



ULg
Library

<http://lib.ulg.ac.be>



<http://matheo.ulg.ac.be>

CARACTERISATION DE LA PHEROMONE SEXUELLE MALE CHEZ BY RHAGOLETIS COMPLETA EN VUE DU DEVELOPPEMENT DE LA LUTTE SEMIOCHIMIQUE

Auteur : Larsy, Laurent

Promoteur(s) : Verheggen, François

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

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

Année académique : 2016-2017

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/3059>

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.

**CARACTERISATION DE LA PHEROMONE
SEXUELLE MALE CHEZ *RHAGOLETIS COMPLETA*
EN VUE DU DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE
DE LUTTE SEMIOCHIMIQUE**

LAURENT LARSY

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRÉSENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN GESTION DES FORETS ET DES ESPACES NATURELS**

ANNÉE ACADEMIQUE 2016-2017

PROMOTEUR : PROFESSEUR FRANÇOIS VERHEGGEN

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

"Le présent document n'engage que son auteur."

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

**CARACTERISATION DE LA PHEROMONE
SEXUELLE MALE CHEZ *RHAGOLETIS COMPLETA*
EN VUE DU DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE
DE LUTTE SEMIOCHIMIQUE**

LAURENT LARSY

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRÉSENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN GESTION DES FORETS ET DES ESPACES NATURELS**

ANNÉE ACADEMIQUE 2016-2017

PROMOTEUR : PROFESSEUR FRANÇOIS VERHEGGEN

Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce aux soutiens et conseils de certaines personnes que je vais remercier ici.

Avant tout, je tiens à remercier le Professeur Frédéric Francis pour son accueil au sein de l'Unité d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive de Gembloux Agro Bio-Tech.

Mes remerciements vont ensuite à mon promoteur, le Professeur François Verheggen, pour son encadrement, ses apprentissages, ses conseils ainsi que pour le temps qu'il m'a consacré au cours de ce travail, notamment pour ses corrections.

J'adresse également mes remerciements à Landry Sarles pour son aide apportée tout au long du travail, ses conseils, ses relectures et sa patiente.

Je remercie ensuite tous ceux et celles qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail. Merci au Professeur Hélène Soyeurt mais aussi à Clément, Antoine et Léo pour leur aide en statistique de même que Maryse et Sophie pour l'utilisation parfois compliquée du GC.

Je remercie ma famille qui m'a toujours soutenu, et ce depuis le début de mes études.

Je remercie enfin les guinseux et mes ami(e)s avec qui j'ai partagé ma vie étudiante et de nombreux souvenirs durant mes années à la faculté.

Résumé

Dans le sud de l'Europe, la production de noix est soumise à de lourdes infestations d'une espèce exotique envahissante : *Rhagoletis completa* (Diptera : Tephritidae). Cette mouche pond ses œufs dans le brou, et réduit les qualités visuelles et organoleptiques de la noix. Les insecticides homologués étant voués à disparaître, le développement de méthodes alternatives de lutte est devenu une priorité européenne.

L'objectif général de ce travail est de contribuer à la caractérisation de la phéromone sexuelle mâle de *R. completa* en vue du développement d'une méthode de lutte sémi chimique basée sur la confusion sexuelle des femelles. Ce travail se base sur un acquis du laboratoire : deux lactones (hexalactone et heptalactone) sembleraient être les composants majoritaires de la phéromone sexuelle mâle de *R. completa*. Trois objectifs spécifiques avaient été fixés et ont été atteints : (1) Nous avons vérifié, par électroantennographie, que les deux lactones préalablement identifiées sont effectivement perçues par le système olfactif de l'insecte. Les deux lactones induisent des réponses électriques similaires. (2) Nous avons comparé divers systèmes d'analyse comportementale, en boîtes de Petri et en tunnels de vol, assistés d'un logiciel d'analyse comportementale et de traitement vidéos. (3) Nous avons évalué l'efficacité d'un dispositif de diffusion des lactones destiné à être appliqué en champs. Nous avons ainsi pu démontrer qu'à l'aide de ce dispositif, les lactones sont relarguées en extérieur sur une durée supérieure à deux semaines.

Les résultats obtenus dans ce travail permettront le développement et la poursuite d'une recherche appliquée visant la mise en place d'une méthode de lutte par confusion sexuelle en verger de noyers.

Mots-clés : *Rhagoletis completa*, Tephritidae, phéromone sexuelle, sémi chimique, confusion sexuelle.

Abstract

In the south of Europe, walnut production is infected by an alien invasive species: *Rhagoletis completa* (Diptera: Tephritidae). This fly lays its eggs in the husk, larvae feed and reduce the visual and organoleptic qualities of the nut. Approved insecticides are likely to be withdrawn from the market and developing alternative control methods has become a priority for Europe.

The main goal of this work is to contribute to the characterization of the male sexual pheromone of *R. completa* in order to develop a semiochemical-based control method through sexual confusion of females. This work is based on a previous research carried out in laboratory: two lactones (hexalactone and heptalactone) would be the main components of the male sexual pheromone of *R. completa*. Three specific objectives had been set and have since been reached: (1) Electroantennography allowed us to check that the two lactones that had first been identified are indeed perceived by the olfactory system of the insect. The two lactones give similar electrical responses. (2) We compared various behaviour analysis systems, in Petri dish and flight tunnels, helped in this regard by a behaviour analysis and video processing software. (3) We assessed the efficiency of a lactone diffusion device which is meant to be used in fields. Therefore, we were able to prove that, thanks to this device, lactones are released outside in more than two weeks.

All results achieved as part of this work will enable further development of an applied research aiming at implementing a method for controlling the invasion of *R. completa* by sexual confusion in walnut orchards.

Keywords: *Rhagoletis completa*, Tephritidae, sex pheromone, semiochimical, sexual confusion.

Table des matières

Remerciements.....	IV
Résumé.....	V
Abstract.....	VI
Table des matières.....	VII
Table des figures	IX
Table des tableaux.....	X
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	2
1 La culture du noyer	2
1.1 Répartition géographique	2
1.2 Importance économique.....	3
1.3 Les bioagresseurs du noyer	4
2 La problématique de <i>Rhagoletis completa</i> Cresson 1929	5
2.1 Identité de <i>R. completa</i>	5
2.1.1 Taxonomie.....	5
2.1.2 Description morphologique de l'insecte	6
2.1.3 Cycle de vie et conditions favorables à son développement.....	7
2.2 Distribution géographique de <i>R. completa</i>	9
2.2.1 Répartition géographique actuelle	9
2.2.2 Les moyens de dispersion.....	10
2.2.3 Expansion future de <i>R. completa</i>	11
2.2.4 Les plantes hôtes et leurs besoins	11
2.3 Les conséquences néfastes de <i>R. completa</i>	12
2.3.1 Les dégâts occasionnés.....	12
2.3.2 Les conséquences économiques.....	13
2.3.3 Les conséquences sociales.....	13
2.3.4 La catégorisation phytosanitaire de <i>R. completa</i> dans le monde.....	14
3 La lutte contre <i>R. completa</i>	14
3.1 Le monitoring.....	14
3.2 Les moyens de lutte actuels	15
3.2.1 Mesures prophylactiques	15
3.2.2 Lutte à l'argile.....	16
3.2.3 Les prédateurs naturels.....	16
3.2.4 Lutte chimique.....	17

3.3	La problématique de la lutte chimique actuelle	18
3.4	Une lutte alternative : la lutte sémiochimique.....	18
	Objectifs	21
	Matériel et méthode.....	22
1	Matériel biologique.....	22
2	Objectif spécifique 1 : Perception olfactive	22
3	Objectif spécifique 2 : Analyses comportementales.....	27
3.1	Observation en boite de Petri assistée par analyse d'images	28
3.2	Tunnel de vol.....	30
4	Objectif spécifique 3 : Dynamique de relargage des lactones.....	31
5	Expérimentations additionnelles.....	33
	Résultats.....	36
1	Objectif spécifique 1 : Perception olfactive	36
1.1	Comparaison de la perception olfactive entre les produits et le témoin	36
1.2	Comparaison de la perception olfactive selon les produits, l'ordre et la concentration	37
2	Objectif spécifique 2 : Analyses comportementales.....	39
2.1	Observation en boite de Petri assistée par analyse d'images	39
2.2	Tunnel de vol.....	41
3	Objectif spécifique 3 : Dynamique de relargage des lactones	41
4	Expérimentations additionnelles.....	44
	Discussion.....	47
1	Objectif 1 : Perception olfactive	47
2	Objectif 2 : Analyses comportementales.....	50
2.1	Observation en boite de Petri assistée par analyse d'images	50
2.2	Tunnel de vol.....	51
3	Objectif 3 : Dynamique de relargage des lactones	51
4	Expérimentations additionnelles.....	52
	Conclusions et perspectives	54
	Références bibliographiques	55

Table des figures

Figure 1 : Dessin des ailes de <i>R. completa</i> (Source : http://bugguide.net).	6
Figure 2 : Cycle de développement de <i>Rhagoletis completa</i>	8
Figure 3 : Noix infectée par <i>R. completa</i> (Source : https://www.huilerie-auron.fr).	12
Figure 4 : Extracteur de microélectrode en verre (Source : http://www.tritechresearch.com).	23
Figure 5 : Appareillage de l'électroantennographie (Source : « ELECTROANTENNOGRAPHY a practical introduction, Syntech 2014 »).....	24
Figure 6 : Mise en place des électrodes (Source : Laurent Larsy).	25
Figure 7 : Générateur d'air (Source : http://www.ockenfels-syntech.com).	25
Figure 8 : Amplificateur de signal (Source : http://www.ockenfels-syntech.com).	26
Figure 9 : Succession des stimulations dans le temps (Source : Laurent Larsy).	27
Figure 10 : Les différents supports testés (Source : Laurent Larsy).	29
Figure 11 : Tunnel de vol (Source : Laurent Larsy).	30
Figure 12 : Diffuseur formé de capsules de caoutchouc (Source : Laurent Larsy).	31
Figure 13 : Cuves étanches (Source : Laurent Larsy).	32
Figure 14 : Dispositif de collecte des lactones (Source : Laurent Larsy).	32
Figure 15 : Microextraction en phase solide (Source : Laurent Larsy)	34
Figure 16 : Broyage des mâles (Source : Laurent Larsy).	34
Figure 17 : Différence de potentiel moyenne induite par les différents produits.	36
Figure 18 : Différence de potentiel moyenne induite par les différents produits selon la concentration et l'ordre.	38
Figure 19 : Réponse électrique moyenne des différents composés et du témoin pour chaque mouche.	38
Figure 20 : Durée moyenne du mouvement selon les différents dispositifs.	39
Figure 21 : Pourcentage moyen d'activité selon les différents dispositifs.	40
Figure 22 : Pourcentage moyen de mobilité selon les différents dispositifs.	40
Figure 23 : Évolution dans le temps du nombre moyen de mouches selon les différentes zones étudiées.	41
Figure 24 : Quantité de lactone relarguée pendant 24 h durant 26 jours. [A - Hexalactone (S) ; B - Hexalactone (R) ; C - Heptalactone (S) ; D - Heptalactone (R)]	42
Figure 25 : Quantité cumulée de lactone relarguée pendant 24 h durant 26 jours. [A - Hexalactone (S) ; B - Hexalactone (R) ; C - Heptalactone (S) ; D - Heptalactone (R)]	43
Figure 26 : Comparaison du temps de rétention de l'heptalactone entre un standard injecté et la fibre SPME.....	44

Figure 27 : Comparaison du temps de rétention de l'heptalactone entre un standard injecté et le liquide extrait du broyat de mouche.....	45
--	----

Table des tableaux

Tableau 1 : Taxonomie de <i>R. completa</i>	6
Tableau 2 : Traitements chimiques contre <i>R. completa</i> (Source : Décrets, arrêtés, circulaires : JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE).	17

Introduction

L'introduction d'insectes ravageurs sur des territoires où ils étaient auparavant absents provoque parfois des conséquences économiques et environnementales importantes. C'est le cas de la mouche du brou du noyer, *Rhagoletis completa* (Diptera : Tephritidae). Cette mouche des fruits inféodée principalement aux espèces de *Juglans* (Bush, 1966), engendre un impact économique important sur la production de noix. Originaire du centre des États-Unis, elle fut introduite en Californie à partir des années 1920 puis elle s'est développée à travers l'Europe vers les années 1980 (Verheggen *et al.*, 2017). Dans le sud de l'Europe, les pays producteurs de noix souffrent des dégâts causés par cette espèce exotique. Une fois les œufs pondus dans le brou, les larves éclosent et s'en nourrissent, dépréciant la qualité des noix (Duso & Lago, 2006).

Les traitements chimiques homologués à base de néonicotinoïdes ou d'organophosphates actuellement utilisés sont voués à disparaître du fait des leurs effets néfastes engendrés sur l'environnement et la santé humaine. En effet, les améliorations dans le domaine scientifique et l'attention grandissante du public pour les questions environnementales et de santé humaine poussent les dirigeants à créer et à appliquer des règles pour la lutte contre les ravageurs. Du fait du changement climatique et du commerce mondial, les inquiétudes concernant les impacts écologiques et économiques des espèces invasives non indigènes d'agents pathogènes et de parasites des plantes augmentent (Verheggen *et al.*, 2017). La priorité européenne est donc le développement de méthodes alternatives de lutte. Une méthode alternative à ne pas sous-estimer concerne les stratégies de contrôle à l'aide de substances sémiochimiques. En effet, les phéromones sexuelles ont prouvé leur efficacité dans la lutte contre les insectes ravageurs des arbres fruitiers (Light, 2016).

Ce travail se base sur un acquis du laboratoire d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive de Gembloux : deux lactones (hexalactone et heptalactone) sembleraient être les composants majoritaires de la phéromone sexuelle mâle de *R. completa*. Le but de ce travail est donc de contribuer à la caractérisation de la phéromone sexuelle mâle de *R. completa* en vue du développement d'une méthode de lutte sémi chimique basée sur la confusion sexuelle des femelles. Les résultats obtenus dans ce travail permettront le développement et la poursuite d'une recherche appliquée visant la mise en place d'une méthode de lutte par confusion sexuelle en verger de noyers.

Synthèse bibliographique

1 La culture du noyer

1.1 Répartition géographique

Malgré une baisse observée en 2013, la production mondiale de noix non décortiquées, ainsi que la surface récoltée, sont en constante augmentation depuis 1994. Depuis 2011, c'est plus de 3 millions de tonnes de noix qui sont récoltées chaque année à travers le monde (FAOSTAT, 2014). Le continent asiatique représente 61,5 % de la production mondiale de noix, l'Amérique 21,5 % et l'Europe 15,6 %. La production en Afrique est quant à elle très faible et ne représente que 1,4 % de la production totale (FAOSTAT, 2014).

La Chine est de loin le premier pays producteur de noix au monde et produisait à elle seule, en 2014, plus d'1,6 millions de tonnes selon la FAO (Food and Agriculture Organization). De plus, l'ensemble des sources statistiques s'entendent pour décrire une production en hausse. Cependant, la Chine n'affecte que légèrement le marché mondial en raison de sa production absorbée par son marché intérieur. En effet, la noix est mangée sous de nombreuses formes et l'on retrouve également de nombreux produits dérivés comme du lait ou de l'huile de noix. On observe également une augmentation des importations chinoises de noix provenant majoritairement des États-Unis. Une partie de ces importations est réexportée vers le Japon ou vers certains pays de l'Union européenne après une première transformation, l'énoisage, qui consiste à enlever les coques (Ctifl, 2014).

Les États-Unis occupent la deuxième place en termes de production de noix. En effet, en 2014 ils produisaient environ 518 000 tonnes de noix par an (FAOSTAT, 2014). Leurs exportations vers les pays asiatiques, mais aussi vers l'Europe (30 %) ne faisant qu'augmenter, ils sont les intervenants les plus importants sur le marché de la noix (Ctifl, 2014).

L'Iran se situe sur la troisième marche du podium avec environ 445 800 tonnes de noix récoltées par an en 2014 (FAOSTAT, 2014). Cependant, ce pays n'a que peu voir pas d'influence sur le marché mondial (Ctifl, 2014).

D'autre pays comme la Turquie, le Mexique, le Chili, l'Ukraine ou encore l'Inde voient leur production de noix augmenter ces dernières années ainsi que leur influence respective sur le marché mondial en favorisant les importations et les exportations (Ctifl, 2014).

Dans l'Union européenne (27 pays), c'est la France et la Roumanie qui dominent la production de noix. En effet, la France produisait en 2014 environ 35 000 tonnes de noix et la Roumanie 31 500 tonnes (FAOSTAT, 2014). La France est à la deuxième place mondiale en termes de pays exportateur, loin derrière les États-Unis (Ctifl, 2014). En France, la noix occupe la deuxième place en termes de culture fruitière, avec une surface cultivée d'environ 20000 hectares (Agreste *et al.*, 2012).

1.2 Importance économique

Comme pour chaque denrée alimentaire, le marché mondial de la noix est en constante évolution. En 10 ans, le prix moyen des exportations dans le monde a augmenté d'environ 80 %. Malgré une baisse des prix observée en 2009, sûrement due à l'importante augmentation du volume des exportations venues des États-Unis, le prix mondial au kilo de noix pour l'exportation est, de nos jours, de nouveau en augmentation. L'accroissement du prix moyen des exportations américaines a progressé de manière beaucoup plus importante que pour la France, dont l'accroissement entre 2002 et 2012 est compris entre 30 % et 40 % (Ctifl, 2014).

En Union européenne, le volume de noix en coque qui est importé est relativement constant. L'approvisionneur majoritaire est les États-Unis pour 48 % des importations. La France fournit 33% du volume de noix en coque en Union européenne. Néanmoins, depuis plus de dix ans, la tendance se modifie et les volumes fournis par la France ont augmenté d'environ 40 % alors que ceux fournis par les États-Unis baissent de 20 % (Ctifl, 2014).

La production française n'a fait qu'augmenter depuis les années 2000 avec une progression d'environ 26 % notamment grâce à la commercialisation de « Noix de Grenoble » et de « Noix du Périgord », deux produits d'Appellation d'Origine Contrôlée (Ctifl, 2014).

1.3 Les bioagresseurs du noyer

Comme vu précédemment, la noix représente une denrée économiquement importante. De même que pour toutes les espèces végétales, le noyer peut être infecté par plusieurs bioagresseurs qui affectent alors la production de noix, ce qui représente une perte économique importante.

Un premier ravageur est la bactérie *Xanthomonas arboricola pathovar juglandis* (*Xaj*) qui peut infecter les noyers, on parle alors de la bactériose du noyer. D'un point de vue symptomatique, on peut observer des taches anguleuses brunes-noires sur les feuilles qui apparaîtront ensuite sur l'épicarpe du fruit. Dans un premier temps, elles seront visqueuses et humides et se transformeront en plaques en séchant par la suite (Samietz *et al.*, 2012). Cette maladie est un problème majeur pour les producteurs car l'attaque des fruits peut causer plus de 50 % de perte des récoltes. Plusieurs mesures prophylactiques peuvent permettre de réduire l'impacte de la maladie et l'utilisation de produits chimiques. Par exemple, le choix d'une variété peu sensible à la maladie. Mais également la densité de plantation et la maîtrise de la taille d'entretien pour contrôler l'humidité. On veillera aussi à l'entretien du sol avec des apports en matière organique, des apports en calcium, une maîtrise de la fertilisation et des irrigations. Dans les cas d'attaques régulières, du cuivre peut être appliqué avant contamination car il offre une action de contact uniquement préventive (Ctifl, 2011a).

