidze, M., Kharabadze, N., Arjevanidze, M., Fanelli, E., & Tarasco, E. (2020). Potential of native entomopathogenic nematodes for the control of brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* in Georgia. *Biocontrol Science and Technology*, 30(9), 962-974. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1776217>

CABI Compendium (2024). *Halyomorpha halys* distribution map [Illustration]. CABI Compendium. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.1079/cabicompendium.27377>

Carnio, V., Favaro, R., Preti, M., & Angeli, S. (2024). Impact of Aggregation Pheromone Traps on Spatial Distribution of *Halyomorpha halys* Damage in Apple Orchards. *Insects*, 15(10). <https://doi.org/10.3390/insects15100791>

Chierici, E., Marchetti, E., Poccia, A., Russo, A., Giannuzzi, V. A., Governatori, L., Zucchi, L., Rondoni, G., & Conti, E. (2025). Laboratory and field efficacy of natural products against the invasive pest *Halyomorpha halys* and side effects on the biocontrol agent *Trissolcus japonicus*. *Scientific reports*, 15(1), 4622. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-87325-9>

Claerebout, S., Haye, T., Ólafsson, E., Pannier, É., & Bultot, J. (2018). *Premières occurrences de Halyomorpha halys (Stål, 1855) pour la Belgique et actualisation de sa répartition en Europe*.

Clarke, D. A., & McGeoch, M. A. (2023). Invasive alien insects represent a clear but variable threat to biodiversity. *Current Research in Insect Science*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.cris.2023.100065>

Clifton, E. H., Jaronski, S. T., Coates, B. S., Hodgson, E. W., & Gassmann, A. J. (2018). Effects of endophytic entomopathogenic fungi on soybean aphid and identification of *Metarhizium* isolates from agricultural fields. *PLoS ONE*, 13(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194815>

Costi, E., Haye, T., & Maistrello, L. (2017). Biological parameters of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*, in southern Europe. *Journal of Pest Science*, 90(4), 1059-1067. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0899-z>

Daraban, G. M., Hlihor, R. M., & Suteu, D. (2023). Pesticides vs. Biopesticides: From Pest Management to Toxicity and Impacts on the Environment and Human Health. In *Toxics* (Vol. 11, Numéro 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/toxics11120983>

De Faria, M. R. de, & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237-256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>

Dessauvages, K., Scheifler, M., Francis, F., & Ben Fekih, I. (2024). A New Isolate Beauveria bassiana GxABT-1: Efficacy against *Myzus persicae* and Promising Impact on the Beet Mild Yellow Virus-Aphid Association. *Insects*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/insects15090697>

Dinno, A. (2014). *dunn.test*: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. In *CRAN: Contributed Packages*. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.dunn.test>

Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. H. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104(2), 134-150. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001756>

Duthie, C., Tana, M., Stephenson, B., Yamoah, E., & McDonald, B. (2012). *Risk analysis of Halyomorpha halys (brown marmorated stink bug) on all pathways*. <http://www.mpi.govt.nz/news-resources/publications.aspx>

Eschen, R., Roques, A., & Santini, A. (2015). Taxonomic dissimilarity in patterns of interception and establishment of alien arthropods, nematodes and pathogens affecting woody plants in Europe. *Diversity and Distributions*, 21(1), 36-45. <https://doi.org/10.1111/ddi.12267>

Forero, D. (2008). The systematics of the Hemiptera. *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1), 1-21. <https://doi.org/10.25100/socolen.v34i1.9244>

Funayama, K. (2008). Seasonal fluctuations and physiological status of *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae) adults captured in traps baited with synthetic

aggregation pheromone of *Plautia crossota stali* Scott (Heteroptera: Pentatomidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 52(2), 69-75. <https://doi.org/10.1303/jjaez.2008.69>

Gariepy, T. D., Bruin, A., Haye, T., Milonas, P., & Vétek, G. (2015). Occurrence and genetic diversity of new populations of *Halyomorpha halys* in Europe. *Journal of Pest Science*, 88(3), 451-460. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0672-0>

Gariepy, T. D., Haye, T., Fraser, H., & Zhang, J. (2014). Occurrence, genetic diversity, and potential pathways of entry of *Halyomorpha halys* in newly invaded areas of Canada and Switzerland. *Journal of Pest Science*, 87(1), 17-28. <https://doi.org/10.1007/s10340-013-0529-3>

Grazia, J., Panizzi, A. R., Greve, C., Schwertner, C. F., Campos, L. A., Garbelotto, T. de A., & Fernandes, J. A. M. (2015). Stink bugs (Pentatomidae). In *True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics* (p. 681-756). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9861-7_22

