

---

**Etude multitrophique des effets de différents bio-insecticides sur *Myzus Persicae* (Sulzer) et *Tuta Absoluta* (Meyrick), ravageurs de solanacées et sur leur ennemi naturel *Macrolophus Pygmaeus* (Rambur)**

**Auteur :** Van De Velde, Megane

**Promoteur(s) :** Francis, Frédéric

**Faculté :** Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme :** Master en bioingénieur : sciences agronomiques, à finalité spécialisée

**Année académique :** 2016-2017

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/3093>

---

*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.*

---

**ETUDE MULTITROPHIQUE DES EFFETS DE  
DIFFERENTS BIO-INSECTICIDES SUR *MYZUS  
PERSICAE* (SULZER) ET *TUTA ABSOLUTA*  
(MEYRICK), RAVAGEURS DE SOLANACEES, ET  
SUR LEUR ENNEMI NATUREL *MACROLOPHUS  
PYGMAEUS* (RAMBUR)**

MEGANE VAN DE VELDE

TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES, A FINALITE SPECIALISEE

ANNÉE ACADÉMIQUE 2016-2017

PROMOTEUR : PROFESSEUR FRÉDÉRIC FRANCIS

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

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

**ETUDE MULTITROPHIQUE DES EFFETS DE  
DIFFERENTS BIO-INSECTICIDES SUR *MYZUS  
PERSICAE* (SULZER) ET *TUTA ABSOLUTA*  
(MEYRICK), RAVAGEURS DE SOLANACEES, ET  
SUR LEUR ENNEMI NATUREL *MACROLOPHUS  
PYGMAEUS* (RAMBUR)**

MEGANE VAN DE VELDE

TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES, A FINALITE SPECIALISEE

ANNÉE ACADÉMIQUE 2016-2017

PROMOTEUR : PROFESSEUR FRÉDÉRIC FRANCIS

# Remerciements

*Avant de commencer ce travail de fin d'études, j'aimerais exprimer ma gratitude envers les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué au bon déroulement de ce travail ainsi qu'à mes années universitaires au sein de Gembloux Agro-Bio Tech.*

*Premièrement, je souhaiterais remercier mon promoteur de TFE, Pr. Frédéric Francis, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet qui me tenait particulièrement à cœur et pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive de la faculté.*

*Ensuite, je tiens à remercier l'ensemble des personnes du bâtiment d'« Horti » pour leur soutien tout au long de ce travail. Particulièrement, je souhaiterais remercier Emilie Bosquée et Laurent Sertheyn pour leurs précieux conseils et leur implication dans mon projet. De même, je les remercie pour leur joie de vivre et leur bonne humeur qui m'ont permis de passer d'agréables moments durant ce TFE. Je souhaiterais également remercier Emilie Bosquée pour la relecture de cette rédaction et pour ces nombreux encouragements. Sache que ces derniers m'ont fait beaucoup de bien et m'ont permis de croire en moi.*

*De même, je tiens à remercier Nicolas Poncelet pour m'avoir épaulé en laboratoire dans les moments où j'en avais besoin. Je le remercie spécialement pour ses bons conseils et la patience dont il fait preuve. Par la même occasion, je souhaiterais remercier Frédéric Dresen sans qui mes plantes seraient sans doute mortes de soif. Je le remercie pour sa gentillesse et sa bonne humeur ainsi que pour l'aide apportée pour le lancement de mes élevages.*

*Je tiens aussi à remercier chaleureusement l'ensemble du personnel de cette unité pour l'accueil dont ils ont fait preuve, leur convivialité, leur sens de l'humour ainsi que pour cette fabuleuse journée à Chevetogne.*

*Je souhaiterais également en profiter pour remercier le Pr. Bruno Schiffers pour son accompagnement durant ces deux années de master. Je tiens à vous remercier d'avoir été présent et de bon conseil à chaque fois que j'en ai eu besoin, aussi bien pour mon stage que dans le cadre de ce TFE.*

*Il paraîtrait qu'il faille toujours garder le meilleur pour la fin. C'est pourquoi je souhaiterais dire un énorme merci à mes parents. Je les remercie de m'avoir donné la chance d'entreprendre mes rêves et d'arriver là où j'en suis aujourd'hui. Je les remercie pour la fierté qu'ils ont de moi et qu'ils ne cessent d'exprimer. Je les remercie pour leur compassion, leur soutien et surtout pour leur amour. Je tenais à vous rappeler que si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous. Je tiens aussi à remercier mon petit frère, Yoan, pour avoir si bien pris soin de moi durant ces dures soirées de blocus et d'examens. Tes chocolats chauds, tes biscuits et tes pâtisseries ont été le moteur de longues heures d'étude.*

*Finalement, je tiens à remercier Jonathan Hairson pour son soutien durant ces six années d'université. Merci de m'avoir supporté pendant ces mois de TFE, je sais que je n'ai pas toujours été facile. Je tiens à te remercier pour avoir été présent du début à la fin, pour ta patience et tes conseils. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragée toutes ces fois où je perdais espoir. Je te remercie notamment pour ton aide apportée au cours de mes études et de ce TFE mais également pour ce que tu m'apportes dans la vie. Je tiens à te remercier pour ces belles années à tes côtés, pour nos fous rires et ces si bons moments en ta compagnie. Merci d'être toi, d'être là et de faire de moi ce que je suis. Comme dirait Francis Cabrel : « Je t'aimais, je t'aime et je t'aimerai ».*

Megane.

# Résumé

Le tréhalose est la plus importante réserve d'hydrates de carbone chez les insectes. Ce dernier peut être transformé en glucose grâce à une enzyme, la tréhalase. La phloridzine, l'amygdaline et la validamycine A sont tous les trois des inhibiteurs cette enzyme. Quelques études ont révélé leur potentiel en tant que bio-insecticide. C'est pourquoi, ces derniers ont été testés sur deux ravageurs de Solanacées, *Myzus persicae* (Sulzer) et *Tuta absoluta* (Meyrick), afin d'évaluer leur impact sur la mortalité de ces derniers. Pour ce faire, des diètes artificielles ont été préparées et données à ceux-ci en tant que seule source alimentaire. Pour *M. persicae*, les inhibiteurs ont été testés à raison de 10 et 25 µg/ml. Après 48 heures, une augmentation significative de la mortalité de *M. persicae* a été constatée uniquement avec une concentration de 25 µg/ml. Dans le cas de *T. absoluta*, la phloridzine a été testée à des concentrations de 25, 50 et 100 µg/ml alors que les deux autres inhibiteurs ont été évalués avec une dose de 100 µg/ml. Dans une perspective de lutte intégrée, l'effet létal des inhibiteurs a également été étudié sur leur ennemi naturel commun, *Macrolophus pygmaeus* (Rambur), par le biais d'une étude multitrophique impliquant *M. persicae*. Aucune mortalité dépendante des inhibiteurs n'a été constatée pour *T. absoluta* et *M. pygmaeus*. Ensuite, deux études protéomiques (2D-DIGE) ont été entreprises sur le modèle puceron afin de mieux comprendre le mode d'action de ces inhibiteurs. Premièrement, celles-ci ont souligné un effet dissuasif de la phloridzine vis-à-vis de l'alimentation. Deuxièmement, il a été montré que l'amygdaline et la validamycine A entraînent une diminution du métabolisme énergétique ainsi que des perturbations à d'autres voies métaboliques. Finalement, des traitements (25 µg/ml) par aspersion sur plants de tabac ont été réalisés avant et après infestation par *M. persicae*. Seul le traitement à la validamycine A après infestation a induit une différence significative comparé au témoin.

**Mots-clés :** puceron, *Tuta absoluta*, *Macrolophus pygmaeus*, inhibiteurs de tréhalase, 2D-DIGE

# Abstract

Trehalose is one of the most important carbohydrates stocks in insects. This molecule can be transformed into glucose thanks to an enzyme called trehalase. Phloridzin, amygdalin and validamycin A are trehalase inhibitors. Some studies have shown their bio-insecticide potential. For this reason, these inhibitors were tested on two pests of Solanaceous, *Myzus persicae* (Sulzer) and *Tuta absoluta* (Meyrick), in order to assess their impact on mortality. Then, artificial diets were prepared and were given to them instead of natural diets. In the case of *M. persicae*, two concentrations (10 et 25 µg/ml) were tested. Only one significant difference was noted for all inhibitors with an amount of 25 µg/ml and after 48 hours. For experiments on *T. absoluta*, three concentrations of phloridzin (25, 50 and 100 µg/ml) were assessed and only one (100 µg/ml) was evaluated for amygdalin and validamycin A. In an integrated pest management (IPM) context, lethal impact of inhibitors was also studied on their common natural enemy, *Macrolophus pygmaeus* (Rambur), thanks to a multitrophic study including *M. persicae*. No inhibitor-dependent mortality was found in the case of *T. absoluta* nor *M. pygmaeus*. Then, two proteomic analyzes (2D-DIGE) were conducted on aphids to increase knowledges about mode of action of trehalase inhibitors. Firstly, a dissuasive effect of phloridzin was highlighted. Moreover, a decrease of energetic metabolism and disturbances at several metabolic pathways were found with the ingestion of amygdalin and validamycin A. Finally, tobacco plants were treated with these inhibitors (25 µg/ml) before or after *M. persicae* infestation. Validamycin A treatment after infestation was the only one to show a significant difference in terms of mortality.

**Key-words:** aphid, *Tuta absoluta*, *Macrolophus pygmaeus*, trehalase inhibitors, 2D-DIGE

## Liste des abréviations

ANOVA	Analyse de la variance
Arp	<i>Actin related protein</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search</i>
2D-DIGE	<i>2D Differential Gel Electrophoresis</i>
DDC	DOPA décarboxylase
DTT	Dithiothréitol
EFE	Entomologie Fonctionnelle et Evolutive
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
HCN	Cyanure d'hydrogène
HIPV	<i>Herbivore Induced Plant Volatile</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IAA	Iodoacétamide
IEF	<i>Isoelectric focusing</i>
IPG	<i>Immobilized pH gradient</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography coupled to tandem with Mass Spectrometry</i>
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight with Mass Spectrometry</i>
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
pI	Point isoélectrique
PM	Poids moléculaire
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecylsulfate-Polyacrimide Gel Electrophoresis</i>
SM	Score Mascot
TFE	Travail de fin d'études

# Table des matières

<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ETAT DE L'ART .....</b>	<b>2</b>
1 LE PUCERON .....	2
1.1 Généralités .....	2
1.2 Morphologie.....	2
1.3 Biologie et cycle de développement .....	3
1.3.1 Les pucerons monœciques ou diœciques.....	3
1.3.2 Les pucerons holocycliques ou anholocycliques.....	4
1.4 Les stades de développement.....	5
1.5 Comportement alimentaire.....	6
1.6 Les dégâts.....	7
1.6.1 Les dégâts directs.....	7
1.6.2 Les dégâts indirects.....	7
1.6.3 Les dégâts chez les Solanacées.....	7
1.7 Le puceron vert du pêcher, <i>Myzus persicae</i> (Sulzer).....	8
2 <i>TUTA ABSOLUTA</i> (MEYRICK). .....	9
2.1 Généralités .....	9
2.2 Morphologie.....	9
2.3 Biologie et cycle de développement .....	10
2.4 Diversité des plantes hôtes.....	12
2.5 Dégâts et importance économique.....	12
2.5.1 Les dégâts.....	12
2.5.2 L'importance économique .....	13
3 <i>MACROLOPHUS PYGMAEUS</i> (RAMBUR).....	14
3.1 Généralités .....	14
3.2 Morphologie.....	14
3.3 Biologie et cycle de développement .....	15
3.4 Comportement alimentaire.....	15
3.5 <i>M. pygmaeus</i> en tant qu'agent de biocontrôle .....	16
3.5.1 Prédation vis-à-vis de <i>Myzus persicae</i> .....	17
3.5.2 Prédation vis-à-vis de <i>Tuta absoluta</i> .....	17
4 METABOLISME DU TREHALOSE ET SON INHIBITION.....	18
4.1 Le tréhalose.....	18
4.2 La dégradation du tréhalose via la tréhalase.....	20
4.3 Inhibiteurs de tréhalase .....	20
<b>III. OBJECTIFS .....</b>	<b>22</b>
<b>IV. PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>23</b>
1 MATERIELS ET METHODES .....	23
1.1 Elevages.....	23
1.1.1 Elevage de <i>Myzus persicae</i> .....	23
1.1.2 Elevage de <i>Tuta absoluta</i> .....	23
1.1.3 Elevage de <i>Macrolophus pygmaeus</i> .....	24
1.2 Diètes artificielles .....	24
1.2.1 Tests préliminaires.....	24
1.2.2 Tests sur <i>Myzus persicae</i> .....	25
1.2.3 Tests sur <i>Tuta absoluta</i> .....	26



1.2.4	Tests sur <i>Macrolophus pygmaeus</i> .....	27
1.3	Analyses protéomiques .....	28
1.3.1	Préparation des échantillons .....	29
1.3.2	2D-DIGE et analyse des gels .....	29
1.3.3	Identification des protéines .....	30
1.4	Passage sur plantes .....	31
1.4.1	Traitement après infestation par <i>Myzus persicae</i> .....	31
1.4.2	Traitement avant infestation par <i>Myzus persicae</i> .....	32
2	RESULTATS .....	33
2.1	Diètes artificielles .....	33
2.1.1	Tests préliminaires .....	33
2.1.2	Tests sur <i>Myzus persicae</i> .....	34
2.1.3	Tests sur <i>Tuta absoluta</i> .....	35
2.1.4	Tests sur <i>Macrolophus pygmaeus</i> .....	38
2.2	Analyses protéomiques .....	39
2.2.1	2D-DIGE sur <i>Acyrtosiphon pisum</i> .....	39
2.2.2	2D-DIGE sur <i>Myzus persicae</i> .....	40
2.3	Passage sur plantes .....	46
2.3.1	Traitement après infestation par <i>Myzus persicae</i> .....	46
2.3.2	Traitement avant infestation par <i>Myzus persicae</i> .....	47
3	DISCUSSIONS .....	49
3.1	Diètes artificielles .....	49
3.1.1	Tests préliminaires .....	49
3.1.2	Effets de la phloridzine sur la mortalité des ravageurs .....	49
3.1.3	Effets de l'amygdaline sur la mortalité des ravageurs .....	51
3.1.4	Effets de la validamycine A sur la mortalité des ravageurs .....	53
3.1.5	Etude multitrophique .....	54
3.2	Analyses protéomiques .....	54
3.2.1	Variations d'expressions protéiques induites par la phloridzine .....	55
3.2.2	Variations d'expressions protéiques induites par l'amygdaline et la validamycine A 57	
3.3	Passage sur plantes .....	61
<b>V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>64</b>
<b>VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>66</b>
<b>VII. ANNEXES .....</b>		<b>76</b>

# Table des figures

Figure 1. Morphologie d'un puceron ailé (Turpeau-Ait Ighil et al., 2011).....	3
Figure 2. Plantes hôtes et cycles biologiques du puceron (d'après Turpeau-Ait Ighil et al., 2011).....	4
Figure 3. Cycle biologique holocyclique d'un puceron (Turpeau-Ait Ighil et al., 2011).....	5
Figure 4. Individus aptères vert jaunâtre de <i>M. persicae</i> (Ephytia, 2013).....	8
Figure 5. Larve de <i>Tuta absoluta</i> sur foliole (Blancard, 2017).....	9
Figure 6. Cycle de développement reprenant les 4 stades de <i>T. absoluta</i> (Urbaneja et al., 2013).....	10
Figure 7. Cycle de développement de <i>T. absoluta</i> (Koppert, 2014b).....	11
Figure 8. <i>Macrolophus pygmaeus</i> adulte (Serail, 2016).....	14
Figure 9. Structure du tréhalose (Wyatt, 1967).....	19
Figure 10. Etapes de préparation d'un dispositif de diète pour puceron (photos : Van De Velde Megane).....	25
Figure 11. Centrifugeuse servant à récolter le jus des plants de tomates (photo : Van De Velde Megane).....	26
Figure 12. Etapes de préparation des diètes pour <i>T. absoluta</i> (photos : Van De Velde Megane).....	27
Figure 13. Dispositifs utilisés durant l'expérimentation sur <i>M. pygmaeus</i> (photos : Van De Velde Megane).....	27
Figure 14. Représentation des différentes étapes d'une 2D-DIGE (Paul et al., 2013).....	28
Figure 15. Etapes d'infestation des plants de tabac avec <i>M. persicae</i> (photos : Van De Velde Megane).....	31
Figure 16. Photo d'un plant de tabac après traitement (photo : Van De Velde Megane).....	32
Figure 17. Mortalité moyenne d' <i>A. pisum</i> après 48 heures sur diète artificielle avec et sans phloridzine (concentration de 25 µg/ml).....	33
Figure 18. Mortalité moyenne d' <i>A. pisum</i> après 24 et 48 heures sur diète artificielle avec et sans alendronate.....	34
Figure 19. Mortalité moyenne de <i>M. persicae</i> après 24 et 48 heures sur diète artificielle avec et sans inhibiteur (phloridzine, amygdaline ou validamycine A) à une concentration de 10 µg/ml.....	34
Figure 20. Mortalité moyenne de <i>M. persicae</i> après 24 et 48 heures sur diète artificielle avec et sans inhibiteur (concentration de 25 µg/ml) : A) phloridzine ou validamycine A ; B) amygdaline.....	35
Figure 21. Nombres totaux de larves de <i>T. absoluta</i> toujours en vie après 24, 48 et 72 heures passées sur diète artificielle avec ou sans phloridzine (concentration de 25 ou 50 µg/ml).....	36
Figure 22. Nombres totaux de larves de <i>T. absoluta</i> toujours en vie après 24, 48 et 72 heures passées sur diète artificielle avec ou sans phloridzine (concentration de 100 µg/ml).....	36
Figure 23. Nombres totaux de larves de <i>T. absoluta</i> toujours en vie après 24, 48 et 72 heures passées sur diète artificielle avec ou sans amygdaline (concentration de 100 µg/ml).....	37
Figure 24. Nombres totaux de larves de <i>T. absoluta</i> toujours en vie après 24, 48 et 72 heures passées sur diète artificielle avec ou sans validamycine A (concentration de 100 µg/ml).....	38
Figure 25. Nombres totaux de <i>M. pygmaeus</i> adultes vivants après 24, 48 et 72 heures de consommation de pucerons ayant ingéré la diète artificielle contenant l'inhibiteur (phloridzine, amygdaline ou validamycine A) à une concentration de 25 µg/ml.....	38
Figure 26. Gel 2D-DIGE réalisé sur les échantillons d' <i>A. pisum</i> ayant consommé la diète artificielle avec et sans phloridzine (concentration de 25 µg/ml).....	39
Figure 27. Gel 2D-DIGE réalisé sur les échantillons de <i>M. persicae</i> ayant consommé la diète artificielle avec et sans inhibiteur (phloridzine, amygdaline ou validamycine A ; concentration de 10 µg/ml).....	42
Figure 28. Répartition des protéines identifiées selon leurs fonctions suite à l'analyse 2D-DIGE des pucerons nourris avec les diètes contenant les inhibiteurs testés.....	46
Figure 29. Mortalité moyenne de <i>M. persicae</i> 48 heures après l'application du traitement par aspersion (concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml) sur les feuilles de tabac préalablement infestées.....	47
Figure 30. Mortalité moyenne de <i>M. persicae</i> 48 heures après l'infestation de plants de tabac préalablement traités (concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml).....	47

## Table des tableaux

Tableau 1. Protéines identifiées et correspondant à des expressions différenciées chez les pucerons ( <i>A. pisum</i> ) ayant ingérés la phloridzine à 25 µg/ml. ....	40
Tableau 2. Protéines différemment exprimées et identifiées chez le puceron <i>Myzus persicae</i> ayant ingéré de la phloridzine (10 µg/ml), de l'amygdaline (10 µg/ml) ou de la validamycine A (10 µg/ml).....	43

## Table des annexes

Annexe 1. P-valeurs obtenues grâce aux ANOVA réalisées sur l'ensemble des taux de mortalité relevés chez <i>A. pisum</i> après 24 et 48 heures sur diète artificielle. ....	76
Annexe 2. P-valeurs obtenues grâce aux ANOVA réalisées sur l'ensemble des taux de mortalité relevés chez <i>M. persicae</i> après 24 et 48 heures sur diète artificielle (concentration de 10 µg d'inhibiteur/ml).....	76
Annexe 3. P-valeurs obtenues grâce aux ANOVA réalisées sur l'ensemble des taux de mortalité relevés chez <i>M. persicae</i> après 24 et 48 heures sur diète artificielle (concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml).....	76
Annexe 4. P-valeurs obtenues grâce aux tests exacts de Fisher réalisés sur le nombre de larves de <i>T. absoluta</i> vivantes et mortes après 24, 48 et 72 heures sur diète artificielle (concentration de 25 ou 50 µg de phloridzine/ml). x = p-valeur incalculable. ....	76
Annexe 5. P-valeurs obtenues grâce aux tests exacts de Fisher réalisés sur le nombre de larves de <i>T. absoluta</i> vivantes et mortes après 24, 48 et 72 heures sur diète artificielle (concentration de 100 µg de phloridzine/ml).....	76
Annexe 6. P-valeurs obtenues grâce aux tests exacts de Fisher réalisés sur le nombre de larves de <i>T. absoluta</i> vivantes et mortes après 24, 48 et 72 heures sur diète artificielle (concentration de 100 µg d'amygdaline/ml). x = p-valeur incalculable.....	77
Annexe 7. P-valeurs obtenues grâce aux tests exacts de Fisher réalisés sur le nombre de larves de <i>T. absoluta</i> vivantes et mortes après 24, 48 et 72 heures sur diète artificielle (concentration de 100 µg de validamycine A/ml). ....	77
Annexe 8. P-valeurs obtenues grâce aux tests exacts de Fisher réalisés sur le nombre de prédateurs vivants et mortes après 24, 48 et 72 heures de consommation de <i>M. persicae</i> ayant ingéré la diète artificielle (concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml). x = p-valeur incalculable.....	77
Annexe 9. P-valeurs obtenues grâce aux ANOVA réalisées sur l'ensemble des taux de mortalité relevés chez <i>M. persicae</i> 48 heures après l'application des traitements (concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml) par aspersion sur les feuilles de tabac préalablement infestées.....	77
Annexe 10. P-valeurs obtenues grâce aux ANOVA réalisées sur l'ensemble des taux de mortalité relevés chez <i>M. persicae</i> 48 heures après l'infestation de plants de tabac préalablement traités (concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml). ....	77

## I. INTRODUCTION

Durant des décennies, les produits phytosanitaires ont été utilisés à outrance pour la protection des cultures. Afin de contrôler chimiquement de nombreux ravageurs, l'agriculture nécessite environ 85% de la production mondiale de pesticides (Kim et al., 2017). De cette manière, les pesticides ont servi à l'accroissement de la production agricole par l'augmentation de la productivité des cultures (Bonny, 2011). Depuis de nombreuses années, ceux-ci aident les pays à subvenir à leurs besoins alimentaires tout en diminuant la pénibilité du travail (Ranga Rao et al., 2016; Deravel et al., 2014). Cependant, la population actuelle montre un intérêt grandissant pour la réduction de l'utilisation d'intrants chimiques. La société se voit désormais sensibilisée par l'impact de la protection des cultures sur la santé. Des études ont démontré que les pesticides peuvent induire de sérieuses maladies et qu'une diminution de l'exposition à ces derniers serait judicieuse (Sarwar, 2015b). De ce fait, les consommateurs portent un intérêt aux résidus de pesticides présents sur les produits alimentaires. En plus des effets sur la santé, les pesticides impactent également l'environnement. D'après Aktar et collègues (2009), les impacts se font aussi bien ressentir aux niveaux de l'air, de l'eau et du sol. Leur utilisation peut conduire à une perte de biodiversité ainsi qu'à l'apparition de résistances chez les ravageurs (Damalas & Eleftherohorinos, 2011; Kim et al., 2017).

Suite aux risques liés à l'utilisation de produits phytosanitaires, des décisions visant l'amélioration ont été prises par l'Union Européenne. C'est pourquoi, le règlement (CE) 1107/2009 a remplacé la Directive européenne 91/414/CEE. Dans ce règlement, les critères de mise sur le marché de substances actives sont plus stricts et les co-formulants utilisés sont également soumis aux procédures d'homologation. De plus, la Directive 128/2009/CE relative à la lutte intégrée (*Integrated Pest Management*) a été adoptée le 21 octobre 2009 dans le but de réduire l'impact des pesticides sur l'environnement et la santé par le biais de plans d'action mis en place par chacun des pays membres de l'Union Européenne (Deravel et al., 2014; Parlement européen et Conseil de l'UE, 2009b; Parlement européen et Conseil de l'UE, 2009a).

Les bio-insecticides constituent une voie de réduction des produits phytopharmaceutiques chimiques (Deravel et al., 2014). Ils peuvent avoir une action rapide tout en étant faiblement toxiques pour les mammifères et faiblement persistants après application (Silvério et al., 2009). Selon Deravel et collègues (2014), la rémanence dans les sols des molécules organiques seraient moindre que celle des pesticides chimiques de synthèse. Néanmoins, les bio-insecticides n'échappent pas au règlement (CE) 1107/2009 et sont soumis à la procédure d'homologation, comme c'est le cas pour les substances des produits phytosanitaires chimiques (Parlement européen et Conseil de l'UE, 2009b).

En 2014, 170.750.767 tonnes de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) ont été produites à travers le monde (FAO, 2017). Or, les tomates sont les hôtes de nombreux insectes ravageurs et de maladies (Yardim & Edwards, 1998) comme le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Francis et al., 2006), ou encore la mineuse de la tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Tropea Garzia et al., 2012). Pas moins de 556 tonnes d'insecticides ont été utilisés uniquement en Belgique pour cette culture (FAO, 2016). Sachant que les tomates peuvent être consommées directement en l'état, il est compréhensible de vouloir limiter l'utilisation des pesticides, et notamment des insecticides, pour lutter contre les ravageurs de ces dernières. Ainsi, la recherche de bio-insecticides est une voie prometteuse.

L'utilisation de bio-insecticides permettant de combattre à la fois *M. persicae* et *T. absoluta*, sans pour autant provoquer d'effets néfastes sur leur ennemi naturel commun, *Macrolophus pygmaeus* (Rambur, 1839), s'inscrirait parfaitement dans le cadre d'une lutte intégrée. De plus, cela permettrait de réduire l'emploi de produits phytosanitaires en culture de tomates et, de ce fait, limiter l'impact sur la santé et l'environnement. C'est pourquoi, ce travail de fin d'études s'est intéressé à cet aspect multitrophique.