Une autre maladie pouvant affecter les noyers est l'anthracnose du noyer. Celle-ci est due au champignon *Gnomonia leptostyla*. On observe l'apparition de taches d'encre noire sur les différentes parties du végétal (feuilles, tiges et nervures). La conséquence de cette attaque et la chute prématuée des feuilles (Berry, 1997). Plusieurs facteurs favorisent l'apparition de ces maladies comme un printemps humide et pluvieux ou la distance trop réduite entre les différents arbres, ce qui empêche le séchage des feuilles et stimule l'infection (Samietz *et al.*, 2012). Les noix provenant d'arbres malades ont habituellement de la chair sombre, peu attrayante et mourante. Ces noix deviennent malades quand elles sont immatures et elles ne se développent donc pas normalement, beaucoup tombent prématulement (Berry, 1997).

Au niveau des ravageurs européens, on retrouve : le carpocapse des pommes et des poires (*Cydia pomonella*) considéré comme le principal ravageur en culture de pommier, poirier, noyer, cognassier et abricotier mais aussi la cochenille rouge du poirier (*Epidiaspis leperi*), la cochenille virgule du pommier (*Lepidosaphes ulmi*), le lécanium du cornouiller et de la vigne (*Parthenolecanium corni*), le xylobore disparate (*Xyleborus dispar*), la zeuzère (*Zeuzera pyrina*), la teigne du noyer *Caloptilia roscipennella* (Hübner 1796), le petit puceron jaune *Chromaphis juglandicola* (Kaltenbach 1843), le puceron des nervures *Panaphis juglandis* (Goeze 1778), l'acarien rouge (*Panonychus ulmi*) et le phytopte du noyer, *Aculops unguiculatus* (Nalepa 1897, anc. *Phyllocoptes unguiculatus*).

Depuis quelques années, la mouche du brou du noyer, *Rhagoletis completa* Cresson 1929, s'est largement répandue au sein de l'Union européenne et sa zone de répartition potentielle représente l'aire de répartition des espèces de *Juglans* (Verheggen *et al.*, 2017). Ce ravageur du noyer cause de nombreux dégâts et en l'absence de lutte, cet insecte infecte la totalité des arbres et des pertes de rendement allant jusqu'à 80 % sont observées (ANSES, 2014).

2 La problématique de *Rhagoletis completa* Cresson 1929

2.1 Identité de *R. completa*

2.1.1 Taxonomie

Rhagoletis completa Cresson 1929 est une mouche de l'ordre des Diptères et issue de la famille des *Tephritidae*. Elle est communément appelée « mouche des brous du noyer » en français et « walnut husk fly » en anglais (EPPO, 2017). Sa classification complète est décrite ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Taxonomie de *R. completa*.

Règne	<i>Animalia</i> (Linnaeus, 1758)
Embranchement	<i>Arthropoda</i> (Latreille, 1829)
Sous-embranchement	<i>Hexapoda</i> (Blainville, 1816)
Classe	<i>Insecta</i> (Linnaeus, 1758)
Ordre	<i>Diptera</i> (Linnaeus, 1758)
Famille	<i>Tephritidae</i> (Newman, 1834)
Genre	<i>Rhagoletis</i> (Loew, 1862)
Espèce	<i>Rhagoletis completa</i> Cresson, 1929

2.1.2 Description morphologique de l'insecte

Comme tous les Diptères, *R. completa* est une mouche possédant une unique paire d'ailes membraneuses ainsi que deux balanciers. Ses pièces buccales, que l'on nomme proboscis, sont de type « suceurs ». Il s'agit d'une mouche dont la taille varie entre 4 mm et 8 mm et dont les ailes possèdent des dessins caractéristiques des espèces (ANSES, 2014) (Figure 1).



Figure 1 : Dessin des ailes de *R. completa* (Source : <http://bugguide.net>).

Pour reconnaître *R. completa*, plusieurs critères peuvent être observés. Tout d'abord, on retrouve à la base postérieure du thorax un point jaune, caractéristique de la famille. Ensuite, les ailes de *R. completa* sont transparentes et colorées de trois bandes noires dont la dernière se termine en forme de « L » et étant accolée au bord antérieur de l'aile. C'est grâce à ce critère que l'on peut distinguer *R. completa* et *R. cerasi*, cette dernière possédant une quatrième tache noire plus petite au bord antérieur de l'aile (ANSES, 2014).

2.1.3 Cycle de vie et conditions favorables à son développement

R. completa est univoltine : elle n'effectue qu'une unique génération par an (Bush, 1966). Le cycle de développement de *R. completa* est décrit dans la figure ci-dessous (Figure 2). En France, cet insecte passe l'hiver sous la forme nymphale et, après une diapause assez longue, les adultes émergent à partir du mois de juillet (Samietz *et al.*, 2012). L'émergence des adultes est synchronisée avec la maturation de la plante hôte et ne varie jamais de plus de deux semaines d'année en année. Néanmoins, une faible quantité d'adultes émergent un mois avant et un mois après le pic d'émergence (Bush, 1966). La longévité des adultes selon les différents cultivars diffère significativement. Cependant, indépendamment du cultivar, la longévité entre les sexes est significativement différente, les femelles vivant 48 jours et les mâles 55 jours (Guillén *et al.*, 2011).

Après l'émergence, il faut compter entre 6 et 8 jours pour qu'il y ait accouplement. Après 1 ou 2 semaines, la femelle commence à pondre entre 300 et 400 œufs. Les œufs sont regroupés dans une poche par fruit et l'on compte environ 15 œufs par brou. Une femelle peut pondre dans une vingtaine de fruits différents (Duso & Lago, 2006).

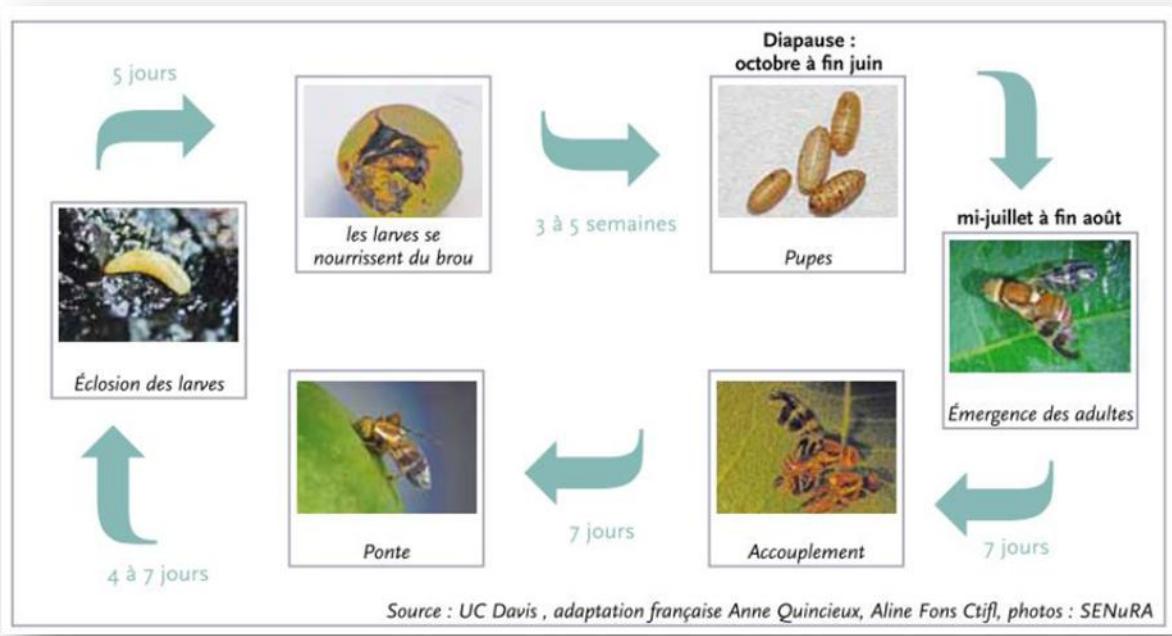


Figure 2 : Cycle de développement de *Rhagoletis completa*.

Après 4 à 7 jours suivant la ponte, les œufs éclosent et les larves émergent avec un sex-ratio à l'équilibre. Les larves se nourrissent alors du brou, ce qui provoque le pourrissement et le noircissement de celui-ci. Les jeunes larves deviennent matures après 3 à 5 semaines et tombent alors au sol. Elles s'enterrent sur une profondeur de quelques centimètres et se transforment en pupe (Ctifl, 2011b).

R. completa réalise alors sa nymphose dans le sol et attendra l'été suivant pour recommencer le cycle. Certaines pupes peuvent néanmoins passer 1 ou 2 saisons en diapause avant l'émergence de nouveaux adultes (Ctifl, 2011b). Une partie des mouches émerge l'année suivante alors qu'un pourcentage relativement faible n'émerge que la deuxième année. Certaines n'émergent pas avant la troisième année et on observe même que quelques individus exigeront quatre ans avant l'émergence (Boyce, 1931).

Certaines conditions sont favorables au développement de *R. completa* comme le choix de la variété et le climat. En effet, aux États-Unis, il a été observé qu'en fonction de la composition d'un verger (une seule variété ou plusieurs variétés différentes) la sensibilité de l'insecte n'est pas la même. *R. completa* semble préférer les variétés précoces car elles atteignent leur taille finale quand l'insecte émerge. La dureté du brou semble aussi être une cause de résistance aux attaques. Quant au climat, ce dernier peut jouer sur les périodes d'émergence et les décaler (Ctifl, 2011b).

2.2 Distribution géographique de *R. completa*

2.2.1 Répartition géographique actuelle

Sur le continent américain, *R. completa* est largement distribuée aux États-Unis. On la retrouve dans les états suivants : Arizona, Californie, Colorado, Idaho, Iowa, Kansas, Minnesota, Mississippi, Missouri, Nebraska, Nevada, Nouveau-Mexique, Oklahoma, Oregon, Texas, Utah et Washington (EPPO, 2017). *Rhagoletis completa* est la première espèce de Tephritidae d'importance économique majeure à s'installer en Californie (Boyce, 1934). Elle est originaire du sud et du centre des États-Unis et s'est répandue dans l'ouest des États-Unis depuis les années 1920 (Bush, 1966). On la retrouve depuis quelques années au sud de la Colombie-Britannique au Canada. Enfin, sa présence est confirmée au Mexique (EPPO, 2017).

En ce qui concerne l'Europe, elle est présente en Allemagne, Autriche, Croatie, France, Hongrie, Italie, aux Pays-Bas, en Slovénie, ainsi qu'en Suisse (EPPO, 2017). De plus, elle a progressé jusqu'en Bosnie-Herzégovine où elle est maintenant installée (Ostojic *et al.*, 2014). Il a été confirmé par des enquêtes que *R. completa* est encore absente en Belgique ainsi qu'au Royaume-Uni (EPPO, 2017). *R. completa* n'est pas déclarée officiellement en Espagne, mais il semble qu'elle soit présente dans des vergers où la variété Hartley est utilisée (ANSES, 2014).

Pour l'Océanie, son absence en Nouvelle-Zélande a également été confirmée par enquête (EPPO, 2017). En Asie, elle est également présente en Chine avec une distribution limitée (ANSES, 2014).

2.2.2 Les moyens de dispersion

R. completa possède plusieurs moyens de dispersion qui lui permettent son introduction dans de nouveaux pays et sa dissémination. Tout d'abord, les végétaux de *Juglans.spp* qui sont destinés à la plantation. Ensuite, les noix qui possèdent encore leur brou et qui peuvent encore contenir des œufs ou des larves. Le sol peut également être un facteur de dispersion. En effet, le transport de sols issus de zones où des végétaux *Juglans.spp* sont plantés peut contenir des pupes. Le brou et le sol peuvent également être transportés par les engins agricoles auxquels ils adhèrent. De plus, il faut savoir que *R. completa* possède un caractère autostoppeur qui lui permet de se disperser à l'aide de tous les véhicules. L'utilisation du brou comme amendement des sols représente aussi un risque de dissémination. Enfin, les individus adultes de *R. completa* se disséminent aussi naturellement car ils sont d'excellents voilier. Les trois facteurs qui semblent les plus pertinents sont la dissémination naturelle, le caractère autostoppeur de *R. completa* et les fruits, reprenant la noix, mais également le brou (ANSES, 2014).

En ce qui concerne la dissémination naturelle, elle semble être un facteur clé car la mouche du brou est un très bon voilier et toutes les solutions sucrées sont synonymes de source d'alimentation pour *R. completa*. Il est aussi probable que, si elle ne trouvait pas de plante hôte, *R. completa* serait capable de parcourir de longues distances. De plus, les paramètres climatiques, comme le vent par exemple, peuvent aussi améliorer son potentiel de dispersion (ANSES, 2014).

Le caractère autostoppeur joue également un rôle important vu la densité du trafic routier durant la période où les adultes émergent. C'est également la période où les engins agricoles réalisent les traitements phytosanitaires et les récoltes. En outre, le transport ne diminue pas le risque de survie vu les ressources alimentaires abondantes de même que l'abondance des plantes hôtes (ANSES, 2014).

L'importance du facteur « fruits » semble moins influente. En effet, la larve se développe dans le brou et est sensible aux conditions extérieures comme le froid. De plus, lors de la nymphose, il y aura un manque de substrat pour poursuivre son développement. Il faut aussi ajouter que les fruits infectés chutent plus rapidement au sol et ne se retrouvent donc pas sur le marché. Enfin, la majorité des fruits sont destinés à l'écalage qui consiste à enlever le brou et la pupaison semble donc peu probable (ANSES, 2014).

2.2.3 Expansion future de *R. completa*

Il semble que la mouche du brou n'ait pas atteint sa zone de répartition totale. En effet, on retrouve de nombreuses cultures de noyers dans les pays avoisinants les pays où *R. completa* est déjà présente. Là où les conditions géographiques, biologiques et climatiques sont propices au développement du genre *Juglans spp.*, *R. completa* peut s'y développer. Il faut cinq mois de l'année où la température moyenne est supérieure à 10°C et où les précipitations annuelles sont supérieures à 700 mm pour obtenir la zone de production de *Juglans regia* et donc la zone potentielle de répartition totale de *R. completa*. De plus, la densité de plantation ainsi que la proximité des vergers augmentent la probabilité d'établissement de *R. completa* (ANSES, 2014).

Au niveau mondial, on observe qu'entre 2004 et 2014, la superficie totale récoltée a augmenté d'environ 50 %. En effet, elle est passée de 643 500 ha en 2004 à 995 000 ha en 2014. Cette tendance s'observe également en Amérique. En Asie, c'est une augmentation de plus de 70 % en dix ans qui est observée. En ce qui concerne l'Union européenne, la surface totale récoltée reste quant à elle relativement constante avec un total de 70 000 ha (FAOSTAT, 2014).

La culture du noyer ne fait donc qu'augmenter au fil des années. De plus, hors des zones de culture, le nombre de plantes hôtes augmente également. Il est donc fort probable que *R. completa* poursuive son expansion à travers le monde et occupe toute l'aire de répartition naturelle de *Juglans spp.* en Eurasie (ANSES, 2014). Avec des hôtes du genre *Juglans spp.* compatibles et présents, il n'y a aucune raison que *R. completa* ne s'établissent pas (Yee, 2008).

2.2.4 Les plantes hôtes et leurs besoins

R. completa utilise comme plantes hôtes les *Juglans spp.* On retrouve notamment en Amérique du Nord *Juglans nigra*, *Juglans californica* et également *Juglans hindsii*. D'autres observations décrivent le pêcher, *Prunus persica*, comme étant un hôte de *R. completa* (Bush, 1966). L'hôte principal reste le noyer commun, *Juglans regia*. Le pêcher ainsi que le prunier, *Prunus domestica*, peuvent être considérés comme hôtes secondaires (Draft ISPM, 2005).

Les hôtes de *R. completa* ont deux besoins liés au climat à savoir : une température moyenne supérieure à 10 °C pendant 5-6 mois ainsi qu'une précipitation annuelle supérieure à 700 mm (ANSES, 2014).

Les caractéristiques physiques des cultivars de *Juglans regia*, en particulier le poids des fruits, influencent significativement les taux d'infestation par *R. completa*. En effet, les femelles attaquent préférentiellement des cultivars comme Würms, Sibisel et Gisinus qui produisent de gros fruits. Les femelles peuvent augmenter leur succès reproductif en sélectionnant des hôtes dans lesquels un nombre plus important d'œufs peut être pondu (Guillén *et al.*, 2011).

2.3 Les conséquences néfastes de *R. completa*

2.3.1 Les dégâts occasionnés

Après accouplement, les femelles vont pondre leurs œufs dans le brou. C'est une quinzaine d'œufs qui vont éclore et donner naissance à de jeunes larves qui vont se nourrir du brou et causer la dégradation de celui-ci (ANSES, 2014). Le brou devient alors noir, mou, humide, gluant et va adhérer à la noix, colorant ainsi les coquilles et causant une perte de valeur du fruit (Figure 3). La commercialisation n'est donc pas possible sans un nettoyage des noix atteintes (Samietz *et al.*, 2012). La surface du fruit va d'abord rester indemne, mais va noircir par la suite et être percée lorsque la larve va réaliser sa pupaison dans le sol (ANSES, 2014).



Figure 3 : Noix infectée par *R. completa* (Source : <https://www.huilerie-auron.fr>).

2.3.2 Les conséquences économiques

Dans les vergers où aucune lutte n'est appliquée contre *R. completa*, jusqu'à 100 % des arbres peuvent être infestés, mais l'utilisation de produits phytopharmaceutiques adaptés permet de contrôler cet insecte. L'utilisation de tels produits représente également un coût variable selon le type d'agriculture. En agriculture conventionnelle, ce coût représente une augmentation de 13 % et en agriculture biologique, une hausse de 430 %. En effet, un verger non traité contre *R. completa* représentera un coût d'environ 159 euros/hectare. En lutte conventionnelle, ce coût monte à environ 180 euros/hectare et en lutte biologique il grimpe à 688 euros/hectare. En effet, on traite contre le carpocapse et les traitements sont plus fréquents, d'où la hausse des prix. Les effets néfastes dus à la présence de *R. completa* en agriculture biologique représentent donc une perte importante en termes de rendement (ANSES, 2014).

Lorsque la mouche du brou n'est pas présente dans les vergers, un rendement de production de noix peut atteindre 2 tonnes par hectare. Néanmoins, lorsqu'elle est présente et qu'aucun contrôle n'est appliqué, ce rendement peut chuter de 80 %. Il faut donc développer un système spécifique de surveillance de *R. completa* afin d'équilibrer la quantité de produits phytopharmaceutiques en fonction de la pression exercée par le ravageur. Ce système de surveillance représente également un coût supplémentaire (ANSES, 2014).

Enfin, le marché mondial de la noix est aussi affecté par les dégâts causés par *R. completa*. La part de l'Union européenne ne représente qu'un faible pourcentage du marché mondial, mais l'ensemble des pertes de marché pour l'exportation représentent environ 79 millions d'euros (ANSES, 2014).

D'autres coûts résultent également de la présence de *R. completa* comme la recherche de nouvelles méthodes de lutte ou encore la formation des producteurs et travailleurs à la reconnaissance et à la lutte contre la mouche du brou (ANSES, 2014).

2.3.3 Les conséquences sociales

Outre les conséquences économiques, la problématique de *R. completa* engendre également des conséquences négatives sociales.