Hai, W. (2011). Liquid culturing of microsclerotia of *Beauveria bassiana*, an entomopathgeonic fungus to control western flower thrip, *Frankliniella occidentalis*. *Chinese Bulletin of Entomology*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:86979519>

Harris, C., Abubeker, S., Yu, M., Leskey, T., & Zhang, A. (2015). Semiochemical production and laboratory behavior response of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha Halys*. *PLoS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140876>

Haye, T., Abdallah, S., Gariepy, T., & Wyniger, D. (2014). Phenology, life table analysis and temperature requirements of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*, in Europe. *Journal of Pest Science*, 87(3), 407-418. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0560-z>

Haye, T., Moraglio, S. T., Stahl, J., Visentin, S., Gregorio, T., & Tavella, L. (2020). Fundamental host range of *Trissolcus japonicus* in Europe. *Journal of Pest Science*, 93(1), 171-182. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01127-3>

Haye, T., Wyniger, D., & Gariepy, T. (2014). *Recent range expansion of brown marmorated stink bug in Europe*. <https://doi.org/https://www.researchgate.net/deref/https%3A%2F%2Fdoi.org%2F10.1007%2Fs10340-013-0529-7>

3?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIiwicGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIiwicHJldmlvdXNQYWdlIjoicHVibGljYXRpb24iLCJwb3NpdGlvbiI6InBhZ2VDb250ZW50In19

Hoebeke, E. R., & Carter, M. E. (2003). *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae): a polyphagous plant pest from Asia newly detected in North America. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 105(1), 225-237. <http://europepmc.org/abstract/AGR/IND23315077>

Hoffman, W. E. (1933). A pentatomid pest of growing beans in South China. *Peking Nat. His. Bull*, 5, 25-27.

Hu, G., & St. Leger, R. J. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6383-6387. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6383-6387.2002>

Hu, X., Xiao, G., Zheng, P., Shang, Y., Su, Y., Zhang, X., Liu, X., Zhan, S., St. Leger, R. J., & Wang, C. (2014). Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(47), 16796-16801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412662111>

Hulme, P. E. (2021). Unwelcome exchange: International trade as a direct and indirect driver of biological invasions worldwide. In *One Earth* (Vol. 4, Numéro 5, p. 666-679). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2021.04.015>

Ioannidis, P., Lu, Y., Kumar, N., Creasy, T., Daugherty, S., Chibucos, M. C., Orvis, J., Shetty, A., Ott, S., Flowers, M., Sengamalay, N., Tallon, L. J., Pick, L., & Hotopp, J. C. D. (2014). Rapid transcriptome sequencing of an invasive pest, the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys*. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-738>

Jaber, L. R., & Araj, S. E. (2018). Interactions among endophytic fungal entomopathogens (Ascomycota: Hypocreales), the green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae), and the aphid endoparasitoid *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*, 116, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.005>

- Jaber, L. R., & Enkerli, J. (2016). Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. *Biological Control*, 103, 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.008>
- Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? In *Biological Control* (Vol. 116, p. 36-45). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>
- James, R. R., & Li, Z. (2012). From Silkworms to Bees: Diseases of Beneficial Insects. In *Insect Pathology, Second Edition* (p. 425-459). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00012-9>
- Jaronski, S. T. (2013). Mass Production of Entomopathogenic Fungi: State of the Art. In *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens* (p. 357-413). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391453-8.00011-X>
- Jones, A. L., Jennings, D. E., Hooks, C. R. R., & Shrewsbury, P. M. (2014). Sentinel eggs underestimate rates of parasitism of the exotic brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*. *Biological Control*, 78, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.07.011>
- Khan, F. (2022). Life cycle of brown marmorated stink bug [Illustration]. UGA Cooperative Extension. https://secure.caes.uga.edu/extension/publications/files/pdf/C%201248_1.PDF
- Jones, J. R., & Lambdin, P. L. (2009). New county and state records for Tennessee of an exotic pest, *Halyomorpha halys* (hemiptera: Pentatomidae), with potential economic and ecological implications. *Florida Entomologist*, 92(1), 177-178. <https://doi.org/10.1653/024.092.0132>
- Kassambara, A., Kosinski, M., & Biecek, P. (2016). survminer: Drawing Survival Curves using « ggplot2 ». In CRAN: Contributed Packages. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.survminer>
- Khrimian, A., Zhang, A., Weber, D. C., Ho, H. Y., Aldrich, J. R., Vermillion, K. E., Siegler, M. A., Shirali, S., Guzman, F., & Leskey, T. C. (2014). Discovery of the aggregation pheromone of the brown marmorated stink bug (*Halyomorpha halys*) through the creation of stereoisomeric libraries of 1-bisabolen-3-ols. *Journal of Natural Products*, 77(7), 1708-1717. <https://doi.org/10.1021/np5003753>