## II. ETAT DE L'ART

### 1 LE PUCERON

Cette partie de l'état de l'art commencera par une description du puceron afin de mieux comprendre ce premier ravageur cerné par cet étude, *Myzus persicae*. Dans le cadre de ce travail, ce dernier a été sélectionné pour sa prédominance mondiale et sa capacité de transmission virale. Ces deux aspects peuvent alors donner plus d'importance aux éventuelles découvertes.

#### 1.1 Généralités

Tout comme les psylles, les aleurodes et les cochenilles, les pucerons font partie de l'ordre des Hémiptères et du sous-ordre des Sternorrhynches (Turpeau-Ait Ighil et al., 2011; Podsiadlowski, 2016). Ils appartiennent à la super-famille des *Aphidoidea* (Nieto Nafria, 2013) comprenant 3 familles : les *Aldegidae*, les *Phylloxeridae* et les *Aphididae* (Podsiadlowski, 2016).

Plusieurs preuves fossiles ont permis d'estimer l'apparition des pucerons à environ 280 millions d'années (Ameixa, 2010; Hullé et al., 1999). Actuellement, plus de 4800 espèces de pucerons ont pu être identifiées à travers le monde dont 900 sont présentes en Europe et 250 espèces sont des ravageurs (Fraval, 2006a; Turpeau-Ait Ighil et al., 2011; Hardy et al., 2015). La plupart des espèces de pucerons sont retrouvées dans les régions tempérées (Fraval, 2006a).

#### 1.2 Morphologie

Le puceron peut être décrit comme un insecte phytophage de petite taille, généralement de 2 à 4 mm, avec un corps ovale quelque peu aplati et comportant des téguments mous (Fraval, 2006a; Blackman & Eastop, 2007).

D'après Fraval (2006), les pièces buccales du puceron sont semblables à celles des cochenilles et des cicadelles. Sur la face inférieure de la tête, un prolongement vertical peut être aperçu, ce dernier formant un rostre segmenté en 4 articles (Fraval, 2006a; Hullé et al., 1998). Ce rostre équivaut à la lèvre inférieure, autrement appelé « labium », et est replié sous le puceron en repos (Hullé et al., 1998). Chez cet insecte, les mandibules et maxilles ont été fortement modifiées pour donner lieu à deux paires de stylets (Fraval, 2006a). Insecte piqueur-suceur, le puceron se nourrit en insérant ses stylets dans la plante pour en prélever la sève élaborée (Sullivan, 2008; Hullé et al., 1998).

Le puceron possède deux antennes de longueur variable, généralement composées de 6 articles. Le dernier article antennaire comprend une partie terminale souvent effilée dénommée le fouet, le flagelle ou encore *processus terminali* (Figure 1). Ces antennes sont soit directement insérées sur le front ou sur des protubérances, les tubercules frontaux. Les antennes sont le siège d'organes olfactifs, les sensoria ou rhinaries (Fraval, 2006a; Hullé et al., 1998; Hullé et al., 1999; Turpeau-Ait Ighil et al., 2011). Ces derniers ont la capacité de capter des signaux de nature chimique (Park & Hardie, 2002; Park & Hardie, 2004).

La plupart des pucerons ont des yeux composés bien développés de couleur rouge-brune. Ceux-ci s'avèrent être plus importants chez les pucerons ailés que chez les aptères. Les yeux se composent d'un grand nombre de lentilles individuelles nommées facettes ou ommatidies. Derrière les yeux se trouve un tubercule oculaire portant 3 ommatidies (Fraval, 2006a; Sullivan, 2008).

Le thorax du puceron comprend 3 segments (prothorax, mésothorax et métathorax) portant les 3 paires de pattes. Les pattes se terminent par des tarsi à deux articles dont le dernier possède une paire de griffes. Chez les formes ailées, le mésothorax est sclérifié et le thorax porte les deux paires d'ailes (Hullé et al., 1999; Hullé et al., 1998; Turpeau-Ait Ighil et al., 2011). D'après Sullivan (2008), les deux paires d'ailes sont membraneuses et l'aile antérieure comporte deux veines longitudinales dont une proéminente.

L'abdomen du puceron est composé de 10 segments difficilement différenciables. Au niveau du cinquième ou du sixième segment, une paire de *cornicules* est présente. Ce sont des organes, semblables à des tubes creux dressés, permettant l'excrétion de phéromones d'alarme émises lorsque le puceron ressent le danger. De plus, lorsque ce dernier est touché ou attaqué par un prédateur, un ou les deux cornicules peuvent s'élever et libérer un exsudat cireux faisant office de fluide collant afin de se défendre. Au-dessus de l'ouverture anale, le dernier segment de l'abdomen est prolongé pour constituer le *cauda* servant à épandre le miellat (Fraval, 2006a; Turpeau-Ait Ighil et al., 2011; Sullivan, 2008).

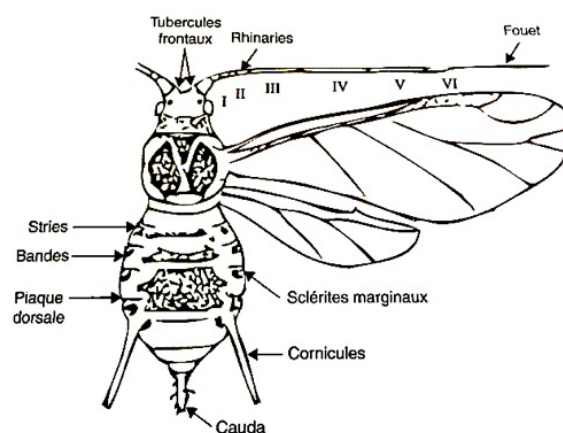


Figure 1. Morphologie d'un puceron ailé (Turpeau-Ait Ighil et al., 2011)

### 1.3 Biologie et cycle de développement

Leurs cycles de vie compliqués engendrent un polymorphisme important chez les pucerons. Ainsi, il est possible de rencontrer, durant le cycle biologique, des formes ailées et des aptères, des pucerons sexués et parthénogénétiques (uniquement femelles) ou encore des femelles ovipares et des vivipares (Sullivan, 2008; Fraval, 2006a; Moran, 1992).

Le puceron fait partie des organismes ayant la capacité de se reproduire de manière sexuée ou asexuée. Cette plasticité dans la reproduction est une réponse adaptative à la saisonnalité et aux conditions environnementales. La majorité des espèces de pucerons utilise la parthénogénèse comme mode de reproduction principal ou exclusif. Globalement, les pucerons peuvent être monœciques ou diœciques et holocycliques ou anholocycliques (Rakauskas, 2008; Turpeau-Ait Ighil et al., 2011; Simon et al., 2010; Blackman, 1974).

#### 1.3.1 Les pucerons monœciques ou diœciques

Plus de 90% des espèces de pucerons sont **monœciques** (une plante hôte). Cela signifie que la totalité de leur cycle de développement est accompli sur plusieurs plantes d'une même espèce ou d'espèces apparentées très voisines d'un point de vue botanique (Figure 2). Dans ce cas, l'alternance annuelle entre la plante hôte primaire et la secondaire n'est pas nécessaire (Sullivan, 2008; Turpeau-Ait Ighil et al., 2011; Hullé et al., 1998).

Dans le cas de pucerons **diœciques** (environ 10% des espèces), deux types de plantes hôtes, généralement très différentes, sont requises pour la réalisation du cycle complet. Cette nécessité d'alternance est en lien direct avec la sexualité car de nombreuses espèces ne savent se reproduire que sur une plante hôte spécifique. En effet, la reproduction sexuée et le développement des colonies ont lieu sur un hôte primaire, souvent un arbre ou arbuste, jusqu'au départ des femelles parthénogénétiques (fondatrigènes) vers un hôte secondaire (Figure 2). Sur ce dernier, les générations d'aptères et d'ailés parthénogénétiques (virginogènes) se succèdent pendant l'été. Les hôtes secondaires sont alors des plantes herbacées accueillant les espèces migrantes. De plus, la diœcie est également perçue comme une adaptation à la saisonnalité permettant aux pucerons d'avoir une alimentation abondante et de bonne qualité nutritionnelle toute l'année. Les pucerons diœciques peuvent être qualifiés de polyphages suite à cette alternance entre les plantes hôtes (Hardy et al., 2015; Hullé et al., 1998; Turpeau-Ait Ighil et al., 2011; Sullivan, 2008).

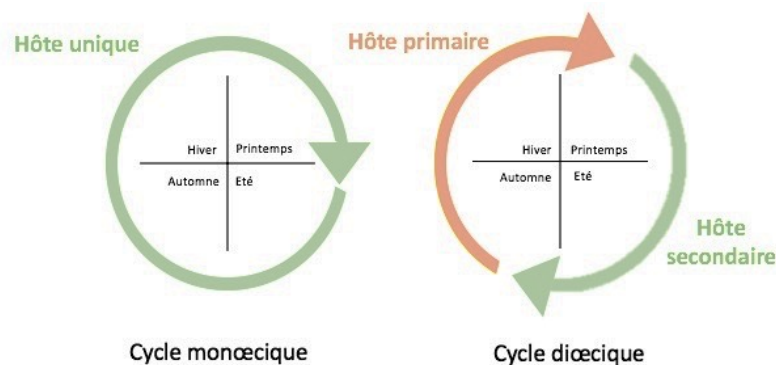


Figure 2. Plantes hôtes et cycles biologiques du puceron (d'après Turpeau-Ait Ighil et al., 2011)

### 1.3.2 Les pucerons holocycliques ou anholocycliques

Le mode de reproduction ancestral du puceron est réalisé grâce à une alternance entre une phase asexuée et une phase sexuée. Les pucerons utilisant cette voie de reproduction, appelée également la parthénogénèse cyclique, sont alors qualifiés d'**holocycliques**. Cette capacité d'effectuer un cycle biologique complet (**holocycle**) faisant intervenir la reproduction sexuée a été maintenue par de nombreux pucerons des régions tempérées (Hullé et al., 1998; Turpeau-Ait Ighil et al., 2011).

Ainsi, il est possible de détailler l'holocycle (Figure 3). En fin d'été, la génération sexuée fait son apparition en réponse à un raccourcissement de la longueur des jours. A l'automne, l'accouplement entre des mâles et des femelles fécondables aptères (ovipares) engendre la production d'œufs résistants au froid sur la plante hôte primaire sur laquelle ces derniers passeront l'hiver. Cette période hivernale est requise avant le parachèvement du développement de l'embryon dans l'œuf. Cet état physiologique suspendu est appelé diapause et dure plusieurs mois (Hullé et al., 1998; Sullivan, 2008; Williams & Dixon, 2007; Simon et al., 2010; Hardy et al., 2015; Fraval, 2006a).

Au printemps, les œufs éclosent et donnent naissance à une femelle parthénogénétique aptère, la fondatrice. De cette dernière se succèdent plusieurs générations de femelles parthénogénétiques, les fondatrigènes. En effet, tout au long du printemps et de l'été, toutes les générations sont parthénogénétiques et possèdent une durée de vie relativement courte (1-4 semaines). Au cours de ces deux saisons, la proportion de fondatrigènes ailées se voit augmenter. Ces fondatrigènes ailées vont pouvoir voyager et aller s'alimenter sur d'autres plantes de la même espèce ou d'espèces différentes. Ainsi, elles produiront plusieurs générations de pucerons aptères et ailés parthénogénétiques appelés virginogènes (Williams & Dixon, 2007; Kindlmann & Dixon, 2010; Hullé et al., 1998).

Au cours de cette période s'étalant du printemps à l'automne, entre 15 et 20 générations peuvent se succéder grâce à la reproduction asexuée. En outre, les femelles parthénogénétiques peuvent larviposier et produire plusieurs dizaines de jeunes larves. Ces dernières deviennent adultes en moins de deux semaines lorsque les températures se situent entre 15 et 20°C. Après quoi, elles sont à leur tour capables de donner naissance à des larves (Turpeau-Ait Ighil et al., 2011).

Une fois le retour de l'automne, des sexupares (femelles parthénogénétiques particulières) font leur apparition. Dans le cas de pucerons monœciques, ces dernières donnent naissance à des femelles ovipares et à des mâles qui pourront s'accoupler. Chez les espèces diœciques, les sexupares sont composés de gynopares ailées ainsi que d'andropares. Les gynopares ailées engendreront des femelles ovipares aptères après avoir regagné l'hôte primaire et les andropares donneront naissance à des mâles ailés qui féconderont celles-ci (Hullé et al., 1998; Williams & Dixon, 2007).

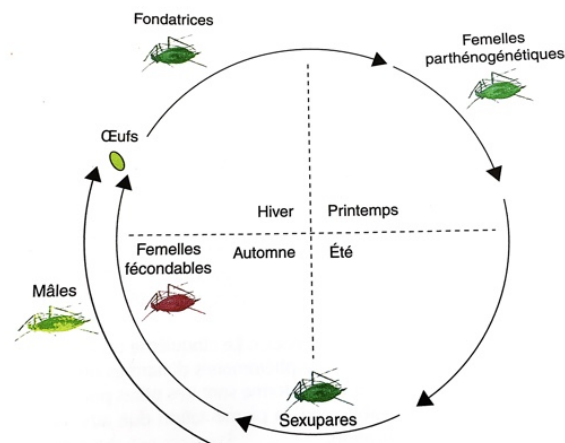


Figure 3. Cycle biologique holocyclique d'un puceron (Turpeau-Ait Ighil et al., 2011)

Toutefois, suite à une forte pression de sélection, certaines espèces monœciques et diœciques ont perdu totalement ou partiellement la capacité de se reproduire sexuellement. Ces pucerons sont qualifiés d'**anholocycliques** et se reproduisent uniquement par parthénogénèse. Cette anholocyclie peut résulter d'une variation génétique ou d'un changement environnemental affectant le revêtement développemental responsable de la phase sexuée (Hardy et al., 2015; Hullé et al., 1998; Moran, 1992).

Il est à noter que, parmi les espèces de grandes cultures, un grand nombre de celles-ci possède en son sein à la fois une partie de la population réalisant l'holocyclie et une fraction se multipliant par anholocyclie. Le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer, 1776), est un exemple d'espèces alliant ces deux modes de reproduction. La partie de la population de *M. persicae* qui est anholocyclique reste l'entièreté de l'année sur l'hôte secondaire. Celle-ci est essentiellement retrouvée dans les climats chauds. La fraction de *M. persicae* holocyclique est principalement caractéristique des régions tempérées. Dans ce cas, la reproduction et la diapause des œufs se déroulent sur un hôte primaire du genre *Prunus* (Blackman, 1974; Turpeau-Ait Ighil et al., 2011).

## 1.4 Les stades de développement

Chez les pucerons, 40 à 60 larves peuvent être produites par femelle. La plupart des espèces de pucerons comprennent quatre stades larvaires actifs avant de passer au stade adulte ailé ou aptère. Les différents stades sont séparés par des mues et leur distinction se base essentiellement sur la taille et le développement de certains appendices. En effet, les larves peuvent être reconnues grâce à leurs caractères juvéniles tels que la cauda plus courte et arrondie, souvent peu différenciée de l'abdomen, la tête large comparé au corps, les cornicules et les



antennes peu développées ou encore la présence de fourreaux alaires si ce sont des ailées (Turpeau et al., 2016; Godin & Boivin, 2002).

## 1.5 Comportement alimentaire

Peu importe le stade de développement, les pucerons sont des piqueurs-suceurs se nourrissant exclusivement du phloème de la plante hôte. Insectes phytophages, les pucerons sont majoritairement monophages ou oligophages alors que les espèces polyphages sont en faible nombre (Sullivan, 2008; Pettersson et al., 2007).

De manière générale, les insectes s'alimentant du phloème doivent prolonger l'interaction avec la plante hôte suffisamment longtemps pour permettre l'ingestion d'une assez grande quantité de la solution nutritive. En effet, leur corps de petite taille et leur cuticule molle les rendent vulnérables à la déshydratation. C'est pourquoi, les pucerons sont capables de prélever le phloème de manière continue pendant plusieurs heures, voir même des jours (Giordanengo et al., 2010; Tjallingii, 1995). Une fois sur la plante, le puceron va explorer celle-ci à l'aide de l'extrémité de son rostre comportant des soies sensorielles. Rapidement, il va insérer ses longs stylets dans les tissus de la plante afin d'évaluer la chimie interne et donc la valeur nutritionnelle de celle-ci. Les premières insertions des stylets sont relativement brèves et durent moins d'une minute. Celles-ci constituent des piqûres d'épreuve peu profondes se limitant probablement à l'épiderme. Les échantillons prélevés sembleraient être rapidement transportés au niveau de l'organe gustatif du pharynx. Ainsi, ils serviraient à fournir assez d'informations au puceron en vue du rejet ou de l'acceptation de la plante (Fraval, 2006b; Giordanengo et al., 2010; Pettersson et al., 2007). L'insertion des stylets se réalise entre deux cellules épidermiques. Ensuite, les pièces buccales suivent une voie apoplastique entre les couches primaires et secondaires de la paroi cellulaire. Pendant cette traversée apoplastique, une salive gélifiante est continuellement sécrétée. Celle-ci forme une gaine de salive, la *gaine sétale* entourant les stylets qui restera dans les tissus de la plante après le retrait de ceux-ci. Cette gaine faciliterait le cheminement des stylets et stabiliserait la coaptation des pièces buccales (Pollard, 1973; Giordanengo et al., 2010; Tjallingii & Hogen Esch, 1993; Tjallingii, 2006).

Comme précisé précédemment, les stylets perforent brièvement des cellules végétales de types différents lors de leur cheminement vers le phloème et ce, sans les traverser. La perforation ne dure que quelques secondes. Une fois les stylets retirés de la cellule perforée, la perforation est rebouchée grâce à la salive gélifiante. Parallèlement à leur insertion dans le plasmalemma, une petite quantité de salive aqueuse est injectée dans le cytosol. Après quoi, un mélange salive/cytoplasme est ingéré par le puceron. Ces diverses perforations permettent au puceron de localiser la position de ses stylets dans les tissus végétaux. Lorsque les vaisseaux phloémiens sont atteints, la salive aqueuse est directement injectée avant l'absorption du phloème par le puceron (Martin et al., 1997; Will et al., 2013; Tjallingii & Hogen Esch, 1993; Tjallingii, 2006; Giordanengo et al., 2010). D'après Cherqui & Tjallingii (2000), l'injection de salive semblerait jouer un rôle crucial dans la prévention des réponses de la plante engendrées par le dommage ou la blessure occasionnée.

Le phloème est absorbé par le puceron grâce à la pression intravasculaire couplée à l'activité de succion de la pompe cibariale (pharynx) (Terradot & Giblot Ducray, 2008). Bien que cette sève élaborée ingérée soit riche en sucre, les acides aminés essentiels à sa croissance y sont retrouvés en faible quantité (Sullivan, 2008). Pour pallier à ce manque, une symbiose existe entre des bactéries symbiotiques (appelées symbiotes) et le puceron (Sandström & Moran, 1999). Ces symbiotes fournissent à leur hôte certains acides aminés faiblement présents dans le phloème. Presque tous les pucerons ont besoin d'un symbiote primaire, *Buchnera aphidicola*. Mais, ils peuvent également avoir des symbiotes secondaires ou facultatifs (Oliver et al., 2010). En plus de cette symbiose, le puceron doit ingérer une grande quantité de phloème dont l'excès sera excrété sous forme de miellat au niveau des cornicules (Leroy et al., 2009; Fraval, 2006b). Ce miellat est essentiellement composé de sucres

dont l'origine est principalement végétale. Le panel de sucres composant le miellat reflète la composition de la sève élaborée prélevée par le puceron (Hogervorst et al., 2007; Wäckers, 2000; Leroy et al., 2009).

## 1.6 Les dégâts

Comme précisé précédemment, les pucerons se nourrissent uniquement de la sève phloémienne des plantes grâce à ses pièces buccales piqueuses-suceuses. Ce mode d'alimentation engendre des dommages tant directs qu'indirects chez les plantes hôtes.

### 1.6.1 Les dégâts directs

Afin d'atteindre la sève élaborée, le puceron effectue plusieurs piqûres dans la plante à l'aide de ses stylets. Ces perforations et l'injection de salive liquide dans les tissus végétaux sont susceptibles d'aboutir à des effets toxiques. Ces derniers engendrent des perturbations physiologiques pouvant être traduites par la formation de galles, la crispation des feuilles ou encore leur dépigmentation (Harmel et al., 2008). De même, la croissance et la reproduction de la plante peuvent être endommagées par la réduction de nutriments disponibles suite aux prélèvements de l'insecte (Dedryver et al., 2010).

### 1.6.2 Les dégâts indirects

De par sa forte concentration en sucres, le miellat excrété par le puceron est un lieu favorable au développement de certains microorganismes dont les champignons saprophytes responsables de la fumagine. Cette dernière induit une réduction de la photosynthèse et peut également mener à l'asphyxie de la plante (Leroy et al., 2009; Harmel et al., 2008).

De plus, les pucerons peuvent véhiculer des virus phytopathogènes (Harmel et al., 2010). D'après le ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), 697 espèces de virus sont reconnus dont plus de 400 virus de plantes ont été rapportés (Hogenhout et al., 2008). Les Hémiptères transmettent la majorité des virus (55%) et les pucerons transmettent plus de 50% des virus de plantes vectorisés par les insectes (environ 275 espèces) (Hogenhout et al., 2008; Fereres & Moreno, 2009; Dedryver et al., 2010). En d'autres termes, les pucerons sont certainement de loin les vecteurs de phytovirus les plus fréquents et les plus efficaces (Brault et al., 2010). D'après Dedryver et al. (2010), les dommages indirects causés par la transmission de virus sont souvent de plus grande ampleur que les dommages directs.

### 1.6.3 Les dégâts chez les Solanacées

Chez les tomates, plusieurs espèces de pucerons telles que *M. persicae* et *Aphis gossypii* Glover sont capables de coloniser les folioles. Ils sont notamment responsables de ponctuations chlorotiques et de réduction de croissance via leur mode d'alimentation. Ils peuvent également induire la déformation et l'enroulement des feuilles. De plus, les colonies causent souvent la présence de fumagine induisant une diminution de la photosynthèse. Cependant, les pucerons sont surtout redoutables par leur capacité de transmission de virus. En effet, plusieurs virus peuvent être transmis aux tomates et ce, par diverses espèces de pucerons. A titre d'exemple, le virus Y de la pomme de terre (PVY) est un virus pouvant être transmis à la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), à la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) et au tabac (*Nicotiana tabacum* L.) par plusieurs espèces dont *M. persicae* et *A. gossypii* (Blancard et al., 2009; Hullé et al., 2014; Hullé et al., 1999).

En outre, c'est grâce à son comportement alimentaire que le puceron figure parmi les vecteurs viraux les plus efficaces chez les Solanacées (Terradot & Giblot Ducray, 2008).

### **1.7 Le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer)**

A l'échelle mondiale, *M. persicae* (Figure 4) compte parmi les ravageurs les plus importants des cultures grâce à sa grande efficacité de transmission des phytovirus. Bien qu'il soit probablement originaire d'Asie, il est désormais retrouvé sur tous les continents (McKinlay et al., 1992). Sous la forme aptère, ce puceron a une couleur allant du vert jaunâtre au vert clair et sa taille varie entre 1,2 et 2,5 mm. *M. persicae* ailé possède, quant à lui, une tâche abdominale dorsale foncée et sa taille est comprise entre 1,4 et 2,3 mm (Turpeau-Ait Ighil et al., 2011; Blackman & Eastop, 1994).

Le puceron vert du pêcher peut avoir deux types de cycles de développement. Dans un premier temps, il est possible que le cycle soit un holocycle diœcique. Dans ce cas, les hôtes primaires sont du genre *Prunus* alors que les hôtes secondaires sont des herbacées. Plus d'une cinquantaine de familles botaniques peuvent faire office d'hôte secondaire pour *M. persicae*. De même, un anholocycle peut également se produire lors d'une absence d'hôtes primaires ou dans les régions à hiver doux permettant une survie par parthénogénèse (Turpeau-Ait Ighil et al., 2011; Hullé et al., 1999).



**Figure 4. Individus aptères vert jaunâtre de *M. persicae* (Ephytia, 2013)**

Très polyphage et vecteur de nombreux virus, *M. persicae* est une espèce très dangereuse pour de nombreuses cultures. En petit nombre, ces pucerons engendrent peu de dégâts directs. Cependant, une culture entière peut être anéantie suite à la transmission virale réalisée par quelques individus (Turpeau-Ait Ighil et al., 2011). Un panel de virus peut être véhiculé et transmis par *M. persicae* pour le cas des Solanacées. L'utilisation accrue des pesticides, tels que les néonicotinoïdes, les carbamates, les organophosphorés, les organochlorés et les pyréthri-noïdes, a mené à des résistances de la part de *M. persicae* (Foster et al., 2003).

## 2 *TUTA ABSOLUTA* (MEYRICK).

### 2.1 Généralités

*Tuta absoluta* (Meyrick), communément appelé la mineuse de la tomate (Figure 5), est un Lépidoptère appartenant à la famille des Gelechiidae. Cet insecte est considéré comme l'un des ravageurs les plus dévastateurs des cultures de Solanacées (Tropea Garzia et al., 2012; Desneux et al., 2010). *T. absoluta* est reconnu comme ravageur depuis les années 1960 en Amérique du Sud, sa région d'origine (Guedes & Picanço, 2012). Dans cette même région, ce Lépidoptère s'avère figurer parmi les causes majeures de la perte de rendement des cultures de tomates sous serre et en plein air (Gontijo et al., 2013).

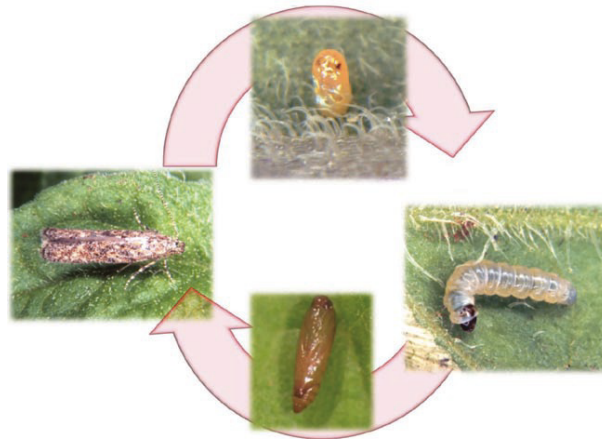


Figure 5. Larve de *Tuta absoluta* sur foliole (Blancard, 2017)

En 2004, l'EPPO a décidé d'ajouter *T. absoluta* à la liste A1 des organismes nuisibles recommandés pour la réglementation, c'est-à-dire en tant que ravageur de quarantaine absent de la zone EPPO (Tropea Garzia et al., 2012). Toutefois, sa présence dans nos régions a été rapportée pour la première fois en fin 2006 dans l'Est de l'Espagne (Urbaneja et al., 2007). Il s'est ensuite répandu à travers le Bassin Méditerranéen et l'Europe (Potting, 2009). En effet, *T. absoluta* a été signalé dans la plupart des pays de la Méditerranée, du Moyen-Orient et de l'Europe de l'Est ainsi que dans les pays d'Europe centrale et du Nord-Ouest (van der Straten et al., 2011). C'est pourquoi, cet insecte a été transféré dans la liste A2 de l'EPPO en tant que ravageur localement présent dans la région de l'EPPO et ce, depuis 2009 (Tropea Garzia et al., 2012). Ainsi, *T. absoluta* est considéré comme une espèce invasive dû à sa capacité de développement très rapide lui permettant de se propager dans de nouvelles zones et d'y causer des dommages économiques considérables (Desneux et al., 2010). La propagation internationale de ce ravageur semblerait être due principalement aux échanges commerciaux de lots de tomates infestées (Desneux et al., 2011).