En effet, pour certains particuliers, la récolte de noix représente un revenu supplémentaire. Dans le cas où il n'y a pas d'utilisation de produits phytosanitaires, le particulier peut perdre l'entièreté de sa récolte et donc une quantité importante d'argent (ANSES, 2014).

2.3.4 La catégorisation phytosanitaire de *R. completa* dans le monde

R. completa est classée sur la liste A1 depuis 1995 en Argentine et en Uruguay. Elle l'est également depuis 2007 en Turquie et elle est considérée depuis cette même année comme ravageur de quarantaine en Jordanie. En ce qui concerne l'Europe, elle fut ajoutée en 1975 sur la liste A1 par l'EPPO, mais elle fut retirée en 1996 (EPPO, 2017). Depuis 1992, *R. completa* est classée dans la directive européenne 2000/29 CE, annexe I, partie A, chapitre 1 (Verheggen *et al.* 2017).

Jusqu'en 2013, *R. completa* était soumise à une lutte obligatoire en France. Néanmoins, les professionnels ont demandé à ce que l'insecte change de statut et ce fut le cas par un arrêté ministériel le 9 septembre 2013. Depuis lors, il n'existe plus de lutte obligatoire contre la mouche du brou en France et seuls les régions ou les départements qui désirent maintenir cette lutte le font (FREDONRA, 2010).

3 La lutte contre *R. completa*

3.1 Le monitoring

Pour lutter efficacement contre un organisme nuisible tel que *R. completa*, il est important d'adapter les traitements phytosanitaires utilisés. Pour cela, un monitoring est nécessaire.

Le système le plus utilisé dans les vergers est la capture d'adultes, mais la détection de larves peut également être exécutée. En ce qui concerne les adultes, ceux-ci sont capturés à l'aide de pièges collants chromatiques qui sont suspendus dans la canopée et surveillés en raison de deux fois par semaine (Verheggen *et al.*, 2017). Afin d'augmenter l'attractivité de ces pièges, il est possible d'y ajouter du carbonate d'ammonium ou de l'acétate d'ammonium (Sarles *et al.* 2015). En effet, la combinaison du piège jaune visuellement attrayant et du carbonate d'ammonium comme appât chimique s'est révélée être une unité de piégeage beaucoup plus puissante que les méthodes antérieures. En raison de sa grande sensibilité, il peut être utilisé non seulement pour la surveillance, mais aussi pour la suppression de population avec piégeage de masse (Riedl & Hoying, 1981).

On observe une relation entre la couleur et la forme de l'objet sur le comportement de la mouche du brou du noyer. Ainsi, le jaune est la couleur préférée en combinaison avec un rectangle bidimensionnel, mais cette espèce est également sensible aux rectangles verts. Ils possèdent une réflectance plus élevée que le feuillage du noyer et peuvent apparaître à la mouche comme une grande surface d'alimentation (Riedl & Hislop, 1985).

La méthode de détection des larves est différente de celle utilisée pour les adultes. En effet, c'est l'inspection visuelle de la surface du fruit qui permettra de mettre en avant les dégâts causés par les femelles adultes et donc la présence de larves dans le fruit. Il sera également possible de détecter les larves plus tardivement lorsque leur activité alimentaire aura causé le noircissement de la noix. Pour ce qui est du coût dû à ce monitoring, pour des conditions françaises, il s'élèverait à 75euros par hectare (Verheggen *et al.*, 2017).

3.2 Les moyens de lutte actuels

3.2.1 Mesures prophylactiques

Il est par possible d'éliminer les noix tombées au sol en utilisant un râteau ou une tondeuse afin de réduire le nombre de larves qui feront leur pupaison. On peut également penser à une barrière physique au sol en disposant de la paille ou un tissu sous les noyers pour éviter que les larves ne puissent creuser le sol pour leur pupaison. Une autre solution est l'utilisation de cultivars tolérants à *R. completa* sur lesquels les infestations surviennent plus tard dans la saison, ce qui entraîne moins de noix infestées (Alston *et al.*, 2015). Par exemple, les cultivars de noyer anglais « Chandler » et « Howard » sont des variétés plus tolérantes (Coates, 2006).

Tous ces moyens ne représentent cependant pas une solution au vu de la superficie souvent exploitée et des coûts relatifs.

3.2.2 Lutte à l'argile

Une première méthode de lutte utilisée est la protection à l'aide d'argile. Cette kaolinite calcinée permet, après pulvérisation, d'établir une protection physique sur les fruits. Néanmoins, cette méthode possède de nombreux inconvénients. Déjà, son utilisation nécessite trois voire quatre pulvérisations à l'année. De plus, cette méthode n'est pas applicable aux arbres de grande taille qui sont pourtant en grande majorité dans les vergers. Cette méthode est donc moins efficace que la lutte chimique, et n'empêchera pas la prolifération des mouches d'année en année (Verheggen *et al.*, 2017).

3.2.3 Les prédateurs naturels

La mouche du brou du noyer possède peu d'ennemis naturels. Un acarien prédateur, *Pyemotes ventricosus*, et un insecte de la famille des *anthocoridae*, *Triphleps insidiosus*, ont été signalés comme se nourrissant d'œufs de *R. completa*. De plus, des fourmis prédatrices ainsi que certaines araignées ont été vues s'attaquant aux larves et aux adultes. Enfin, certains oiseaux peuvent également s'attaquer aux adultes, mais le taux de prédation est faible. Il semblerait que, de tous les agents de lutte biologique, ce sont les volailles sous noyers infestés qui sont susceptibles d'avoir le plus grand impact sur la réduction des populations (Alston *et al.*, 2015). Une autre étude a montré que l'utilisation de nématodes entomopathogènes pour le contrôle des larves des *R. cerasi* donne de bons résultats (Kepenekci *et al.*, 2015). De nombreux autres insectes sont mentionnés comme prédateurs naturels comme *Biosteres sublaevis* ou *Coptera occidentalis* mais vu leur grande polyphagie ils ne peuvent être une solution pour lutter efficacement contre *R. completa* (CABI, 2016).

Dans l'Union européenne, la présence de *Rhagoletis suavis*, une mouche compétitrice également inféodée au genre *Juglans spp.*, pourrait permettre un équilibre dans l'exploitation de la ressource, mais cette compétition ne permettra pas la réduction de la probabilité d'établissement de *R. completa* (ANSES, 2014).

C'est pour des raisons économiques que ces méthodes alternatives ne sont pas exploitées. En effet, l'utilisation de produits phytopharmaceutiques permet de contrôler plusieurs bioagresseurs en même temps et parmi eux *R. completa* (ANSES, 2014).

3.2.4 Lutte chimique

Pour le moment, seule la lutte chimique semble efficace dans la lutte contre *R. completa*. En France, les produits phytopharmaceutiques actuellement utilisés sont soit à base de phosmet (organophosphoré non systémique), de thiaclopride (néonicotinoïde) ou de spinosad. En Italie, lorsque les pesticides sont pulvérisés avec un timing correct, l'infestation est maintenue à des niveaux acceptables et ce avec une seule application (Duso & Lago, 2006).

Pour la lutte contre le carpocapse, les méthodes de contrôle se basent principalement sur l'utilisation d'insecticides à large spectre, tels que le Guthion® (azinphos-méthyl). Des préoccupations concernant la sécurité, l'impact environnemental et la durabilité des pesticides synthétiques ont engendré le développement et l'utilisation de méthodes de contrôle plus souples dans le cadre de la stratégie intégrée de lutte antiparasitaire. Une autre préoccupation concernant l'utilisation d'azinphos-méthyle et d'autres pesticides est le développement de la résistance aux insecticides (Lacey & Unruh, 2005).

Les différents traitements visent les parties aériennes du végétal, mais les doses et les conditions d'emploi sont différentes. Les différentes modalités de traitements sont reprises dans le tableau ci-dessous (Tableau 2) (Angot, 2009).

Tableau 2 : Traitements chimiques contre *R. completa* (Source : Décrets, arrêtés, circulaires : JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE).

Type de traitement	Dose	Conditions d'emploi
Poudre mouillable à base de 50 % de phosmet	0,15 kg/hl spécialité commerciale – sur la base d'une conversion à 1 000 litres de bouillie appliqués à l'hectare.	2 applications maximum avec un intervalle entre applications de 14 jours Délai avant récolte de 35 jours
Suspension concentrée à base de 480 g/l spinosad	0,02 l/hl spécialité commerciale – sur la base d'une conversion à 1 000 litres de bouillie appliqués à l'hectare	2 applications maximum avec un intervalle entre applications de 14 jours Délai avant récolte de 14 jours
Concentré pour appât à base de 0,02 % de spinosad	1,5 l/ha spécialité commerciale dans 30 à 40 litres d'eau par hectare	5 à 7 applications localisées (traitement en « tâche » dans le haut des arbres à la lance) avec un intervalle de 10 jours entre 2 applications Délai avant récolte de 14 jours
Suspension concentrée à base de 480 g/l de thiaclopride	0,025 l/hl spécialité commerciale – sur la base d'une conversion à 1 000 litres de bouillie appliqués à l'hectare	2 applications maximum avec un intervalle entre applications de 14 jours Délai avant récolte de 14 jours

3.3 La problématique de la lutte chimique actuelle

En Italie, différentes substances phytopharmaceutiques ont été utilisées depuis le début des années 1990. De plus, *R. completa* et *R. suavis* pourraient s'hybrider et induire donc une augmentation de la variabilité génétique au sein de l'espèce. Il n'est donc pas impossible que *R. completa* développe de la résistance aux insecticides mais la diversité des modes d'actions des substances réduit les chances de développement de cette résistance, d'hybridation et de variabilité génétique. Une autre source de variabilité génétique pourrait venir de l'hypothèse selon laquelle un faible nombre d'individus de *R. completa* aurait été introduit en Europe (ANSES, 2014). Il a également été observé aux États-Unis que *R. completa* s'est largement dispersée même au-delà des zones de production de *J. regia* ainsi que des hybrides (Bush, 1966).

L'impacte des produits chimiques représente une conséquence néfaste importante sur la santé humaine. Les habitants voisins des noyeraies traitées peuvent voir leur santé atteinte et leurs nappes phréatiques contaminées (ANSES, 2014). De plus, l'utilisation de la lutte chimique pour éradiquer *R. completa* peut avoir un effet sur le tourisme. Il est en effet compliqué de réaliser des traitements phytosanitaires là où des touristes font par exemple du camping (ANSES, 2014). Un autre point à soulever est qu'on retrouve un grand nombre de *Juglans spp.* sauvages qui sont des hôtes potentiels (ANSES, 2014).

Enfin, la biodiversité peut également être impactée par les composés utilisés. Ceux-ci étant toxiques pour la faune aquatique, mais aussi pour divers oiseaux et de nombreux insectes pollinisateurs (Vidau *et al.*, 2011) et les auxiliaires de culture (ANSES, 2014).

3.4 Une lutte alternative : la lutte sémiochimique

Comme vu précédemment, la méthode actuelle pour contrôler les populations de *Rhagoletis* dans les vergers conventionnels est l'application d'insecticides. Néanmoins, des recherches alternatives sont effectuées notamment par l'utilisation de substances sémiochimiques. En effet, les phéromones des mouches des fruits sont efficaces pour améliorer les efforts de surveillance et le piégeage en masse lorsqu'elles sont couplées à des systèmes préexistants tels qu'un attractif alimentaire (Sarles *et al.*, 2015). Le piégeage de masse consiste en la collecte des adultes, des larves ou des œufs d'un ravageur de manière à limiter sa population et sa descendance.

Du fait de leur importance dans la recherche d'individus pour l'accouplement, les substances sémiochimiques de certaines espèces de *Rhagoletis* ont été identifiées et caractérisées dans le but de les intégrer dans des programmes efficaces de lutte intégrée contre les ravageurs (Sarles *et al.*, 2015). Trois groupes principaux de substances sémiochimiques ont été identifiés chez ces mouches: les substances allélochimiques libérées par le fruit hôte qui guident les mouches vers le site d'oviposition (kairomones) ; les phéromones sexuelles ; et les phéromones de marquage d'hôte (Sarles *et al.*, 2015). Malheureusement, aucune caractérisation analytique supplémentaire n'a été menée pour élucider les mécanismes chimiques impliqués dans le comportement sexuel des mouches des fruits du genre *Rhagoletis* malgré leur potentiel rôle de lutte antiparasitaire (Benelli *et al.*, 2014).

Aucune étude ne documente l'exploitation des phéromones sexuelles de *Rhagoletis* pour la surveillance ou le piégeage (Tan *et al.*, 2014). Cependant, leur spécificité et leur activité biologique à faibles doses représentent deux avantages majeurs qui devraient favoriser leur inclusion dans les programmes de lutte intégrée (Sarles *et al.*, 2015).

Une fois la maturité sexuelle atteinte, les femelles commencent à chercher un partenaire mâle pour se reproduire. Ce dernier attend généralement une femelle sur un fruit qu'il défend contre les autres mâles concurrents (Papaj, 1994). Chez *Rhagoletis cerasi*, après accouplement, les femelles deviennent insensibles à la phéromone sexuelle mâle pendant plusieurs jours (B. I. Katsoyannos, 1982).

Du fait que la plupart des insecticides classiques utilisés pour contrôler les mouches des fruits ont été interdits ou vont l'être dans un futur proche, les producteurs de fruits recherchent des options de contrôle plus économiques et pratiques. Les pièges sémiochimiques peuvent être l'une des solutions de rechange les plus adaptée, à condition qu'elle soit abordable, efficace et spécifique aux ravageurs. Il existe de nombreux exemples d'attractifs efficaces et de composés mortels qui ciblent les insectes nuisibles. Le développement de pièges sémiochimiques contre les mouches des fruits semble donc être une tâche réalisable (Sarles *et al.*, 2015).

Les phéromones sexuelles ont été identifiées chez de nombreuses autres mouches de la famille des Tephritidae. On peut citer par exemple : *Rhagoletis pomonella* Walsh, *Rhagoletis cerasi* L., ou encore *Dacus oleae* Gmelin (B. I. Katsoyannos, 1982) . Par exemple, des expériences ont montré que les mâles de *Rhagoletis cerasi* L. attirent les femelles et que cette attraction est due à une odeur, apparemment une phéromone, libérée par les mâles (B. Katsoyannos, 1976).

L'efficacité de l'utilisation des phéromones sexuelles pour la détection/la surveillance ou pour la perturbation d'accouplement/le piégeage massif a déjà été démontrée de manière convaincante, notamment pour la mouche de l'olivier *Daucus oleae* (Haniotakis *et al.*, 1991). De même, la lutte par confusion sexuelle contre le carpocapse (*Cydia pomonella*) dans un verger a permis, pendant 25 années, d'éviter les traitements d'insecticides après la floraison (Charmillot *et al.*, 2007). Il n'y a donc aucune raison de ne pas parvenir à des conclusions similaires pour une espèce de *Rhagoletis* (Sarles *et al.*, 2015).

L'introduction de produits sémiochimiques comme méthode de contrôle dans la lutte intégrée est donc probable. Les pièges à appâts en carbonate d'ammonium pourraient permettre une détection plus rapide des émergences initiales dans un verger. Après les premières détections, les premières applications des molécules actives de la phéromone de marquage hôte pourraient réduire le risque d'oviposition, qui survient généralement rapidement après l'émergence. Enfin, les pièges, appâtés avec des phéromones sexuelles et des kairomones associées aux fruits et placés dans le verger, pourraient attirer et tuer les individus émergents. L'identification et la formulation des phéromones sexuelles de *Rhagoletis* et des kairomones des fruits est donc une étape initiale importante pour la réalisation de méthodes agricoles plus respectueuses de l'environnement (Sarles *et al.*, 2015).

Objectifs

Depuis son introduction sur le territoire européen, la mouche du brou du noyer est devenue un ravageur important pour la production nucicole. Ce travail s'inscrit dans la logique européenne de réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques et dans la recherche de méthodes de lutte alternative.

Ainsi, l'**objectif général de ce travail est de contribuer à la caractérisation de la phéromone sexuelle mâle chez *Rhagoletis completa* en vue du développement d'une méthode de lutte sémiologique**. Le laboratoire d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive de Gembloux a débuté une recherche visant la caractérisation de la phéromone sexuelle de *Rhagoletis completa*. Le laboratoire ambitionne le développement d'une stratégie de lutte sémiologique qui perturberait l'accouplement des mouches et réduirait, in fine, le niveau d'infestation. Ce travail se base sur un acquis du laboratoire : deux lactones (hexalactone et heptalactone) sembleraient être les composants majoritaires de la phéromone sexuelle mâle de *R. completa*.

Ce travail comporte trois objectifs spécifiques qui doivent fournir une base scientifique fondamentale au développement d'une recherche appliquée future :

(1) Le premier de ces trois objectifs spécifiques consiste à vérifier, par électroantennographie, que les deux lactones préalablement identifiées sont effectivement perçues par le système olfactif de l'insecte.

(2) Le deuxième objectif spécifique consiste à développer une méthodologie d'étude du comportement sexuel chez *R. completa*. Cette méthodologie devrait permettre d'évaluer l'activité biologique des différentes lactones composant la phéromone sexuelle.

(3) Le troisième objectif spécifique consiste en la mise au point d'un dispositif de diffusion des lactones destiné à être appliqué en champs. Ce travail permettra de vérifier que le dispositif de diffusion est efficace sur une durée de plusieurs semaines.

Matériel et méthode

1 Matériel biologique

Les pupes de *R. completa* ont été prélevées dans des vergers de *Juglans regia* (var. Franquette) exempts d'insecticides à Chatte en France et ont ensuite été congelées puis élevées dans un laboratoire d'institut de quarantaine de niveau 2. L'émergence des mouches se réalise entre 55-70 jours après la sortie des pupes du congélateur. Les mâles et les femelles ont été séparés à l'émergence et ont été gardés dans des cages contenant de l'eau et comme nourriture un mélange d'hydrolysat de levure et de sucre. Les conditions de la pièce étaient de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ d'humidité relative (HR) et une période de lumière de 16 heures (Sarles *et al.*, 2017).

Suite à un problème des émergences, les mouches utilisées dans les expérimentations sont d'un âge variable (entre 1 et 3 mois).

2 Objectif spécifique 1 : Perception olfactive

L'electroantennographie est une technique utilisée pour mesurer l'activité électrique des antennes des insectes en réponse aux phéromones et autres odeurs. Grâce à deux électrodes placées de part et d'autre d'une antenne, la différence de potentiel créé à partir de la somme des impulsions électriques de l'ensemble des sensilles stimulées est enregistrée.

Deux lactones ont été préalablement identifiées comme composants majoritaires de la phéromone sexuelle de *R. completa*. Ces lactones sont des molécules chirales et présentent, chacune, deux formes énantiomériques. Au début de ce travail, la forme chirale naturellement émise par les mouches n'était pas connue. Nous avons donc testé la capacité du système olfactif de *R. completa* à percevoir deux mélanges racémiques de lactones (hexalactone et heptalactone) à 3 concentrations différentes (1 ng/μl, 10 ng/μl et 100 ng/μl). Les différentes concentrations sont obtenues en réalisant plusieurs dilutions des réactifs purs dans de l'hexane.