Kriticos, D. J., Kean, J. M., Phillips, C. B., Senay, S. D., Acosta, H., & Haye, T. (2017). The potential global distribution of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*, a critical threat to plant biosecurity. *Journal of Pest Science*, 90(4), 1033-1043. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0869-5>

Kuhar, T. P., & Kamminga, K. (2017). Review of the chemical control research on *Halyomorpha halys* in the USA. In *Journal of Pest Science* (Vol. 90, Numéro 4, p. 1021-1031). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0859-7>

Lacey, L. A., & Shapiro-Ilan, D. I. (2008). Microbial control of insect pests in temperate orchard systems: Potential for incorporation into IPM. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 53, p. 121-144). <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093419>

Lee, D. H. (2015). Current status of research progress on the biology and management of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) as an invasive species. In *Applied Entomology and Zoology* (Vol. 50, Numéro 3, p. 277-290). Springer-Verlag Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s13355-015-0350-y>

Lee, D. H., & Leskey, T. C. (2015). Flight behavior of foraging and overwintering brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Bulletin of Entomological Research*, 105(5), 566-573. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000462>

Lee, D. H., Short, B. D., Joseph, S. V, Bergh, J. C., & Leskey, T. C. (2013). Review of the biology, ecology, and management of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in China, Japan, and the Republic of Korea. In *Environmental Entomology* (Vol. 42, Numéro 4, p. 627-641). <https://doi.org/10.1603/EN13006>

Lee, D. H., Wright, S. E., & Leskey, T. C. (2013). Impact of insecticide residue exposure on the invasive pest, *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae): Analysis of adult mobility. *Journal of Economic Entomology*, 106(1), 150-158. <https://doi.org/10.1603/EC12265>

Lee, D.-H., Short, B. D., Nielsen, A. L., & Leskey, T. C. (2014). Impact of Organic Insecticides on the Survivorship and Mobility of *Halyomorpha halys*(Stål) (Hemiptera : Pentatomidae) in the Laboratory. In *Source: The Florida Entomologist* (Vol. 97, Numéro 2). <https://about.jstor.org/terms>

Lenth, R. V. (2017). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. In *CRAN: Contributed Packages*. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.emmeans>

Leskey, T. C., Hamilton, G. C., Nielsen, A. L., Polk, D. F., Rodriguez-Saona, C., Christopher Bergh, J., Ames Herbert, D., Kuhar, T. P., Pfeiffer, D., Dively, G. P., Hooks, C. R. R., Raupp, M. J., Shrewsbury, P. M., Krawczyk, G., Shearer, P. W., Whalen, J., Koplinka-Loehr, C., Myers, E., Inkley, D., ... Wright, S. E. (2012). Pest status of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* in the USA. *Outlooks on Pest Management*, 23(5), 218-226. <https://doi.org/10.1564/23oct07>

Leskey, T. C., Lee, D. H., Short, B. D., & Wright, S. E. (2012). Impact of insecticides on the invasive *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae): Analysis of insecticide lethality. *Journal of Economic Entomology*, 105(5), 1726-1735. <https://doi.org/10.1603/EC12096>

Leskey, T. C., & Nielsen, A. L. (2018). Impact of the Invasive Brown Marmorated Stink Bug in North America and Europe: History, Biology, Ecology, and Management. *Annual Review of Entomology*, 63(1), 599-618. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043226>

Leskey, T. C., Short, B. D., Butler, B. R., & Wright, S. E. (2012). Impact of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål), in mid-Atlantic tree fruit orchards in the United States: Case studies of commercial management. *Psyche (London)*. <https://doi.org/10.1155/2012/535062>

Leskey, T. C., Wright, S. E., Short, B. D., & Khrimian, A. (2012). Development of behaviorally-based monitoring tools for the brown marmorated stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) in commercial tree fruit orchards. *Journal of Entomological Science*, 47(1), 76-85. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-47.1.76>

Li, Z., Li, C., Huang, B., & Meizhen, F. (2001). *Discovery and demonstration of the teleomorph of Beauveria bassiana (Bals.) Vuill., an important entomogenous fun-gus*.