### 2.2 Morphologie

Le cycle de vie de *T. absoluta* comprend quatre stades de développement morphologiquement différents (Figure 6) : œuf, larve, nymphe (pupe) et adulte (Desneux et al., 2010; Urbaneja et al., 2013). Les œufs sont de forme ovale avec un diamètre d'environ 0,2 mm et une longueur approximative de 0,4 mm (Bloem & Spaltenstein, 2011; Urbaneja et al., 2013). Les œufs fraîchement pondus sont de couleur blanc crème et deviennent progressivement jaunes puis jaunes-orangés au fil du temps (Estay, 2000). La veille de l'éclosion, il est possible de constater deux tâches rouges correspondant aux yeux de la larve (Torres et al., 2001).



**Figure 6. Cycle de développement reprenant les 4 stades de *T. absoluta* (Urbaneja et al., 2013)**

Chez *T. absoluta*, quatre stades larvaires peuvent être distingués (Blancard, 2017). Le premier stade est de couleur crème avec la tête noire et mesure environ 1,6 mm de long. Les deux stades larvaires suivant possèdent approximativement une longueur respective de 2,8 mm et 4,7 mm. Enfin, le dernier stade (L4) peut atteindre 8 mm. De plus, sur la larve en L4 apparaît une tâche rougeâtre au niveau dorsal qui va s'étendre longitudinalement de l'ocelle à la marge externe du corps (Urbaneja et al., 2013). Il est à noter que la couleur de la larve évolue de blanc crémeux à vert profond durant son développement (Bloem & Spaltenstein, 2011).

La nymphe de *T. absoluta* est cylindrique et verdâtre dans sa forme première. Lorsqu'elle devient mature, la couleur de cette dernière vire au brun-noir. Il est également constatable que les pupes mâles sont plus claires et plus petits que les femelles. Cependant, une nymphe mesure environ 4,3 mm de long pour un diamètre de 1,1mm. Généralement, les nymphes sont recouvertes d'un cocon blanc soyeux (Urbaneja et al., 2013; Estay, 2000; Bloem & Spaltenstein, 2011).

Enfin, les adultes mesurent entre 6 et 7 mm de long et sont pourvus d'antennes filiformes. Ils présentent une couleur grise argentée pouvant tirer sur le marron et possèdent des tâches noires sur les ailes antérieures. Il est possible de distinguer la femelle du mâle car cette dernière est plus volumineuse et plus lourde. De plus, son abdomen est de couleur crème (Koppert, 2014b; Desneux et al., 2010; Urbaneja et al., 2013).

### **2.3 Biologie et cycle de développement**

*T. absoluta* est une espèce multivoltine (production de plusieurs générations par an) avec un potentiel de reproduction élevé. Son cycle peut être bouclé en 29 à 38 jours mais peut nécessiter 76 jours à 14°C (Desneux et al., 2010; Pereyra & Sanchez, 2006; Urbaneja et al., 2013; EPP0, 2005). Selon Vercher et al. (2010), jusqu'à 13 générations par an peuvent se succéder dans les conditions qu'offre l'Espagne. Dans le cas de la France, *T. absoluta* aurait la capacité d'atteindre 10 à 12 générations par année (Koppert, 2014b).

D'après une étude menée par Krechmer & Foerster (2015), la température affecte aussi bien le développement, la reproduction et la longévité de *T. absoluta*. Toujours d'après cette recherche, la température limite minimale estimée pour le cycle complet est de 8°C, cette donnée étant similaire aux résultats d'études antérieures. Dans le cas des stades larvaires, la température limite minimale avoisine 6,2°C (Mahdi et al., 2011) à 6,7°C (Krechmer & Foerster, 2015). Le travail de Polat et al. (2016) évalue l'accumulation de chaleur requise pour la réalisation du cycle complet à 466,59 degrés-jours à 20°C.

Sous les conditions Méditerranéennes, cet insecte au stade adulte peut être retrouvé toute l'année (Vercher et al., 2010). La durée de vie moyenne est de 10-15 jours pour les femelles et de 6-7 jours pour les mâles (Estay,

2000). Les femelles vivent plus longtemps que les mâles afin que celles-ci soient sexuellement matures lors de l'émergence de ces derniers (Fernandez & Montagne, 1990). Toutefois, les mâles n'ayant pas eu l'occasion de s'accoupler vivent significativement plus longtemps (Urbaneja et al., 2013).

*T. absoluta* présente des activités crépusculaires à nocturnes. Généralement, ce ravageur reste caché dans la végétation durant la journée. La période entre l'émergence et l'accouplement est assez courte pour les mâles (quelques heures) et est de 20-22 heures pour les femelles (Tropea Garzia et al., 2012). Selon Lee et al. (2014), les femelles sont passives, ne montrent pas de signe de reconnaissance masculine et n'approchent pas les mâles. En revanche, ces derniers manifestent un comportement actif, recherchant et approchant les femelles. Chez *T. absoluta*, l'accouplement dure 4-5 heures et les femelles s'accouplent une seule fois par jour. Sur toute leur durée de vie, ces dernières peuvent s'accoupler jusqu'à six fois (Lee et al., 2014; Urbaneja et al., 2013). La majorité de l'oviposition se produit 7 jours après la première copulation. Durant cette période, pas moins de 70 % des œufs d'une femelle sont pondus en soirée et au crépuscule. Il est à noter qu'une seule femelle peut pondre jusqu'à 260 œufs durant sa vie. Néanmoins, le nombre d'œufs pondus par femelle varie avec les variétés de tomates. Les femelles pondent sur les feuilles supérieures, les tiges ainsi que sur les fruits des plants de tomates (Leite et al., 2004; Urbaneja et al., 2013; Tropea Garzia et al., 2012; Uchôa-Fernandes et al., 1995). D'après Estay (2000), les œufs déposés seuls (rarement en groupe) sont préférentiellement retrouvés sur les feuilles (73%) et dans une moindre mesure sur les nervures et les tiges (21%), les sépales (5%) ou les fruits (1%). De même, Torres et al. (2001) a démontré que les sites d'oviposition préférentiels sur les plantes en pré-floraison sont localisés sur la face inférieure des feuilles dans la portion apicale de la plante.

Au bout de 4 à 6 jours après la ponte (Figure 7), l'éclosion a lieu (Blancard, 2017). Selon l'étude de Cuthbertson et al. (2013), le premier stade larvaire (L1) nécessite environ 18 minutes pour éclore. La larve en L1 vadrouille ensuite en moyenne 12 minutes avant de commencer à creuser sa galerie sous la surface de la feuille. Cette dernière étape dure approximativement 70 minutes. Le développement larvaire du stade L1 à L4 se déroule en 1 à 2 semaines selon les conditions environnementales (Koppert, 2014b). Les recherches de Pereyra & Sanchez (2006) ont montré que le temps de développement larvaire moyen est de  $12,14 \pm 0,18$  jours à 25°C. Une fois que la larve est prête à se nymphoser, celle-ci cesse de s'alimenter et se laisse généralement tomber sur le sol grâce à un fil de soie (Bawin et al., 2015; Bawin et al., 2016; Urbaneja et al., 2013). De manière générale, le stade nymphal se déroule sur le sol mais peut également avoir lieu à l'intérieur des galeries ou sur la plante hôte. Il faudra compter entre 10 et 12 jours avant de voir apparaître l'adulte et ainsi boucler le cycle (Blancard, 2017; Urbaneja et al., 2013).

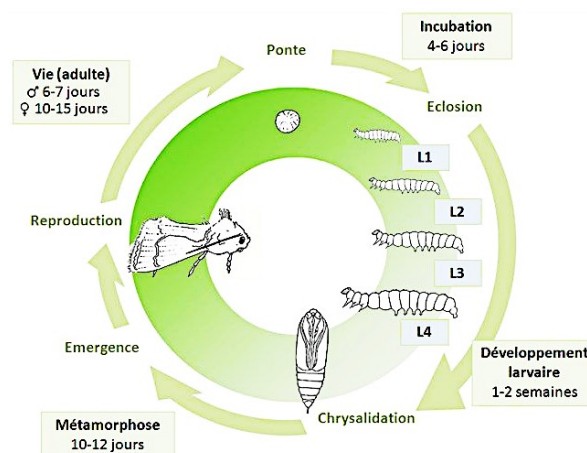


Figure 7. Cycle de développement de *T. absoluta* (Koppert, 2014b)

Bien que cela soit rare chez les Lépidoptères (Vivarium, 1984), *T. absoluta* peut se reproduire parthénogénétiquement en conditions de laboratoire (Caparros Megido et al., 2012). Cette étude insiste sur le fait que la reproduction asexuée de ce ravageur pourrait avoir de lourdes conséquences sur les stratégies de

gestion de ce dernier. Cependant, l'occurrence de cet événement à l'échelle naturel est à clarifier. En effet, la reproduction sexuée permet une meilleure aptitude globale de la population.

## **2.4 Diversité des plantes hôtes**

*T. absoluta* est un insecte oligophage (Siqueira et al., 2000) qui peut se nourrir de différentes espèces de Solanacées (Pereyra & Sanchez, 2006). C'est grâce à son attirance pour certains composés organiques volatils de feuilles de tomates que ce ravageur localise les plantes hôtes et peut pondre (Proffit et al., 2011).

Bien que l'hôte primaire de ce Lépidoptère soit la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), il est également capable d'attaquer et de causer des dommages à plusieurs espèces et genres de Solanacées (Tropea Garzia et al., 2012). En effet, *T. absoluta* a la capacité de s'alimenter, de se développer et de se reproduire sur des Solanacées cultivées telles que l'aubergine (*Solanum melongena* L.), la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.), le poivron (*Solanum muricatum* L.) ou encore le tabac (*Nicotiana tabacum* L.). En outre, ce ravageur peut également être retrouvé sur des Solanacées non-cultivées (Desneux et al., 2010; Desneux et al., 2011). Les hôtes secondaires de *T. absoluta* sont localisés indifféremment dans les terres cultivées, les terrains sauvages, les exploitations forestières et les zones urbaines (Lambinon et al., 2004). Ainsi, ces derniers pourraient lui servir de réservoir ou de refuge. Cependant, il existe peu de certitudes quant à l'efficacité de développement et de reproduction de cet insecte sur les plantes cultivées et non-cultivées reportées dans la littérature comme étant des hôtes potentiels (Bawin et al., 2015).

Des plantes n'appartenant pas aux Solanacées ont également été citées en tant que plantes hôtes (Portakaldali et al., 2013). Toutefois, l'étude de Bawin et al. (2016) a démontré que les espèces ne faisant pas partie des Solanacées sont des hôtes peu probables pour *T. absoluta* car peu d'entre-elles permettent la ponte et aucune d'elles ne supporte le développement larvaire.

## **2.5 Dégâts et importance économique**

### **2.5.1 Les dégâts**

Les larves de *T. absoluta* se nourrissent du mésophylle des parties aériennes des plantes ainsi que des fruits. Ceci engendre des pertes significatives de rendement, des dommages esthétiques et des pourritures pour les tomates vendues en l'état (Bawin et al., 2016). De plus, la fécondation peut être stoppée si les larves s'attaquent aux fleurs. En fait, les plants de tomates peuvent être attaqués à tous les stades de développement, de la plantule à la plante mature (Braham & Hajji, 2012; Urbaneja et al., 2013). Des dégâts sévères menant à la mort peuvent être occasionnés aux plantules lorsque les larves se développent dans la tige principale (Pereyra & Sanchez, 2006). Une fois éclos, les larves pénètrent dans les feuilles, les tiges, les bourgeons et les fruits des plants de tomates où elles se nourrissent et s'y développent (Bloem & Spaltenstein, 2011; Desneux et al., 2010). Les galeries creusées induisent une perte de rendement par une diminution de la capacité photosynthétique de la plante. Celles formées au niveau des tiges altèrent le développement de la plante et peuvent mener à la formation de nécroses. Les fruits attaqués peuvent ensuite être envahis par des pathogènes secondaires provoquant la pourriture de ces derniers (Desneux et al., 2010). De manière générale, les multiples blessures tissulaires provoquées par les larves rendent les plantes plus vulnérables aux maladies secondaires et particulièrement celles causées par les bactéries pénétrant dans les tissus endommagés (Tropea Garzia et al., 2012).

Les dégâts occasionnés aux fruits peuvent atteindre 100% en l'absence de stratégies de contrôle (Urbaneja et al., 2012). En effet, les pertes de rendement se produisent aussi bien dans les productions de fruits vendus en l'état que dans celles à fins industrielles. L'ampleur des pertes est dépendante du succès des contrôles mis en place (Urbaneja et al., 2013). Cependant, la première détection de l'infestation du fruit en champs s'avère complexe. La larve se déplace dans le fruit via un petit trou d'entrée généralement réalisé en dessous des sépales. C'est pour cette raison que les processus post-récoltes sont aussi infectés par le ravageur (Tropea Garzia et al., 2012). Dans ce cas, l'aspect visuel du fruit récolté est altéré (Desneux et al., 2010).

### 2.5.2 L'importance économique

A travers le monde, *T. absoluta* fait partie des insectes ravageurs les plus économiquement importants pour la culture de la tomate. L'introduction de cet insecte dans un pays conduit à une augmentation soudaine de l'utilisation des insecticides chimiques constituant le moyen de lutte principal. Les cultures de tomates en plein air peuvent nécessiter de 10-12 applications à plus de 30 applications par période de culture (Guedes & Picanço, 2012). En plus de causer des préoccupations en termes de santé et d'environnement, ces procédures engendrent une augmentation des coûts de production. Ces derniers peuvent être plus que triplés par l'introduction de *T. absoluta* et le panel d'insecticides utilisés pour son contrôle. En outre, l'utilisation d'insecticides induit l'apparition de populations résistantes à un large éventail de composés et l'élimination des ennemis naturels de ce ravageur (Siqueira et al., 2000; Guedes & Picanço, 2012; Silva et al., 2015). Un impact économique potentiel supplémentaire est possible suite à la perturbation des pratiques de lutte intégrée (IPM). En effet, les insecticides pourraient affecter l'IPM en ayant un effet néfaste sur les agents biologiques de contrôle ainsi que sur les abeilles pollinisatrices (van der Straten et al., 2011).

Un autre impact économique est le fait que ce ravageur possède un statut de quarantaine dans plusieurs pays. En réponse à l'apparition de ce dernier en Europe, les autorités Canadiennes et Américaines imposent des conditions d'importation strictes pour les tomates en provenance de l'Europe (van der Straten et al., 2011). L'Italie et l'Espagne font partie des 10 premiers pays producteurs de tomates au niveau mondial (Desneux et al., 2011). Or, *T. absoluta* est retrouvé sur ces territoires (Speranza & Sannino, 2012; Urbaneja et al., 2007). D'après Desneux et al. (2011), cet insecte apparaît comme une menace majeure pour les pays dont les exportations de tomates sont importantes pour l'économie.

En outre, l'apparition de *T. absoluta* est une menace de grande ampleur pour la durabilité de la production mondiale de tomates (Desneux et al., 2011). C'est pour cette raison que ce travail de fin d'études s'est intéressé à ce ravageur.



### 3 *MACROLOPHUS PYGMAEUS* (RAMBUR)

Comme précisé dans l'introduction, cet insecte possède une capacité de prédation pour les deux ravageurs décrits précédemment. Ainsi, cet ennemi naturel a été choisi lors de ce travail afin d'être le chaînon donnant un sens à l'aspect multitrophique de cette étude.

#### 3.1 Généralités

*Macrolophus pygmaeus* est une punaise du genre *Macrolophus* appartenant à la famille des Miridae et du sous-ordre des Heteroptera. Cette famille est constituée de plus de 10 000 espèces caractérisées par l'absence d'ocelles, un rostre composé de 4 segments et des tarsi tri-articulés (Koppert, 2014a; Chamont, 2016). *M. pygmaeus* est natif de l'écozone Paléartique. Sa distribution s'étend de la Finlande à l'Algérie en passant par les Açores et le Tadjikistan (Sanchez et al., 2012).

Dans la littérature, une confusion subsiste concernant les recherches sur *Macrolophus*. En effet, les deux espèces *M. pygmaeus* et *M. caliginosus* sont confondues dans beaucoup d'études. De plus, *M. caliginosus* est maintenant devenu le synonyme de *M. melanotoma* (Wheeler, 2001). Ces deux espèces se différencient uniquement sur base de la couleur du premier segment antennaire qui est complètement noir chez *M. pygmaeus* alors qu'il comprend une bande centrale blanche chez *M. caliginosus*. Ce critère de différenciation ayant ses limites, il est également possible de les différencier sur base de marqueurs génétiques de l'ADNmt (Perdikis et al., 2003).

#### 3.2 Morphologie

Sur le plan morphologique, les adultes de *M. pygmaeus* (Figure 8) ont une forme effilée et mesurent de 2,9 à 3,6mm. Ces punaises adultes sont de couleur vert clair et possèdent des yeux rouges-marrons situés sur les côtés de la tête. Ils sont équipés de pièces buccales piqueuses-suceuses. Leurs antennes sont longues et le premier article de ces dernières est de couleur noire. Les femelles ont un abdomen plus gros et sont un peu plus grandes en taille. De plus, elles sont dotées d'un ovipositeur. Ce sont ces caractéristiques qui permettent de les différencier des mâles (Wheeler, 2001; Koppert, 2014a; Serail, 2016).

Les œufs de *M. pygmaeus* ont la particularité d'être très allongés. Après éclosion, cette punaise passe par cinq stades nymphaux. Les premiers stades sont de couleur jaune-verte. Progressivement, la couleur des nymphes se rapproche de celle des adultes. Les nymphes âgées sont pourvues d'ébauches d'ailes mais n'ont pas les segments basaux des antennes de couleur noire. Grâce à leurs longues pattes, les adultes et les nymphes ont la capacité de se mouvoir rapidement malgré les trichomes des plantes (Koppert, 2014a; Serail, 2016; Biobest, 2017).



Figure 8. *Macrolophus pygmaeus* adulte (Serail, 2016)

### 3.3 Biologie et cycle de développement

Les températures limites minimales et maximales de *M. pygmaeus* sont respectivement 10°C et 40°C. En deçà de 10°C, le développement s'avère très lent alors que les punaises meurent au-delà de 40°C. La durée de développement de cet insecte dépend à la fois de la température et de la nourriture disponible, aussi bien en termes de quantité que de nature (Fauvel et al., 1987; Koppert, 2014a). La température optimale pour le développement de l'espèce est comprise entre 15 et 25°C (Serail, 2016). La période de développement nécessite une durée plus importante lorsque la température diminue (Mohd et al., 2009). De cette manière, la température devrait être supérieure à 15°C car cela influence positivement le taux d'augmentation de la population. Toutefois, une température excédant 30°C induit une réduction drastique de l'oviposition ou son absence totale (Perdikis & Lykouressis, 2004).

L'espèce *M. pygmaeus* est monogame. Le mâle éprouve de sérieuses difficultés lors de l'accouplement car la femelle n'accepte de copuler qu'après multiples contacts. Plusieurs mâles poursuivent activement la femelle mais un seul est capable de s'accoupler avec cette dernière. Une fois le mâle accepté, la copulation dure en moyenne 4,1 minutes. L'accouplement est principalement réalisé la nuit ou durant les premières heures de la journée. Après quoi, la femelle devient très réticente à une nouvelle copulation. En effet, elle fuit les mâles ou les rejette en balançant son abdomen d'un côté à l'autre. Afin qu'elle soit fertile toute sa vie, le sperme du mâle reste dans ses ovarioles (Franco et al., 2011; Gemeno et al., 2007). Selon Fauvel et al. (1987), la vie des femelles comprend trois périodes : la *préoviposition* de l'émergence au 1<sup>er</sup> jour de ponte, l'*oviposition* correspondant à la phase de ponte et la *postoviposition* du dernier œuf pondu à la mort. Généralement, la femelle s'accouple dans les 3 jours suivant la dernière mue, dite *imaginale*. La ponte débute environ 3 jours après la copulation. Si la ponte ne commence pas dans un délai de 4-5 jours après l'accouplement, celle-ci a rarement lieu. Suivant la température et l'alimentation, une femelle pond entre 100 et 250 œufs et l'oviposition représente entre 58 et 85% de sa durée de vie. La moyenne est de 84,9 jours à 15°C et de 23,3 jours à 30°C. Les œufs sont pondus dans le tissu végétal de la feuille, le pédoncule ou la tige. Il faut minimum 10 jours avant qu'ils éclosent. A 25°C, cela nécessite 11 jours alors qu'il en faut 37 jours à 15°C (Fauvel et al., 1987; Koppert, 2014a; Biobest, 2017; Serail, 2016).

Comme précisé précédemment, la nymphe passe par cinq stades après éclosion avant de devenir adulte. Le passage à l'adulte demande un total de 19 jours à 25°C ou 58 jours à 15°C. Les femelles vivent approximativement 40-45 jours à 25-30°C ou 110 jours à 15°C (Biobest, 2017; Koppert, 2014a; Serail, 2016). Les recherches de Fauvel et al. (1987) ont montré une longévité plus importante chez les mâles. D'après Koppert (2014a), les adultes sont principalement localisés au niveau des tiges et des jeunes pousses alors que les nymphes sont habituellement retrouvées sur la face inférieure des feuilles. Toujours selon ce dernier, l'hiver est passé sous la forme d'œuf car celle-ci supporte relativement bien les basses températures.

### 3.4 Comportement alimentaire

*M. pygmaeus* est une espèce prédatrice polyphage naturellement présente en région Méditerranéenne (Koppert, 2014a; Chamont, 2016). Ce prédateur possède un comportement zoophytophage. Cela signifie qu'il est strictement lié à la plante en plus de la proie. Cette zoophytophagie s'avère positive car elle permet la survie en champs des *M. pygmaeus* lorsque les proies se font rares ou viennent à manquer (Ingegno et al., 2011; Eubanks & Denno, 1999). En effet, cet insecte est capable d'obtenir des hydrates de carbone et d'autres nutriments en s'alimentant directement à partir des tissus végétaux. Ceci le rend indépendant de la disponibilité des proies ou de nectar. D'ailleurs, les Miridae semblent être uniques parmi les arthropodes prédateurs par leur capacité à exploiter les éléments nutritifs des plantes en s'alimentant des tissus de ces dernières (Portillo et al., 2012).

D'après Portillo et al. (2012), *M. pygmaeus* peut réaliser son développement et se reproduire à de faibles niveaux lorsqu'il se nourrit de tiges et de feuilles. Perdikis & Lykouressis (2000) affirment que ce prédateur peut se développer sans présence de proies sur des plantes cultivées telles que les tomates, les aubergines, les concombres, les haricots et les poivrons. L'oviposition est cependant plus faible en cultures d'aubergines et de tomates s'il n'y a pas de proies. Ainsi, *M. pygmaeus* est principalement retrouvé sur les Solanacées, particulièrement en culture de tomates et tabac, mais il est également rencontré sur d'autres cultures (Serail, 2016). Ses performances varient en fonction de la plante sur laquelle il se nourrit. C'est pourquoi il arrive que les femelles ne sachent pas pondre sur certaines plantes (Ingegno et al., 2011; Perdikis & Lykouressis, 2004). La phytophagie est une caractéristique principale de leur biologie permettant leur survie en champs pendant une période relativement longue (Perdikis et al., 2008). L'étude de Mohd et al. (2009) a démontré une capacité de survie de 3,67 jours sans source de nourriture et de  $25,67 \pm 2,33$  jours en s'alimentant uniquement de plantes. Il s'avère également possible d'utiliser des plantes non-cultivées aux abords des cultures afin d'assurer la survie de cette espèce quand les proies viennent à diminuer (Lykouressis et al., 2008). Cette dernière possibilité est intéressante sachant que *M. pygmaeus* peut exceptionnellement causer des dégâts dans les cultures. Ces dommages collatéraux surviennent quand il y a une surpopulation de l'insecte, trop peu de proies disponibles ainsi que lors d'utilisation dans des cultures ou variétés sensibles (Biobest, 2017).

En outre, *M. pygmaeus* est zoophage (Chamont, 2016; Koppert, 2014a). C'est un prédateur s'alimentant préférentiellement d'aleurodes mais aussi de divers ravageurs à corps mou tels que les acariens, les pucerons, les thrips ou encore les œufs et jeunes stades larvaires des Lépidoptères. *M. pygmaeus* se nourrit en insérant ses stylets dans sa proie. Ensuite, il aspire le contenu du corps de cette dernière (Albajes & Alomar, 1999; Koppert, 2014a; Perdikis et al., 2008). Par jour, un adulte est capable de vider entre 40 et 50 œufs d'aleurode (Biobest, 2017) et de consommer en moyenne 6 larves de ce même insecte (Mohd et al., 2009).

### **3.5 *M. pygmaeus* en tant qu'agent de biocontrôle**

Comme précisé précédemment, *M. pygmaeus* est un prédateur polyphage. Ce dernier peut être un agent de lutte biologique efficace car il peut se maintenir et se nourrir sur des plantes hôtes en l'absence des proies (Perdikis & Lykouressis, 2000). En effet, cet espèce a montré un potentiel élevé en lutte biologique pour les cultures de Solanacées et, de manière générale, en cultures maraîchères (Perdikis et al., 2008; Castañé Cristina et al., 2011). En tant qu'agent de biocontrôle, il a été prouvé que les Miridae prédateurs sont efficaces pour la régulation naturelle des aleurodes, des pucerons ainsi que des Lépidoptères ravageurs (Albajes & Alomar, 1999; Koppert, 2014a; Mohd et al., 2009).