La mise en place de l'expérience nécessite plusieurs manipulations préalables. Premièrement, il faut fabriquer des électrodes de verre en utilisant des capillaires de dimensions 1,5 x 1,17 mm et de longueur égale à 10 cm. Le capillaire est coupé en deux puis il est placé dans un extracteur de microélectrode en verre à une seule étape (Narishige PP-830) à une température de 85 °C (**Figure 4**). On obtient alors deux électrodes. L'une est taillée en biseau afin d'augmenter la surface de contact avec l'antenne et est appelée l'électrode de travail. L'autre est simplement ouverte pour permettre à la seconde antenne de s'y infiltrer (arista comprise) (Figure 5). Cette dernière porte le nom d'électrode de référence, elle est connectée à la terre. Ces deux électrodes sont remplies d'une solution saline (NaCl 7.5 g/l, CaCl₂ 0.21 g/l, KCl 0.35 g/l, NaHCO₃ 0.2 g/l) puis elles sont placées sur leurs supports respectifs au contact d'un fil d'argent.



Figure 4 : Extracteur de microélectrode en verre (Source : <http://www.tritechresearch.com>).

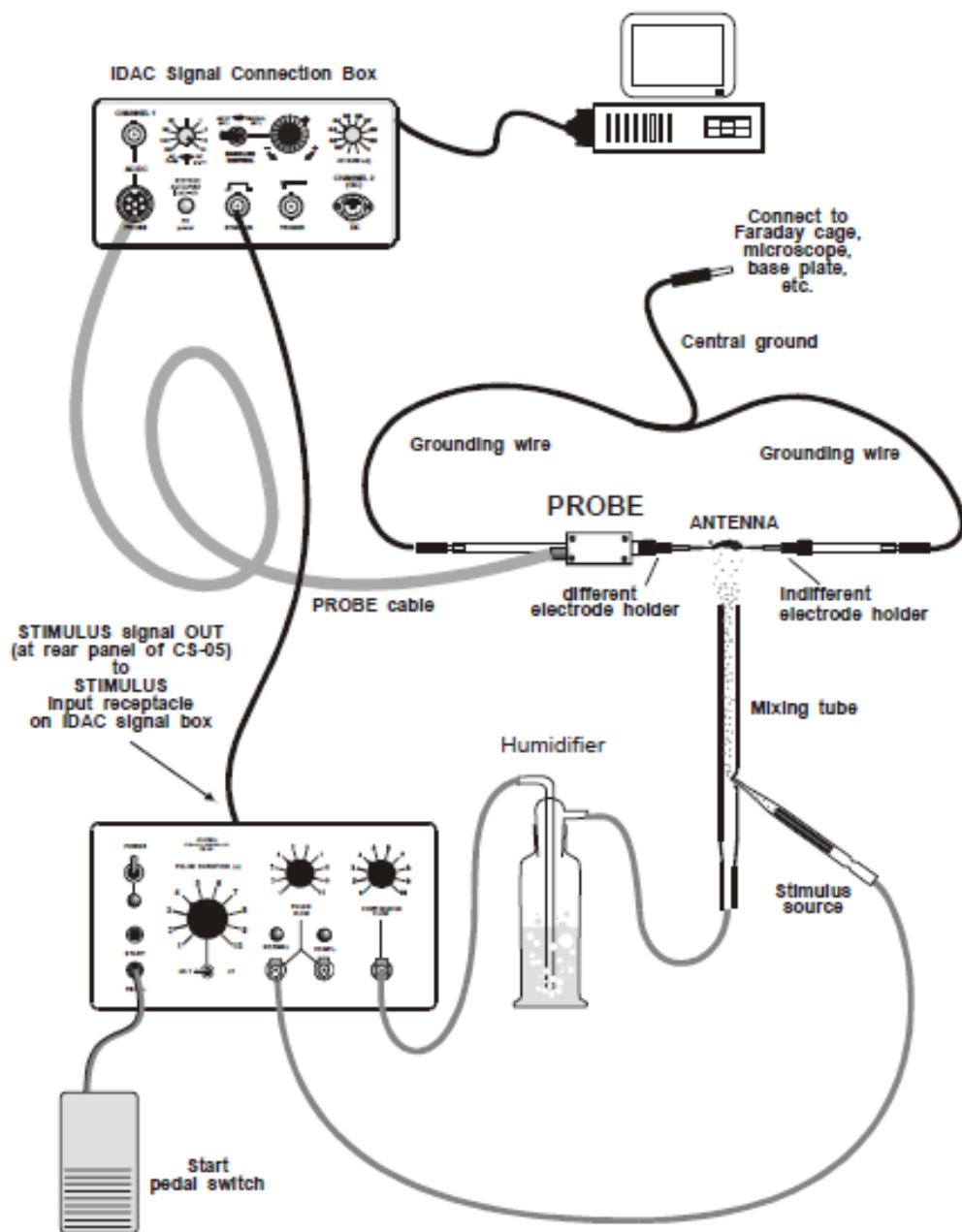


Figure 5 : Appareillage de l'électroantennographie (Source : « ELECTROANTENNOGRAPHY a practical introduction, Syntech 2014 »).

Une fois les électrodes prêtes, l'insecte est monté sur son support. Pour ce faire, la mouche est placée au congélateur pendant environ 30 secondes. Cela permet à l'insecte d'être immobile sans toute fois le tuer et donc de faciliter sa mise en place. Après ce délai, l'insecte est sorti du congélateur et immobilisé à l'aide de plasticine. Seule la tête de l'insecte reste libre. La mouche est alors placée sur un support et les électrodes sont ensuite mises en place sur les antennes (Figure 6). Pour se faire, un binoculaire ainsi qu'une lampe sont nécessaires.

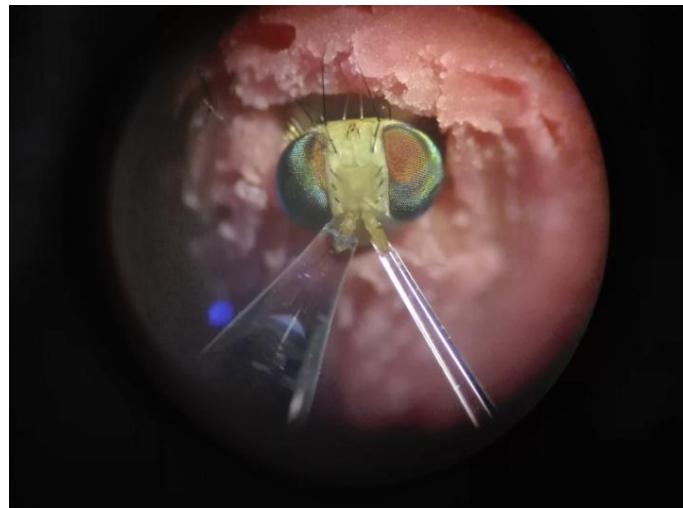


Figure 6 : Mise en place des électrodes (Source : Laurent Larsy).

Une fois l'insecte positionné avec les électrodes, un générateur d'air (STIMULUS AIR CONTROLLER Type CS-55) (Figure 7) envoie de l'air au travers d'un filtre de charbon (Whatman Carbon Cap) et cet air filtré est envoyé dans un récipient rempli d'eau pour l'humidifier, et éviter de dessécher les antennes.



Figure 7 : Générateur d'air (Source : <http://www.ockenfels-syntech.com>).

Pour chaque stimulation à l'aide de composés organiques volatils, la réponse antennaire est envoyée à un amplificateur de signal (Syntech IDAC-4) (Figure 8), qui permet la visualisation du signal sur un ordinateur raccordé et possédant le logiciel « Autospike », qui permet l'enregistrement et la quantification des différences de potentiel produites par l'antenne.



Figure 8 : Amplificateur de signal (Source : <http://www.ockenfels-syntech.com>).

Les différents produits sont testés en prélevant 10 µl de produit appliqué sur un papier-filtre de 1 cm² (1x1cm) placé dans une pipette pasteur. L'extrémité de la pipette pasteur est introduite dans le tuyau d'air continu. À l'aide d'une pédale, l'expérimentateur peut commander l'impulsion d'un flux d'air d'intensité et durée maîtrisée qui passe au travers de cette pipette et emporte le produit à tester sur l'antenne. La durée de la stimulation est ici fixée à 0,5 s. Le courant d'air continu est diminué et compensé par l'air injecté.

Avant de mettre en place la méthodologie, plusieurs essais furent nécessaires. En effet, il faut que le montage soit standardisé pour chaque répétition et il est important de trouver le bon temps d'évaporation des produits. Dans un premier temps, des durées d'évaporation trop faibles ont été appliquées induisant des réponses trop importantes que pour être mesurées. La durée appropriée doit permettre de mesurer les réponses antennaires sans qu'il y ait de perte de réponse dans le temps. Une fois ces essais réalisés, une méthodologie fut appliquée.

Au niveau des injections, chaque composé est pulvérisé après une période d'évaporation sous hôte de 2 minutes (Figure 9). Un témoin à l'hexane est pulvérisé au début et à la fin de chaque manipulation. C'est donc un total de 8 pulvérisations qui sont appliquées à chaque mouche. Les manipulations sont réalisées sur 20 mouches. Pour 10 d'entre elles, le mélange racémique pour l'hexalactone est testé en premier et pour les 10 autres c'est le mélange racémique pour l'heptalactone qui est testé en premier.

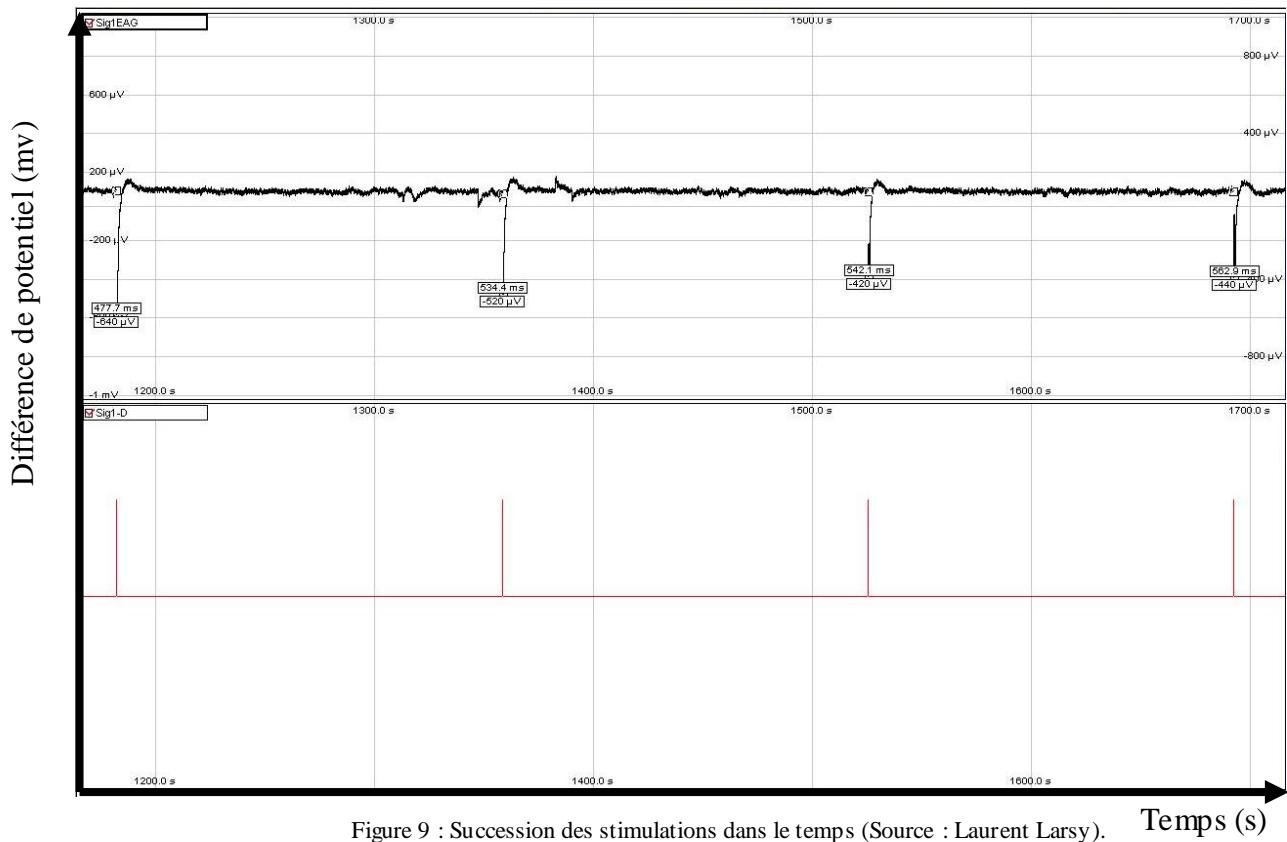


Figure 9 : Succession des stimulations dans le temps (Source : Laurent Larys).

À l'aide du logiciel R, les différences de potentiel produites sous la stimulation par les deux mélanges de lactones sont comparées aux différences de potentiel produites sous la stimulation témoin.

3 Objectif spécifique 2 : Analyses comportementales

Ce deuxième objectif spécifique consiste à développer une méthodologie d'étude du comportement sexuel chez *R. completa*. Cette méthodologie devrait permettre d'évaluer l'activité biologique des différentes lactones composant la phéromone sexuelle. Si tous les composés identifiés peuvent être perçus par le système olfactif de l'insecte (voir objectif spécifique 1), seuls certains d'entre eux peuvent effectivement induire une modification du comportement sexuel des femelles. Ces essais comportementaux sont destinés à être réalisés en grand nombre dans le futur. C'est pourquoi un dispositif et une méthodologie simple doivent être développés.

Dans le cadre de ce travail, j'ai donc évalué deux dispositifs d'études comportementales : (1) l'observation en boîte de Petri assistée par analyse d'images et (2) l'observation en tunnel de vol.

3.1 Observation en boite de Petri assistée par analyse d'images

Suite à différentes expérimentations préliminaires, nous avons décidé d'évaluer 4 dispositifs en boite de Petri afin de définir celui qui est le plus adapté à l'observation du comportement sexuel des femelles de *R. completa* (Figure 10).

Un dispositif est composé d'une boite de pétri en plastique d'un diamètre de 14 cm (avec couvercle en plastique) dans laquelle deux autres boites de pétri en plastique au diamètre de 4 cm sont placées. Ces deux boites de pétri n'ont pas de couvercle, mais sont recouvertes d'un tulle maintenu par un élastique. Dans l'une d'entre-elle est placé un mâle, l'autre reste vide et sert de témoin.

Le deuxième dispositif est identique au premier à la différence que le couvercle en plastique de la grande boite de pétri est remplacé par un tulle tendu maintenu par un élastique.

Le troisième dispositif est composé d'une boite de pétri en verre de 20 cm de diamètre (avec couvercle en verre) dans laquelle deux autres boites de pétri en plastique au diamètre de 4 cm sont placées. Ici aussi, ces deux boites de pétri n'ont pas de couvercle, mais sont recouvertes d'un tulle maintenu par un élastique. Dans l'une d'entre-elle est placé un mâle, l'autre reste vide et sert de témoin.

Enfin, le dernier dispositif est identique au troisième à la seule différence que le couvercle en verre de la grande boite de pétri est remplacé par un tulle tendu maintenu lui aussi par un élastique.

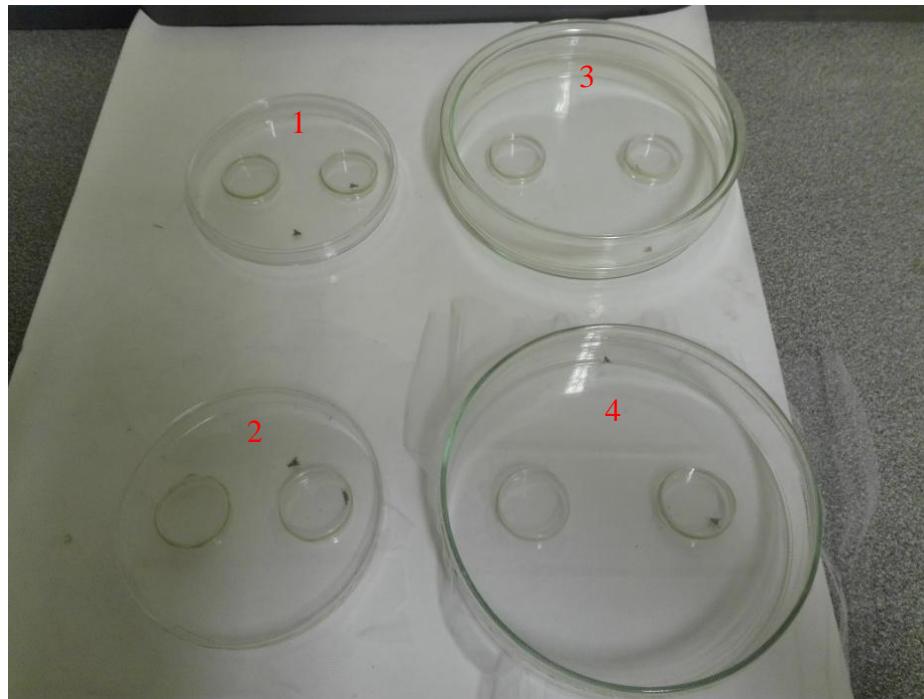


Figure 10 : Les différents supports testés (Source : Laurent Lalsy).

Dans chacun de ces 4 différents dispositifs, le comportement des mouches femelles est étudié, incluant la durée de mouvement, l'activité et la durée de la mobilité. La mouche est considérée en mouvement lorsque sa vitesse est égale ou dépasse 1 cm/s. L'activité calcule le pourcentage d'activité de l'arène entière. La mobilité calcule l'activité de l'animal même si le point central ne bouge pas (activité des ailes par exemple). Pour enregistrer ces différentes données comportementales, nous avons filmé les mouches et soumis ces vidéos à l'analyse d'un logiciel nommé EthoVision XT (Noldus®). Une GoPro est installée sur un statif à une hauteur de 50 cm et filme à la verticale les différents dispositifs. EthoVision XT est un logiciel de tracking vidéo qui permet l'enregistrement automatiquement des mouvements des animaux. Ce logiciel est utilisé pour la première fois dans le laboratoire d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive de Gembloux et les connaissances sur son utilisation sont donc restreintes.

Ce sont 5 vidéos de 30 minutes qui sont enregistrées par dispositif, soit un total de 20 vidéos. Pour ces enregistrements, une GoPro est utilisée ainsi qu'une application nommée « Image App » qui permet de commander la GoPro à partir de son Smartphone.

À l'aide du logiciel R, nous avons comparé statistiquement les valeurs des paramètres comportementaux mesurés entre les différents dispositifs.

3.2 Tunnel de vol

Afin d'étudier l'influence temporelle de plusieurs mâles sur un groupe de femelles, l'expérimentation en tunnel de vol fut également étudiée. Pour ce faire, un tunnel de vol aux dimensions 1m x 50cm x 50cm est utilisé. Il est découpé en 3 zones : une zone *témoin*, une zone centrale *neutre* et une zone *mâle*. Chaque zone est délimitée à l'aide d'une ligne tracée au crayon. Au centre de la zone *témoin* est placé une boîte de pétri vide en plastique au diamètre de 4 cm et recouverte d'un tulle tendu maintenu avec un élastique. Au centre de la zone *mâle* est placé une autre boîte de pétri en plastique au diamètre de 4 cm et recouverte d'un tulle tendu maintenu à l'aide d'un élastique. Dans cette seconde boîte de pétri, 5 mâles sont placés. Une fois le dispositif mis en place, 6 femelles sont lâchées au niveau de la zone *neutre* (Figure 11).

Un relevé des positions est effectué toutes les heures de 9 h à 17 h où le nombre de femelles dans chaque zone est comptabilisé. Cette expérience est réalisée durant 7 jours avec deux lots de femelles différents. Ici aussi, le programme R est utilisé afin d'évaluer statistiquement l'influence de la présence de mâle sur le comportement de vol des femelles.