Litwin, A., Nowak, M., & Różalska, S. (2020). Entomopathogenic fungi: unconventional applications. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 19, Numéro 1, p. 23-42). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>

Lopes, R. B., Laumann, R. A., Moore, D., Oliveira, M. W. M., & Faria, M. (2014). Combination of the fungus *Beauveria bassiana* and pheromone in an attract-and-kill strategy against the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 151(1), 75-85. <https://doi.org/10.1111/eea.12171>

- Lopez, D. C., & Sword, G. A. (2015). The endophytic fungal entomopathogens Beauveria bassiana and Purpureocillium lilacinum enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, 89, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.010>
- Lovett, B., & St. Leger, R. J. (2017). The Insect Pathogens. *Microbiology Spectrum*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0001-2016>
- Lugendo, A. R., Ben Fekih, I., Caparros Megido, R., Pierreux, J., Francis, F., & Segers, A. (2025). Efficacy of Entomopathogenic Fungi Against *Bruchus rufimanus* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Laboratory and Field Trials Using Dropleg Spraying Technique. *Agriculture (Switzerland)*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/agriculture15040376>
- Martinson, H. M., Venugopal, P. D., Bergmann, E. J., Shrewsbury, P. M., & Raupp, M. J. (2015). Fruit availability influences the seasonal abundance of invasive stink bugs in ornamental tree nurseries. *Journal of Pest Science*, 88(3), 461-468. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0677-8>
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of Beauveria bassiana as a microbial insecticide. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 32, Numéro 11). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- Medal, J., Smith, T., & Cruz, A. S. (2013). Biology of the brown marmorated stink bug *halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae) in the laboratory. *Florida Entomologist*, 96(3), 1209-1212. <https://doi.org/10.1653/024.096.0370>
- Mohekar, P., Osborne, J., Wiman, N. G., Walton, V., & Tomasino, E. (2017). Influence of winemaking processing steps on the amounts of (E)-2-decenal and tridecane as off-odorants caused by brown marmorated stink bug (*Halyomorpha halys*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 872-878. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04268>
- Morehead, J. A., & Kuhar, T. P. (2017). Efficacy of organically approved insecticides against brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* and other stink bugs. *Journal of Pest Science*, 90(4), 1277-1285. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0879-3>
- Morrison, W. R., Allen, M., & Leskey, T. C. (2018). Behavioural response of the invasive *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) to host plant stimuli augmented with

semiochemicals in the field. *Agricultural and Forest Entomology*, 20(1), 62-72. <https://doi.org/10.1111/afe.12229>

Morrison, W. R., Blaauw, B. R., Short, B. D., Nielsen, A. L., Bergh, J. C., Krawczyk, G., Park, Y. L., Butler, B., Khrimian, A., & Leskey, T. C. (2019). Successful management of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in commercial apple orchards with an attract-and-kill strategy. *Pest Management Science*, 75(1), 104-114. <https://doi.org/10.1002/ps.5156>

Morrison, W. R., Park, C. G., Seo, B. Y., Park, Y. L., Kim, H. G., Rice, K. B., Lee, D. H., & Leskey, T. C. (2017). Attraction of the invasive *Halyomorpha halys* in its native Asian range to traps baited with semiochemical stimuli. *Journal of Pest Science*, 90(4), 1205-1217. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0816-x>

Nielsen, A. L., & Hamilton, G. C. (2009). Seasonal Occurrence and Impact of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in Tree Fruit. In *J. Econ. Entomol* (Vol. 102, Numéro 3). <https://academic.oup.com/jee/article/102/3/1133/2199185>

Nielsen, A. L., Hamilton, G. C., & Matadha, D. (2008). Developmental rate estimation and life table analysis for *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology*, 37(2), 348-355. [https://doi.org/10.1603/0046-225X\(2008\)37\[348:DREALT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2008)37[348:DREALT]2.0.CO;2)

Nielsen, A. L., Holmstrom, K., Hamilton, G. C., Cambridge, J., & Ingerson-Mahar, J. (2013). Use of black light traps to monitor the abundance, spread, and flight behavior of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Economic Entomology*, 106(3), 1495-1502. <https://doi.org/10.1603/EC12472>

Noël, G., Segers, A., Carpentier, J., Rossini, L., Garone, E., & Francis, F. (2024). An update for *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) (Hemiptera, Pentatomidae) distribution in Belgium. *Biodiversity Data Journal*, 12. <https://doi.org/10.3897/BDJ.12.E125067>

Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2013). Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. In *Insects* (Vol. 4, Numéro 3, p. 357-374). <https://doi.org/10.3390/insects4030357>

Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2016). Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects. *Advances in Genetics*, 94, 165-249. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.003>

- Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., & Keyhani, N. O. (2015). Improving mycoinsecticides for insect biological control. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 99, Numéro 3, p. 1057-1068). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6270-x>
- Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., & Pereira, R. M. (2008). Beauveria bassiana: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 267-270. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.010>
- Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution. *BioControl*, 55(1), 113-128. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9241-x>
- Pajač Živković, I., Mulamehmedović, J., Göldel, B., & Lemić, D. (2022). Sexual dimorphism of brown marmorated stink bug. *Journal of Central European Agriculture*, 23(1), 62-68. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/23.1.3319>
- Panwar, N., & Szczepaniec, A. (2024). Endophytic entomopathogenic fungi as biological control agents of insect pests. In *Pest Management Science* (Vol. 80, Numéro 12, p. 6033-6040). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ps.8322>
- Parker, B. L., Skinner, M., Gouli, S., Gouli, V., & Kim, J. S. (2015). Virulence of BotaniGard® to second instar brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae). *Insects*, 6(2), 319-324. <https://doi.org/10.3390/insects6020319>
- Pedrini, N., Crespo, R., & Juárez, M. P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. In *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* (Vol. 146, Numéros 1-2 SPEC. ISS., p. 124-137). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.003>
- Peterson, H. M., Ray, S., Ali, J. G., & Krawczyk, G. (2022). Feeding and oviposition by the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) induce direct and systemic changes in volatile compound emissions from potted peach and tree of heaven. *Arthropod-Plant Interactions*, 16(2), 227-247. <https://doi.org/10.1007/s11829-022-09893-1>
- Resquín-Romero, G., Cabral-Antúnez, C., Sarubbi-Orue, H., Garrido-Jurado, I., Valverde-García, P., Schade, M., & Butt, T. M. (2020). Virulence of *Metarhizium brunneum* (Ascomycota: Hypocreales) Strains against Stinkbugs *Euschistus heros* and *Dichelops furcatus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Economic Entomology*, 113(5), 2540-2545. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa150>

- Resquín-Romero, G., Garrido-Jurado, I., Delso, C., Ríos-Moreno, A., & Quesada-Moraga, E. (2016). Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 136, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.03.003>
- Rice, K. B., Bergh, C. J., Bergmann, E. J., Biddinger, D. J., Dieckhoff, C., Dively, G., Fraser, H., Gariepy, T., Hamilton, G., Haye, T., Herbert, A., Hoelmer, K., Hooks, C. R., Jones, A., Krawczyk, G., Kuhar, T., Martinson, H., Mitchell, W., Nielsen, A. L., ... Tooker, J. F. (2014). Biology, ecology, and management of brown marmorated stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Integrated Pest Management*, 5(3). <https://doi.org/10.1603/ipm14002>
- Rice, K. B., Morrison, W. R., Short, B. D., Acebes-Doria, A., Bergh, J. C., & Leskey, T. C. (2018). Improved trap designs and retention mechanisms for halyomorpha halys (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Economic Entomology*, 111(5), 2136-2142. <https://doi.org/10.1093/jee/toy185>
- Rider, D. A., Schwertner, C. F., Vilímová, J., Rédei, D., Kment, P., & Thomas, D. B. (2018). Higher Systematics of the Pentatomoidea. In *Invasive Stink Bugs and Related Species (Pentatomoidea)* (p. 25-202). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315371221-2>
- Ríos-Moreno, A., Garrido-Jurado, I., Resquín-Romero, G., Arroyo-Manzanares, N., Arce, L., & Quesada-Moraga, E. (2016). Destruxin A production by Metarhizium brunneum strains during transient endophytic colonisation of Solanum tuberosum. *Biocontrol Science and Technology*, 26(11), 1574-1585. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1223274>
- Rondoni, G., Bertoldi, V., Malek, R., Foti, M. C., Peri, E., Maistrello, L., Haye, T., & Conti, E. (2017). Native egg parasitoids recorded from the invasive Halyomorpha halys successfully exploit volatiles emitted by the plant-herbivore complex. *Journal of Pest Science*, 90(4), 1087-1095. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0861-0>
- Sabbatini-Peverieri, G., Boncompagni, L., Mazza, G., Paoli, F., Dapporto, L., Giovannini, L., Marianelli, L., Hoelmer, K., & Roversi, P. F. (2021). Combining physiological host range, behavior and host characteristics for predictive risk analysis of *Trissolcus japonicus*. *Journal of Pest Science*, 94(3), 1003-1016. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01311-w>
- Sagun, S., Collins, E., Martin, C., Nolan, J., & Horzempa, J. (2016). Alarm Odor Compounds of the Brown Marmorated Stink Bug Exhibit Antibacterial Activity. *Journal of Pharmacognosy & Natural Products*, 2(3). <https://doi.org/10.4172/2472-0992.1000119>

Schaefer, C. W., & Panizzi, A. R. (2000). Stink Bugs (Pentatomidae). In *Heteroptera of Economic Importance* (p. 443-496). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420041859-14>