Selon Castañé Cristina et al. (2011), le programme de lutte intégrée a été facilement adapté à *M. pygmaeus*. Les lâchers périodiques correspondent à la méthode la plus utilisée pour l'introduction de ce prédateur. Cette méthode peut être améliorée en fournissant, en parallèle de ces lâchers, de l'alimentation alternative hautement adaptée telle que les œufs d'*Ephestia kuehniella* Zeller [Lepidoptera : Pyralidae] (Perdikis et al., 2008; Serail, 2016). A l'échelle mondiale, *M. pygmaeus* est commercialisé depuis les années 1990 et son utilisation en tant que prédateur généraliste a progressivement augmenté dans les serres de tomates au niveau de l'Europe (Judith Arnó et al., 2009; Ghoneim, 2014). C'est pourquoi cette punaise est aisément achetée auprès de compagnies telles que Biobest (Westerlo, Belgique). Ce fournisseur préconise de lâcher *M. pygmaeus* assez tôt dans la saison car le développement de la population est relativement lent (Biobest, 2017). En outre, ce prédateur est vendu et utilisé avec succès dans les programmes de lutte biologique par inoculation combinés avec des pesticides sélectifs et/ou des parasitoïdes d'œufs (Biondi et al., 2013).

### 3.5.1 Prédation vis-à-vis de *Myzus persicae*

Au fil des années, le comportement prédateur de *M. pygmaeus* envers *M. persicae* a largement été étudié sous différentes conditions et cultures (De Backer, Wäckers, et al., 2015; Perdikis & Lykouressis, 2004; Perdikis & Lykouressis, 2000; Lykouressis et al., 2007; Fantinou et al., 2009). Il a été prouvé que la punaise est plus attirée par les plantes infestées par *M. persicae* que par les plantes saines. Ceci résulte d'une réaction suite aux HIPVs (*Herbivore induced plant volatile*) émis (Moayeri et al., 2006). De plus, *M. pygmaeus* préfère consommer le premier stade larvaire de ce puceron. Ceci aurait pour but de maximiser le gain net de nutriments, comme cela est suggéré par la théorie de la stratégie optimale de recherche de nourriture (Fantinou et al., 2009).

Déjà lors d'une étude menée en 1987 (Fauvel et al., 1987), il avait été prouvé que *M. persicae* constitue une excellente proie pour *M. caliginosus*. D'ailleurs, l'article de Perdikis & Lykouressis (2004) appuie le fait que *M. pygmaeus* se maintient très bien sur des plants de poivrons (*Solanum muricatum* L.) lorsque *M. persicae* lui est donné en tant que proie. Lors de cette étude, les femelles et les mâles ont survécu 132,9 et 120,7 jours respectivement à 15°C. Or, les femelles vivent en moyenne 110 jours à 15°C (Biobest, 2017).

De manière générale, les pucerons constituent une bonne source de nourriture pour *M. pygmaeus* (Perdikis & Lykouressis, 2000). Cependant, *M. persicae* améliore particulièrement le taux de reproduction ainsi que la longévité de l'auxiliaire en plus d'être activement recherché en tant que proie (De Backer et al., 2015). *M. pygmaeus* possède une réponse fonctionnelle de type II pour *M. persicae*. Ceci signifie que le taux de prédation augmente avec la densité de proies offertes et finit par atteindre un plateau à des densités élevées (Fantinou et al., 2008).

Lors de leurs expériences sur plants de poivrons, De Backer, Wäckers, et al. (2015) ont testé une densité de 16 *M. pygmaeus* par cage de 7,5 m<sup>3</sup> sur une petite colonie de *M. persicae* (10 individus). Ceux-ci ont permis de réduire de 88% le nombre de pucerons comparé à la cage contrôle où presque 900 individus ont été observés. Dans cette étude, seule la densité la plus importante ayant été testée (48 prédateurs par cage) a pu complètement éradiquer la population de pucerons. Bien que cette densité soit élevée pour la commercialisation, les recherches De Backer, Wäckers, et al. (2015) suggèrent que *M. pygmaeus* a la capacité de protéger la culture contre de nouvelles infestations de *M. persicae*.

### 3.5.2 Prédation vis-à-vis de *Tuta absoluta*

En région Méditerranéenne, pas moins de huit espèces, principalement d'Hemiptera, ont été identifiées en tant que prédateurs de *T. absoluta*. Parmi ces dernières figure *M. pygmaeus*. C'est pourquoi, ce prédateur a été utilisé pendant plusieurs années en plein air et en serre lors d'un programme de lutte intégrée mis en place dans le nord-est de l'Espagne pour les cultures de tomates (Urbaneja et al., 2013; Urbaneja et al., 2012). Selon Alomar et al. (2002), ce prédateur est un ennemi naturel endémique couramment retrouvé dans les cultures de tomates espagnoles.

Les adultes de *M. pygmaeus* attaquent tous les stades pré-imaginales du ravageur. Toutefois, ce prédateur mange davantage les œufs que les larves. Ainsi, plus de 100 œufs sont consommés par jour et par individu (Urbaneja et al., 2013; Urbaneja et al., 2012). Comme dans le cas de *M. persicae*, *M. pygmaeus* possède une réponse fonctionnelle de type II pour *T. absoluta* (De Backer et al., 2014). Dès lors, le taux de prédation augmente avec la densité de proies offertes et finit par atteindre un plateau à des densités élevées (Fantinou et al., 2008).

Lorsque *M. pygmaeus* est bien établi dans la culture, il est capable de réduire l'infestation des folioles ou des fruits jusqu'à 75% et 56% respectivement (Mollá et al., 2009). De même, J. Arnó et al. (2009) ont pu établir sur base d'observations qu'une moyenne de 4,5 individus par plante permet de maintenir les dommages induits aux fruits en dessous de 4% de dommages. En contrepartie, Nannini et collègues (2012) ont montré qu'une densité de 1,79 individus par plante n'est pas suffisante pour atteindre des niveaux de lutte efficace. Cette étude insiste sur la faible croissance démographique du prédateur principalement due à l'application d'insecticides. Quant à Mollá et collègues (2013), ils ont prouvé que *M. pygmaeus* produit très peu de progénitures lorsqu'il s'alimente d'œufs de *T. absoluta* sous des conditions contrôlées. Ceci suggère qu'il n'est pas capable de développer sa population quand seule cette proie est disponible (Mollá et al., 2013; Zappalà et al., 2013). Malgré cela, cette punaise est un agent de biocontrôle efficace contre ce ravageur sous des conditions de serre (Urbaneja et al., 2008) D'ailleurs, une étude récente a pu démontrer que *M. pygmaeus* est capable de discriminer les plants de tomates infestés de *T. absoluta* des plants non-infestés par ce dernier par le biais d'indicateurs olfactifs. En effet, un nombre significativement plus important de ce prédateur était présent sur les plantes infestées par des larves du ravageur. Ceci serait dû à l'orientation préférentielle de *M. pygmaeus* vers les sources de HIPVs telles qu'un plant de tomates infestés par des larves de *T. absoluta* (De Backer, Caparros Megido, et al., 2015).

Bien que *M. pygmaeus* soit un bon prédateur vis-à-vis de *T. absoluta*, il est à garder à l'esprit qu'il n'est pas le seul. Un autre Miridae, *Nesidiocoris tenuis* Reuter, s'avère également efficace contre ce ravageur (Arnó & Gabarra, 2011; Mollá et al., 2009; Bloem & Spaltenstein, 2011; Urbaneja et al., 2013). Ainsi, il est possible d'améliorer les résultats de la lutte biologique contre *T. absoluta* en combinant *M. pygmaeus* à d'autres moyens de lutte tels que d'autres prédateurs ou parasitoïdes (De Backer et al., 2014).

## 4 METABOLISME DU TREHALOSE ET SON INHIBITION

En tant que bio-insecticides potentiels, des inhibiteurs réduisent la disponibilité de l'énergie pour l'insecte. Le tréhalose étant une réserve énergétique (Klowden, 2013), l'inhibition de sa catalyse apparaît comme une potentielle voie de contrôle des ravageurs étudiés.

### 4.1 Le tréhalose

Chez les insectes, le glycogène et le tréhalose constituent les plus importantes réserves d'hydrate de carbone. Ceux-ci sont synthétisés au moment où l'apport en hydrates de carbone est supérieur à ce qui est immédiatement requis. En outre, le tréhalose représente la forme majeure de stockage d'énergie dans l'hémolymph. Lorsque les réserves doivent être mobilisées, tant le glycogène que le tréhalose peuvent être facilement reconvertis en glucose (Klowden, 2013; Thompson, 1999; Thompson, 2003).

Le tréhalose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) est un disaccharide non-réducteur composé de deux unités de glucose liées par un lien  $\alpha, \alpha$ -1,1-glucosidique (Figure 9). Cette caractéristique non-réductrice donne un avantage au tréhalose comparé au glucose. En effet, ce sucre est chimiquement moins réactif. De ce fait, le tréhalose constitue une réserve d'énergie et de carbone (Becker et al., 1996; Elbein et al., 2003; Candy et al., 1997).

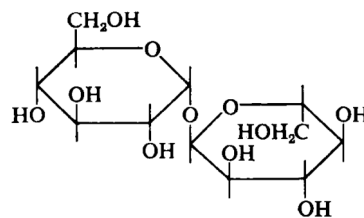


Figure 9. Structure du tréhalose (Wyatt, 1967)

Le tréhalose est synthétisé exclusivement par le corps gras à partir de monosaccharides alimentaires, de glycogène stocké et par néoglucogenèse réalisée avec une variété de précurseurs (Candy et al., 1997). Le corps gras est un tissu apparent qui s'étend de la tête à l'abdomen de l'insecte et se constitue d'un réseau de lobes tissulaires attachés aux organes et baignant dans l'hémolymphe. Ainsi, il est constamment en contact avec l'hémolymphe de l'insecte. De cette manière, les inter-échanges de métabolites entre les cellules du corps gras et l'hémolymphe sont attendus (Becker et al., 1996; Klowden, 2013).

Il existe au moins trois voies métaboliques ayant été décrites pour la biosynthèse du tréhalose. Cependant, la voie la plus connue et répandue implique le transfert d'une unité de glucose de l'UDP-glucose au glucose-6-phosphate pour former du trehalose-6-phosphate et de l'UDP (Elbein et al., 2003). Cette réaction est catalysée par la tréhalose phosphate synthase et permet de former le lien glycosidique  $\alpha$ 1- $\alpha$ 1 (Thompson, 2003). La dernière étape de cette biosynthèse est alors l'hydrolyse du tréhalose-6-phosphate en tréhalose et en phosphate inorganique (Candy & Kilby, 1961). Ce processus requière de l'énergie sous forme d'ATP et d'UTP. Ainsi, le phosphate enrichi en énergie nécessaire à la synthèse de tréhalose est principalement produit par l'oxydation des acides gras (McDougall & Steele, 1988; Becker et al., 1996).

Le tréhalose est une molécule plus large que le glucose et diffuse plus doucement, ce qui lui permet d'être présent en concentrations élevées dans l'hémolymphe. Le maintien d'une haute concentration en tréhalose permet de faciliter sa diffusion vers tous les organes de l'insecte (Klowden, 2013; Wyatt, 1967). Cette concentration varie en fonction de l'espèce, bien qu'elle soit généralement comprise entre 1 et 2% (p/v) (Becker et al., 1996; Moriwaki et al., 2003; Candy et al., 1997). A titre d'exemple, cette concentration s'élève à  $678,9 \pm 170,3$  mM pour *M. persicae* (Moriwaki et al., 2003) contre 10 mM chez les larves de *Bombyx mori* L. [Lepidoptera : Bombycidae] (Kono et al., 1993). En outre, le niveau de tréhalose contenu dans le l'hémolymphe varie également avec les hydrates de carbone provenant de l'alimentation. D'ailleurs, ces derniers constituent la principale source d'énergie pour les insectes (Thompson, 1999). Enfin, la concentration en tréhalose varie dans certaines cellules en fonction du stade de développement, du niveau nutritionnel ainsi qu'avec l'environnement (Elbein et al., 2003; Becker et al., 1996).

Comme précisé précédemment, le tréhalose constitue un sucre de réserve. De même, il est l'hydrate de carbone le plus important pour le vol des insectes. Durant le vol, il est essentiel d'assurer l'apport d'énergie nécessaire aux muscles et aux autres tissus. Dès lors, le tréhalose est consommé lors d'activité de vol afin de procurer de l'énergie à l'insecte (Candy et al., 1997; Becker et al., 1996). Le tréhalose joue aussi un rôle au niveau de la protection contre certains stress. En outre, il possède des qualités en tant que cryoprotecteur. Certains insectes peuvent ainsi accumuler du tréhalose afin de se protéger du gel. D'ailleurs, ce dernier est plus efficace pour la stabilisation des membranes que certains cryoprotecteurs tels que le glycérol ou le saccharose. De plus, le tréhalose permet la stabilisation des protéines lors de stress thermiques ou osmotiques. Finalement, ce sucre est impliqué dans la régulation de l'alimentation (Thompson, 2003).

## 4.2 La dégradation du tréhalose via la tréhalase

La dégradation du tréhalose peut être réalisée par plusieurs voies dont celle de l'hydrolyse. Dans ce cas, le tréhalose est influencé par une enzyme, la tréhalase ( $\alpha$ -glucoside-1-glucohydrolase, EC 3.2.1.28), pour produire du glucose. En effet, la tréhalase catalyse l'hydrolyse irréversible du tréhalose en deux molécules de glucose selon une cinétique d'équilibre rapide. Après quoi, le glucose peut être utilisé pour des synthèses ou être catabolisé via la glycolyse ou la voie des pentoses phosphates. Il est à noter que la tréhalase hydrolyse tout le tréhalose disponible. C'est pour cette raison que son activité dans les tissus de l'insecte doit être contrôlée (Terra & Ferreira, 1994; Klowden, 2013; Thompson, 2003; Silva et al., 2004; Becker et al., 1996). Bien que l'activité de la tréhalase est en partie sous contrôle hormonal, le mécanisme de régulation de celle-ci n'est pas entièrement compris (Shukla et al., 2015).

La tréhalase est l'une des carbohydrases les plus répandues chez l'insecte. Elle intervient tant au niveau de l'intestin moyen que dans les muscles liés à l'activité de vol, le corps gras et les glandes labiales (Wyatt, 1967). Elle est donc active dans toute une série de tissus et d'organes de l'insecte, y compris l'hémolymphe (Thompson, 2003). Dans les cellules de l'intestin moyen de l'insecte, cette enzyme peut être retrouvée dans les fractions solubles ou membranaires. Les tréhalases soluble et membranaire peuvent être trouvées en quantité variable dans l'intestin moyen de différents insectes. Cependant, la tréhalase soluble est prédominante chez la plupart des insectes (Terra & Ferreira, 1994). D'après Wyatt (1967), la fonction physiologique principale de la tréhalase soluble serait de récupérer le tréhalose ayant diffusé de l'hémolymphe vers la lumière intestinale afin d'éviter sa perte. Ainsi, le tréhalose ayant diffusé peut être clivé en glucose. Ce dernier peut alors être absorbé pour ensuite entrer dans l'hémolymphe et être finalement reconverti en tréhalose au niveau du corps gras (Wyatt, 1967; Becker et al., 1996).

## 4.3 Inhibiteurs de tréhalase

Lorsque la tréhalase est inhibée de manière sélective, cela induit une hypoglycémie chez l'insecte. Cette inhibition engendre une réduction considérable du métabolisme lié au glucose ainsi qu'un dysfonctionnement des systèmes biologiques du maintien de la vie de l'organisme en tant que résultat final. Plusieurs cas de traitements d'insectes à l'aide d'inhibiteurs de tréhalase ont été reportés (Park et al., 2008).

La phloridzine est un composé phénolique présent uniquement dans le genre des pommes, *Malus* (Montgomery & Heinrich, 1974). Selon une étude de Rafaeli-bernstein & Mordue (1974) menée sur *Locusta migratoria migratorioides* L. [Orthoptera : Acrididae], la phloridzine altère significativement la réabsorption du glucose par les tubes de Malpighi. De même, Silva, Terra, & Ferreira (2006) a montré que la phloridzine inhibe l'activité de la tréhalase liée à la membrane chez *Diatraea saccharalis* (Fabricius) [Lepidoptera : Pyralidae].

Park et al. (2008) se sont penchés sur deux autres inhibiteurs de tréhalase, l'amygdaline et la validamycine A. Ceux-ci ont été testés sur la tréhalase de larves de mouche domestique, *Musca domestica* L. [Diptera : Muscidae]. Les résultats de cette étude se sont avérés concluants. Silva et al. (2004) ont mis en évidence l'amygdaline comme étant un inhibiteur de tréhalase efficace agissant sur la tréhalase du moyen intestin de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) [Lepidoptera : Noctuidae]. L'amygdaline fait partie des nitrolosides, substances naturelles contenant des cyanides. Elle est le composant majeur des noyaux d'abricot, des amandes amères et des pêches ainsi que des graines de pommes, poires et prunes. L'amygdaline est un composé cyanogénique appartenant au groupe des glycosides cyanogéniques aromatiques (Kolesár et al., 2015).

Quant à la validamycine A, elle est notamment produite par une bactérie, *Streptomyces hydroscopicus*, en fermentation industrielle. Elle est structurellement similaire au tréhalose et agit comme un inhibiteur compétitif

puissant de la tréhalase (Li et al., 2016; Tatun et al., 2015). Son rôle en tant qu'inhibiteur de tréhalase a été reporté dans diverses études incluant différents ordres d'insectes tels que les Lépidoptères, les Diptères ou encore les Orthoptères (Asano et al., 1990; Tatun et al., 2015). De même, les recherches de Tatun et al. (2015) ont démontré une efficacité de la validamycine A durant le stade larvaire de *Tribolium castaneum* (Herbst) [Coleoptera : Tenebrionidae], aussi bien par alimentation que par injection. Ainsi, les résultats ont souligné une diminution significative de l'activité de la tréhalase pendant les stades larvaires, pupes et adultes.

L'inhibition de l'activité de la tréhalase est considérée comme un mode d'action attractif pour le développement de nouveaux agents de contrôle contre les insectes ravageurs (Park et al., 2008). Les quelques exemples d'inhibiteurs de tréhalase cités ci-dessus montrent leur utilisation potentielle en tant que bio-insecticides dans les programmes de lutte intégrée contre les ravageurs. Dans le cas de ce travail de fin d'études, il est facilement compréhensible que les inhibiteurs étudiés doivent avoir la capacité de contrôler les ravageurs, *M. persicae* et *T. absoluta*, tout en ayant un effet minimal sur l'auxiliaire, *M. pygmaeus*. Sans quoi, leur utilisation est contradictoire à une bonne lutte intégrée et n'a pas lieu d'être.



### III. OBJECTIFS

Dans un premier temps, ce travail de fin d'études (TFE) visait à évaluer l'effet de différents bio-insecticides potentiels sur la mortalité de deux ravageurs de Solanacées, *Myzus persicae* et *Tuta absoluta* ainsi que sur leur ennemi naturel commun, *Macrolophus pygmaeus*. Pour ce faire, cette partie de TFE a été consacrée à l'étude du taux de mortalité des 3 insectes par le biais d'alimentation artificielle dans laquelle les inhibiteurs de tréhalase ont été incorporés. Ainsi, trois inhibiteurs ont été pris en compte dans ce travail :

- La phloridzine
- L'amygdaline
- La validamycine A

Dans cette même partie, une étude multitrophique (diète – *M. persicae* – *M. pygmaeus*) a été réalisée dans le but d'évaluer l'impact des inhibiteurs sur le prédateur en termes de mortalité.

Ensuite, des analyses protéomiques ont été réalisées sur les couples insectes-inhibiteurs pour lesquels un effet sur la mortalité a été constaté. Cette partie avait pour but d'améliorer la compréhension au sujet du/des mode(s) d'action de ces inhibiteurs en investiguant les modifications d'expressions protéiques engendrées par l'ajout de ces derniers dans des diètes artificielles.

Enfin, les inhibiteurs ont été testés par aspersion de plants de tabac afin d'évaluer leur effet sur la mortalité de *M. persicae*. Les aspersion ont été effectuées en prévention ainsi qu'en post-infestation de manière à étudier les éventuelles différences d'efficacité.

## IV. PARTIE EXPERIMENTALE

### 1 *MATERIELS ET METHODES*

#### 1.1 Elevages

##### 1.1.1 Elevage de *Myzus persicae*

L'élevage de *Myzus persicae* a été mis en place à partir de la souche MPCH12 du laboratoire d'entomologie fonctionnelle et évolutive (EFE, Gembloux Agro-Bio Tech). Celle-ci était maintenue sur fève dans une logette ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ;  $60\% \text{ HR} \pm 5\%$  ; 16 :8-h j:n). Afin de lancer l'élevage sur Solanacées, des pucerons provenant de cette souche ont été placés sur des plantes de tabac ayant atteint le stade 4-5 feuilles. Après quoi, les plantes infestées ont été mises en cages BugDorm® (47,5 (L) x 47,5 (l) x 47,5 (h) cm) à raison de 12 plantes par cage.

Les graines de tabac ont été semées en bac sur du terreau universel (La Plaine Chassart®) préalablement humidifié. Les plantules ont été repiquées individuellement dès le stade 2-3 feuilles. Le repiquage a été réalisé avec le même terreau dans des pots Soparco® de dimensions 8 (L) x 8 (l) x 7 (h) cm. Afin de stimuler et d'accélérer la croissance des plantes, trois engrais (FloraGro®, FloraMicro® et FloraBloom®) ont été ajoutés à l'eau d'arrosage de manière à avoir une concentration de 1ml par litre pour chacun de ceux-ci. Les plantes ont séjourné dans une chambre de culture ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ;  $60\% \text{ HR} \pm 5\%$  ; 16 :8-h j:n) et ce, jusqu'à leur utilisation pour l'élevage de pucerons.

##### 1.1.2 Elevage de *Tuta absoluta*

*Tuta absoluta* utilisé pour ce travail provenait de l'élevage de quarantaine du laboratoire EFE (Gembloux Agro-Bio Tech). L'élevage a bénéficié d'une température de  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $60\% \text{ HR} \pm 5\%$  ; 16 :8-h j:n). Les insectes ont été précautionneusement contenus dans de grandes cages BugDorm® de dimensions 93,0 (L) x 47,5 (l) x 47,5 (h) cm.

*T. absoluta* a été maintenu sur des plants de tomates entiers. Afin d'éviter la limitation en ressource alimentaire, les plants ont été renouvelés de manière à garder constamment un minimum de 6 plantes non attaquées dans la cage. Les graines de plants de tomates (variété MoneyMaker) ont été commandées à la société Graines – Semences. Elles ont été semées par 160 graines à intervalle de 2 semaines. Chaque semi a été divisé dans quatre récipients rectangulaires (40 graines/récipient). Pour ce faire, du terreau universel (La Plaine Chassart®) a été déposé dans lesdits récipients sans être tassé. Après quoi, les graines ont été disposées et recouvertes par une fine couche du même terreau. Les récipients ont été placés sous serre et arrosés pour humidifier complètement le terreau. Une fois le stade deux feuilles atteint, les plantules pouvaient être repiquées individuellement en terreau dans des pots Göttinger® de 10 cm de diamètre pour une hauteur de 8 cm. Enfin, les plantes ont été laissées sous serre et arrosées régulièrement jusqu'à leur utilisation pour l'élevage.

### 1.1.3 Elevage de *Macrolophus pygmaeus*

Pour cette étude, un élevage de *Macrolophus pygmaeus* a été mis en place. Deux tubes de *Macrolophus*-System contenant chacun 250 punaises ont été fournis par la société Biobest (Westerlo, Belgique). Les insectes ont alors été placés dans des cages BugDorm® de dimensions 93,0 (L) x 47,5 (l) x 47,5 (h) cm ou 47,5 (L) x 47,5 (l) x 47,5 (h) cm. L'élevage de *M. pygmaeus* a été maintenu sur des plants de tomates. Ceux-ci ont été cultivés de la même manière que pour l'élevage de *T. absoluta*, les plantes étant renouvelées régulièrement. De plus, des œufs stériles d'*Ephestia kuehniella* Zeller ont été donnés en guise de proies fictives pour compléter l'alimentation de l'auxiliaire. Ces derniers provenaient du produit Nutrimac™ vendu par Biobest. Les *M. pygmaeus* ont été élevés dans une logette à 20°C ± 2°C (60% HR ± 5% ; 16 :8-h j:n).

## **1.2 Diètes artificielles**

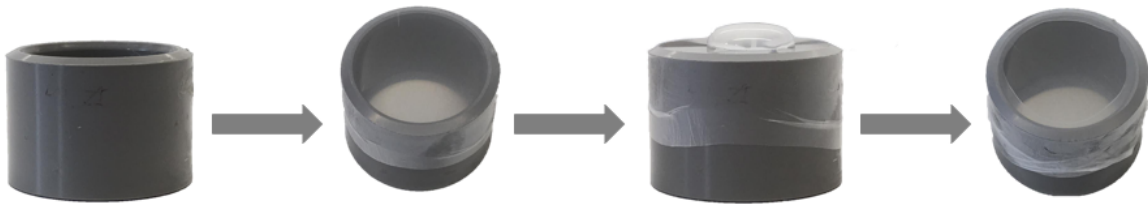
Une première partie de ce travail de fin d'études a été consacrée à l'étude des effets de différents bio-insecticides potentiels mis en diète artificielle sur les trois insectes étudiés. Dans celle-ci, un screening de plusieurs bio-insecticides potentiels a été réalisé dans le but de déterminer d'un éventuel effet sur la mortalité des insectes concernés.

### 1.2.1 Tests préliminaires

En attendant que les différents élevages nécessaires à ce travail soient prêts, des tests préliminaires ont été réalisés sur le puceron vert du pois, *Acyrtosiphon pisum* Harris. Les pucerons de cette espèce provenaient de l'élevage maintenu sur fève par le laboratoire EFE (Gembloux Agro-Bio Tech). Deux inhibiteurs ont été testés sur ce puceron : la phloridzine dihydrate et l'alendronate sodium dihydrate. Ceux-ci ont été fournis par la société Sigma-Aldrich© (Overijse, Belgique). Les concentrations ayant été choisies pour ces tests étaient 25µg/ml pour la phloridzine ainsi que 1 µg/ml et 10 µg/ml pour l'alendronate.

Dans un premier temps, l'effet de la phloridzine dihydrate sur la mortalité d'*A. pisum* a été évalué en alimentation artificielle. Pour ce faire, une diète contrôle composée de 15% de sucrose a été utilisée en tant que diète de référence pour la comparaison avec la diète contenant l'inhibiteur. Le pH de la diète a été corrigé pour être compris entre 6,9 et 7,5. Afin de préparer la diète à base de phloridzine 25 µg/ml, une solution mère d'une concentration de 1mg/ml a été placée dans un bain-marie à 80°C jusqu'à dissolution complète de la phloridzine. Une dilution de 40 fois a été effectuée à l'aide d'une solution sucrose 15% pour atteindre la concentration de 25 µg/ml. Le pH de cette diète a été ajusté avec du NaOH 0,1M et de l'HCl 0,1M de manière à ce qu'il soit équivalent au pH de la diète contrôle. Après quoi, les deux diètes ont été filtrées avec un filtre 0,2 µm à l'aide d'une seringue.