Figure 11 : Tunnel de vol (Source : Laurent Larys).

4 Objectif spécifique 3 : Dynamique de relargage des lactones

Les futures études de terrain consisteront à diffuser dans un verger les lactones préalablement identifiées. Cette diffusion doit pouvoir être opérée plusieurs jours sans devoir remplacer la source de diffusion. Afin de préparer au mieux ces futures études de terrain, le second objectif spécifique de ce travail consiste à évaluer la capacité d'un système de diffusion à base de capsules de caoutchouc à diffuser sur la durée les mélanges racémiques de lactones. Le diffuseur est formé de 3 capsules de caoutchouc, le composé étant situé dans la capsule centrale (Figure 12).



Figure 12 : Diffuseur formé de capsules de caoutchouc (Source : Laurent Lalsy).

Quatre cuves cylindriques en verre étanches sont utilisées et chacune d'entre elles contient un diffuseur dans lequel un énantiomère d'une lactone est placé (Figure 13). Toutes les cuves et les couvercles sont nettoyés à l'hexane avant chaque manipulation afin de supprimer les résidus éventuels. Pour chaque cuve utilisée, 2 cartouches de 60 mg HayeSep Q (co-polymer of ethylvinylbenzene and divinylbenzene) sont sélectionnées aléatoirement. La seconde cartouche permet d'adsorber le surplus dans le cas où la première serait saturée (Figure 14). Un débitmètre permet de vérifier que le flux d'air est le même pour les 4 cuves ($600 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).



Figure 13 : Cuves étanches (Source : Laurent Larys).

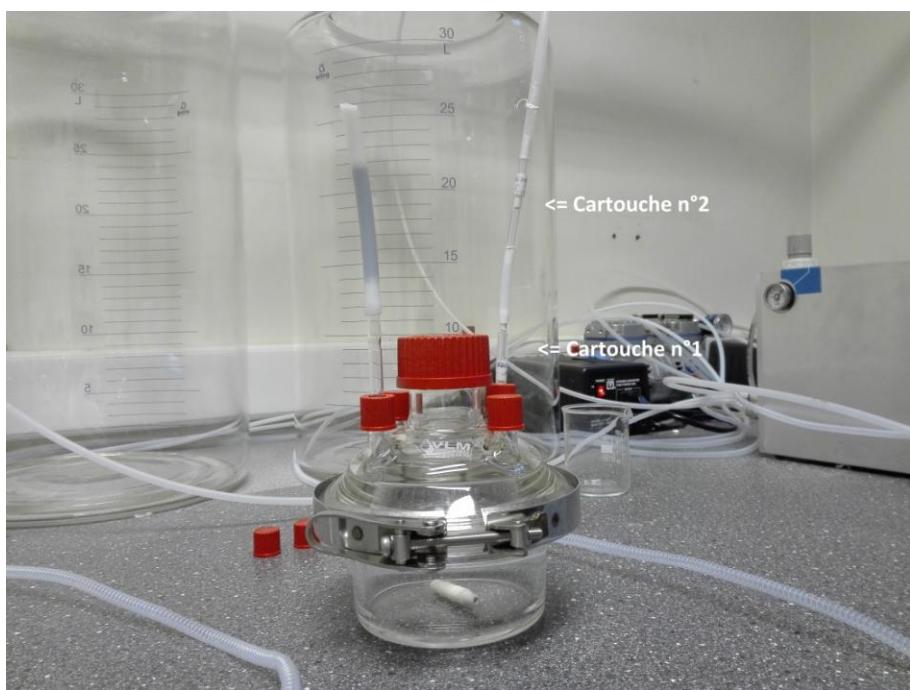


Figure 14 : Dispositif de collecte des lactones (Source : Laurent Larys).

Le montage effectué, l'expérimentation dure 30 minutes et est réalisée tous les jours pendant 26 jours. Les diffuseurs sont stockés à l'extérieur du laboratoire enfin d'être dans des conditions proches des conditions de terrain. Ils sont donc positionnés dans un récipient à l'abri de la pluie et sont soumis à la température extérieure.

Une fois l'expérimentation terminée, les 8 cartouches sont éluées. Pour ce faire, une solution mère de butylbenzène ($1\mu\text{l.ml}^{-1}$) est diluée dans de l'hexane (100 µl de butylbenzène/900 µl d'hexane). Chaque jour, deux solutions d'élution sont utilisées, une pour les 4 cartouches principales et une pour les 4 cartouches secondaires. 250 µl de solution d'élution sont donc utilisés par cartouche. Une fois élué, le liquide récupéré est stocké dans un insert, lui-même placé dans un vial. Une fois les manipulations effectuées, les éluats sont passés au GC et il est possible d'obtenir la quantité de lactone émise chaque jour pour les 30 minutes d'expérimentation. Connaissant le temps de rétention de chaque composé, l'aire des pics est calculée. La quantité de butylbenzène étant connue, un rapport des aires permet de connaître la quantité émise de chaque composé pour les 30 minutes d'expérimentation. Cette quantité est ensuite calculée pour 24 h et des courbes de dynamique de relargage sont créées pour les différents énantiomères.

5 Expérimentations additionnelles

Les mâles arrivant en fin de vie, j'ai pensé qu'il était intéressant de savoir s'ils émettaient encore ou non l'une ou l'autre lactone et si oui, en quelle quantité. Cela me permettra de confirmer ou non mes hypothèses quant aux résultats obtenus. Pour se faire, deux manipulations supplémentaires non prévues ont été réalisées.

Dans un premier temps, deux lots de mâles sont constitués en fonction du nombre de mâles restant (un lot de 4 mâles et un lot de 5 mâles). Pour chaque lot, une fibre (SPME, fibre de 10 mm avec un revêtement de carbone-divinylbenzène-polydiméthylsiloxane 50/30 l-Supelco) est utilisée pour récolter les différents composés émis par ces mâles (Figure 15). La microextraction en phase solide (SPME) est une méthode d'extraction sans solvant où les composés sont extraits par adsorption sur une fibre de silice fondu revêtue d'un polymère.



Figure 15 : Microextraction en phase solide (Source : Laurent Lalsy)

Dans un second temps, les mâles sont broyés dans 200 µl d'hexane à l'aide d'un agitateur et d'un support magnétique (Figure 16). Ensuite, le liquide récolté est filtré en passant au travers de fibre de verre placée dans une pipette pasteur. Une fois filtré, le liquide est placé dans un insert, lui-même mis dans un vial.



Figure 16 : Broyage des mâles (Source : Laurent Lalsy).

Les deux fibres SPME ainsi que les différents extraits liquides sont ensuite passés au GC. Ici, 1 µl de chaque échantillon est injecté sur une colonne OPTIMA 5, capillaire non polaire (30 m × 0,25 mm ID, 0,50 µm d'épaisseur, Macherey Nagel, Düren, Allemagne) et le four est programmé comme suit : température initiale à 60 °C pendant 2 minutes, puis augmentée de 5° C.min⁻¹ jusqu'à 190 °C, avec une prise finale de 2 minutes. L'hélium (débit constant de 1,3 ml.min⁻¹) est le gaz porteur. Les chromatogrammes sont obtenus et analysés à l'aide du logiciel Chromeleon. Pour la quantification, 2 µl d'un standard des mélanges racémiques dilués dans l'hexane (0,0001 ng.µl⁻¹) sont injectés. En comparant les temps de rétention, on peut savoir si les mâles émettent et contiennent encore en eux l'une ou l'autre lactone. Par une mesure des aires de pics, il est également possible de mesurer approximativement la quantité de lactone encore présente.

Résultats

1 Objectif spécifique 1 : Perception olfactive

Le premier objectif de ce travail est de vérifier, par électroantennographie, que les deux lactones préalablement identifiées sont effectivement perçues par le système olfactif de l'insecte. Nous avons donc comparé les différences de potentiel fournies par les différents produits et analysé l'effet de l'ordre et de la concentration.

1.1 Comparaison de la perception olfactive entre les produits et le témoin

Nous avons calculé la moyenne du témoin et de chacun des deux produits. La différence de potentiel induite par le témoin et les différents produits (l'heptalactone, l'hexalactone et l'hexane) est significativement différente ($F_{2,57}=5,41$; $P=0,007$). La structuration des moyennes indique que la différence de potentiel produite par l'heptalactone est significativement différente de celle produite par l'hexane. Cependant, celles de l'heptalactone et de l'hexalactone ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre. Il en est de même entre l'hexalactone et l'hexane (Figure 17).

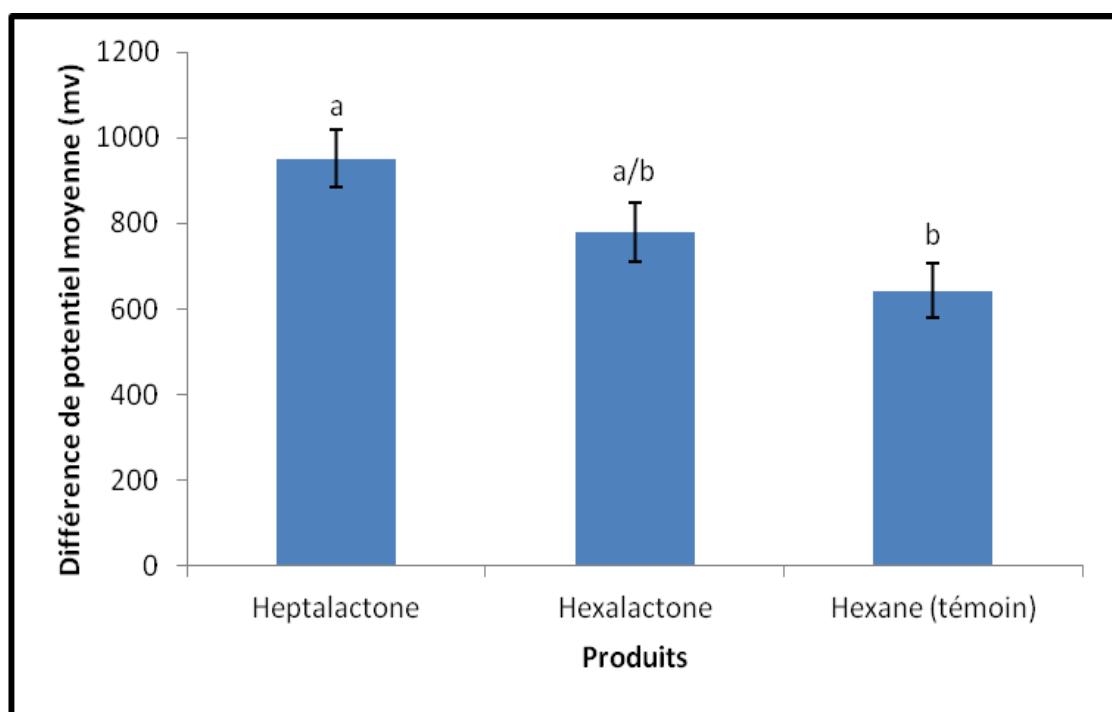


Figure 17 : Différence de potentiel moyenne induite par les différents produits.

1.2 Comparaison de la perception olfactive selon les produits, l'ordre et la concentration

Une analyse de la variance à trois critères a été appliquée afin de vérifier l'impact du produit chimique (heptalactone, hexalactone et hexane), de la concentration (1, 10 et 100 ng/μl), et de l'ordre selon lequel les composés ont été testés sur la différence de potentiel produite par les antennes des mouches. Aucune triple interaction n'est observée ($F_{2,108}=0,15$; $P=0,865$). Il n'y a pas non plus de double interaction entre la position et la concentration ($F_{2,108}=0,24$; $P=0,790$) ni entre le produit et la concentration ($F_{2,108}=0,33$; $P=0,716$). Nous avons donc pu évaluer l'impact de la concentration sur la réponse antennaire : la réponse électrique produite par les antennes de *R. completa* est indépendante de la concentration en lactones testée ($F_{2,108}=1,17$; $P=0,314$).

Par contre, nous avons observé une interaction entre le produit et la position ($F_{1,108}=12,88$; $P<0,001$). Nous avons donc dû décomposer l'analyse, et réaliser deux analyses de la variance à deux critères, une analyse par ordre.

Pour l'ordre 1, qui indique quel produit a été testé en premier, il n'y a pas de double interaction entre le produit et la concentration ($F_{2,54}=0,02$; $P=0,984$). De plus, la structuration des moyennes indique l'absence de différence significative entre les concentrations ($F_{2,54}=0,15$; $P=0,864$) et entre les produits ($F_{1,54}=0,04$; $P=0,835$).

Pour l'ordre 2, qui indique quel produit a été testé en deuxième position, il n'y a pas de double interaction entre le produit et la concentration ($F_{2,54}=0,59$; $P=0,560$). La structuration des moyennes indique l'absence de différence significative entre les concentrations ($F_{2,54}=1,57$; $P=0,218$), mais la présence d'une différence significative entre les produits ($F_{1,54}=29,93$; $P<0,001$).

Nous avons donc pu évaluer l'impact de l'ordre sur les produits. Que l'heptalactone ou l'hexalactone soit testé en premier, nous n'observons pas de différence significative sur la réponse électrique des antennes. Cependant, nous observons un effet du produit testé en deuxième position. Lorsque l'hexalactone est testé après l'heptalactone, celui-ci génère une différence de potentiel significativement plus faible (Figure 18).

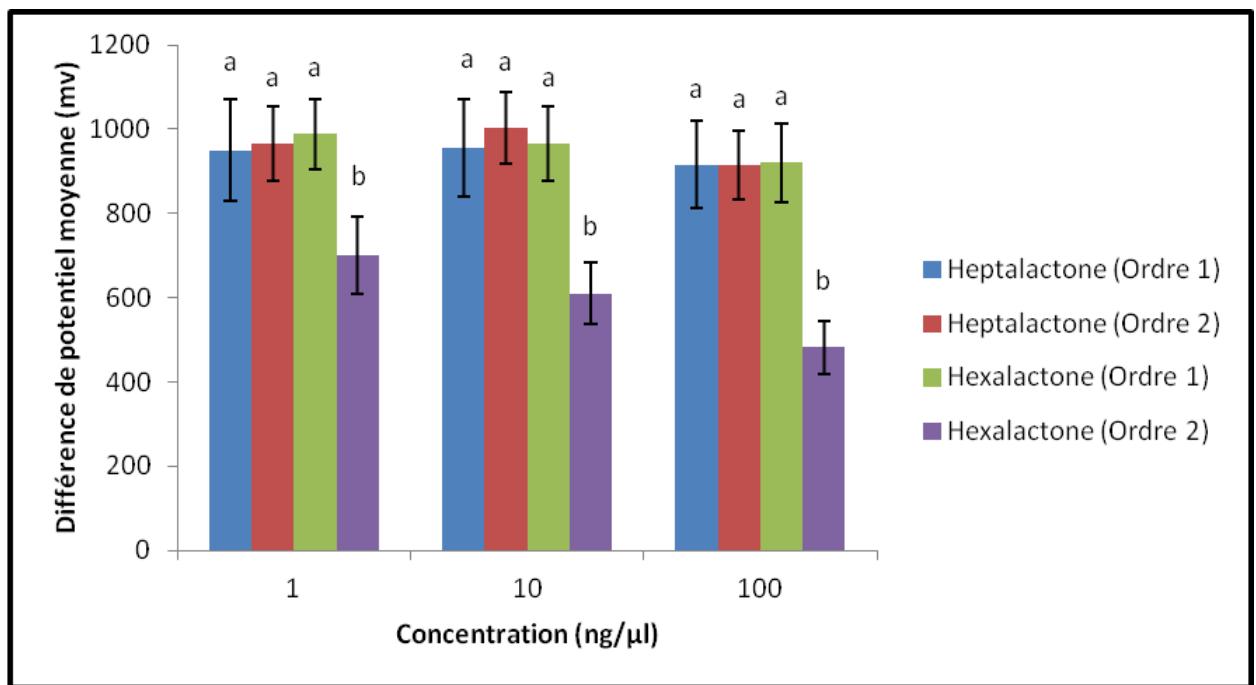


Figure 18 : Différence de potentiel moyenne induite par les différents produits selon la concentration et l'ordre.

Les résultats présentés précédemment cachent la variabilité inter-mouches. Pour visualiser celle-ci, nous avons calculé, pour chaque mouche, la moyenne du témoin et de chacun des deux produits (Figure 19).

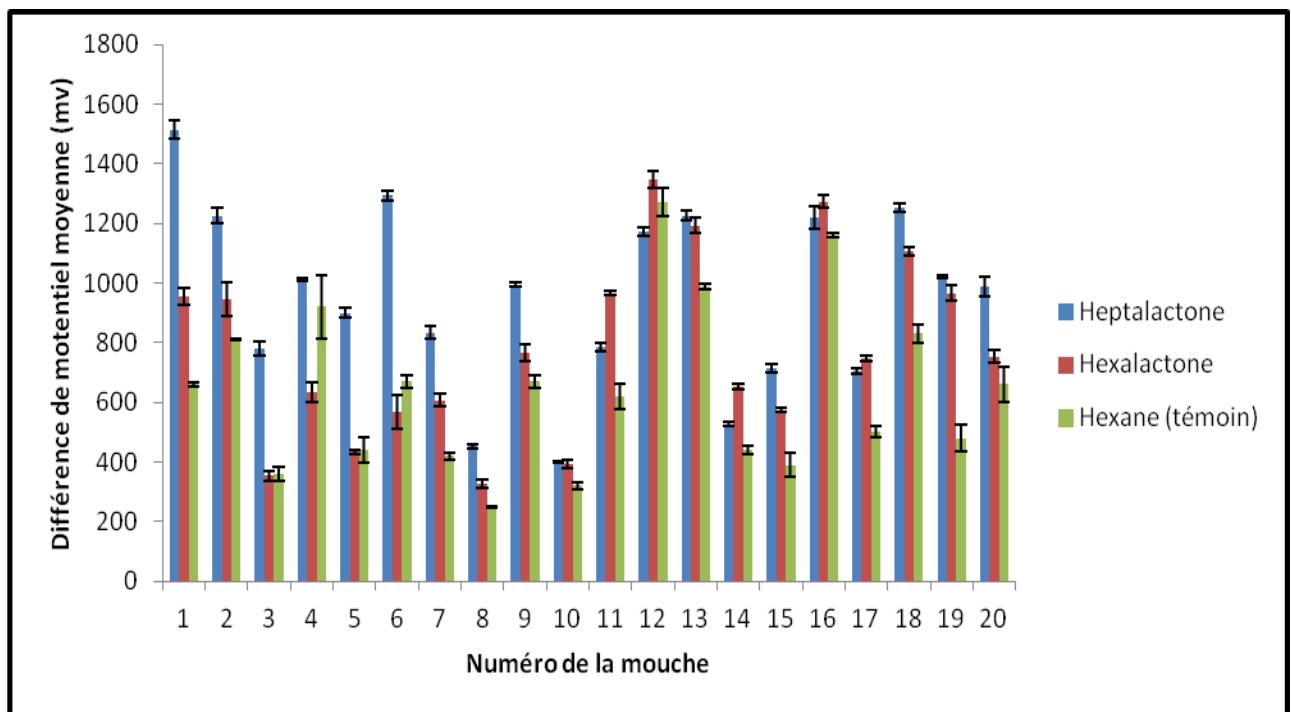


Figure 19 : Réponse électrique moyenne des différents composés et du témoin pour chaque mouche.