Seebens, H., Bacher, S., Blackburn, T. M., Capinha, C., Dawson, W., Dullinger, S., Genovesi, P., Hulme, P. E., van Kleunen, M., Kühn, I., Jeschke, J. M., Lenzner, B., Liebhold, A. M., Pattison, Z., Pergl, J., Pyšek, P., Winter, M., & Essl, F. (2021). Projecting the continental accumulation of alien species through to 2050. *Global Change Biology*, 27(5), 970-982. <https://doi.org/10.1111/gcb.15333>

Seebens, H., Blackburn, T. M., Dyer, E. E., Genovesi, P., Hulme, P. E., Jeschke, J. M., Pagad, S., Pyšek, P., Winter, M., Arianoutsou, M., Bacher, S., Blasius, B., Brundu, G., Capinha, C., Celesti-Grapow, L., Dawson, W., Dullinger, S., Fuentes, N., Jäger, H., ... Essl, F. (2017). No saturation in the accumulation of alien species worldwide. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14435>

Skinner, M., Parker, B. L., & Kim, J. S. (2014). Role of Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management. In *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective* (p. 169-191). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00011-7>

St. Leger, R. J. (2008). Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 271-276. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.007>

St. Leger, R. J., Frank, D. C., Roberts, D. W., & Staples, R. C. (1992). Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry*, 204(3), 991-1001. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16721.x>

St Leger, R. J., & Wang, J. B. (2020). *Metarhizium*: Jack of all trades, master of many: Sex and host switching in a fungus. In *Open Biology* (Vol. 10, Numéro 12). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rsob.200307>

Stahl, J., Tortorici, F., Pontini, M., Bon, M. C., Hoelmer, K., Marazzi, C., Tavella, L., & Haye, T. (2019). First discovery of adventive populations of *Trissolcus japonicus* in Europe. *Journal of Pest Science*, 92(2), 371-379. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1061-2>

StopBMSB (2021). Where is BMSB - State-by-State. StopBMSB.org.
<https://www.stopbmsb.org/where-is-bmsb/state-by-state/>

Sugie, H., Yoshida, M., Kawasaki, K., Noguchi, H., Moriya, S., Takagi, K., Fukuda, H., Fujii, A., Yamanaka, M., Ohira, Y., Tsutsumi, T., Tsuda, K., Fukumoto, K., Yamashita, M., & Suzuki, H. (1996). Identification of the Aggregation Pheromone of the Brown-Winged Green Bug, *Plautia stali* SCOTT (Heteroptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology*, 31(3), 427-431. <https://doi.org/10.1303/aez.31.427>

Sung, G.-H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J.-M., Jennifer Luangsa-ard, J., Shrestha, B., Spatafora, J. W., Sung, G., Sung, J., cylindrostromata Liang, O. Z., Liu, A., Liu Sung, M. G., dayiensis Sung, O. G., & dermapterigena Liang, O. Z. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 57, 5-59. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.7.01>

Swaney, D. L., Wenger, C. D., & Coon, J. J. (2010). Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics. *Journal of Proteome Research*, 9(3), 1323-1329. <https://doi.org/10.1021/pr900863u>

Taylor, C. M., Coffey, P. L., DeLay, B. D., & Dively, G. P. (2014). The importance of gut symbionts in the development of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål). *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090312>

Therneau, T. M. (2001). survival: Survival Analysis. In *CRAN: Contributed Packages*. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.survival>

Tillman, P. G., Aldrich, J. R., Khrimian, A., & Cottrell, T. E. (2010). Pheromone attraction and cross-attraction of *nezara*, *acrosternum*, and *euschistus* spp. Stink Bugs (Heteroptera: Pentatomidae) in the field. *Environmental Entomology*, 39(2), 610-617. <https://doi.org/10.1603/EN09114>

Toyama, M., Ihara, F., & Yaginuma, K. (2011). Photo-response of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae), and its role in the hiding behavior. *Applied Entomology and Zoology*, 46(1), 37-40. <https://doi.org/10.1007/s13355-010-0002-1>

Vega, F. E. (2018). The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. In *Mycologia* (Vol. 110, Numéro 1, p. 4-30). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1418578>