La mise en place des dispositifs de distribution des diètes a été réalisée sous hotte à flux laminaire verticale de façon à éviter le développement de bactéries et de champignons dans ces dernières. Le dispositif, nommé « cylindre » dans la suite de la rédaction, était constitué d'un cylindre en PVC opaque de 4 cm x 3 cm (Ø x h) sur lequel un Parafilm était étiré suffisamment afin que les stylets du puceron puissent le traverser pour prélever la diète. Sur ce dernier, 1000 µl de diète (contrôle ou contenant l'inhibiteur) ont été disposés et recouverts par un deuxième Parafilm (Figure 10).



**Figure 10. Etapes de préparation d'un dispositif de diète pour puceron (photos : Van De Velde Megane)**

Une fois les cylindres préparés, 20 pucerons adultes ont été introduits dans chacun d'eux. L'expérimentation a été menée sur 5 cylindres par diète, soit un total de 100 pucerons et 5 répétitions par modalité testée. Enfin, les cylindres contenant les pucerons ont été déposés dans un phytotron à  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (60% HR  $\pm$  5% ; 16 :8-h j:n). Le nombre de pucerons morts par cylindre a été relevé après 48 heures sur diète. Les pucerons ayant survécu à cette expérimentation ont été rassemblés par modalité et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La seconde partie des tests préliminaires s'est intéressée à l'effet de l'alendronate sur la mortalité d'*A. pisum*. Dans ce cas, la diète contrôle (sucrose 15%) a été conçue de la même façon que précédemment. Deux concentrations en alendronate ont été testées (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Les dilutions ont été effectuées par ajout d'une solution de sucrose 15%.

Les 3 diètes à tester étant préparées, le pH de celles-ci a été vérifié et ajusté à l'aide de NaOH ou HCl 0,1M pour être compris entre 6,9 et 7,5. Ensuite, les diètes ont été filtrées (filtre de 0,2  $\mu\text{m}$ ) et placées dans des dispositifs similaires à ceux produits pour la phloridzine (Figure 10). Comme pour cette dernière, 5 cylindres ont été confectionnés par diète. Vingt pucerons adultes ont pu être introduits dans chaque cylindre de façon à avoir 5 répétitions par diète avec un total de 100 pucerons par modalité évaluée. Les cylindres contenant les pucerons ont séjourné dans un phytotron à  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (60% HR  $\pm$  5% ; 16 :8-h j:n).

Après 24 et 48 heures, le nombre de pucerons morts par cylindre a été relevé pour l'ensemble des diètes. Après le délai de 48 heures, les pucerons encore en vie ont été rassemblés par modalité dans un Eppendorf qui a ensuite été placé au  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Pour chacune des expériences, les données brutes ont été transformées en taux de mortalité (exprimé en pourcentage) par cylindre. La moyenne du taux de mortalité ainsi que l'écart-type associé ont été calculés sur l'ensemble des 5 cylindres et pour chacune des diètes. Finalement, une analyse de la variance (ANOVA) à une variable fixe (la diète) a été réalisée pour chaque relevé sur les taux de mortalité à l'aide du logiciel Minitab 17 dans le but d'attester d'une éventuelle différence de moyennes entre la diète contenant l'inhibiteur et la diète contrôle.

### 1.2.2 Tests sur *Myzus persicae*

Dans le but d'évaluer l'effet de différents inhibiteurs de tréhalase sur la mortalité de *M. persicae*, trois bio-insecticides potentiels ont été sélectionnés : la phloridzine dihydrate, l'amygdaline et la validamycine A. Les deux premiers inhibiteurs ont été fournis par la société Sigma-Aldrich© alors que le dernier provenait de Santa Cruz Biotechnology® (Texas, USA). Pour ces tests, les inhibiteurs de tréhalase ont été testés en diète artificielle à des concentrations de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Pour tester les différents inhibiteurs de tréhalase à une concentration de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , les diètes ont été préparées identiquement à celles d'*A. pisum*. Toutefois, la solution mère de chaque inhibiteur a été diluée 100 fois dans une solution de sucrose 15 %. Cinq cylindres par diète testée ont alors été conçus similairement à

ceux du protocole d'*A. pisum* de manière à avoir 5 répétitions par modalité. Dans chacun de ceux-ci, 40 pucerons adultes ont été placés. Le nombre de pucerons morts par cylindre a été relevé après 24 et 48 heures.

Afin de tester la concentration de 25 µg/ml pour l'ensemble des inhibiteurs sélectionnés, le protocole suivi était identique à celui réalisé au point 1.2.1 lors du test de la phloridzine sur *A. pisum*. Cependant, l'étape comprenant le passage au bain-marie n'a été nécessaire que dans le cas de la phloridzine. Le nombre de pucerons morts par cylindre a été relevé après 24 et 48 heures sur diète pour l'ensemble des modalités.

Pour les deux expérimentations, les pucerons toujours vivants ont été rassemblés par modalité dans un Eppendorf et conservés à -80°C. Les données brutes ont quant à elles été traitées comme celles d'*A. pisum*.

### 1.2.3 *Tests sur Tuta absoluta*

Dans le cas de *T. absoluta*, les diètes utilisées pour tester les différents inhibiteurs de tréhalase étaient à base de jus de plants de tomates. Elles se présentaient sous forme solide afin que la larve puisse s'en alimenter et s'en servir en tant que lieu de vie, similairement aux conditions naturelles.

Pour ce faire, les parties végétatives des plants de tomates ont été passées dans une centrifugeuse de manière à en extraire le jus (Figure 11). Celui-ci a ensuite été conservé à -80°C.



**Figure 11. Centrifugeuse servant à récolter le jus des plants de tomates (photo : Van De Velde Megane)**

Dans un premier temps, la phloridzine a été testée à des concentrations de 25 µg/ml et 50 µg/ml. Le jus a été décongelé et centrifugé à 5000 g durant 5 min. Seul le surnageant a été récupéré afin d'éliminer les impuretés et morceaux des plants restants. Dans cette expérimentation, la diète témoin était composée de 64% de jus et 36% d'eau distillée auxquels 1% p/v d'agar a été ajouté. Les diètes contenant l'inhibiteur ont été préparées similairement à la diète témoin. Toutefois, une solution stock de phloridzine concentrée à 1 mg/ml a été ajoutée aux diètes de manière à obtenir les concentrations précitées. L'ensemble des diètes ont été autoclavées durant 20 min à 120°C. Il est à noter que l'addition de la solution stock a été effectuée sur plaque agitatrice et chauffante après le passage à l'autoclave afin de ne pas dénaturer la phloridzine.

Une fois les diètes autoclavées, celles-ci ont été coulées sous hotte à flux laminaire verticale dans des boîtes de Pétri en plastique (35mm Ø x 10 mm h) de sorte que la gélose soit d'une épaisseur de 5 mm. Pour chacune des modalités, 10 boîtes ont été préparées et une larve de stade L3-L4 a été placée sur la diète. Ainsi, 10 larves ont été testées pour chaque modalité à raison d'une larve par boîte. Les diètes ont ensuite été disposées

sur des cupules en plastique préalablement recouvertes de Parafilm. Les dispositifs ont finalement été refermés par des cupules perforées permettant les échanges gazeux (Figure 12).



**Figure 12. Etapes de préparation des diètes pour *T. absoluta* (photos : Van De Velde Megane)**

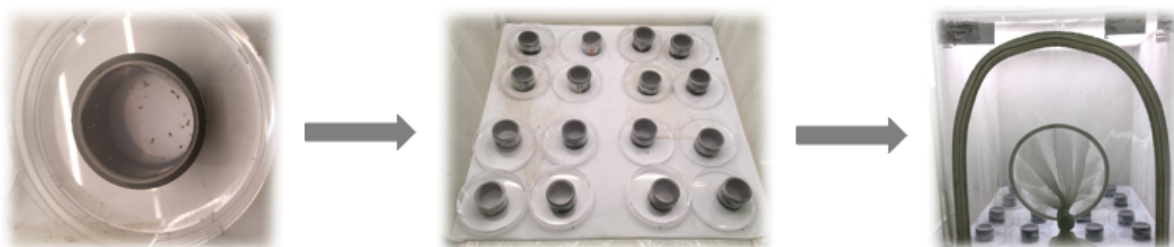
Par la suite, trois autres expérimentations ont été menées afin de tester respectivement la phloridzine, l'amygdaline et la validamycine A à une concentration de 100 µg/ml. Le protocole suivi était identique à celui décrit précédemment à quelques exceptions près. En effet, pour ces manipulations les larves ont subi une isolation de 24 heures en l'absence de nourriture dans le but de les affamer avant de les mettre sur diète. De plus, l'étape du bain-marie n'a pas été nécessaire dans le cas de l'amygdaline et de la validamycine A. Les diètes contrôles ont, quant à elles, été reproduites à l'identique.

Pour toutes les expériences, le nombre de larves mortes et vivantes a été relevé après 24 heures, 48 heures et 72 heures. Les données brutes ont ensuite été testées statistiquement. Pour cela, le nombre de larves mortes et vivantes de chaque inhibiteur a été comparé avec les données de la diète contrôle grâce à un test exact de Fisher et ce, pour tous les pas de temps.

#### 1.2.4 Tests sur *Macrolophus pygmaeus*

Dans cette partie du travail, une étude multitrophique a été réalisée afin de tester l'effet des différents inhibiteurs (phloridzine, amygdaline et validamycine A) sur la mortalité de l'ennemi naturel. Une concentration de 25 µg/ml en inhibiteur a été sélectionnée pour évaluer cet effet. Le protocole a été effectué de sorte que le prédateur soit amené à s'alimenter de pucerons ayant préalablement ingéré lesdits inhibiteurs.

Ainsi, 10 dispositifs de diètes similaires en tout point à ceux décrits à la section 1.2.2 ont été préparés par modalité à tester. Dans chacun de ceux-ci, 40 pucerons adultes ont été placés pour qu'ils puissent s'acclimater et se nourrir de la diète artificielle. Les cylindres ont été placés dans un phytotron (20°C ± 2°C ; 60% HR ± 5% ; 16 :8-h j:n). Après 24 heures, tous les cylindres ont été standardisés de manière à ce qu'il n'y ait plus que 30 pucerons dans chacun d'eux et un *M. pygmaeus* a été ajouté par dispositif. Une fois cette étape terminée, le cylindre a été retourné sur une partie de boîte de Pétri (fond ou couvercle) afin de faciliter l'observation à l'intérieur de ce dernier. Tous les dispositifs ont ensuite été placés à l'intérieur de cages BugDorm® de dimensions 47,5 (L) x 47,5 (l) x 47,5 (h) cm dans une logette à 20°C ± 2°C (60% HR ± 5% ; 16 :8-h j:n) (Figure 13).



**Figure 13. Dispositifs utilisés durant l'expérimentation sur *M. pygmaeus* (photos : Van De Velde Megane)**

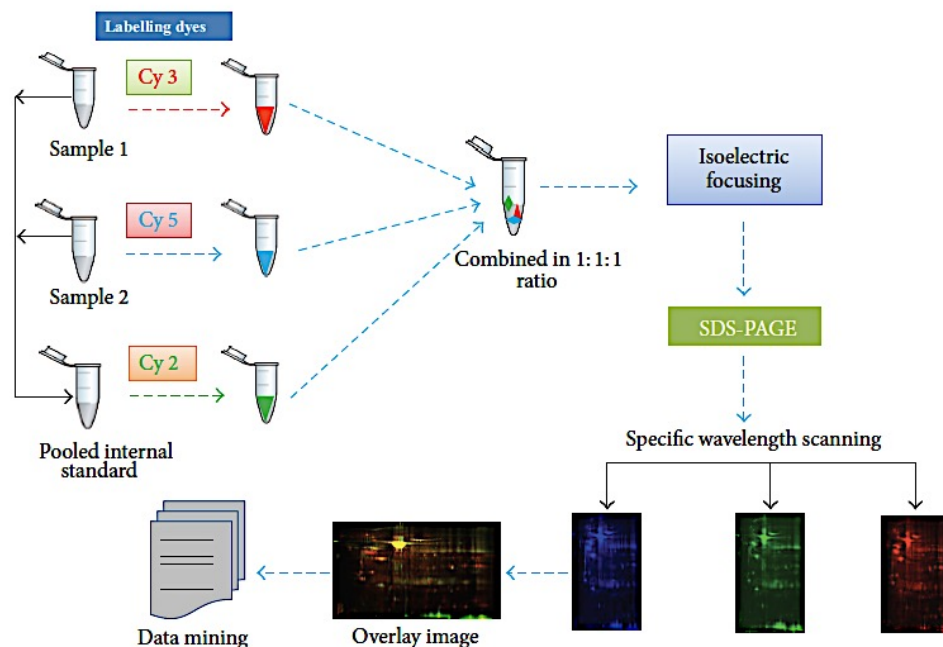
Pour chaque modalité testée, le nombre de *M. pygmaeus* morts et vivants a été relevé toutes les 24 heures et ce, jusqu'à 72 heures. Pour chaque pas de temps et inhibiteur, ce relevé a été comparé statistiquement au nombre d'individus morts et vivants obtenus pour les diètes témoins. Pour ce faire, un test exact de Fisher a été utilisé.

### 1.3 Analyses protéomiques

Dans le cadre de cette recherche, deux études protéomiques ont été menées. La première analyse a été réalisée afin d'étudier les modifications d'expressions protéiques engendrées par la phloridzine à 25 µg/ml sur les pucerons *A. pisum* par rapport aux pucerons témoins. Dès lors, 2 échantillons préalablement mis à -80°C ont été préparés pour l'étude : pucerons témoins alimentés avec du sucrose 15% et pucerons ayant ingéré la phloridzine.

Quant à la deuxième étude comparative, celle-ci a été menée sur les pucerons *M. persicae* et visait à comparer les modifications d'expressions protéiques engendrées par les trois inhibiteurs (phloridzine, amygdaline et validamycine A) concentrés à 10 µg/ml par rapport aux pucerons témoins. De plus, les profils protéiques des inhibiteurs ont également pu être comparés entre eux. Dans cette seconde manipulation, quatre échantillons préalablement congelés ont dû être préparés : pucerons témoins, pucerons ayant ingéré la phloridzine, pucerons ayant ingéré l'amygdaline et pucerons ayant ingéré la validamycine A.

Pour les deux expérimentations, une 2D-DIGE (*Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis*) (Figure 14) a été réalisée afin de comparer les expressions protéiques induites par les différents traitements. Les étapes subies par les échantillons étaient identiques et sont décrites dans les paragraphes ci-après.



**Figure 14. Représentation des différentes étapes d'une 2D-DIGE. Les protéines sont extraites d'un échantillon et subissent un marquage fluorescent (Cy3, Cy5 ou Cy2). La première dimension (IEF) vise à séparer les protéines suivant leur point isoélectrique alors que la deuxième dimension (SDS-PAGE) les sépare selon leur poids moléculaire. Ensuite, les gels sont scannés aux longueurs d'ondes respectives pour les marqueurs. Enfin les images sont analysées (Paul et al., 2013)**

### 1.3.1 Préparation des échantillons

Les échantillons de pucerons ont été broyés à l'aide d'un micropilon dans 100 µl et 200 µl de tampon UT (urée 7M, thiourée 2M, 0,5% p/v CHAPS) respectivement pour *M. persicae* et *A. pisum*. Les Eppendorfs ont ensuite été centrifugés pendant 10 min à 4°C à 12000 RPM afin de récupérer le surnageant. Après quoi, les protéines de chaque échantillon ont pu être extraites suivant le protocole B du *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Royaume-Uni) et resuspendues dans 100 µl de tampon UT. Il est à noter que ces différentes manipulations ont nécessité un travail sur glace afin de ne pas dégrader les protéines.

Une fois les échantillons préparés, ceux-ci ont été dosés suivant le protocole *RC-DC Microfuge Tube Assay* (1,5ml) (Bio-Rad, Hercules, USA) de sorte que leur concentration respective soit connue. Le protocole précité a été optimisé par la réalisation de deux lavages des échantillons afin d'éliminer complètement les traces d'UT. Pour ce faire, les étapes impliquant le *RC Reagent I* et le *RC Reagent II* ont été répétées avant de continuer la manipulation.

Le pH des échantillons destinés au marquage fluorescent a été ajusté à 8,5 avec du NaOH 100 mM. Ces derniers ont ensuite été dilués à 5 µg de protéines/µl par ajout d'UT-tris. Afin d'effectuer le marquage des protéines avec les colorants cyanine Cy2, Cy3 ou Cy5 (Lumiprobe, Hannover, Allemagne), 1µl de colorant a été additionné à 5 µl d'échantillon. Après 30 min d'incubation sur glace à l'obscurité, 1µl de lysine a été ajouté aux différents Eppendorfs afin d'arrêter la réaction. Une deuxième incubation de 10 min sur glace à l'obscurité a été nécessaire. Pour chaque *strip* (bande) d'IEF (*Isoelectric focusing*) voulant être réalisé, les protéines marquées ont été rassemblées dans un Eppendorf. Le volume de chaque Eppendorf a été ajusté avec de l'UT de manière à obtenir 225 µl de volume final. Toutefois, l'Eppendorf du *strip* destiné au gel préparatif a été ajusté avec un mélange d'UT et des échantillons de protéines non-marquées (500 µg de protéines).

Deux et quatre échantillons de protéines, respectivement pour *A. pisum* et *M. persicae*, correspondant aux différents inhibiteurs testés ainsi qu'au témoin ont été marqués chacun avec Cy3 et Cy5. De plus, chaque gel était pourvu d'un standard marqué au Cy2 contenant une quantité égale de protéines de tous les échantillons pour un total de 25 µg.

Pour les deux études protéomiques, deux types de gels 2D ont été utilisés. D'une part, les gels 2D analytiques contenant les échantillons marqués (25 µg de protéines marquées au Cy2, Cy3 et Cy5) ont servi à l'analyse quantitative. D'autre part, un gel préparatif contenant également les échantillons protéiques non-marqués (500 µg de protéines) a été utilisé pour le *picking*.

### 1.3.2 2D-DIGE et analyse des gels

Le volume de chaque Eppendorf contenant le mélange de protéines marquées a été ajusté à 450 µl au moyen de 225 µl d'un mixte IPG/DTT (4 µl de 100x BioLyte® 3/10 Ampholyte de Bio-Rad + 2 mg de DTT de Sigma Aldrich© + 219 µl d'UT). Après 20 min d'incubation sur glace à l'obscurité, 2 µl de bleu de bromophénol ont été additionnés.

La focalisation isoélectrique (IEF) de chaque mixte protéique a été réalisée à l'aide du *Protean® i12™ IEF Cell* (Bio-Rad) et d'un *ReadyStrip™ IPG Strip pH 3-10 NL* (Bio-Rad) de 24 cm pendant une réhydratation passive de 9 h à 15°C. La première dimension a ensuite été effectuée par un enchaînement de quatre étapes. Cette dernière a débuté par une tension de 200V durant 2 h et celle-ci a augmenté linéairement jusqu'à 1000 V durant 4 h puis linéairement jusqu'à 10 000V pendant une heure. Enfin, cette tension a été maintenue durant 4 h et 30 min. Le courant maximum infligé était de 50 µA par *strip*.



Une fois la première dimension terminée, les *strips* ont été équilibrés suivant les instructions du fabricant (*Instruction Manual : 2D Electrophoresis with 2D HPE™ Large Gels*, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Allemagne). Ainsi, les *strips* ont été incubés 15 min dans une solution de réduction (30% p/v d'urée, 83% de tampon d'équilibration, 0,83% p/v de DTT) et 15 min supplémentaires dans une solution d'alkylation (30% p/v d'urée, 83% de tampon d'équilibration, 2% d'IAA).

Toujours suivant les mêmes instructions de fabricant, la deuxième dimension a été réalisée avec le *HPE FlatTop Tower* (The Gel Company, San Francisco, USA) sur un gel *2D HPE™ Large Gel NF 12,5% acrylamide* (SERVA Electrophoresis GmbH). Ensuite, tous les gels ont été mis à incuber sur une plaque agitatrice dans 250 ml de solution de fixation (15% d'éthanol, 10% d'acide acétique et 75% d'eau milliQ). Après 4 h d'incubation, les gels ont été placés dans une solution d'acide acétique 10%. Enfin, ces derniers ont été scannés à l'aide de l'*Ettan™ DIGE Imager* (GE Healthcare) et de son logiciel (*Software Ettan™ DIGE Imager 1.0*).

Les images obtenues grâce au scanner ont été analysées avec le logiciel *Nonlinear Progenesis SameSpots* (Nonlinear Dynamics©, Newcastle upon Tyne, Royaume-Uni).

### 1.3.3 Identification des protéines

Pour les deux études protéomiques, le gel préparatif a été coloré au *Silver Blue* (2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20% méthanol, 0,12% de coomassie G-250, 67,88% H<sub>2</sub>O distillée) durant 6 h. Ce dernier a ensuite été rincé plusieurs fois à l'eau distillée avant d'être mis à décolorer toute une nuit dans de l'eau distillée. La décoloration a duré approximativement 16 h et la solution de décoloration a été changée toutes les 30 min une fois la nuit passée.

Le gel préparatif étant décoloré, les spots de protéines ont été prélevés manuellement grâce à l'utilisation d'un *Screen Picker* (Proteomics Consult, Kampenhout, Belgique) et d'un stylo de prélèvement *OneTouch 2D Gel SpotPicker* 1,5 mm (The Gel Company) semblable à un emporte-pièce. Chaque disque de gel obtenu par piquage était placé dans un puit de plaque PCR 96 puits (Eppendorfs, Hamburg, Allemagne) contenant 50 µl d'eau distillée afin d'éviter une éventuelle déshydratation.

Les spots de gels ont pu être envoyés au GIGA à Liège afin de procéder à l'identification des protéines. Cette dernière a été réalisée par le biais d'une LC-MS/MS ou d'un MALDI-TOF couplée à une spectrométrie de masse.

Dans le cas de la LC-MS/MS, les protéines subissent une hydrolyse enzymatique. Les peptides obtenus sont ensuite séparés par chromatographie liquide en phase inverse sur base de leur hydrophobicité et sont ionisés dans la source du spectromètre de masse. L'analyse des peptides provenant de l'hydrolyse enzymatique est alors effectuée dans le spectromètre de masse, ce dernier accédant également à leur structure par fragmentation (INRA, 2009a).

Lors d'un MALDI-TOF, les protéines subissent une digestion enzymatique par la trypsine. Ensuite, la mesure des peptides est obtenue par spectrométrie de masse. Pour ce faire, les peptides co-cristallisent avec une matrice. Cette dernière absorbe à la longueur d'onde d'un laser à azote et provoque le passage des cristaux analyte-matrice à un état gazeux. Ceci engendre alors la formation d'ions volant dans un tube de vol (TOF). Dès lors, le temps nécessaire à l'ion pour atteindre le détecteur permet de déterminer la masse de celui-ci. Enfin, la masse sur charge (m/z) est obtenue par conversion du temps (INRA, 2009b).

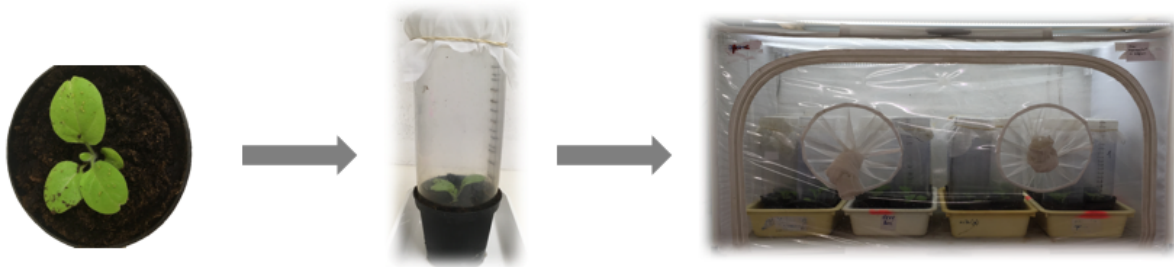
Le choix entre ces deux méthodes d'identification a été pris en fonction de l'intensité de la coloration des spots piqués. Quelle que soit la méthode, les peptides obtenus ont été comparés aux bases de données des *Arthropoda* de la NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Finalement, les résultats protéiques transmis par le GIGA ont pu être traités à l'aide du logiciel Mascot 2.2.06. Il est à noter que seules les protéines ayant une p-valeur inférieure à 0,05 ou un score Mascot supérieur à 45 ont été considérées. Ainsi, les protéines pour lesquelles la p-valeur n'était pas significative ou que le score Mascot était inférieur à 45 ont été écartées et non prises en compte. De plus, le poids moléculaire et le point isoélectrique des protéines ont été vérifiés. Finalement, les fonctions des différentes protéines ont été recherchées sur les sites UniProt, ProSite et InterPro.

## 1.4 Passage sur plantes

### 1.4.1 Traitement après infestation par *Myzus persicae*

Afin de tester les différents inhibiteurs (phloridzine, amygdaline, validamycine A) sur plantes, les modèles tabac (*Nicotiana tabacum* L.) et *M. persicae* ont été sélectionnés. Dès lors, 20 pucerons adultes ont été déposés sur chaque plant de tabac de stade 3-4 vraies feuilles pour un total 5 plants par modalité testée. Les plants de tabac utilisés provenaient de la plantation destinée à l'élevage de *M. persicae*. Toutefois, les plantules ont été repiquées séparément dans des pots Göttinger® de 10 cm de diamètre pour une hauteur de 8 cm.

Chaque plante infestée de pucerons était recouverte d'un manchon en plastique de dimensions 20 cm x 8,5 cm (h x Ø), ce dernier étant refermé par une tulle permettant les échanges gazeux. Les plantes étaient regroupées dans des bacs en plastique par modalité. Ceux-ci ont ensuite été placés dans une grande cage BugDorm® de dimensions 93,0 (L) x 47,5 (l) x 47,5 (h) cm dans une logette (20°C ± 2°C ; 60% HR ± 5% ; 16 :8-h j:n) (Figure 15).



**Figure 15. Étapes d'infestation des plants de tabac avec *M. persicae* (photos : Van De Velde Megane)**

Vingt-quatre heures après l'installation des pucerons, chaque inhibiteur a été appliqué sur ses plants respectifs grâce à une pulvérisation avec une distance de 35 cm et à raison de 6 aspersion (4,51 ± 0,14 ml) par plante. L'application a été réalisée de sorte que l'inhibiteur testé recouvre aussi bien la face supérieure que la face inférieure des feuilles (Figure 16). Dans cette expérimentation, les plantes témoins ont subi le même traitement mais avec de l'eau distillée.