2 Objectif spécifique 2 : Analyses comportementales

Le second objectif consistait à développer une méthodologie d'étude du comportement sexuel chez *R. completa* afin de permettre l'évaluation de l'activité biologique des différentes lactones composant la phéromone sexuelle.

2.1 Observation en boîte de Petri assistée par analyse d'images

En boîte de Petri, nous avons comparé le comportement des mouches au sein de quatre dispositifs décrits en page 29. La durée de mouvement, l'activité et la durée de la mobilité ont été évaluées pour chacun d'eux.

La Figure 20 présente les durées moyennes du mouvement selon les 4 dispositifs expérimentés. La mouche est considérée en mouvement lorsque sa vitesse est égale ou dépasse 1 cm/s. Aucune différence de durée moyenne de mouvement n'est mise en évidence entre les dispositifs testés ($F_{3,16}=1,90$; $P=0,170$).

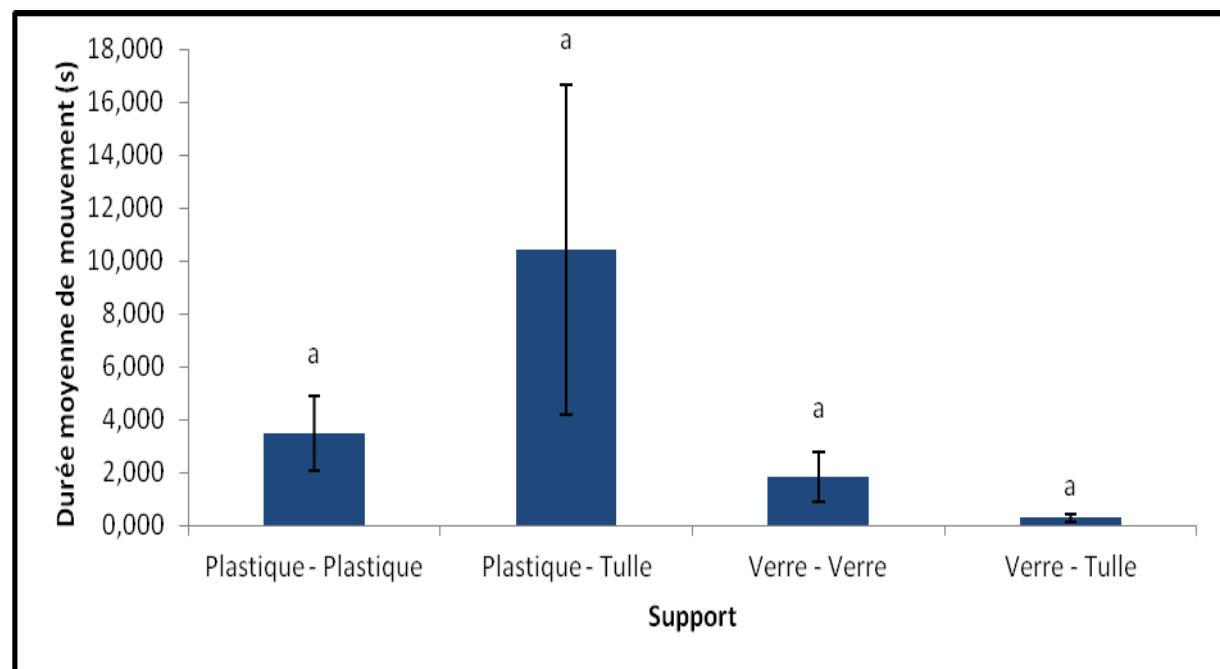


Figure 20 : Durée moyenne du mouvement selon les différents dispositifs.

La Figure 21 présente le pourcentage moyen d'activité selon les 4 dispositifs expérimentés. L'activité représente le pourcentage d'activité de l'arène entière. Aucune différence de pourcentage moyen d'activité n'est mise en évidence entre les dispositifs testés ($F_{3,16}=1,52$; $P=0,248$).

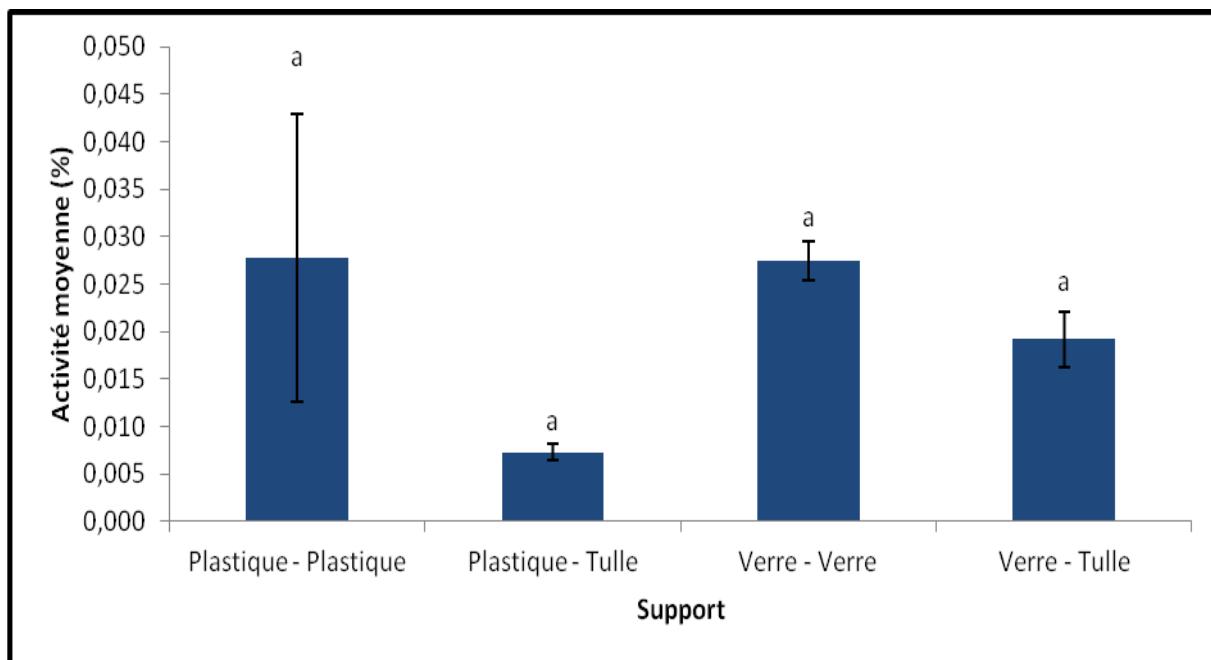


Figure 21 : Pourcentage moyen d'activité selon les différents dispositifs.

La Figure 22 présente le pourcentage moyen de mobilité selon les 4 dispositifs expérimentés. La mobilité calcule l'activité de l'animal même si le point central ne bouge pas (activité des ailes par exemple). Aucune différence de pourcentage moyen de mobilité n'est mise en évidence entre les dispositifs testés ($F_{3,16}=2,74$; $P=0,077$).

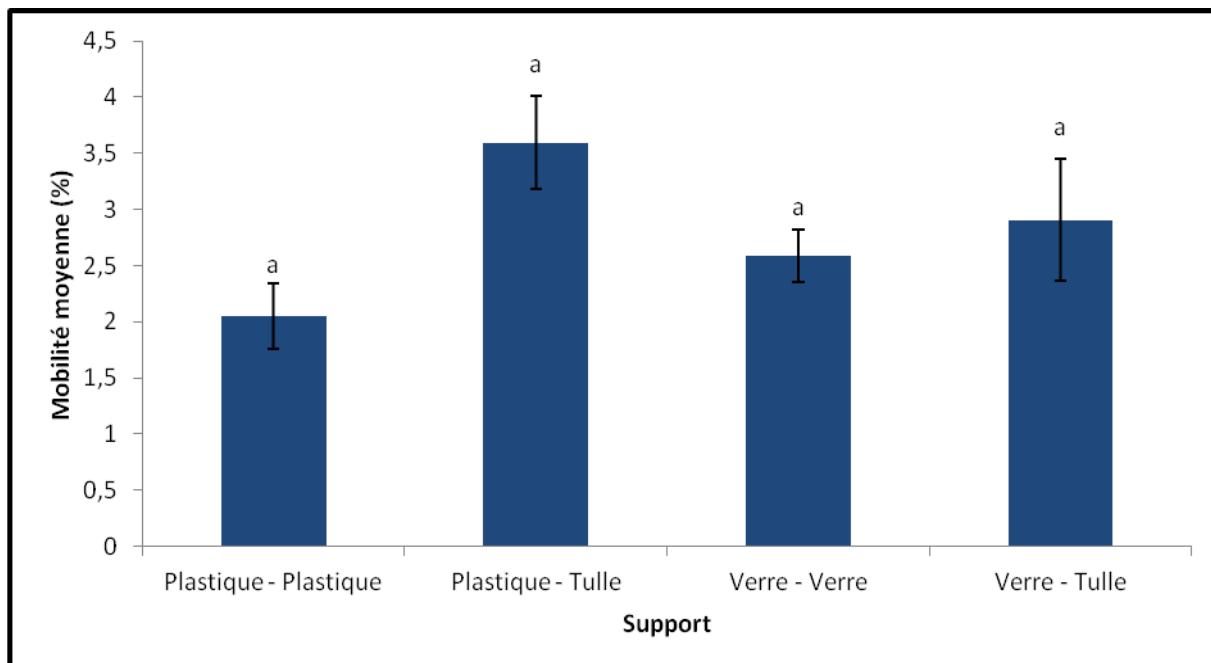


Figure 22 : Pourcentage moyen de mobilité selon les différents dispositifs.

2.2 Tunnel de vol

En tunnel de vol, nous avons étudié l'impact des mouches mâles sur le comportement des mouches femelles. Nous avons recensé le nombre de femelles présentes dans chacune des 3 zones décrites à la page 30.

La Figure 23 présente l'évolution dans le temps du nombre moyen de mouches selon les 3 zones étudiées. Il n'y a pas de double interaction entre la zone et l'heure ($F_{16,162}=1,16$; $P=0,308$). Nous avons donc pu évaluer l'impact de la zone et de l'heure sur le nombre de mouches présentes dans chaque zone : le nombre de mouches dans chaque zone est indépendant de la zone ($F_{2,162}=0,22$; $P=0,800$) et de l'heure ($F_{8,162}=0,00$; $P=1,000$).

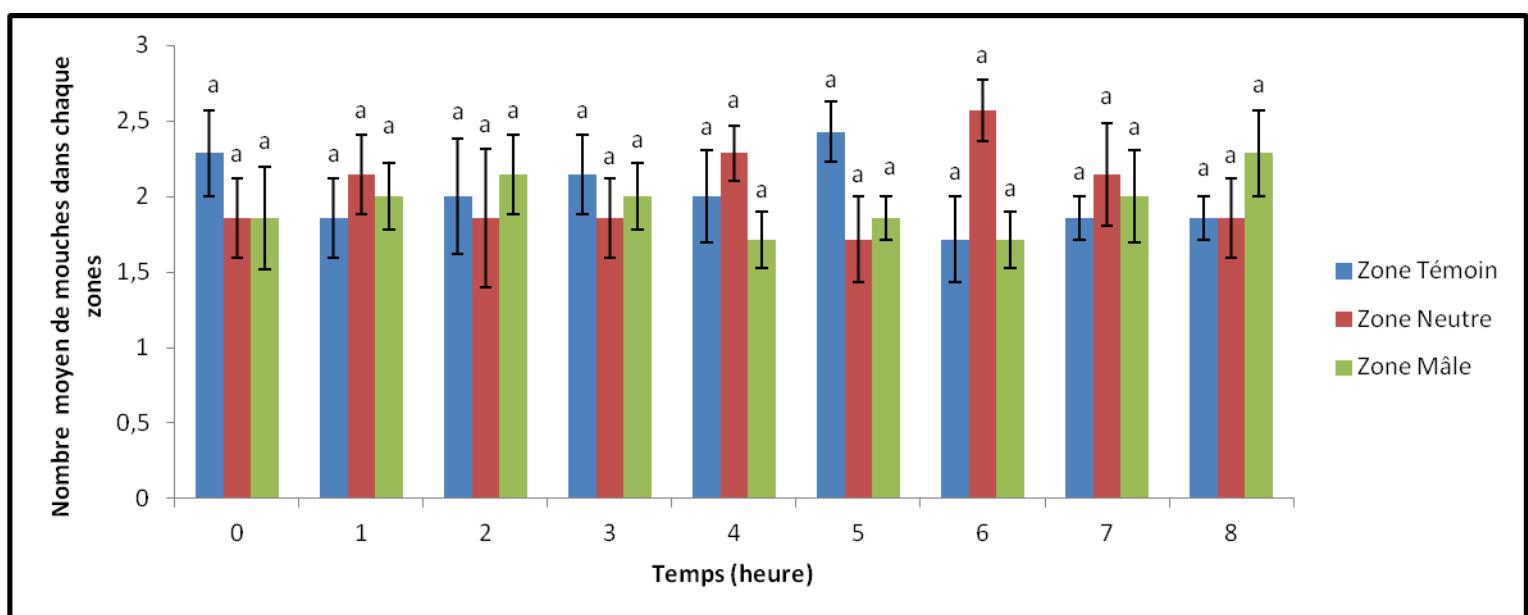


Figure 23 : Évolution dans le temps du nombre moyen de mouches selon les différentes zones étudiées.

3 Objectif spécifique 3 : Dynamique de relargage des lactones

Le troisième objectif consistait en la mise au point d'un dispositif de diffusion des lactones destiné à être appliqué en champs et de vérifier que le dispositif de diffusion est efficace sur une durée de plusieurs semaines.

La Figure 24 présente, pour chaque composé, la quantité de lactone relarguée pendant 24 h durant 26 jours.

La Figure 25 présente, pour chaque composé, la quantité cumulée de lactone relarguée pendant 24 h durant 26 jours. Les mêmes tendances que celles décrites pour la figure 24 sont également observées.

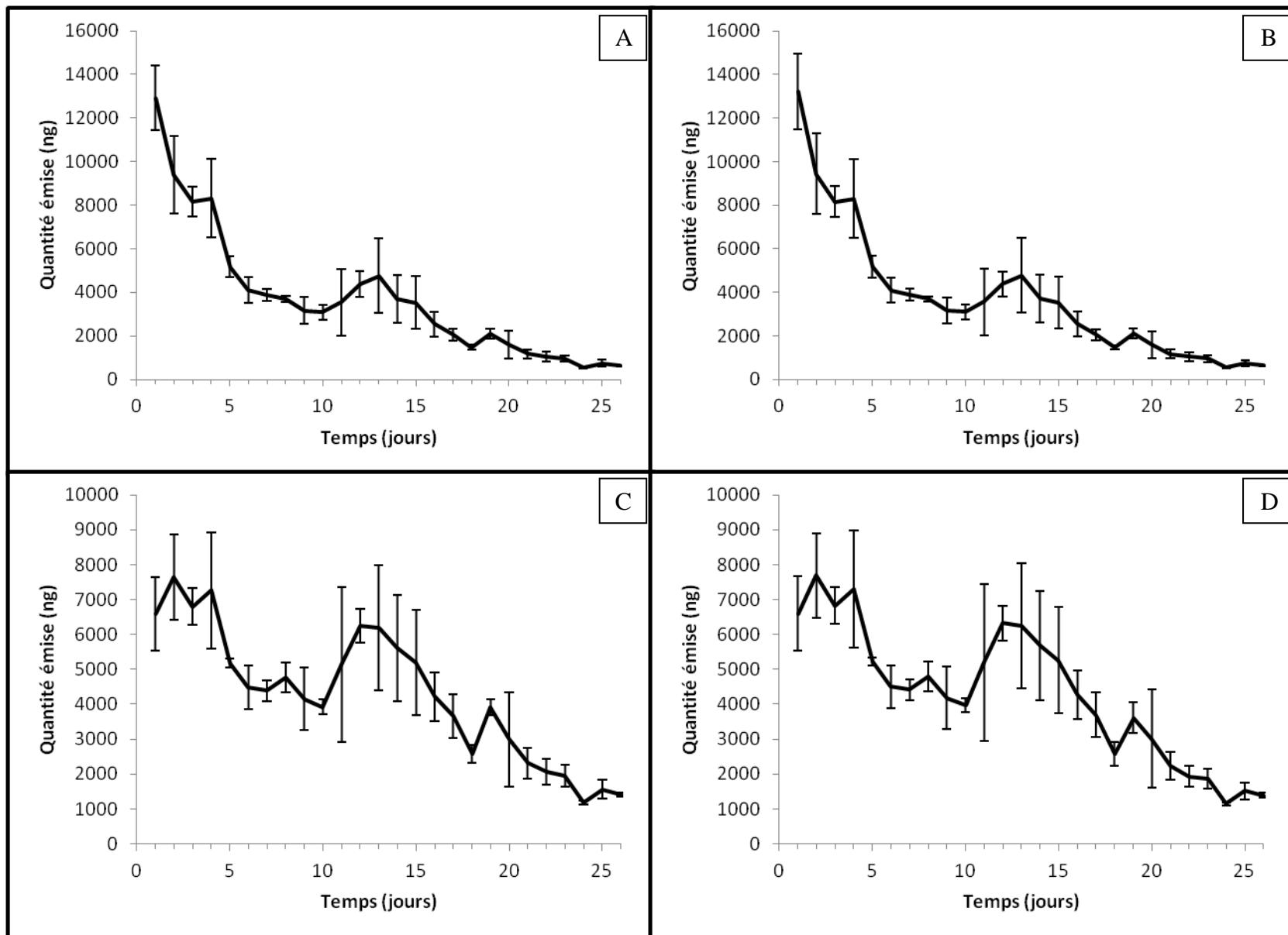


Figure 24 : Quantité de lactone relarguée pendant 24 h durant 26 jours. [A - Hexalactone (S) ; B - Hexalactone (R) ; C - Heptalactone (S) ; D - Heptalactone (R)]