- Wan, F. H., & Yang, N. W. (2016). Invasion and Management of Agricultural Alien Insects in China. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 61, p. 77-98). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023916>
- Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., & Gong, M. (2021). The Toxins of Beauveria bassiana and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705343>
- Weber, D. C., Morrison, W. R., Khrimian, A., Rice, K. B., Leskey, T. C., Rodriguez-Saona, C., Nielsen, A. L., & Blaauw, B. R. (2017). Chemical ecology of *Halyomorpha halys*: discoveries and applications. In *Journal of Pest Science* (Vol. 90, Numéro 4, p. 989-1008). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0876-6>
- Weber, D. C., Morrison, W. R., Khrimian, A., Rice, K. B., Short, B. D., Herlihy, M. V., Leskey, T. C., & Nielsen, A. (2020). Attractiveness of Pheromone Components with and Without the Synergist, Methyl (2E,4E,6Z)-2,4,6-Decatrienoate, to Brown Marmorated Stink Bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Economic Entomology*, 113(2), 712-719. <https://doi.org/10.1093/jee/toz312>
- Wermelinger, B., Wyniger, D., & Forster, B. (2008). *First records of an invasive bug in Europe: Halyomorpha halys Stål (Heteroptera: Pentatomidae), a new pest on woody ornamentals and fruit trees?*
- Wiman, N. G., Walton, V. M., Shearer, P. W., Rondon, S. I., & Lee, J. C. (2015). Factors affecting flight capacity of brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Pest Science*, 88(1), 37-47. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0582-6>
- Wong, W. (2024). A samurai wasp lays its own eggs inside BMSB eggs [Photographie]. Invasive Species Council of British Columbia. <https://bcinvasives.ca/news/hunting-for-stink-bug-eggs/>
- Xu, J., Fonseca, D. M., Hamilton, G. C., Hoelmer, K. A., & Nielsen, A. L. (2014). Tracing the origin of US brown marmorated stink bugs, *Halyomorpha halys*. *Biological Invasions*, 16(1), 153-166. <https://doi.org/10.1007/s10530-013-0510-3>
- Yanagi, T., & Hagihara, Y. (1980). Ecology of the brown marmorated stink bug. *Plant Prot*, 34, 315-321.

Yang, Z. Q., Yao, Y. X., Qiu, L. F., & Li, Z. X. (2009). A new species of *Trissolcus* (Hymenoptera: Scelionidae) parasitizing eggs of *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae) in China with comments on its biology. *Annals of the Entomological Society of America*, 102(1), 39-47. <https://doi.org/10.1603/008.102.0104>

Zhang, J., Zhang, F., Gariepy, T., Mason, P., Gillespie, D., Talamas, E., & Haye, T. (2017). Seasonal parasitism and host specificity of *Trissolcus japonicus* in northern China. *Journal of Pest Science*, 90(4), 1127-1141. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0863-y>

Zheng, P., Xia, Y., Zhang, S., & Wang, C. (2013). Genetics of *Cordyceps* and related fungi. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 97, Numéro 7, p. 2797-2804). <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4771-7>

Zhou, Y., Giusti, M. M., Parker, J., Salamanca, J., & Rodriguez-Saona, C. (2016). Frugivory by Brown Marmorated Stink Bug (Hemiptera: Pentatomidae) Alters Blueberry Fruit Chemistry and Preference by Conspecifics. *Environmental Entomology*, 45(5), 1227-1234. <https://doi.org/10.1093/ee/nvw110>

Annexes



Figure 20. Cage d'élevage de *H. halys*



Figure 21. Chambre de comptage de Bürker de la marque Marienfeld Superior™.



Figure 22. Conidies de *B. bassiana* (à gauche) et de *M. brunneum* (à droite) observées sur une chambre de comptage de Bürker.