**Figure 16. Photo d'un plant de tabac après traitement (photo : Van De Velde Megane)**

Les différents inhibiteurs testés possédaient une concentration de 25  $\mu\text{g/ml}$ . Pour la préparation de ceux-ci, une solution mère concentrée à 1  $\text{mg/ml}$  de chaque inhibiteur a été diluée 40x dans de l'eau distillée. Il est à noter que, dans le cas de la phloridzine, la solution mère a été mis dans un bain-marie à 80°C jusqu'à dissolution complète de cette dernière.

Dans le but de limiter les biais, le pH de la solution contrôle et des différentes solutions contenant les inhibiteurs concentrés à 25  $\mu\text{g/ml}$  a été standardisé avec du NaOH et du HCl 0,1M. Le pH de référence ayant été sélectionné était celui de l'eau de ville (pH  $\approx$  7,3).

Les plantes traitées ont séjourné 48 heures dans les mêmes conditions que celles précitées. Une fois ce délai terminé, le nombre de pucerons vivants par plante a été relevé. Les données brutes ont été transformées en taux de mortalité (exprimé en pourcentage) par plante. La moyenne du taux de mortalité ainsi que l'écart-type associé ont été calculés sur l'ensemble des 5 plants de tabac et pour chacun des inhibiteurs. Finalement, une analyse de la variance (ANOVA) à une variable fixe (traitement) a été réalisée pour chaque relevé sur les taux de mortalité à l'aide du logiciel Minitab 17 dans le but d'attester d'une éventuelle différence de moyennes entre l'application du témoin et celle de l'inhibiteur.

#### 1.4.2 Traitement avant infestation par *Myzus persicae*

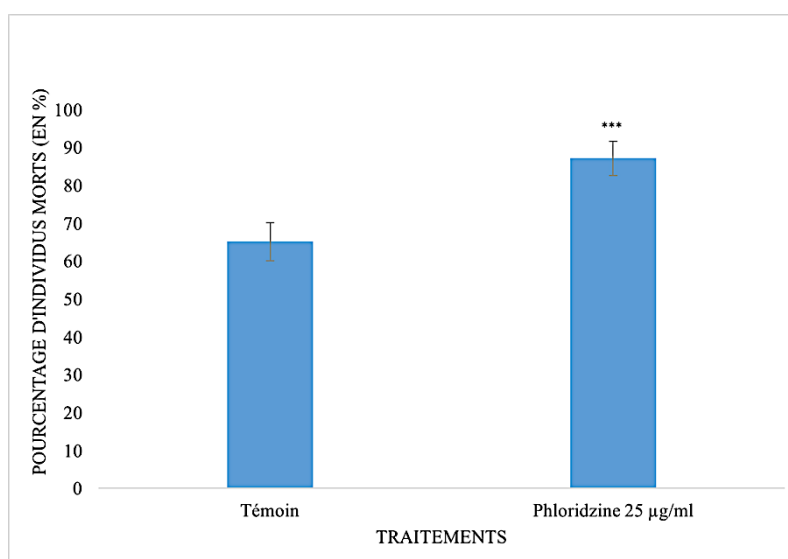
Pour réaliser cette expérience, le protocole suivi était basé en tout point sur celui de l'expérimentation précédente. En effet, les inhibiteurs testés et la solution témoin ont été préparés à l'identique. De même, le nombre de répétitions par modalité testée ainsi que les relevés effectués étaient inchangés. L'unique différence entre ces deux expériences a été le fait de réaliser l'aspersion des inhibiteurs 24 heures avant l'infestation des pucerons. En d'autres termes, seules les étapes d'infestation et de traitement ont été inversées.

## 2 RESULTATS

### 2.1 Diètes artificielles

#### 2.1.1 Tests préliminaires

Les taux de mortalité moyens d'*A. pisum* obtenus lors du test visant à évaluer l'effet de la phloridzine (concentrée à 25 µg/ml) sur la mortalité de cet insecte après 48 heures d'alimentation artificielle sont représentées à la Figure 17. La mortalité passe de  $65 \pm 5$  % pour la diète contrôle à  $87 \pm 4$  % lors de l'ajout de la phloridzine.

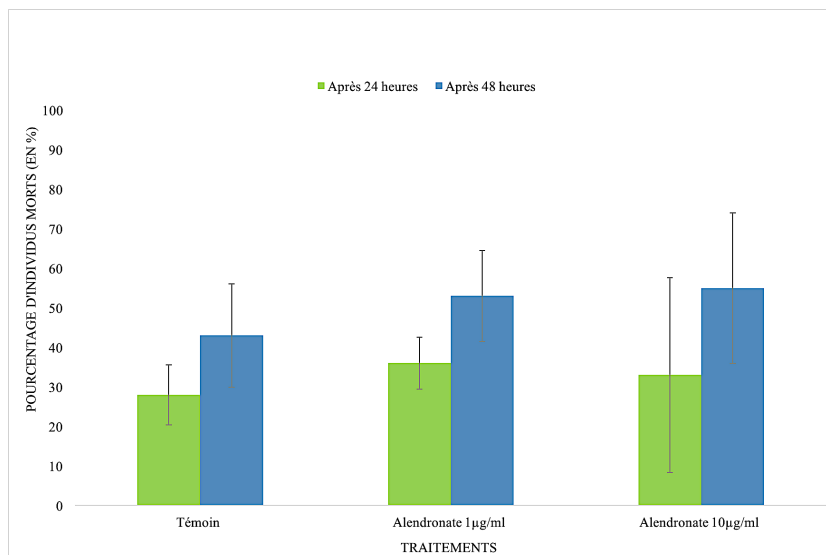


**Figure 17. Mortalité moyenne d'*A. pisum* après 48 heures sur diète artificielle avec et sans phloridzine (concentration de 25 µg/ml). \*\*\* = différence très hautement significative vis-à-vis du témoin.**

Une différence très hautement significative entre ces deux traitements a été observée ( $p < 0,001$ ). Ainsi, les résultats obtenus attestent une élévation de la mortalité d'*A. pisum* engendrée par l'incorporation de la phloridzine à raison de 25 µg/ml dans la diète artificielle.

Dans le cas de l'expérimentation sur ce même insecte avec l'alendronate (Figure 18), les taux de mortalité moyens sont de  $28 \pm 8$  %,  $36 \pm 7$  % et  $33 \pm 25$  % après 24 heures, respectivement pour le témoin et les diètes concentrées à 1 µg/ml ainsi qu'à 10 µg/ml. Suite aux ANOVA réalisées sur les relevés (Annexe 1), il est possible de conclure qu'aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) n'existe entre les diètes contenant l'inhibiteur et le témoin en termes de mortalité. De plus, aucune différence significative n'est à signaler entre les trois traitements ( $p = 0,714$ ).

Une tendance à la hausse de la mortalité est constatée entre les deux pas de temps évalués et ce, pour chaque modalité. Toutefois, une comparaison statistique entre les relevés effectués à 24 et 48 heures ne peut être réalisée suite à la dépendance des résultats. En effet, le nombre de pucerons morts après 48 heures est en relation directe avec la mortalité à 24 heures.



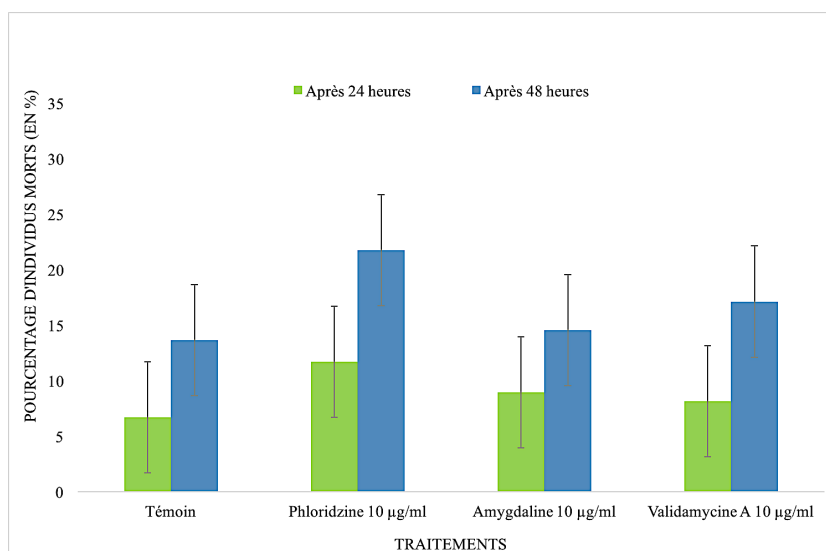
**Figure 18. Mortalité moyenne d'*A. pisum* après 24 et 48 heures sur diète artificielle avec et sans alendronate**

Après 48 heures sur diète artificielle, la mortalité moyenne observée est de  $43 \pm 13$  % pour le contrôle,  $53 \pm 12$  % pour la concentration de  $1 \mu\text{g/ml}$  et de  $55 \pm 19$  % pour la diète contenant  $10 \mu\text{g}$  d'alendronate/ml. Malgré l'augmentation d'une dizaine de pourcent constatée avec l'inhibiteur, aucune différence significative (Annexe 1) n'est observée entre les traitements et le témoin ainsi qu'entre les trois modalités ( $p = 0,420$ ).

Contrairement aux tests effectués pour la phloridzine, les résultats obtenus avec l'alendronate ne soulignent aucune corrélation entre l'ajout de l'inhibiteur et la mortalité chez *A. pisum*.

### 2.1.2 Tests sur *Myzus persicae*

Les taux de mortalité moyens observés lors de l'évaluation de l'effet des différents inhibiteurs concentrés à  $10 \mu\text{g/ml}$  sur la mortalité de *M. persicae* sont présentés (Figure 19).



**Figure 19. Mortalité moyenne de *M. persicae* après 24 et 48 heures sur diète artificielle avec et sans inhibiteur (phloridzine, amygdaline ou validamycine A) à une concentration de  $10 \mu\text{g/ml}$**

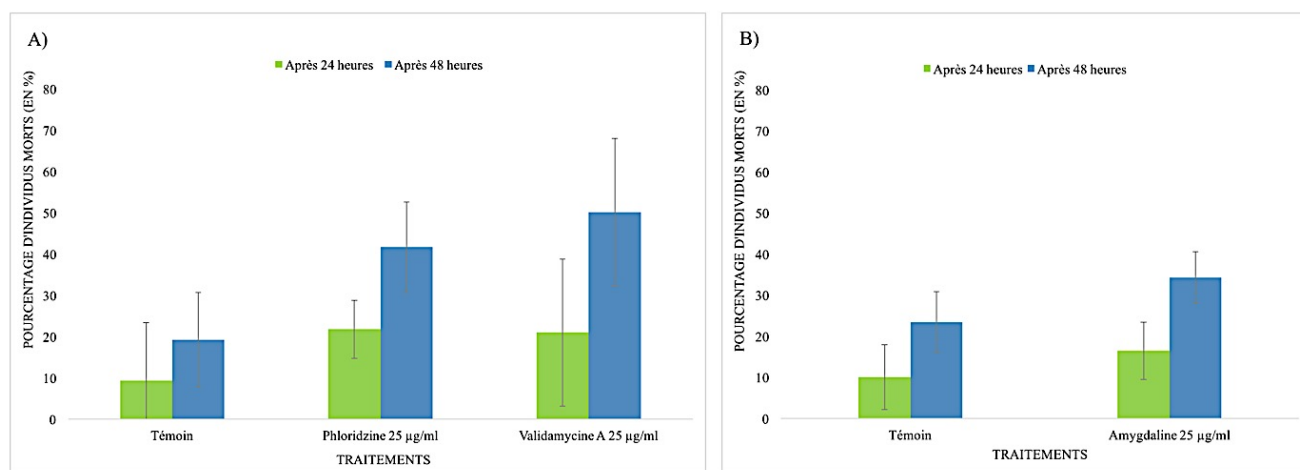
Après 24 heures sur diète artificielle, les taux de mortalité moyens pour *M. persicae* sont de  $7 \pm 4$  % pour le témoin,  $12 \pm 4$  % pour la phloridzine,  $9 \pm 1$  % pour l'amygdaline et  $8 \pm 5$  % pour la validamycine A, tous

les inhibiteurs étant concentrés à 10 µg/ml. Aucune différence significative n'est à signaler entre les différents traitements et le contrôle (Annexe 2) ainsi qu'entre les quatre modalités ( $p = 0,366$ ),

Bien que la mortalité moyenne s'élève à  $22 \pm 7 \%$ ,  $15 \pm 2 \%$  et  $17 \pm 7 \%$  après 48 heures, respectivement pour la phloridzine, l'amygdaline et la validamycine A, comparé au témoin qui lui atteint  $14 \pm 7 \%$ , aucune différence significative n'est constatée ni entre les traitements et le contrôle (Annexe 2), ni entre les quatre modalités ( $p = 0,228$ ).

La dépendance en termes de nombre d'individus morts entre les deux moments d'expérimentation ne permet pas de réaliser une analyse statistique comparative. Cependant, les taux de mortalité moyens de chaque modalité montrent une augmentation entre 24 et 48 heures. La phloridzine a tendance à se démarquer à la hausse malgré une valeur de  $p$  non-significative et ce, pour les deux pas de temps.

Les résultats de l'expérimentation menée avec une concentration en inhibiteur de 25 µg/ml (Figure 20) sont similaires aux précédents après 24 heures mais s'avèrent contrastés après 48 heures sur diète.



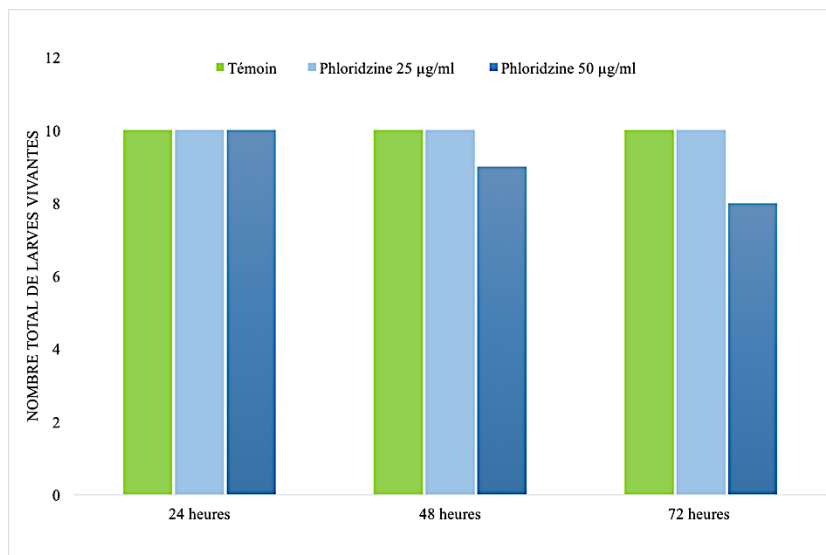
**Figure 20. Mortalité moyenne de *M. persicae* après 24 et 48 heures sur diète artificielle avec et sans inhibiteur (concentration de 25 µg/ml) : A) phloridzine ou validamycine A ; B) amygdaline**

Après une durée de 24 heures d'alimentation artificielle, aucune différence significative n'est à mettre en évidence entre les inhibiteurs et les témoins (Annexe 3) suite aux écart-types importants. Les taux de mortalité moyens sont de  $9 \pm 14 \%$  (Figure 20 A) /  $10 \pm 8 \%$  (Figure 20 B) pour les témoins,  $22 \pm 7 \%$  pour la phloridzine,  $21 \pm 18 \%$  pour la validamycine A et  $16 \pm 7 \%$  pour l'amygdaline. Bien que non-significative, une légère hausse de la mortalité est constatée avec l'ajout des inhibiteurs. Cette augmentation s'amplifie après 48 heures d'expérimentation et devient significative ( $p < 0,05$  ; Annexe 3). La mortalité moyenne atteint alors  $42 \pm 11\%$ ,  $50 \pm 18 \%$  ainsi que  $34 \pm 6 \%$  respectivement pour la phloridzine, la validamycine A et l'amygdaline contre  $19 \pm 11 \%$  (Figure 20 A) /  $23 \pm 7 \%$  (Figure 20 B) pour les témoins.

Cette différence significative en termes de mortalité met en évidence une élévation du nombre de pucerons morts après 48 heures grâce à une diète concentrée à 25 µg d'inhibiteur/ml.

### 2.1.3 Tests sur *Tuta absoluta*

Les nombres totaux de larves toujours vivantes après 24, 48 et 72 heures sur les 10 larves testées par traitement sont repris pour chaque modalité à la Figure 21.

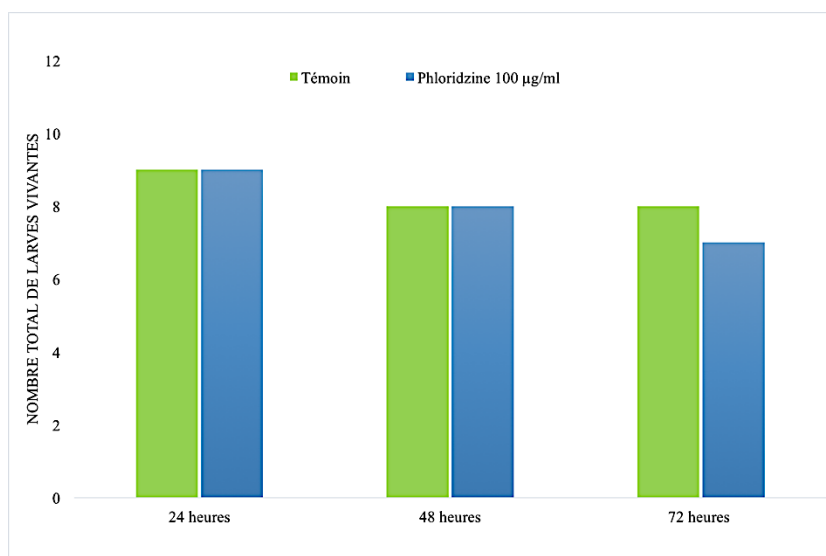


**Figure 21.** Nombres totaux de larves de *T. absoluta* toujours en vie après 24, 48 et 72 heures passées sur diète artificielle avec ou sans phloridzine (concentration de 25 ou 50 µg/ml)

Le nombre de larves vivantes reste inchangé pour le témoin et la diète concentrée à 25 µg de phloridzine/ml et ce, jusqu'à la fin de l'expérience. Dès lors, aucune probabilité n'a pu être calculée pour cette partie des données dû à l'absence totale de mortalité chez les larves. Cependant, l'indépendance des facteurs est incontestable vu les résultats identiques. En d'autres termes, l'ajout de phloridzine à une concentration de 25 µg/ml n'induit pas d'effet sur la mortalité des larves de *T. absoluta* lors des 72 premières heures.

Dans le cas de la concentration en phloridzine de 50 µg/ml, le nombre de larves vivantes passe à 9 puis à 8 respectivement après 48 et 72 heures d'alimentation. Néanmoins, cette augmentation de mortalité comparé au témoin n'est pas suffisante que pour être statistiquement significative ( $p > 0,05$  ; Annexe 4), ce qui atteste l'indépendance des facteurs. Ainsi, l'ajout de la phloridzine à cette concentration ne suffit pas pour induire un effet significatif sur la mortalité des larves de *T. absoluta* dans les 72 heures.

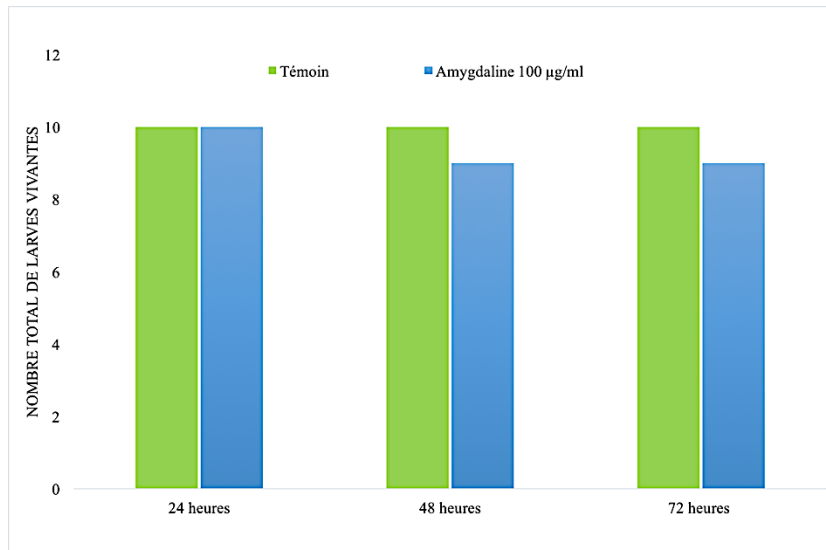
La deuxième expérimentation menée sur les larves de *T. absoluta* visait à augmenter la concentration en phloridzine pour attester d'un éventuel effet sur la mortalité. Or, une similarité des modalités (témoin et phloridzine) en termes de nombre de larves en vie après 24, 48 et 72 heures est présentée à la Figure 22.



**Figure 22.** Nombres totaux de larves de *T. absoluta* toujours en vie après 24, 48 et 72 heures passées sur diète artificielle avec ou sans phloridzine (concentration de 100 µg/ml)

Les probabilités calculées grâce aux tests exact de Fisher étant toutes égales à 1 (Annexe 5), l'hypothèse nulle (indépendance des facteurs) est acceptée. De ce fait, la mortalité observée chez les larves de *T. absoluta* n'est pas dépendante du type de diète administrée. La phloridzine à une concentration de 100 µg/ml n'a donc aucun effet sur la mortalité de la larve endéans les 72 heures.

Cette même concentration (100 µg/ml) a ensuite été testée en remplaçant la phloridzine par l'amygdaline. La Figure 23 reprend les nombres de larves vivantes observés toutes les 24 heures jusqu'à 72 heures et ce, pour les deux modalités évaluées (témoin et inhibiteur).



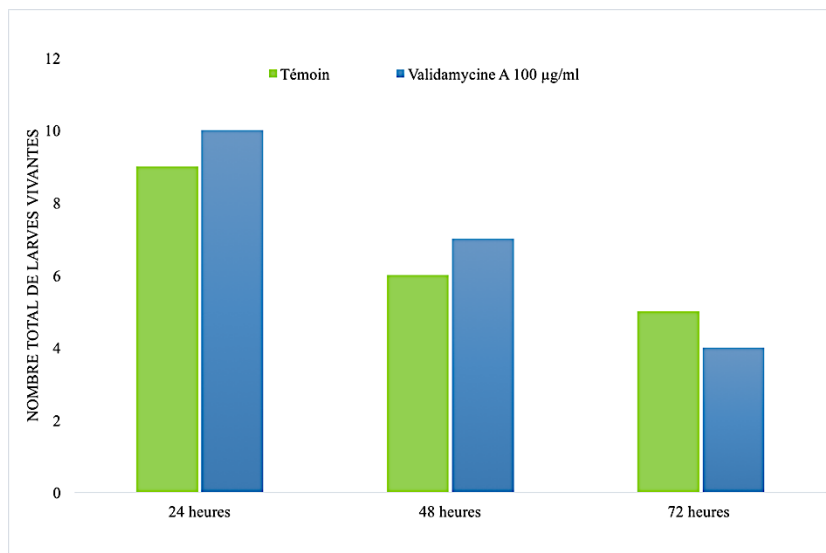
**Figure 23. Nombres totaux de larves de *T. absoluta* toujours en vie après 24, 48 et 72 heures passées sur diète artificielle avec ou sans amygdaline (concentration de 100 µg/ml)**

Il est possible de constater l'absence de mortalité pour le témoin tout au long de l'expérience. Dans le cas de la diète contenant 100 µg d'amygdaline/ml, seule une larve a été retrouvée morte après 48 heures.

Aucune probabilité n'a pu être calculée après 24 heures à cause de l'absence totale de mortalité chez les larves, toutes modalités confondues. Ceci n'empêche pas de certifier que l'inhibiteur n'a aucun effet sur la mortalité durant les premières 24 heures. Les probabilités calculées sur les données relevées à 48 et 72 heures sont quant à elles égales à 1 (Annexe 6). Dès lors, l'hypothèse nulle (indépendance des facteurs) est approuvée. Par conséquent, la mortalité observée dans le cas de la diète contenant l'amygdaline n'est nullement attribuable à l'ajout de l'inhibiteur dans cette dernière.

Finalement, les nombres de larves en vie de *T. absoluta* après 24, 48 et 72 heures passées sur deux types de diète artificielle (témoin et diète contenant 100 µg de validamycine A/ml) sont représentés à la Figure 24.





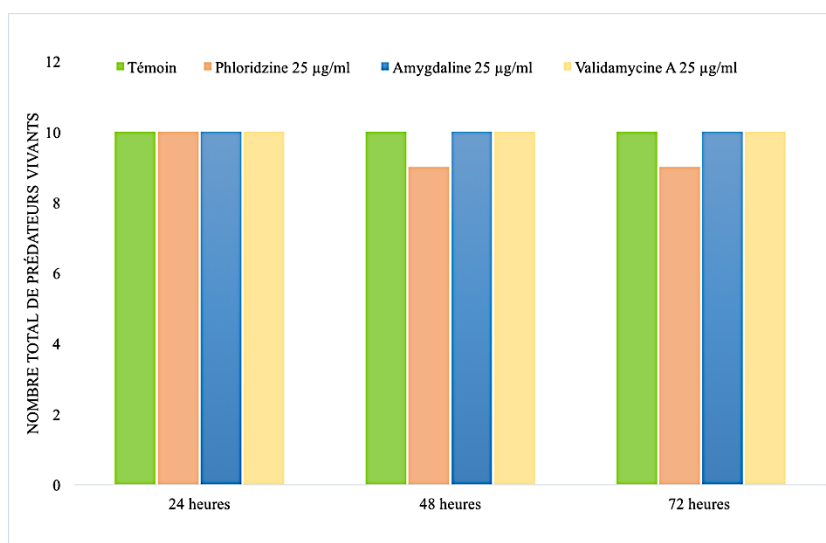
**Figure 24. Nombres totaux de larves de *T. absoluta* toujours en vie après 24, 48 et 72 heures passées sur diète artificielle avec ou sans validamycine A (concentration de 100 µg/ml)**

Après 24 heures, une mortalité est constatée pour le témoin, ce qui n'est pas le cas pour l'inhibiteur. Le nombre de larves en vie chute ensuite à 6 et 7 respectivement pour le témoin et la validamycine A. Ainsi, la mortalité est plus importante chez le contrôle pendant les 48 premières heures. Après 72 heures sur diète, cette tendance s'inverse.

Les probabilités calculées à chaque pas de temps étant toutes égales à l'unité (Annexe 7), l'hypothèse nulle est vérifiée. Dans ce cas, il y a une indépendance entre le nombre de larves mortes/vivantes et la diète ingérée par l'insecte. La validamycine A n'a donc pas d'effet sur la mortalité des larves de *T. absoluta* endéans les 72 heures.