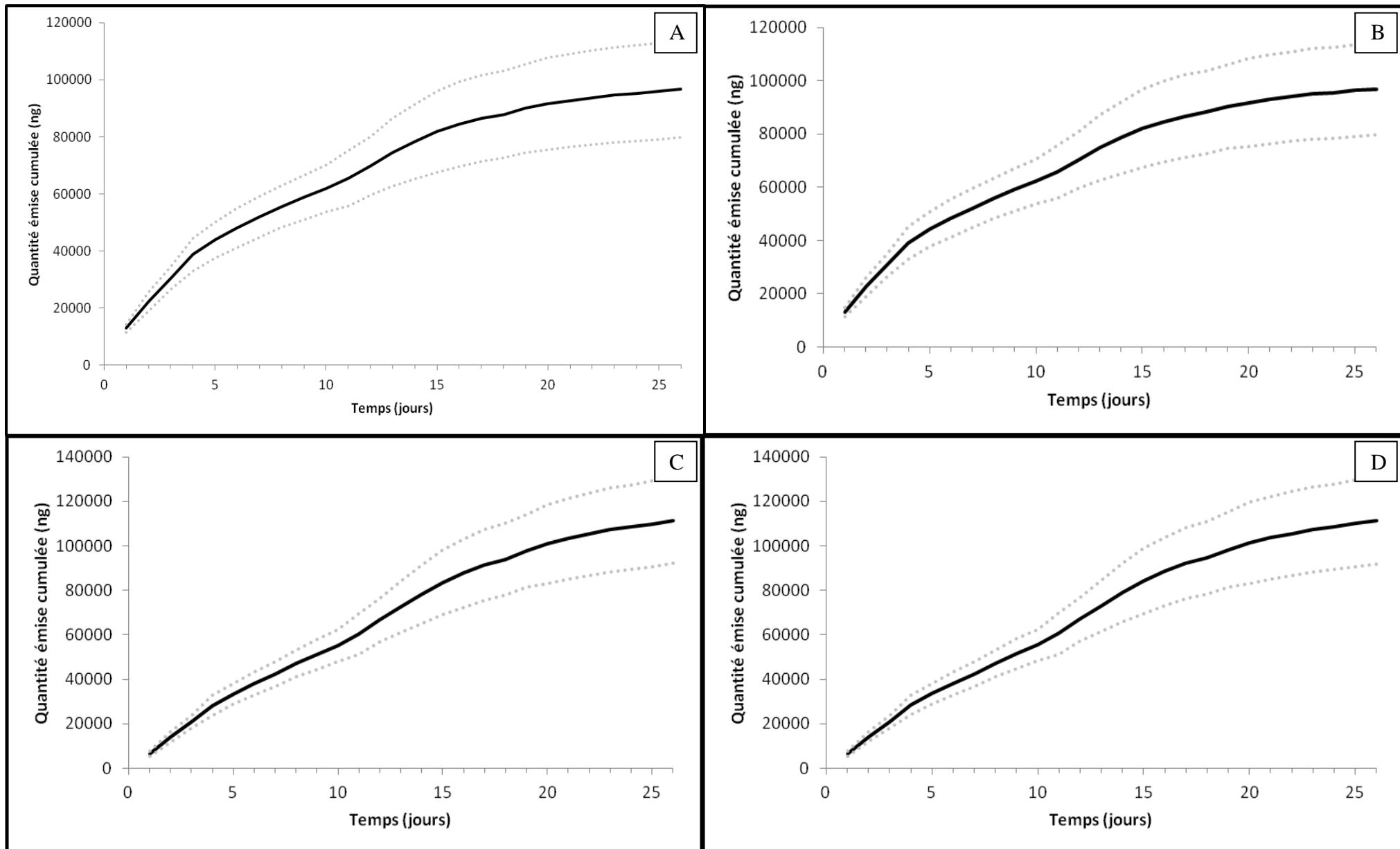


Figure 25 : Quantité cumulée de lactone relarguée pendant 24 h durant 26 jours. [A - Hexalactone (S) ; B - Hexalactone (R) ; C - Heptalactone (S) ; D - Heptalactone (R)]

4 Expérimentations additionnelles

L'objectif de ces expérimentations additionnelles était de savoir si les mâles en fin de vie émettaient encore l'une ou l'autre lactone et si oui, en quelle quantité. Sur les deux lots de mouches analysés avec la technique SPME, seul l'un des lots montre la présence d'un composé recherché. Pour ce lot, seul l'heptalactone semble encore émis par les mouches mâles avant leur mort. La Figure 26 présente la comparaison du temps de rétention de l'heptalactone entre un standard injecté et la fibre SPME analysée au GC. Nous remarquons que les temps de rétention sont presque identiques. Le temps de rétention de l'heptalactone du standard est de 17,311 minutes et celui de la fibre est de 17,291 minutes.

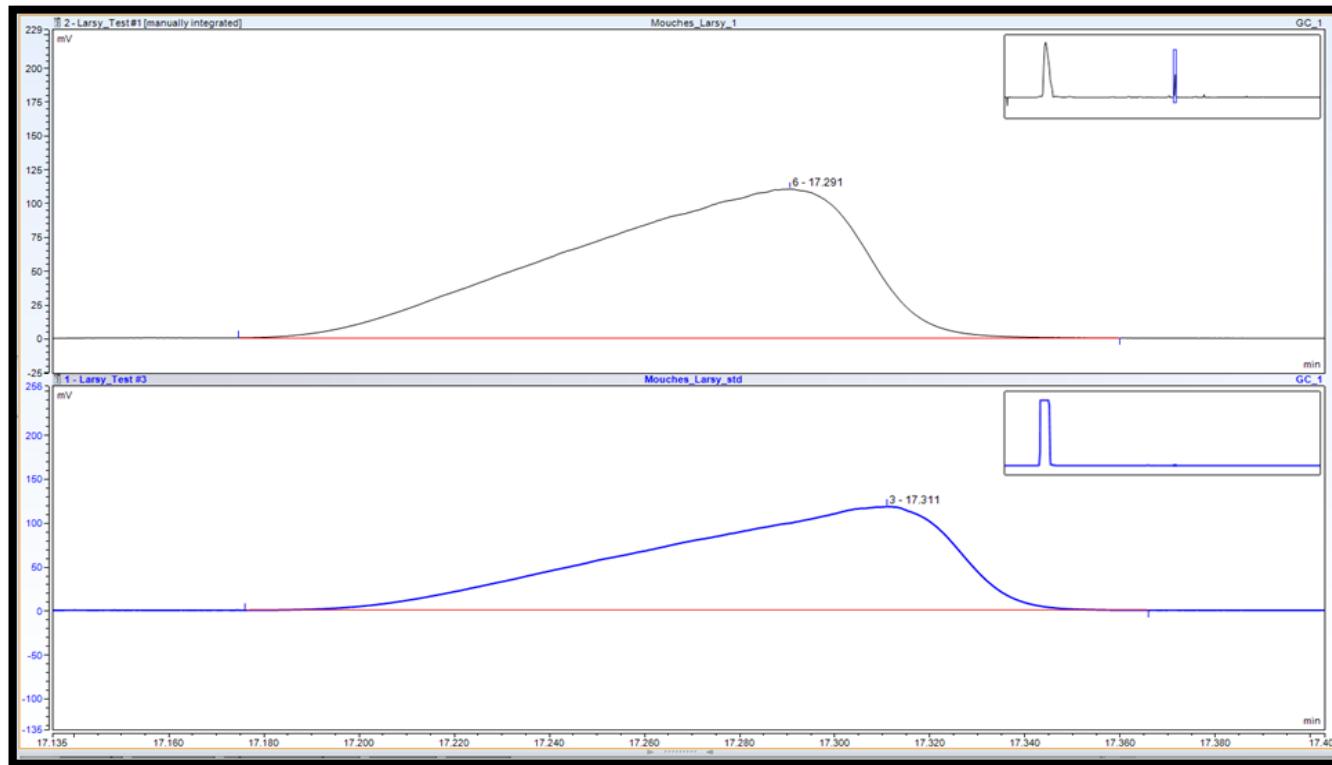


Figure 26 : Comparaison du temps de rétention de l'heptalactone entre un standard injecté et la fibre SPME.

Sur les sept mouches broyées et analysées au GC, seule une mouche semble contenir un composé recherché. La Figure 27 présente la comparaison du temps de rétention de l'heptalactone entre un standard injecté et le liquide extrait du broyat de mouche analysé au GC. Nous remarquons que les temps de rétention sont proches. Le temps de rétention de l'heptalactone du standard est de 17,311 minutes et celui du liquide extrait est de 17,207 minutes.

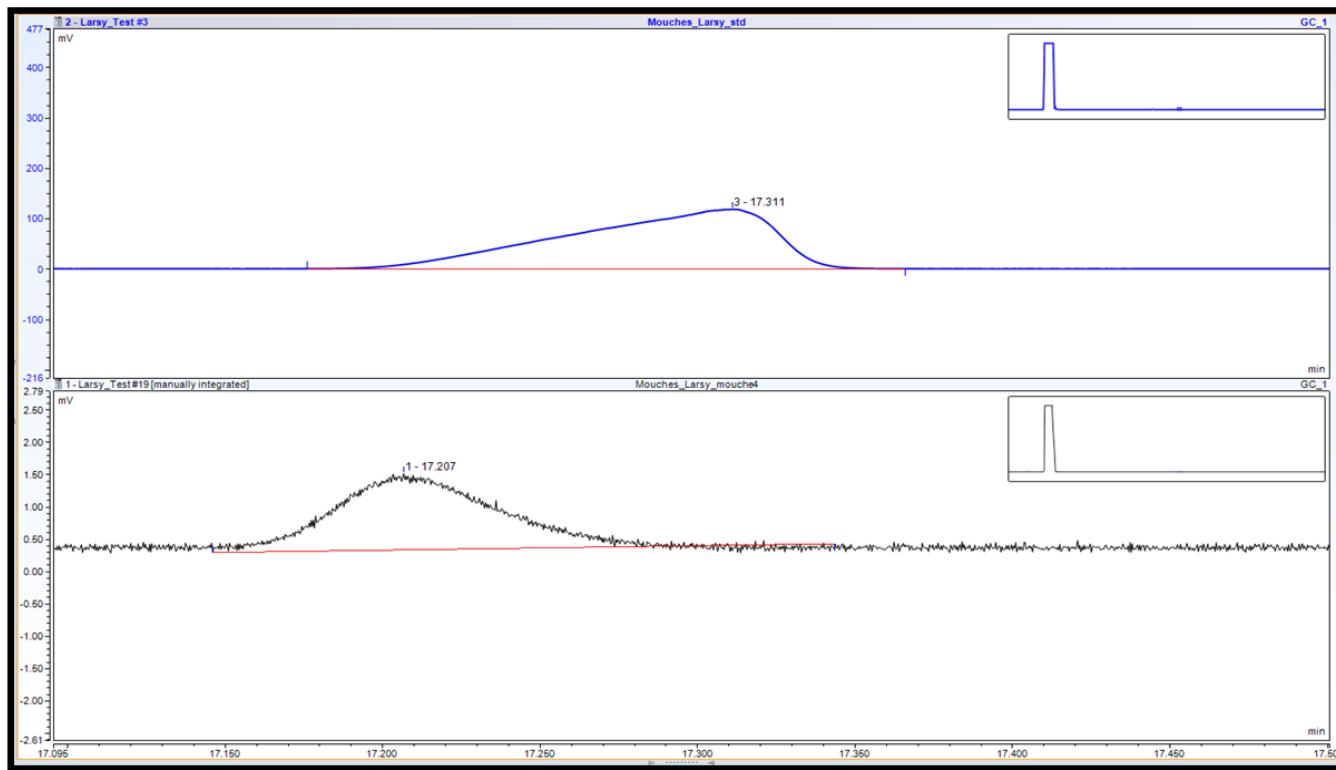


Figure 27 : Comparaison du temps de rétention de l'heptalactone entre un standard injecté et le liquide extrait du broyat de mouche.

Dans les deux expérimentations, nous ne retrouvons que la présence d'heptalactone. L'aire du pic standard équivaut à une quantité de 200 ng d'heptalactone. Pour l'analyse SPME, l'aire du pic équivaut à une quantité approximative de 178,5 ng d'heptalactone pour un lot de 4 mouches pendant 24 h. L'aire du pic pour le liquide extrait indique que la mouche contient approximativement une quantité de 13,54 ng d'heptalactone en elle.

Discussion

1 Objectif 1 : Perception olfactive

L'antenne des insectes est l'organe principal responsable de la chimioréception et de la transduction des stimuli olfactifs. Fonctionnellement, les antennes servent d'interface entre les odeurs environnementales et le comportement des insectes (Tan *et al.*, 2014). Les antennes des diptères supérieurs, y compris les Tephritidae, sont particulièrement propices à l'analyse EAG (Tan *et al.*, 2014). Cependant, le rapport entre la réponse comportementale et l'amplitude de la réponse EAG n'est pas toujours clair (Cha *et al.*, 2008). Les résultats de l'électroantennographie ont montré que l'heptalactone et l'hexalactone semblent être globalement captés différemment par rapport au témoin (hexane). Néanmoins, selon l'ordre d'application des produits, la réponse électrique diffère selon les composés. L'heptalactone fournit une réponse électrique semblable, peu importe son ordre d'application. Par contre, on observe que l'hexalactone fournit une réponse électrique différente selon son ordre d'application. Sa réponse électrique est plus faible lorsqu'il est injecté en seconde position, après l'heptalactone.

L'hypothèse principale qui peut justifier cette réponse réside dans l'activité des protéines de liaison odorante (OBP). Pour les animaux terrestres, la plupart des odeurs sont des molécules hydrophobes qui doivent être transportées au travers d'un milieu aqueux, la lymphe sensillaire chez les insectes, pour atteindre les récepteurs olfactifs. Afin de réaliser ce transport à travers cette barrière hydrophile, les protéines de liaison odorantes aident à capturer et à transporter les phéromones jusqu'aux récepteurs (Pelosi & Maida, 1990; Vogt *et al.*, 1985). Ces protéines sont petites, solubles dans l'eau et localisées dans le fluide entourant la dendrite sensorielle. Elles représentent une adaptation majeure de l'évolution du système olfactif (Vogt *et al.*, 1991). Chez les insectes, elles sont très abondantes (plus de 10mM) dans le lymphome des antennes (Klein, 1987). De plus, la grande quantité d'énergie mobilisée par l'insecte afin de synthétiser ces protéines ne peut se justifier que par un large bénéfice pour l'insecte. En effet, les insectes vivent souvent avec une balance énergétique critique (Litwack, 2010). Une fois la phéromone transmise, elle est dégradée par des estérases sensillaires spéciales (Ishida & Leal, 2008; Vogt *et al.*, 1985). Les protéines de liaison odorante sont alors de nouveau disponibles.

Comme l'heptalactone et l'hexalactone sont des molécules structurellement proches, il est raisonnable d'imaginer qu'elles utilisent les mêmes OBP. De plus, il se peut que pour l'un des produits, l'action des estérases sensillaires soit plus rapide, rendant disponibles plus rapidement les OBP utilisées. En effet, les processus cellulaires et physiologiques comme les mécanismes de la régulation temporelle à médiation hormonale des composants protéiques comprenant le système olfactif périphérique n'ont pas encore été étudiés chez les Tephritidae. Ces protéines comprennent les récepteurs olfactifs transmembranaires eux-mêmes ainsi qu'une variété de constituants de protéines solubles comme les protéines liant les odorants, les protéines chimiosensorielles et les enzymes qui éliminent les odorants actifs de la membrane dendritique (de Bruyne & Baker, 2008).

On pose alors l'hypothèse que pour l'heptalactone, l'action des estérases est lente, mettant plus de temps à rendre ces OBP disponibles pour l'hexalactone. C'est la raison pour laquelle, quand l'hexalactone est injecté en deuxième position, les OBP utilisées pour l'heptalactone ne seraient pas encore disponibles. Le nombre de molécules transmises est donc réduit et la réponse électrique est plus faible. En effet, la réponse électrique totale représente la sommation de potentiels électriques de multiples récepteurs présents sur la longueur de l'antenne (Tan *et al.*, 2014). Pour l'hexalactone, l'action des estérases serait plus rapide. Ce serait la raison pour laquelle, lorsqu'il est injecté en premier, l'hexalactone libérerait plus rapidement ces OBP et les molécules transmises seraient plus nombreuses, fournissant une réponse électrique plus importante.

Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait réaliser à nouveau l'expérimentation tout en laissant un temps plus important entre les différentes injections. Cela permettrait de laisser plus de temps à l'action des estérases et ainsi d'augmenter le nombre d'OBP disponibles. On pourrait alors vérifier si la réponse électrique plus faible de l'hexalactone est bien due à la disponibilité de ces protéines.

Un autre facteur qui possède une grande importance en électroantennographie est l'âge des individus testés. En effet, des analyses comparatives utilisant des mouches femelles d'âges connus et des doses fixes d'ammoniac et de dioxyde de carbone ont révélé que la réponse EAG n'était pas statique, mais variait selon l'âge et le stade de maturité. Dans cette étude, une réponse EAG maximale à l'ammoniac a été observée chez les femelles immatures de 4 à 6 jours alors que la réponse EAG de pointe au dioxyde de carbone s'est produite chez les femelles sexuellement matures, de 10 à 12 jours. Une autre conclusion de cette étude était que les femelles immatures, qui présentaient une réponse EAG plus forte à l'ammoniac, étaient également plus sensibles à la dose d'ammoniac dans les essais en tunnel de vol. Cependant, à des doses plus élevées, l'ammoniac est devenu répulsif chez les femelles immatures et beaucoup moins furent capturées par rapport aux femelles mûres. Par conséquent, une réponse EAG forte doit être interprétée avec prudence, car ce n'est pas nécessairement un indicateur d'attraction. Le dépistage EAG doit toujours être complété par des essais biologiques appropriés pour déterminer la réponse comportementale (Kendra *et al.*, 2005).

Dans le cas présent, les expérimentations ont été réalisées avec des mouches femelles d'un âge relativement semblable (variabilité maximale de 30 jours). De plus, la méthode ne permet pas de mettre en avant l'influence du facteur âge. En effet, 5 mouches ont reçu l'heptalactone avant l'hexalactone puis 5 autres mouches ont reçu l'ordre inverse. Cela fut ensuite répété une seconde fois.

Par réflexion, d'autres hypothèses pourraient aussi jouer un rôle dans la variation de réponse électrique. La standardisation du montage par exemple. En effet, la majorité des sensilles olfactives sont situées sur le troisième segment élargi de l'antenne (Shanbhag *et al.*, 2000). Si le montage n'est pas toujours effectué de la même manière, les réponses électriques peuvent varier. Par exemple, si les antennes sont recouvertes de solution saline, l'accès aux récepteurs peut être bloqué. Ici, l'hypothèse d'utilisation d'un modèle standard peut être considérée, vu le nombre de répétitions et d'essais préliminaires.

Un autre facteur pourrait être les conditions environnementales variables. En effet, des variations de température ou la présence de substances volatiles dans l'air pourraient modifier la réponse électrique. Ici, la salle d'expérimentation a été aérée et la température maintenue à plus ou moins +20°C.

La volatilité des composés pourrait également jouer un rôle. En effet, si un composé est plus volatil qu'un autre, le temps d'évaporation sous hotte doit être adapté. Néanmoins, les produits ici testés sont deux lactones et on peut donc estimer qu'ils ont la même volatilité.

Enfin des problèmes morphologiques des antennes ont été observés sur les insectes. La dégradation des antennes comme la perte d'article par exemple, pourrait expliquer la variabilité de la réponse antennaire. Cependant, les mouches avec des dégradations macroscopiques n'ont pas été utilisées. Le risque d'avoir expérimenté des mouches présentant des problèmes morphologiques est donc relativement faible.

2 Objectif 2 : Analyses comportementales

2.1 Observation en boite de Petri assistée par analyse d'images

Les résultats des observations en boite de pétri assistées par analyse d'images n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les différents dispositifs testés, et ce pour les 3 paramètres étudiés (mouvement, activité et mobilité). De plus, les valeurs observées restent dans des intervalles très faibles. Pour le mouvement, la moyenne la plus élevée représente 10,4 secondes sur un total de 1800 secondes. Le pourcentage d'activité moyen le plus élevé possède une valeur de 0,027% et le pourcentage de mobilité moyen le plus élevé représente 3,6%. De même, les erreurs standards sont relativement élevées, c'est pour cette raison également qu'il n'y a pas de différence significative entre les 4 dispositifs.

L'hypothèse principale pour expliquer l'absence de déplacement/mouvement des insectes repose sur l'âge des mouches. Comme expliqué précédemment, l'âge peut influencer l'émission et la réception de phéromone. Ici, les mouches étaient déjà très âgées (plusieurs mois). Il se peut donc que les femelles ne captent plus les phéromones et/ou que les mâles ne les émettent plus. En effet, l'accouplement survient 6 à 8 jours après émergence (Verheggen *et al.*, 2016). Il est raisonnable de penser que c'est durant une période de temps d'une à deux semaines que les insectes sont les plus aptes à émettre et à capter les phéromones.