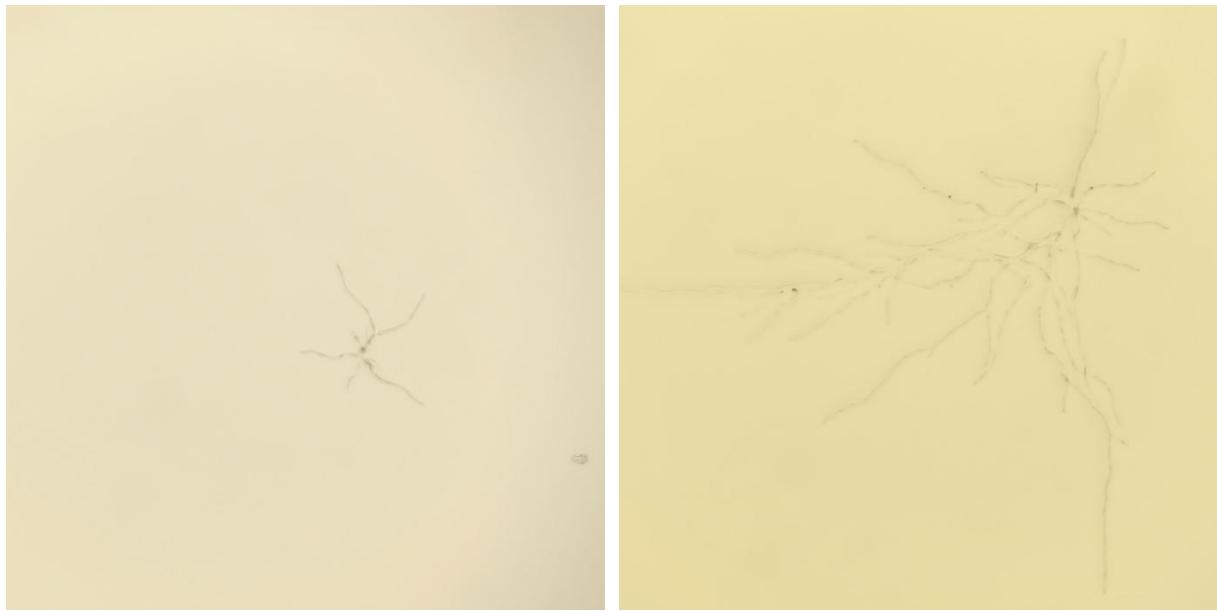


Figure 23. Conidies germées de *B. bassiana* (à gauche) et de *M. brunneum* (à droite), après 1 jour sur milieu SDA.



Figure 24. *V. faba* en phase d'intégration endophytique de CEP.



Figure 25. Développement de la souche ARSEF4556 à 5, 10 et 15 jours pour le test d'endophytisme.



Figure 26. Cage et piège attract-&-infect utilisés lors des essais comportementaux.

Comparaison par paires des Hazard Ratio - Endophytisme

Comparaison	Hazard Ratio (95% IC)	p-valeur	Interprétation
ARSEF4556 vs GHA	1.56 (0.45–5.37)	0.681	Pas de différence significative
ARSEF4556 vs Contrôle	1283905096.55 (0.00–Inf)	1.000	Pas de différence significative
GHA vs Contrôle	825561939.72 (0.00–Inf)	1.000	Pas de différence significative

Note:

*** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05

Figure 27. Comparaison par paires des risques de mortalité des punaises pour la méthode par endophytisme. La figure reprend les valeurs de HR avec intervalle de confiance à 95 %, la p-valeur associée et l'interprétation statistique.

Comparaison par paires des Hazard Ratio - Pulvérisation

Comparaison	Hazard Ratio (95% IC)	p-valeur	Interprétation
ARSEF4556 vs Contrôle	19.09 (6.75–53.96)	<0.001***	Risque plus faible que la référence
GHA vs Contrôle	7.03 (2.40–20.63)	<0.001***	Risque plus faible que la référence
ARSEF4556 vs GHA	2.71 (1.49–4.95)	<0.001***	Risque plus faible que la référence

Note:

*** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05

Figure 28. Comparaison par paires des risques de mortalité des punaises pour la méthode par pulvérisation. La figure reprend les valeurs de HR avec intervalle de confiance à 95 %, la p-valeur associée et l'interprétation statistique.

Comparaison par paires des Hazard Ratio - Trempage

Comparaison	Hazard Ratio (95% IC)	p-valeur	Interprétation
ARSEF4556 vs Contrôle	12.23 (5.83–25.65)	<0.001***	Risque plus faible que la référence
GHA vs Contrôle	7.13 (3.36–15.13)	<0.001***	Risque plus faible que la référence
ARSEF4556 vs GHA	1.72 (1.12–2.64)	0.009**	Risque plus faible que la référence

Note:

*** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05

Figure 29. Comparaison par paires des risques de mortalité des punaises pour la méthode par trempage. La figure reprend les valeurs de HR avec intervalle de confiance à 95 %, la p-valeur associée et l'interprétation statistique.

Comparaison par paires des Hazard Ratio - [Phéromones]

Comparaison	Hazard Ratio (95% IC)	p-valeur	Interprétation
Contrôle vs 1mg PHER	0.50 (0.13–1.90)	0.548	Pas de différence significative
Contrôle vs 5mg PHER	0.51 (0.13–1.91)	0.553	Pas de différence significative
1mg PHER vs 10mg PHER	1.83 (0.48–6.89)	0.648	Pas de différence significative
5mg PHER vs 10mg PHER	1.82 (0.48–6.86)	0.653	Pas de différence significative
Contrôle vs 10mg PHER	0.92 (0.21–4.07)	0.999	Pas de différence significative
1mg PHER vs 5mg PHER	1.00 (0.32–3.17)	1.000	Pas de différence significative

Note:

*** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05

Figure 30. Comparaison par paires des risques de contact avec le piège pour les différentes concentration de phéromone d'agrégation de l'espèce (PHER) et de son synergiste (MDT). La figure reprend les valeurs de HR avec intervalle de confiance à 95 %, la p-valeur associée et l'interprétation statistique.