#### 2.1.4 Tests sur *Macrolophus pygmaeus*

L'impact des inhibiteurs (concentration de 25 µg/ml) sur la mortalité du prédateur *M. pygmaeus* après consommation de proies ayant ingéré ces derniers est présenté à la Figure 25.



**Figure 25. Nombres totaux de *M. pygmaeus* adultes vivants après 24, 48 et 72 heures de consommation de pucerons ayant ingéré la diète artificielle contenant l'inhibiteur (phloridzine, amygdaline ou validamycine A) à une concentration de 25 µg/ml**

La mortalité est nulle tout au long de l'expérimentation pour le témoin, l'amygdaline et la validamycine A. Seul un ennemi naturel a été retrouvé mort après un délai de 48 heures pour la phloridzine.

Dans le cas de l'amygdaline et de la validamycine A, aucune probabilité n'a pu être calculée dû à l'absence totale de mortalité, toutes modalités confondues. Bien que l'analyse statistique ne soit pas applicable, il est possible d'attester que la consommation de pucerons ayant ingéré de l'amygdaline ou de la validamycine A n'induit nullement une mortalité chez *M. pygmaeus* dans un délai de 72 heures. Cette constatation est également d'application pour la phloridzine endéans les 24 heures.

Après 72 heures, 9 prédateurs sur 10 sont toujours en vie pour la modalité phloridzine. Les probabilités étant égales à l'unité (Annexe 8) pour les relevés obtenus à 48 et 72 heures suggèrent l'acceptation de l'hypothèse nulle (indépendance des facteurs). Ainsi, cette mortalité observée est indépendante de la diète consommée et n'est donc pas imputable à l'inhibiteur.

## 2.2 Analyses protéomiques

### 2.2.1 2D-DIGE sur *Acyrtosiphon pisum*

Une première analyse protéomique a été réalisée avec *A. pisum*. Celle-ci avait pour but de comparer les expressions protéiques entre les pucerons témoins et ceux ayant ingéré la diète artificielle contenant de la phloridzine à raison de 25 µg/ml. La Figure 26 représente le gel 2D-DIGE réalisé avec les échantillons d'*A. pisum*.

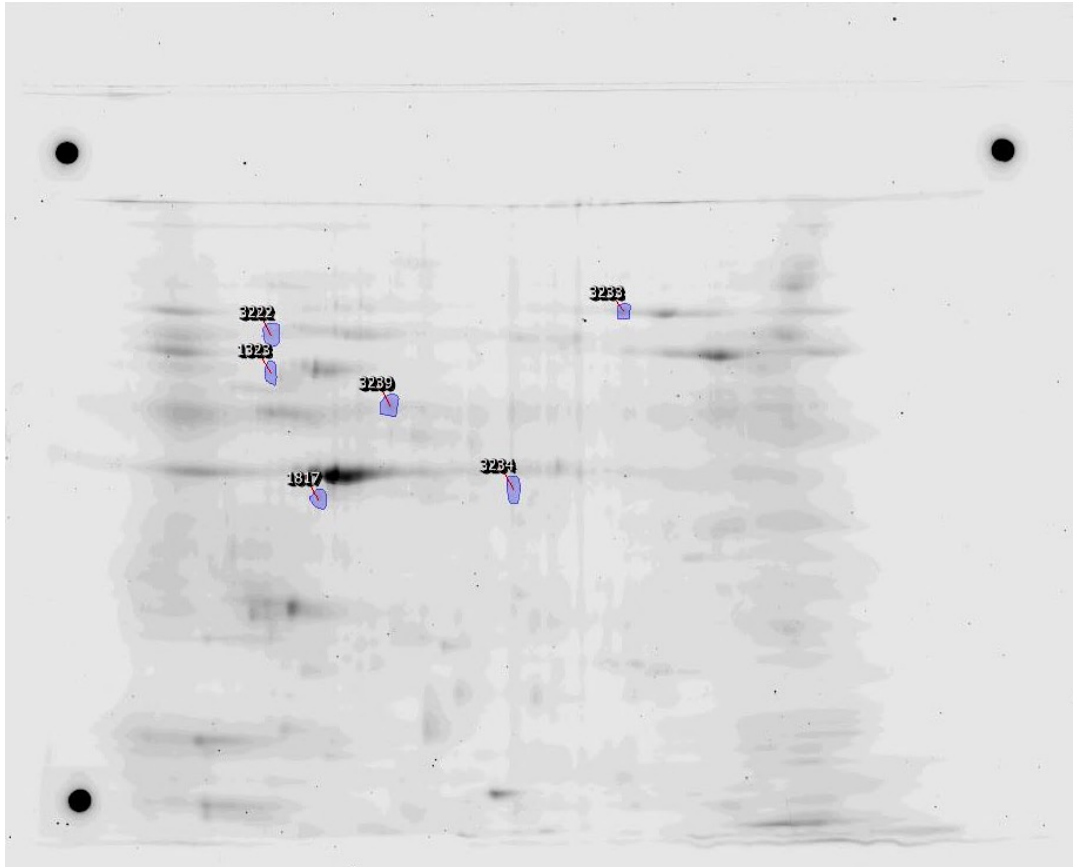


Figure 26. Gel 2D-DIGE réalisé sur les échantillons d'*A. pisum* ayant consommé la diète artificielle avec et sans phloridzine (concentration de 25 µg/ml). Les spots numérotés représentent la localisation des protéines pour lesquelles une variation significative ( $p < 0,05$ ) de leur expression a été constatée entre les modalités.

Pour chaque spot, un piquage a été réalisé et la protéine correspondante a été identifiée ainsi que son poids moléculaire et son point isoélectrique grâce au logiciel Mascot. Les résultats d'identification de protéines sont présentés au Tableau 1.

**Tableau 1. Protéines identifiées et correspondant à des expressions différenciées chez les pucerons (*A. pisum*) ayant ingérés la phloridzine à 25 µg/ml.**

Numéro de spot	Volumes moyens normalisés		Accession NCBI	Nom de la protéine	PM (KDa)	pI	SM
	Témoin	Phloridzine					
1323	0,697	0,858	gi285430	Symbionin symL - pea aphid	57,9	4,9	484
1817	1,008	1,309	gi328703350	40S ribosomal protein SA-like [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	33,5	4,8	150
3222	0,852	1,080	gi193690627	v-type proton ATPase catalytic subunit A-like [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	67,8	4,8	450
3233	0,598	0,716	gi193620175	Protein LOC100167736 [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	72,6	8,3	8266
3234	1,039	1,279	gi 217330650	Actin related protein 1 [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	41,8	5,3	231
3239	0,892	1,028	gi328716950	v-type proton ATPase subunit B-like [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	55,3	5,3	484
			gi193713655	Protein disulfide-isomerase A3-like [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	55,3	5,3	360

Accession NCBI = numéro d'accèsion sur la *National Center for Biotechnology Information* ; PM = poids moléculaire de la protéine (KDa) ; pI = point isoélectrique ; SM (Score Mascot) = score d'après la recherche sur Mascot. L'échelle colorimétrique (*heat map*) représente la variation d'expression : plus c'est surexprimé, plus la teinte est foncée tandis que plus c'est sous—exprimé, plus la teinte est claire.

Deux constatations sont à souligner. D'une part, les protéines identifiées sont issues du puceron *A. pisum*, modèle étudié. D'autre part, il est à garder à l'esprit que le spot 3239 comprend un mélange de deux protéines. Dans ce cas, il est impossible de déterminer si les deux protéines sont surexprimées en même temps ou si cette surexpression n'est induite que par l'une d'entre elle.

### 2.2.2 2D-DIGE sur *Myzus persicae*

Suivant le gel 2D-DIGE obtenu à partir des échantillons de *M. persicae* (Figure 27), un piquage a été réalisé pour chacun des spots différemment exprimés sur ce gel.

Sur un total de 79 *pickings* effectués (Figure 27), 14 protéines ont été rejetées à cause d'un score Mascot inférieur à 45 ou d'une absence complète d'informations à leur sujet. De plus, 11 autres protéines n'ont pu être identifiées suite à une non-correspondance du poids moléculaire et/ou du point isoélectrique. De ce fait, 54 spots ont permis une détermination correcte de la protéine concernée. Au sein de ces derniers, une même protéine a pu être détectée à plusieurs reprises et correspond alors à plusieurs spots. Ainsi, seules 42 protéines différentes sont mises en évidence dans ce tableau. La majorité de celles-ci s'avère appartenir aux pucerons. Dans certains cas, la protéine citée provient d'un autre organisme. En effet, lorsque le BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de la protéine proposée par le GIGA avec la base de données de la NCBI n'a pas

donné un pourcentage d'identification satisfaisant ainsi qu'une *e-value* faible, il a été choisi de garder la protéine du GIGA et ce, malgré l'absence de correspondance avec les protéines retrouvées chez le puceron.

Le Tableau 2 reprend l'ensemble des spots piqués ainsi que les protéines ayant été identifiées. Au sein du tableau, les protéines ont été classées par groupe suivant leurs fonctions. Ainsi, 7 groupes ont été créés.

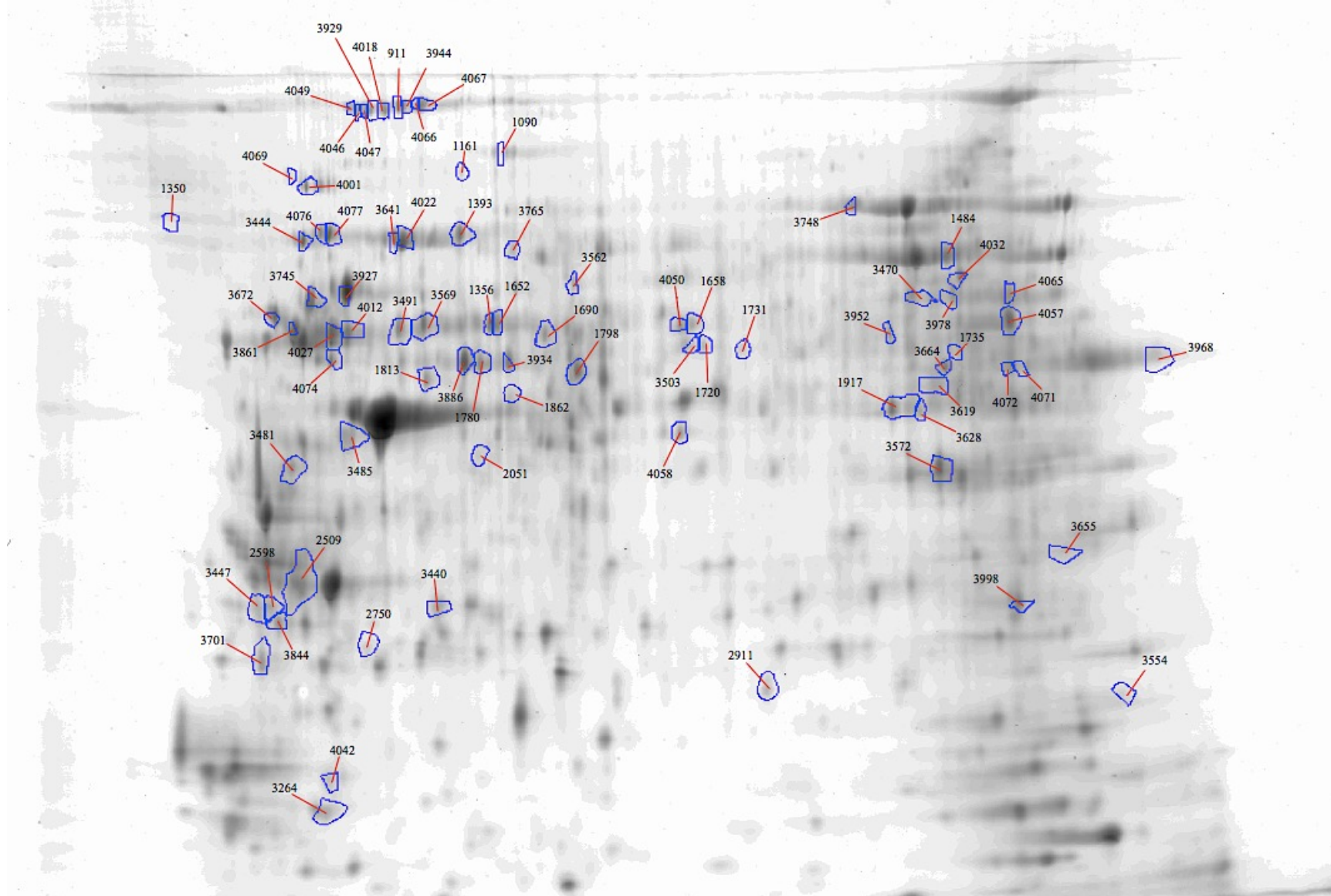


Figure 27. Gel 2D-DIGE réalisé sur les échantillons de *M. persicae* ayant consommé la diète artificielle avec et sans inhibiteur (phloridzine, amygdaline ou validamycine A ; concentration de 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Les spots numérotés représentent la localisation des protéines pour les lesquelles une variation significative ( $p < 0,05$ ) de leur expression a été constatée entre les modalités.

Tableau 2. Protéines différemment exprimées et identifiées chez le puceron *Myzus persicae* ayant ingéré de la phloridzine (10 µg/ml), de l'amygdaline (10 µg/ml) ou de la validamycine A (10 µg/ml)

Numéro de spot	Volumés moyens normalisés				Accession NCBI	Nom de la protéine	PM (KDa)	pI	SM
	Témoin	Phloridzine	Amygdaline	Validamycine A					
<b>Muscles/cytosquelette</b>									
911	1,343	1,487	1,269	0,901	gi 1028680375	Myosin heavy chain, muscle isoform X33 [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	226,0	5,6	68
4047	0,840	0,881	1,849	1,355					209
3944	1,807	1,827	1,235	0,837	gi 641654466	Myosin heavy chain, muscle isoform X11 [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	225,7	5,7	180
4018	0,939	1,003	1,696	1,394					193
4067	1,547	1,758	1,279	1,044					193
4046	0,919	0,979	1,944	1,284	gi 985419446	Myosin heavy chain, muscle isoform X29 [ <i>Diuraphis noxia</i> ]	224,8	5,8	169
4066	1,665	1,674	1,248	1,020	gi 1028680310	Myosin heavy chain, muscle isoform X16 [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	225,5	5,7	160
4042	0,349	0,192	1,688	0,849	gi 641663835	Actin-1, partial [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	12,7	5,4	73
<b>Energie</b>									
1652	1,269	1,334	0,970	1,086	gi 328716950	V-type proton ATPase subunit B [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	55,6	5,3	147
1656	1,183	1,234	0,922	1,012					91
3470	1,622	1,532	0,739	0,635	gi 328704551	Pyruvate kinase isoform X1 [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	61,5	8,3	82
3572	1,151	1,397	0,799	0,782	gi 763708673	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [ <i>Aphis gossypii</i> ]	35,6	8,7	110
3664	1,190	1,359	0,922	0,811	gi 193676562	Citrate synthase 2, mitochondrial [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	52,3	7,2	107
3886	1,257	1,373	0,972	1,036	gi 193669445	Enolase isoform X2 [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	47,5	5,5	118
3934	1,513	1,492	0,920	1,112					85
1917	1,272	1,413	0,855	0,742	gi 985402954	Fructose-bisphosphate aldolase [ <i>Diuraphis noxia</i> ]	40,2	6,8	126
3978	1,433	1,480	0,804	0,723	gi 193582510	Glutamate dehydrogenase, mitochondrial [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	59,9	7,6	120
3998	1,086	1,411	0,875	0,760	gi 1037108215	6-phosphogluconolactonase [ <i>Drosophila eugracilis</i> ]	26,6	9,24	69
4050	1,422	1,275	0,912	0,952	gi 985390024	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial [ <i>Diuraphis noxia</i> ]	55,1	6,7	54

#### IV. PARTIE EXPERIMENTALE

4057	1,370	1,758	0,789	0,589	gi 193666827	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	60,0	9,1	91
4071	1,651	1,639	0,606	0,777					75
4072	1,199	1,135	0,517	0,762					69
<b>Stress</b>									
3264	0,732	0,601	1,400	1,394	gi 6066606	Hsp60 protein [ <i>Myzus persicae</i> ]	60,5	5,2	48
3745	1,166	1,204	1,190	1,590					142
3927	1,691	2,161	0,533	0,713	gi 285430	Symbionin symL - pea aphid	58,0	4,9	167
3641	1,370	1,328	0,883	0,844	gi 1007653998	Heat shock protein 70 cognate [ <i>Rhopalosiphum padi</i> ]	71,5	5,2	122
4022	1,403	1,463	0,910	0,943					137
4001	1,297	1,280	0,849	0,757	gi 193652748	Heat shock protein 83 [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	83,7	4,8	114
4077	1,150	1,294	1,063	0,986	gi 242397408	Heat shock protein cognate 3 precursor [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	73,0	5,1	179
<b>Division cellulaire</b>									
1862	0,679	0,459	1,436	1,654	gi 910354904	Inner centromere protein isoform X3 [ <i>Papilio xuthus</i> ]	33,8	6,5	63
2750	0,524	0,400	1,354	0,924	gi 217330650	Actin related protein 1 [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	41,8	5,3	77
3440	0,368	0,264	1,848	0,940					140
3485	0,444	0,299	1,665	1,423					119
3503	1,570	1,663	0,959	1,016	gi 755711625	Putative dynactin subunit 2 [ <i>Fopius arisanus</i> ]	44,7	5,1	68
3861	1,108	1,297	0,633	0,581	gi 985420793	Tubulin beta-1 chain [ <i>Diuraphis noxia</i> ]	50,2	4,8	167
4012	1,195	1,167	0,842	0,966	gi 193594183	Tubulin alpha-1 chain [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	50,0	5,0	116
4024	1,189	1,245	0,830	0,832					170
<b>ARN/ADN</b>									
1690	1,379	1,219	0,898	0,970	gi 193697813	CAD protein [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	247,8	6,0	70
3554	0,736	0,514	1,570	1,147	gi 1013173289	Elongation factor 1-alpha [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	26,1	8,3	56
3569	1,242	1,265	0,866	0,975	gi 985411172	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I-like [ <i>Diuraphis noxia</i> ]	36,1	5,3	71
4074	1,173	1,283	0,724	0,734	gi 52630935	Putative acidic p0 ribosomal protein [ <i>Aphis citricidus</i> ]	34,4	5,6	74

<b>Autres</b>									
1658	1,422	1,360	0,966	0,987	gi 808129545	Reticulon-1 isoform X1 [ <i>Bombus terrestris</i> ]	51,3	4,8	58
1780	1,336	1,162	0,956	1,070	gi 193683602	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	53,9	5,7	102
1798	1,273	1,227	0,899	0,983	gi 972205809	Tyrosine-protein kinase Abl isoform X2 [ <i>Polistes dominula</i> ]	164,5	6,6	56
2051	0,579	0,383	1,556	1,454	gi 328710546	Calpain-A isoform X1 [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	92,6	5,1	48
3491	1,333	1,449	0,820	0,778	gi 985394175	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase [ <i>Diuraphis noxia</i> ]	53,5	5,6	66
3619	0,851	0,725	1,233	0,935	gi 641678830	Four and a half LIM domains protein 2 isoform X3 [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	41,9	8,9	90
3672	1,210	1,298	1,051	0,971	gi 641664855	Protein disulfide-isomerase [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	57,5	4,7	150
3844	0,998	0,956	1,143	1,334	gi 240848687	Peroxiredoxin-6-like [ <i>Acyrtosiphon pisum</i> ]	25,2	4,6	128
3952	1,319	1,330	0,962	0,772	gi 985418980	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial [ <i>Diuraphis noxia</i> ]	55,5	7,1	79
<b>Fonctions inconnues / protéines non caractérisées</b>									
1393	1,331	1,378	1,211	1,082	gi 766935775	Putative leucine-rich repeat-containing protein DDB_G0290503 [ <i>Ceratosolen solmsi marchali</i> ]	133,7	6,6	106
2509	0,802	0,865	1,290	1,185	gi 1061475862	TBC1 domain family member 4 [ <i>Orchesella cincta</i> ]	39,7	5,7	65
3655	0,755	0,687	1,423	1,422	gi 951537182	Transmembrane protein 186 [ <i>Dinoponera quadriceps</i> ]	23,7	9,5	63
3765	1,110	1,190	0,915	0,971	gi 943947834	Uncharacterized protein C9orf117 homolog [ <i>Papilio machaon</i> ]	69,5	5,8	52

Accession NCBI = numéro d'accèsion sur la *National Center for Biotechnology Information* ; PM = poids moléculaire de la protéine (kDa) ; pI = point isoélectrique ; SM (Score Mascot) = score d'après la recherche sur Mascot. L'échelle colorimétrique (*heat map*) représente la variation d'expression : plus c'est surexprimé, plus la teinte est foncée tandis que plus c'est sous—exprimé, plus la teinte est claire.



Les modifications d'expressions protéiques induites par les différents inhibiteurs sont variables selon les groupes ainsi que d'une protéine à l'autre. Deux tendances sont tout de même à souligner. D'un côté, les expressions induites par la validamycine A et l'amygdaline présentent toutes les deux une tendance inverse à celle du contrôle. Quant à l'expression causée par la phloridzine, celle-ci suit de près la tendance de l'échantillon témoin.

Les groupes de protéines cibles ayant subi une modification au niveau de leur expression sont présentés (Figure 28).

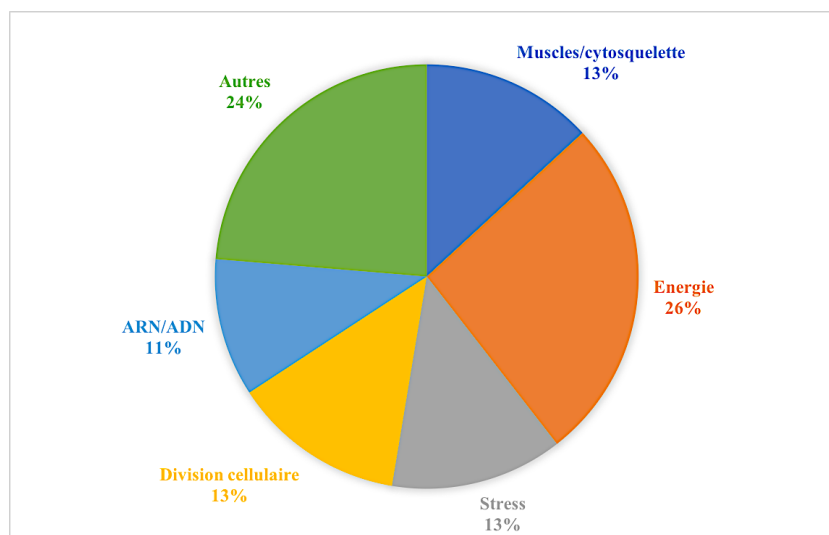
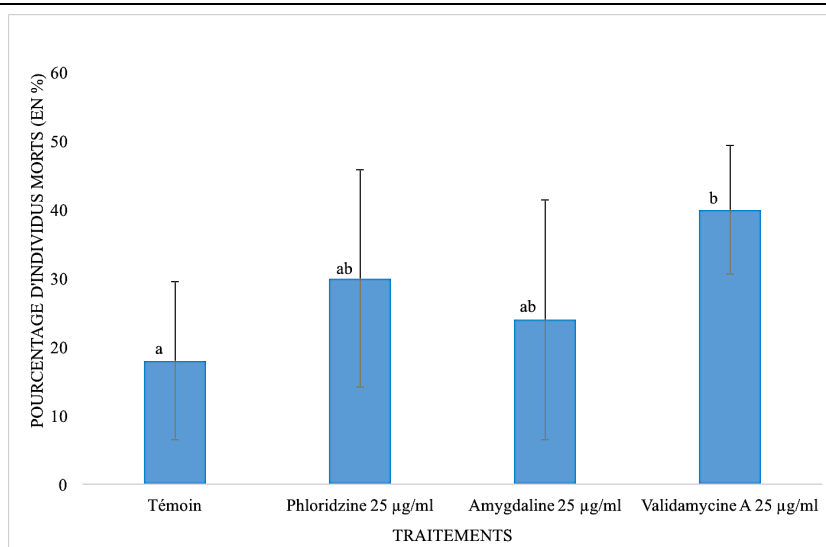


Figure 28. Répartition des protéines identifiées selon leurs fonctions suite à l'analyse 2D-DIGE des pucerons nourris avec les diètes contenant les inhibiteurs testés

## 2.3 Passage sur plantes

### 2.3.1 Traitement après infestation par *Myzus persicae*

L'histogramme ci-après (Figure 29) représente les taux de mortalité moyens de *M. persicae* 48 heures après l'application des inhibiteurs (phloridzine, amygdaline ou validamycine A) à une concentration de 25 µg/ml ou de l'eau distillée (témoin) sur les plantes préalablement infestées de pucerons. Ces taux s'élèvent à  $30 \pm 16\%$  pour la phloridzine,  $24 \pm 17\%$  pour l'amygdaline et  $40 \pm 9\%$  pour la validamycine A contre  $18 \pm 12\%$  pour le témoin.



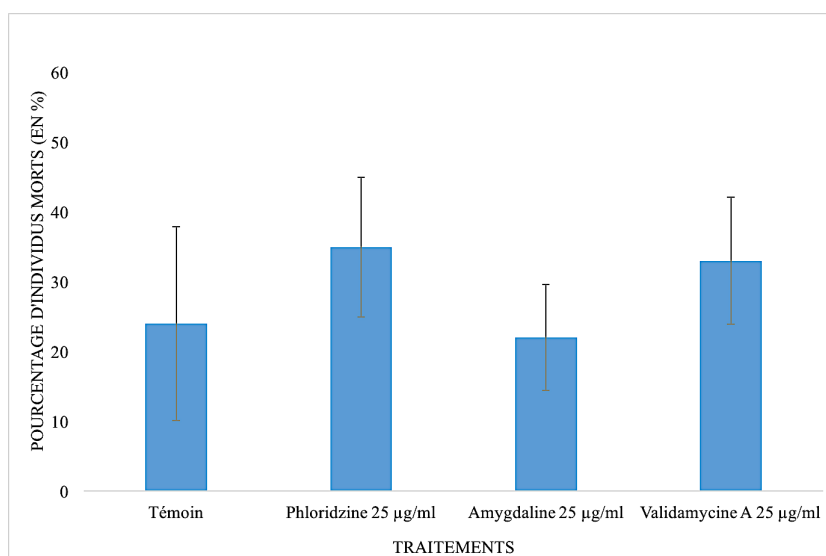
**Figure 29. Mortalité moyenne de *M. persicae* 48 heures après l'application du traitement par aspersion (concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml) sur les feuilles de tabac préalablement infestées. Les modalités ne partageant pas la même lettre sont considérées comme significativement différentes.**

Les traitements à la phloridzine et à l'amygdaline ne sont pas significativement différents du témoin en termes de taux de mortalité moyens (Annexe 9). A contrario, le traitement à la validamycine A induit une augmentation significative ( $p = 0,011$ ) de la mortalité moyenne de *M. persicae*.