Une autre hypothèse est le type de support. Les insectes seraient-ils plus sensibles au verre ou au plastique ?

Des études comportementales avec le logiciel EthoVision ont déjà été réalisées pour certaines mouches comme les drosophiles par exemple. Dans cette étude, ils ont utilisé des individus mâles et femelles âgés de 4 jours. Le support était constitué de deux plaques en verre avec présence d'une lampe. Les résultats ont montré que les femelles passaient environ 80% de leur temps en activité contre 65% pour les mâles (Martin, 2004).

Comme le dispositif de l'étude donnait de bons résultats, un support en verre fut utilisé dans un premier temps. Néanmoins, les résultats ne furent pas convaincants. Tout en gardant à l'esprit que l'âge trop avancé des mouches était sûrement la raison principale de cette absence d'activité, d'autres supports furent alors testés afin d'éliminer l'hypothèse relative à la matière constituant le support. Comme aucun dispositif ne semble être plus adapté qu'un autre, l'hypothèse de l'âge trop avancé des mouches utilisées semble donc plus que plausible.

Dans le futur, il serait intéressant de réaliser l'expérience avec des individus beaucoup plus jeunes. De plus, il faudrait également augmenter la durée des vidéos. En effet, il a été montré que l'activité évolue au cours du temps et qu'elle est plus importante après plusieurs heures (Martin, 2004).

2.2 Tunnel de vol

Les mêmes hypothèses que celles formulées pour les observations en boîte de pétri peuvent être établies pour les expérimentations en tunnel de vol. Aucune différence entre les zones ne fut observée ni entre les heures. Une fois de plus, l'âge trop avancé des individus mâles et femelles a plus que sûrement joué un rôle.

3 Objectif 3 : Dynamique de relarguage des lactones

Les adultes émergent du sol de début juillet à fin août, avec un pic d'émergence entre la fin de juillet et le début d'août (Verheggen *et al.*, 2017). La durée d'émergence totale représente donc environ une soixantaine de jours. La question à se poser est : qu'elle est la durée pendant laquelle les diffuseurs doivent être efficaces ? Faut-il que la diffusion soit réalisée pendant toute l'émergence ou une diffusion ciblée pendant le pic d'émergence est suffisante ? Selon l'utilité des diffuseurs (mating disruption, monitoring, piégeage massif...), l'efficacité demandée du diffuseur ne sera pas la même. Pour le mating disruption, un suivi sur toute la saison semble nécessaire et donc une diffusion sur une période de deux mois. La dynamique a pour but de connaître la durée d'efficacité du diffuseur et donc de pouvoir prévoir le remplacement des diffuseurs durant la saison pour garder une efficacité optimale. De plus, cela permet aussi de prévoir le coût associé puisque, plus le diffuseur possède une efficacité dans le temps et moins il faudra le remplacer.

Ensuite, il faudra déterminer le nombre de diffuseurs nécessaire par surface, ainsi que la quantité de composés à appliquer. Il faudra également prendre en compte la région dans laquelle la lutte sera appliquée. Selon les régions et les climats, on observe des différences entre les degrés-jours. La date de début des émergences pourra donc changer et la durée d'émergence pourra être plus étendue ou plus courte selon les différentes régions du globe. En effet, déjà entre deux zones d'une même région (une zone légèrement montagneuse et une vallée) des écarts de deux semaines entre le début des émergences sont déjà observés.

Les résultats de la dynamique de relargage des lactones ont montré que les courbes d'émission se ressemblent fortement pour deux énantiomères d'un même composé. Les deux énantiomères de l'hexalactone sont émis dans un premier temps, en plus grande quantité que les énantiomères de l'heptalactone. Ensuite, la tendance s'inverse et, sur le long terme, ce sont les énantiomères de l'heptalactone qui sont relargués en plus grande quantité. Il faut toute fois remarquer que les erreurs standards sont généralement plus importantes pour les énantiomères de l'heptalactone.

Il me semble plus judicieux de viser l'entièreté de la période d'émergence afin de réduire au maximum les dégâts. Dans ce cas, l'heptalactone semble le mieux adapté car celui-ci est émis certes en plus faible quantité au début, mais il sera émis en plus grande quantité sur le long terme. L'utilisation de l'hexalactone peut s'avérer utile si, par exemple, les émergences se manifestent plus rapidement que prévu. L'hexalactone se diffusant plus rapidement, il sera alors plus efficace. Néanmoins, il faut que les mouches soient attirées par les deux composés de manières distinctes. S'il faut une combinaison des deux composés pour avoir attraction, alors l'utilisation d'un composé sans l'autre ne donnera aucun résultat. Ensuite, la quantité émise nécessaire pour avoir attraction n'est pas connue. Il se peut donc que même si l'heptalactone est émis en plus grande quantité, cela puisse ne pas avoir d'effet. Une émission forte ou faible n'indique pas une forte ou faible attraction. Cependant, une quantité émise plus importante peut favoriser un rayon d'attraction autour du diffuseur plus élevé.

D'autres expérimentations permettront de savoir si l'attraction résulte de l'action d'un seul composé ou d'une interaction entre ces deux produits.

4 Expérimentations additionnelles

Les résultats obtenus par technique SPME montrent qu'un seul des deux produits est encore émis par les mâles en fin de vie. En effet, le temps de rétention observé du composé correspond au temps de rétention d'un standard d'heptalactone. De même, le broyat de mouche relève également ce composé en admettant qu'il s'agisse bien de l'heptalactone, les temps de rétention n'étant pas exactement identiques. Dans les deux cas, l'hexalactone est complètement absent.

La seule présence de ce composé amène plusieurs hypothèses. Il est important de garder à l'esprit l'hypothèse selon laquelle les femelles sont trop âgées pour encore capter ces composés. Néanmoins, si les femelles peuvent encore réagir aux phéromones, l'absence d'hexalactone pourrait montrer soit que l'heptalactone n'est pas le composé intervenant dans l'attraction des femelles par les mâles ou encore, que pour avoir attraction, cela résulte peut être d'une combinaison des deux composés. Cependant, sur les 7 mâles broyés, un seul semble encore contenir de l'heptalactone. Il se peut donc que dans les tests comportementaux réalisés l'ensemble des mâles n'émettait plus rien. Dans tous les cas, on peut dire que la quantité d'heptalactone est relativement faible.

Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail était de fournir des résultats pour permettre le développement et la poursuite d'une recherche appliquée visant la mise en place d'une méthode de lutte par confusion sexuelle en verger de noyers. L'électroantennographie a démontré que les lactones identifiées comme étant les composantes principales de la phéromone sexuelle mâle étaient captées par le système olfactif de l'insecte. Néanmoins, d'autres expérimentations devraient être réalisées pour améliorer nos connaissances de ces lactones. Il faudrait, dans un premier temps, augmenter le temps entre les injections afin de vérifier l'action des OBP. Dans ce travail, ce sont les mélanges racémiques de ces lactones qui ont été testés. Il serait également intéressant de tester les différents énantiomères de chacune des lactones.

Malheureusement, les problèmes rencontrés avec l'élevage n'ont pas permis de réaliser les différentes études comportementales avec le matériel biologie le plus adapté. En effet, à cause de l'âge trop avancé des insectes, les résultats obtenus n'ont pas permis de visualiser l'effet des mâles sur le comportement des femelles. Maintenant que les connaissances quant à l'utilisation du programme EthoVision se sont améliorées, il faudrait recommencer les expérimentations avec des mouches plus jeunes. L'utilisation de boîtes de Petri en verre me semble plus adaptée étant donné les bons résultats obtenus selon la littérature. La durée des vidéos devrait elle être augmentée.

L'étude de la dynamique de relargage des lactones a permis de quantifier l'efficacité des diffuseurs dans le temps. Des expérimentations futures permettant de quantifier la quantité de lactone nécessaire à l'attraction devraient être réalisées.

La lutte sémiologique par confusion sexuelle représente une alternative concrète à la lutte chimique et les expérimentations en laboratoire sont nécessaires. Elle a déjà fait ses preuves pour la lutte contre d'autres insectes ravageurs comme *Cydia pomonella*. Néanmoins, l'utilisation de phéromones sexuelles pour la lutte intégrée reste un défi. En effet, un mélange de phéromones peut présenter des résultats très positifs au laboratoire, mais n'avoir aucune activité efficace dans des conditions naturelles où les insectes sont soumis à un très grand nombre de substances sémiologiques différentes. La réalisation d'un mélange sémiologique capable d'être plus fort que les émissions naturelles est donc un défi important (Smart *et al.*, 2014).

Références bibliographiques

- Agreste, Ctifl, & INTERFEL. (2012). Fruits à coque : Noix. *Fiches Produits FNPF*, (Enquête 2007).
- Alston, D., Murray, M., & Barnhill, J. (2015). Walnut husk fly (*Rhagoletis completa* Cresson). *Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory*, 173(14), 1–7.
- Angot, J.-L. (2009). Décrets, arrêtés, circulaires. *Journal Officiel de La République Française*.
<http://doi.org/10.1051/dmbd/120108>
- ANSES. (2014). Demande d'analyse de risque phytosanitaire portant sur *Rhagoletis completa*.
- Benelli, G., Daane, K. M., Canale, A., Niu, C. Y., Messing, R. H., & Vargas, R. I. (2014). Sexual communication and related behaviours in Tephritidae: Current knowledge and potential applications for Integrated Pest Management. *Journal of Pest Science*, 87(3), 385–405.
<http://doi.org/10.1007/s10340-014-0577-3>
- Berry, F. H. (1997). Walnut Anthracnose. Retrieved from
https://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/fidls/walnut_anthr/wal_anthr.htm
- Boyce, A. M. (1931). The diapause phenomenon in insects, with special reference to *Rhagoletis completa* Cress. (Diptera: Trypetidae). *Journal of Economic Entomology*, 24(5), 1018–1024.
- Boyce, A. M. (1934). Bionomics of the Walnut husk fly, *Rhagoletis completa*. *Hilgardia*, 8(11), 363–579.
- Bush, G. L. (1966). The Taxonomy, Cytology, and Evolution of the Genus *Rhagoletis* in North America (Diptera, Tephritidae). *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 134, 431–526.
- CABI. (2016). Invasive Species Compendium. Retrieved from <http://www.cabi.org>
- Cha, D. H., Nojima, S., Hesler, S. P., Zhang, A., Linn, C. E., Roelofs, W. L., & Loeb, G. M. (2008). Identification and field evaluation of grape shoot volatiles attractive to female grape berry moth (*Paralobesia viteana*). *Journal of Chemical Ecology*, 34(9), 1180–1189.
<http://doi.org/10.1007/s10886-008-9517-0>
- Charmillot, P. J., Pasquier, D., Perro, J., & Widmer, T. F. (2007). 25 ans de lutte par confusion contre le carpocapse *Cydia pomonella* dans un verger à Allaman. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 39(4), 237–243.

- Coates, W. (2006). Walnut husk fly: varietal susceptibility and quality observations. *Walnut Research Reports 2005*, (location 2), 1–4. Retrieved from http://walnutresearch.ucdavis.edu/2005/2005_157.pdf
- Ctifl. (2011a). Connaissance et maîtrise de la bactériose du Noyer. *Le Point Sur Les Maladies et Ravageurs*, 1, 1–8.
- Ctifl. (2011b). Connaissance et maîtrise de la mouche du Brou du Noyer. *Le Point Sur Les Maladies et Ravageurs*, 2, 1–8.
- Ctifl. (2014). Etude du marché de la noix.
- De Bruyne, M., & Baker, T. C. (2008). Odor detection in insects: Volatile codes. *Journal of Chemical Ecology*, 34(7), 882–897. <http://doi.org/10.1007/s10886-008-9485-4>
- Draft ISPM. (2005). International standards for phytosanitary measures, requirements for the establishment and maintenance of pest free areas for tephritid fruit flies, 1–34.
- Duso, C., & Lago, G. D. (2006). Life cycle, phenology and economic importance of the walnut husk fly *Rhagoletis completa* Cresson (Diptera: Tephritidae) in northern Italy. *Annales de La Société Entomologique de France*, 42(February 2015), 245–254. <http://doi.org/10.1080/00379271.2006.10700628>
- EPPO. (2017). PQR database. Retrieved from <http://www.eppo.org>
- FAOSTAT. (2014). Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Retrieved from <http://www.fao.org>
- FREDONRA. (2010). Lutte contre la mouche du brou de la noix. Retrieved from <http://www.fredonra.com/filiere-agricole/arboriculture/lutte-mouche-brou-de-la-noix/>
- Guillén, L., Aluja, M., Rull, J., Höhn, H., Schwizer, T., & Samietz, J. (2011). Influence of walnut cultivar on infestation by *Rhagoletis completa*: Behavioural and management implications. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 140(3), 207–217. <http://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01157.x>
- Haniotakis, G., Kozyrakis, M., Fitsakis, T., & Antonidakis, A. (1991). An Effective Mass Trapping Method for the Control of *Dacus Oleae* (Diptera, Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 84(2), 564–569. <http://doi.org/10.1093/jee/84.2.564>

- Ishida, Y., & Leal, W. S. (2008). Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(26), 9076–9080. <http://doi.org/10.1073/pnas.0802610105>
- Katsoyannos, B. (1976). Female Attraction to Males in *Rhagoletis cerasi*. Swiss *Federal Research Station for Arboriculture, Viticulture and Horticulture, CH-8820 Wiedenswil, Switzerland*, 474–476.
- Katsoyannos, B. I. (1982). Male sex pheromone of *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera, Tephritidae): Factors affecting release and response and its role in the mating behavior. *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 94(6409), 187–198.
- Kendra, P. E., Montgomery, W. S., Mateo, D. M., Puche, H., Epsky, N. D., & Heath, R. R. (2005). Effect of age on EAG response and attraction of female *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) to ammonia and carbon dioxide. *Environmental Entomology*, 34(3), 584–590.
<http://doi.org/10.1603/0046-225X-34.3.584>
- Kepenekci, İ., Hazir, S., & Özdem, a. (2015). Evaluation of native entomopathogenic nematodes for the control of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae) larvae in soil. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(1), 74–79. <http://doi.org/10.3906/tar-1403-96>
- Klein, U. (1987). Sensillum-lymph proteins from antennal olfactory hairs of the moth *Antherea polyphemus* (Saturniidae). *Insect Biochemistry*, 17(8), 1193–1204. [http://doi.org/10.1016/0020-1790\(87\)90093-X](http://doi.org/10.1016/0020-1790(87)90093-X)
- Lacey, L. a., & Unruh, T. R. (2005). Biological Control of Codling Moth (*Cydia pomonella*, Lepidoptera: Tortricidae) and Its Role in Integrated Pest Management, With Emphasis on Entomopathogens. *Vedalia*, 12(1), 33–60.
- Light, D. M. (2016). Control and monitoring of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in walnut orchards treated with novel high-load, low-density “meso” dispensers of sex pheromone and pear ester. *Environmental Entomology*, 45(3), 700–707. <http://doi.org/10.1093/ee/nvw017>
- Litwack, G. (2010). Pheromones. In *Vitamins and hormones* (Vol. 83, pp. 1–642).
- Martin, J. R. (2004). A portrait of locomotor behaviour in *Drosophila* determined by a video-tracking paradigm. *Behavioural Processes*, 67(2), 207–219. <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2004.04.003>

Ostojic, I., Zovko, M., & Petrovic, D. (2014). First record of walnut husk fly *Rhagoletis completa* (Cresson, 1929) in Bosnia and Herzegovina. *Works of the Faculty of Agriculture University of Sarajevo*, 59(64(1)), 121–126.

Papaj, D. R. (1994). Oviposition site guarding by male walnut flies and its possible consequences for mating success. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34(3), 187–195.
<http://doi.org/10.1007/BF00167743>

Pelosi, P., & Maida, R. (1990). Odorant-binding proteins in vertebrates and insects: similarities and possible common function. *Chemical Senses*, 15(2), 205–215.
<http://doi.org/10.1093/chemse/15.2.205>

Riedl, H., & Hislop, R. (1985). Visual attraction of the walnut husk fly (Diptera: Tephritidae) to color rectangles and spheres. *Environmental Entomology*, 14(6), 810–814.

Riedl, H., & Hoying, S. a. (1981). Evaluation of trap designs and attractants for monitoring the walnut husk fly, *Rhagoletis completa* Cresson (Diptera, Tephritidae). *Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*, 91(5), 510–520.

Samietz, J., Schwizer, T., Höhn, H., Linder, C., Aluja, M., & Guillén, L. (2012). Noircissement des noix dû aux mouches et aux maladies: importance du choix variétal. *Revue Suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 44(2), 88–93. Retrieved from
http://www.revuevitiarbohorti.ch/artikel/2012_02_f_270.pdf

Sarles, L., Boullis, A., Fassotte, B., Lognay, G., Verhaeghe, A., Francis, F., & Verheggen, F. J. (2017). Identification of walnut husk (*Juglans regia* L.) volatiles and the behavioral response of the invasive Walnut Husk Fly, *Rhagoletis completa* Cresson. <http://doi.org/10.1002/ps.4584>

Sarles, L., Verhaeghe, A., Francis, F., & Verheggen, F. J. (2015). Semiochemicals of *Rhagoletis* fruit flies: Potential for integrated pest management. *Crop Protection*, 78, 114–118.
<http://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.09.001>

Shanbhag, S. ., Müller, B., & Steinbrecht, R. . (2000). Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster*. *Arthropod Structure & Development*, 29(1999), 211–229.
[http://doi.org/10.1016/S1467-8039\(00\)00028-1](http://doi.org/10.1016/S1467-8039(00)00028-1)

Smart, L. E., Aradottir, G. I., & Bruce, T. J. a. (2014). *Role of Semiochemicals in Integrated Pest Management. Integrated Pest Management*. Elsevier Inc.
<http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00007-5>

Tan, K. H., Nishida, R., Jang, E. B., & Shelly, T. E. (2014). *Trapping and the detection, control, and regulation of tephritid fruit flies: Lures, area-wide programs, and trade implications. Trapping and the Detection, Control, and Regulation of Tephritid Fruit Flies: Lures, Area-Wide Programs, and Trade Implications*. <http://doi.org/10.1007/978-94-017-9193-9>

Verheggen, F., Verhaeghe, A., Giordanengo, P., Tassus, X., & Escobar-Gutiérrez, A. (2017). Walnut husk fly, *Rhagoletis completa* (Diptera: Tephritidae), invades Europe: invasion potential and control strategies. *Applied Entomology and Zoology*, 1–7. <http://doi.org/10.1007/s13355-016-0459-7>

Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Vigùès, B., Brunet, J. L., ... Delbac, F. (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by nosema ceranae. *PLoS ONE*, 6(6), 1–8.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0021550>

Vogt, R. G., Riddiford, L. M., & Prestwich, G. D. (1985). Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antherea polyphemus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(24), 8827–8831.
<http://doi.org/10.1073/pnas.82.24.8827>

Vogt, R. G., Rybczynski, R., & Lerner, M. R. (1991). Molecular cloning and sequencing of general odorant-binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: comparisons with other insect OBPs and their signal peptides. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(10), 2972–2984.

Yee, W. L. (2008). Host plant use by and new host records of apple maggot, western cherry fruit fly, and other *Rhagoletis* species (Diptera: Tephritidae) in western Washington state. *The Pan-Pacific Entomologist*, 84(3), 179–193. <http://doi.org/10.3956/2007-48.1>