Deux groupes peuvent être distingués au sein des modalités. D'une part, le premier groupe reprend le témoin, le traitement à la phloridzine ainsi que celui à l'amygdaline. D'autre part, le deuxième groupe comprend les 3 inhibiteurs. Ces deux groupes ont été formés grâce à des comparaisons de Fisher par paires.

### 2.3.2 Traitement avant infestation par *Myzus persicae*

Lorsque les plants de tabac sont traités en préventif 24 heures avant l'infestation de pucerons, les taux de mortalité moyens de ces derniers après 48 heures sur plantes s'élèvent à  $35 \pm 10$  % pour la phloridzine,  $22 \pm 8$  % pour l'amygdaline et  $33 \pm 9$  % pour la validamycine A contre  $24 \pm 14$  % dans le cas du témoin. Ces résultats sont présentés à la Figure 30.



**Figure 30. Mortalité moyenne de *M. persicae* 48 heures après l'infestation de plants de tabac préalablement traités (concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml).**

Aucune différence significative n'existe entre les traitements et le témoin ( $p > 0,05$  ; Annexe 10). De même, une ANOVA effectuée sur l'ensemble des modalités (inhibiteurs et témoin) démontre l'inexistence d'une différence significative ( $p = 0,166$ ) entre ces dernières en termes de mortalité. De ce fait, l'application des inhibiteurs en préventif n'engendre pas une augmentation de la mortalité des pucerons.

### 3 DISCUSSIONS

#### 3.1 Diètes artificielles

##### 3.1.1 Tests préliminaires

Les résultats obtenus lors de ces tests préliminaires ont permis de choisir la voie vers laquelle s'orienter pour la suite de ce travail.

Les tests réalisés avec l'alendronate (concentrations de 1 µg/ml et 10 µg/ml) n'ont pas abouti aux mêmes résultats que ceux obtenus lors de précédents travaux menés à l'EFE (Gembloux Agro-Bio Tech). Ainsi, il s'est avéré qu'aucune différence significative entre l'inhibiteur et le témoin n'a pu être soulignée dans le cadre de cette étude en 48 heures. Ceci pourrait s'expliquer par une erreur de manipulation d'une des deux parties. De ce fait, il serait prudent de réitérer les tests afin d'avoir un avis tranché sur la question. Une élévation du taux de mortalité entre les relevés effectués à 24 et 48 heures est à signaler. Cette constatation peut être expliquée par la dépendance directe entre les données. Les relevés s'effectuant sur les mêmes dispositifs expérimentaux pour les deux pas de temps, la mortalité observée à 48 heures ne pouvait qu'être augmentée ou inchangée par rapport à celle obtenue après 24 heures.

L'expérimentation impliquant la phloridzine (concentration de 25 µg/ml) a permis de mettre en évidence une augmentation très hautement significative de la mortalité d'*A. pisum*. Dès lors, ces résultats permettent de démontrer l'efficacité de l'inhibiteur en tant que bio-insecticide. Ce constat corrobore les conclusions ayant été tirées lors d'études antérieures au sein de l'EFE (Gembloux Agro-Bio Tech). Il est à noter que le taux de mortalité élevé chez le contrôle pourrait s'expliquer par un stress induit lors du changement d'environnement du puceron. De même, ceci pourrait résulter d'un problème au niveau du pH de la diète. En effet, les diètes ont été préparées dans un laboratoire où la température était supérieure à 20°C alors que l'expérimentation a eu lieu dans un phytotron réglé sur 20°C ± 2°C. Sachant que le pH varie avec la température (Barron Colin Ashton & Geary, 2011), il n'est pas improbable que la diète préparée ait vu son pH augmenter avec la diminution de température. Dès lors, la qualité de cette dernière a pu être modifiée. Ainsi, ce pourcentage de mortalité important pourrait être dû à une mauvaise acclimatation d'*A. pisum* ou à une diminution de la qualité de la diète artificielle. Dans tous les cas, l'augmentation de la mortalité d'*A. pisum* par ajout de la phloridzine à une concentration de 25 µg/ml reste indéniable. Ceci est la raison pour laquelle il a été choisi de continuer l'ensemble des différentes études en incluant cet inhibiteur.

##### 3.1.2 Effets de la phloridzine sur la mortalité des ravageurs

L'expérimentation menée sur *M. persicae* avec la phloridzine (10 µg/ml) n'a pas permis de mettre en évidence un effet de l'inhibiteur sur la mortalité du ravageur. Bien que la différence ne soit pas significative, la mortalité moyenne s'avère plus importante lors de l'ajout de l'inhibiteur. Il est donc possible qu'un nombre de répétitions plus important permettrait de réduire les écart-types et de souligner une éventuelle différence entre l'inhibiteur et le témoin. D'autre part, il est également probable que la dose ne soit tout simplement pas assez élevée que pour constater l'effet de l'inhibiteur.

Cette même expérimentation réalisée avec une concentration en phloridzine de 25 µg/ml a permis de révéler le potentiel bio-insecticide de cet inhibiteur contre *M. persicae* après 48 heures. Dans un premier temps, aucun

effet de la phloridzine sur la mortalité de *M. persicae* n'a été constaté après 24 heures d'alimentation artificielle. Ceci pourrait être dû aux écart-types importants. Toutefois, cette absence de différence significative pourrait résulter d'un nombre de répétitions relativement faible engendrant des écart-types non-négligeables. Un délai de 48 heures a donc été nécessaire pour que la différence entre le témoin et l'inhibiteur soit significative. La p-valeur ( $p = 0,013$ ) étant proche de la limite entre la différence significative et la différence hautement significative, la remarque précédente reste d'application. Ainsi, une augmentation du nombre de répétitions pourrait accentuer l'écart entre ces deux modalités.

Pour les deux expériences précitées, une augmentation du taux de mortalité entre les relevés effectués à 24 et 48 heures ont été observés et ce, pour les deux modalités (témoin et phloridzine). Comme pour le cas d'*A. pisum*, ceci peut être expliqué par la dépendance entre les relevés. En effet, ces derniers étant réalisés sur les mêmes diètes artificielles pour les deux pas de temps, le nombre de pucerons morts observés à 48 heures ne pouvait être que supérieur ou égale à celui constaté après 24 heures. De même, le taux de mortalité constaté pour la modalité contrôle peut être justifié par l'acclimatation pouvant entraîner la mort de certains individus. Afin de réduire cette mortalité, il aurait peut-être été judicieux d'acclimater au préalable les pucerons et donc de démarrer l'expérience avec des pucerons acclimatés à la diète artificielle. Ceci aurait sans doute limité le stress infligé à l'insecte.

La mortalité constatée dans un délai de 48 heures lors de l'ajout de la phloridzine (25  $\mu\text{g/ml}$ ) à la diète artificielle corrobore les résultats littéraires. En effet, l'étude menée par Junde & Lidao (1984) a démontré l'efficacité de la phloridzine en tant que bio-insecticide avec l'obtention d'une mortalité larvaire de 80-99 % pour *M. persicae* endéans les 7 jours avec une teneur en inhibiteur de 0,1%. Or, la mortalité moyenne de *M. persicae* adulte constatée lors de l'expérimentation s'élève à  $42 \pm 11$  % après seulement 48 heures et avec une concentration quatre fois moindre (25  $\mu\text{g/ml}$ ) que celle utilisée par Junde & Lidao (1984). Les résultats de ce TFE sont donc en parfaite adéquation avec cette recherche.

Il est à garder à l'esprit que l'augmentation du taux de mortalité observé avec l'incorporation de la phloridzine (25  $\mu\text{g/ml}$ ) dans la diète pourrait également résulter d'une diminution de la prise alimentaire en plus de l'effet bio-insecticide de l'inhibiteur. Cette hypothèse est soutenue par diverses études soulignant l'effet dissuasif de la phloridzine envers l'alimentation (Montgomery & Heinrich, 1974; Dreyer & Jones, 1981; Junde & Lidao, 1984). Il a été démontré que l'augmentation de la concentration en phloridzine induit une diminution de l'ingestion de la diète ainsi qu'une réduction de la durée moyenne de la première investigation alimentaire chez *M. persicae*, ce dernier étant sensible à l'effet dissuasif de l'inhibiteur (Montgomery & Heinrich, 1974). La ED50 (*Effective Dose*) permettant d'avoir 50% d'effet dissuasif après 8 heures a été déterminée à 1400  $\mu\text{g/ml}$  dans le cas de *M. persicae* (Dreyer & Jones, 1981; Rahbé & Febvay, 1993). Or, cette teneur est 56 fois plus élevée que celle de l'étude effectuée dans le cadre de ce TFE. Sachant cela, il est fort probable que le délai de 48 heures nécessaire pour l'obtention d'une différence significative en termes de mortalité soit due à la faible concentration testée.

Dans le cas des expérimentations menées sur *T. absoluta*, aucun effet sur la mortalité larvaire endéans les 72 heures n'a été constaté suite à l'ajout de phloridzine et ce, pour toutes les concentrations testées (25, 50 et 100  $\mu\text{g/ml}$ ). La mortalité plus importante observée pour les deux modalités (témoin et phloridzine) lors de l'essai à 100  $\mu\text{g}$  de phloridzine/ml pourrait être expliquée par l'isolation de 24 heures subie par les larves. De ce fait, cette mortalité serait le fruit de l'affaiblissement de certaines larves engendrant la mort de celles-ci indépendamment du traitement.

Il est possible que des doses supérieures à 100  $\mu\text{g/ml}$  ou des délais dépassant les 72 heures pourraient permettre de souligner une éventuelle augmentation de la mortalité des larves. Cependant, la dose de 100  $\mu\text{g/ml}$  a été jugée limite d'un point de vue économique suite à son coût à l'achat. D'autre part, un délai d'action de plus de 72 heures pourrait entraîner des dégâts très importants au niveau des cultures. Dès lors, la phloridzine

n'apparaît pas comme un bio-insecticide permettant l'augmentation du taux de mortalité de ce ravageur à des doses économiquement raisonnables.

Les résultats obtenus dans le cas de *T. absoluta* ne sont pas surprenants. En effet, l'étude réalisée par Hunter et al. (1994) sur *Platynota idaeusalis* (Walker) [Lepidoptera : Tortricidae] a souligné l'inefficacité de la phloridzine en termes de mortalité larvaire à des concentrations de 5 et 10 %. Néanmoins, cette même recherche a montré une corrélation positive entre la concentration en phloridzine et le temps de développement ainsi qu'une corrélation négative entre cette teneur et le temps de pupaison. Dès lors, il aurait sans doute été judicieux de prendre en compte d'autres paramètres tels que ceux précités plutôt qu'évaluer uniquement la mortalité larvaire durant ce TFE.

Pour toutes les concentrations testées sur *T. absoluta*, l'inefficacité de la phloridzine sur la mortalité larvaire pourrait être justifiée par la présence d'un mécanisme de réduction de l'inhibition de la tréhalase. En effet, il est supposé que les insectes possèdent de tels mécanismes (Silva et al., 2006). Un de ces mécanismes consisterait en une élévation de la teneur en tréhalose dans l'hémolymphe, cette dernière pouvant atteindre 100mM chez les Lépidoptères (Thompson, 2003). Une autre stratégie utilisée par les insectes pourrait être l'augmentation de l'activité tréhalase (Ferreira et al., 1997). Dans ces conditions, il est facilement imaginable que la phloridzine a pu être contrecarrée par de tels mécanismes lors de l'expérimentation, ceci induisant alors une absence d'effet de l'inhibiteur sur la mortalité larvaire.

### 3.1.3 Effets de l'amygdaline sur la mortalité des ravageurs

Lors de l'évaluation des effets de l'amygdaline sur la mortalité de *M. persicae*, aucune différence significative n'a pu être soulignée avec une concentration en inhibiteur de 10 µg/ml. En effet, les taux de mortalité observés après chaque pas de temps (24 et 48 heures) étaient similaires entre le témoin et la diète contenant l'amygdaline.

Avec l'incorporation de cet inhibiteur à raison de 25 µg/ml dans la diète artificielle, une mortalité significativement plus élevée a été constatée. Toutefois, ce fait n'a pu être mis en évidence qu'après 48 heures d'alimentation. Ceci laisse donc penser qu'une période minimale de 48 heures est nécessaire pour que l'amygdaline puisse agir sur le taux de mortalité.

A la vue des résultats obtenus aux deux expérimentations, il est possible d'avancer qu'une concentration de 10 µg/ml n'est pas suffisante pour induire un effet létal sur *M. persicae* en 48 heures alors qu'une teneur de 25 µg/ml permet d'observer une hausse de la mortalité du ravageur endéans ce délai. De plus, cette augmentation induite par la présence de l'inhibiteur dans la diète permet de révéler son efficacité en tant que bio-insecticide. Il est à noter que l'élévation de la mortalité pour une même modalité entre les deux pas de temps étudiés est à mettre en relation avec leur dépendance comme dans le cas de la phloridzine et ce, pour les deux expériences.

Deux hypothèses peuvent être posées concernant l'effet obtenu sur la mortalité de *M. persicae* grâce à l'amygdaline. D'une part, l'amygdaline est connue pour sa capacité à inhiber la tréhalase (Silva et al., 2004; Park et al., 2008). La première hypothèse avancée concerne donc l'inhibition de la tréhalase chez *M. persicae* par l'inhibiteur. Ce dernier engendrerait la mort des pucerons suite à une baisse de l'activité de la tréhalase et donc une diminution de la transformation du tréhalose en glucose disponible. Par conséquent, la mort du ravageur serait due à un déficit énergétique.

D'autre part, des recherches menées par Halarewicz & Gabrys (2012) ont démontré qu'une diète artificielle à base de sucrose 15 % contenant de l'amygdaline à raison de 0,1% engendre une modification des activités d'ingestion. Dans cette étude, le puceron *Rhopalosiphum padi* (L.) refuse d'ingérer la diète ou diminue

drastiquement ses périodes d'ingestion. Ces auteurs ont souligné une durée de première ingestion sept fois moindre par rapport au témoin (sucrose 15%) ainsi qu'une durée moyenne de la phase d'ingestion réduite d'un facteur huit. De même, l'investigation couplée d'une phase d'ingestion est diminuée de moitié. Une constatation similaire avait été soulevée par Schoonhoven & Derksen-Koppers (1976). Dans leur travail, ces derniers affirment qu'une diète pourvue en amygdaline est moins acceptée par *M. persicae*. Ces données littéraires permettent de poser une deuxième hypothèse sur l'augmentation de mortalité constatée dans le cadre de ce TFE. L'amygdaline possédant un effet dissuasif comme la phloridzine, il se pourrait que l'addition de cette dernière au sein de la diète ait permis de diminuer la prise alimentaire des pucerons. Ainsi, la hausse de mortalité relevée pourrait être due à une sous-alimentation de *M. persicae* ou à l'absence complète de prise alimentaire par celui-ci.

Bien entendu, il n'est pas exclu que l'effet de l'amygdaline sur la mortalité de *M. persicae* soit le fruit d'une combinaison de ces deux hypothèses.

Lors de l'expérimentation conduite sur *T. absoluta*, l'amygdaline (100 µg/ml) n'a engendré aucun effet significatif sur la mortalité larvaire durant les 72 heures de test. En d'autres termes, la mortalité constatée est nullement dépendante du traitement infligé. La survie des larves exposées à l'amygdaline peut être due à plusieurs mécanismes conférant une certaine tolérance à l'inhibiteur.

Dans un premier temps, il est envisageable que l'absence de mortalité liée à l'inhibiteur soit le résultat d'un mécanisme contrant la réduction de l'inhibition de la tréhalase en augmentant son activité (Silva et al., 2006; Ferreira et al., 1997). Dès lors, l'inhibition appliquée par l'amygdaline serait contrecarrée par une suractivité de la tréhalase. Dans ce cas, il est probable que l'accentuation de l'activité de la tréhalase soit causée par la synthèse de nouvelles molécules de tréhalase en réponse à des mécanismes signaux inconnus (Silva et al., 2006). Cette hypothèse est corroborée par des recherches antérieures entreprises sur la trypsine d'insectes (Mazumdar-Leighton & Brodway, 2001).

Une étude menée sur des Lépidoptères a permis de souligner la présence d'une activité β-glucosidase chez ces derniers (Yu, 1989). L'auteur de cette recherche met l'accent sur la capacité du système β-glucosidase actif à hydrolyser l'amygdaline pour en libérer son aglycone qui lui est toxique pour l'insecte. Ainsi, l'activité β-glucosidase est néfaste pour ce dernier lorsqu'il ingère des glycosides tels que l'amygdaline. Toutefois, les résultats obtenus par Pentzold et al. (2015) ont mis en évidence une inhibition de l'activité β-glucosidase durant l'alimentation et la digestion. De plus, une détoxification enzymatique des cyanures d'hydrogène (HCN) libérés a également été mise en lumière (Stauber et al., 2012). De ce fait, il est probable que la tolérance des larves de *T. absoluta* vis-à-vis de l'amygdaline ainsi que l'absence de mortalité soient dues à une capacité d'inhiber l'activité β-glucosidase ou à une détoxification enzymatique des HCN relâchés.

Une dernière hypothèse concernant l'inefficacité de l'inhibiteur peut être posée. D'après Pentzold et al. (2015), la tolérance des Lépidoptères aux glucosides cyanogéniques tels que l'amygdaline est principalement due à l'excrétion intacte de ces derniers. L'excrétion efficace de l'amygdaline pourrait donc être responsable de la tolérance des larves et permettrait de surmonter la toxicité de l'inhibiteur.

Bien que la cause exacte de la tolérance de *T. absoluta* ne soit pas déterminée, l'expérimentation menée dans le cadre de ce TFE met en doute le potentiel bio-insecticide de l'amygdaline envers ce ravageur. En effet, une dose supérieure à 100 µg/ml ou un délai de plus de 72 heures seraient peut-être nécessaires pour apercevoir un effet de l'inhibiteur sur la mortalité larvaire du ravageur. Or, ces deux alternatives ne s'avèrent pas économiquement acceptables. L'utilisation de l'amygdaline dans la lutte contre ce Lépidoptère n'apparaît donc pas comme une solution alternative aux produits phytosanitaires.

### 3.1.4 Effets de la validamycine A sur la mortalité des ravageurs

Aucun effet léthal endéans les 48 heures n'est apparu lors de l'incorporation de la validamycine A à raison de 10 µg/ml dans la diète artificielle de *M. persicae*. Cette constatation a également été relevée après 24 heures d'alimentation sur diète contenant 25 µg de validamycine A/ml. Dans ce dernier cas, cette différence non significative entre les deux modalités (témoin et validamycine A) pourrait être due aux écart-types non négligeables. Dès lors, il se pourrait qu'une augmentation du nombre de répétitions permette de révéler une différence significative après 24 heures. Ainsi, un effet léthal sur *M. persicae* dans ce délai pourrait être observé.

Après 48 heures d'expérimentation sur *M. persicae* avec une teneur en validamycine A de 25 µg/ml, une élévation significative du nombre de pucerons morts a pu être mise en évidence. Par conséquent, il est possible d'attester que la validamycine A concentrée à 25 µg/ml possède une efficacité en tant que bio-insecticide sur *M. persicae* dans un délai de deux jours. Suite à la p-valeur calculée proche de 0,01, il se pourrait qu'un nombre de répétitions plus important permette de souligner une différence hautement significative entre le témoin et le traitement.

A contrario, les probabilités calculées lors de l'expérimentation sur *T. absoluta* ont permis d'affirmer l'existence d'une indépendance entre les traitements (témoin et validamycine A à 100 µg/ml) et la mortalité larvaire observée et ce, pour tous les pas de temps étudiés. Ainsi, la mortalité survenue durant le test n'est pas à imputer aux traitements. D'ailleurs, les 48 premières heures, la modalité témoin a présenté une mortalité plus élevée que le traitement à la validamycine A. Cette tendance s'est ensuite inversée après 72 heures. Il est à souligner que la mortalité survenue lors de cette expérience a été particulièrement importante comparé aux précédentes études menées sur *T. absoluta*. Ce fait peut être expliqué par l'utilisation d'un lot différent de jus de plants de tomates pour la préparation des diètes artificielles. Dès lors, le nombre de larves mortes résulterait d'une défaillance de la qualité de la diète.

Les variations de l'effet léthal de la validamycine A entre les deux ravageurs ne sont pas surprenantes. Tatun et al. (2015) ont démontré que l'effet léthal de la validamycine A est directement dépendant de la dose administrée par alimentation et injection dans le cas des larves de *Tribolium castaneum* (Herbst) [Coleoptera : Tenebrionidae]. Cette affirmation a été corroborée par l'étude de Tang et al. (2016) dans laquelle la mortalité de *Nilaparvata lugens* (Stal) [Homoptera : Delphacidae] passe de 10% pour une teneur en inhibiteur de 0,1 µg/µl à 57% avec une dose 100 fois plus élevée. Asano et al. (1990) ont quant à eux constaté une mortalité dépassant la barre des 50% en injectant 10 µg de validamycine A par larve de *Spodoptera litura* Fabricius [Lepidoptera : Noctuidae].

Suite à cela, il paraît logique de conclure que de la dose de 10 µg/ml n'est pas suffisante pour induire un effet léthal chez *M. persicae* alors qu'une concentration de 25 µg/ml est suffisante pour apprécier cet effet. Ces résultats sont en parfaite adéquation avec la constatation de Tatun et al. (2015). Dans le cas de *T. absoluta*, tout porte à croire que la dose testée n'a simplement pas été suffisamment importante que pour engendrer une mortalité suite à l'ingestion de l'inhibiteur. Jin & Zheng (2009) ont prouvé qu'une concentration en validamycine A de  $3,17 \cdot 10^3$  mg/l, soit une dose 31,7 fois plus concentrée que celle testée dans ce TFE, est requise pour inhiber de 50% l'activité tréhalase des termites. Ceci appuie l'hypothèse de la dose insuffisante pour *T. absoluta*.

En somme, la validamycine A a montré son potentiel en tant que bio-insecticide pour une lutte contre *M. persicae*. A l'inverse, cette dernière apparaît inefficace contre *T. absoluta* dans des délais et à des concentrations économiquement raisonnables.



### 3.1.5 Etude multitrophique

Au cours de cette étude multitrophique, aucun effet létal de la part des inhibiteurs testés (phloridzine, amygdaline ou validamycine A ; 25 µg/ml) n'a été relevé endéans les 72 heures lorsque *M. pygmaeus* s'est nourrit de pucerons ayant ingéré ces derniers. Un seul individu a été retrouvé mort dans la modalité phloridzine après 48 heures. Cette mortalité observée est indépendante ( $p = 1,000$ ) de la diète consommée et n'est donc pas imputable à l'inhibiteur concerné.

Dans « lutte intégrée », le terme « intégrée » implique l'incorporation d'ennemis naturels/d'antagonistes dans la prise de décision ainsi que dans l'utilisation de tactiques compatibles et non perturbatrices préservant ces derniers (Ehler, 2006). C'est pour cette raison que les résultats de ce TFE sont très intéressants et prometteurs pour l'intégration de ces inhibiteurs au sein d'une lutte intégrée. En n'entraînant pas la mort de l'ennemi naturel, ces inhibiteurs de tréhalase permettraient de lutter contre des pucerons à deux niveaux. D'une part, ces inhibiteurs induiraient une mortalité importante de *M. persicae*. D'autre part, *M. pygmaeus* pourrait consommer ce dernier sans pour autant subir de conséquences létales. De même, cela n'entraverait pas la lutte contre *T. absoluta* par le biais de *M. pygmaeus*. De cette façon, l'emploi de ces inhibiteurs et leur incorporation dans un programme de lutte intégrée permettraient de réduire l'utilisation de produits phytosanitaires dans les cultures de Solanacées. Ceci rejoint alors la pensée de Park et al. (2008) qui considèrent les inhibiteurs de tréhalase comme étant attractifs pour le développement de nouveaux agents de contrôle contre les ravageurs.

Toutefois, il est à garder à l'esprit que seule la mortalité a été étudiée. Il n'est donc pas à exclure que ces inhibiteurs pourraient induire des dommages sur le long terme ou sur d'autres paramètres tels que la fécondité et le développement de l'ennemi naturel. Ainsi, il serait plus que judicieux d'approfondir ces aspects afin d'avoir une idée précise sur le sujet.

## 3.2 Analyses protéomiques

Les résultats des deux études protéomiques ont révélé l'absence de modifications au niveau de la tréhalase quel que soit l'inhibiteur testé. Bien que surprenant, ceci n'apparaît pas incohérent. Pour l'expérimentation de Jin & Zheng (2009),  $3,17 \cdot 10^3$  mg/l de validamycine A ont été nécessaires afin d'inhiber 50 % de l'activité tréhalase chez les termites. Ainsi, l'absence de modifications de l'activité de la tréhalase, et donc de son expression, pourrait être expliquée par le fait que les doses en inhibiteur de 10 µg/ml (phloridzine, amygdaline ou validamycine A) et 25 µg/ml (phloridzine) n'aient pas été suffisantes pour induire une variation de l'expression de cette enzyme.

De plus la 2D-DIGE réalisée sur *M. persicae* a permis la détermination de seulement 54 spots sur les 79 spots piqués. Ceci pourrait être le résultat de plusieurs facteurs. Premièrement, certains spots n'ont pas indiqué la présence de matériel protéique, ce qui explique l'absence de mis en évidence. Ceci pourrait être expliqué par une quantité de matériel inférieure à la limite de la technique utilisée ou par un *picking* mal effectué. Ensuite, certaines protéines n'ont pu être identifiées suite à un score Mascot inférieur à 45 ou à une non-correspondance du poids moléculaire et/ou du point isoélectrique. Dans ce cas, il est probable que ces protéines ne figurent pas dans la base de données de la NCBI ou ne soient pas encore connues à ce jour. Sachant cela, il n'est pas non plus exclu que la tréhalase n'ait pas été identifiée pour une des raisons précitées. Il est à noter que les 54 spots ont présenté des redondances en termes d'identification, ce qui a permis *in fine* de déterminer 42 protéines différentes. Ceci pourrait être le fruit d'un clivage de la protéine dont les fragments auraient migré différemment sur le gel.

Malgré tout cela, les deux analyses protéomiques réalisées respectivement sur *A. pisum* et *M. persicae*, ont permis de mettre en lumière deux profils d'expressions. D'une part, il a été constaté que l'addition de phloridzine a induit une expression similaire à celle du témoin et/ou une surexpression d'un petit nombre de protéines. D'autre part, l'amygdaline et la validamycine A ont tous deux engendré des profils protéiques inverses à celui présenté par le contrôle. C'est pour cette raison qu'il a été décidé de séparer la discussion de ces résultats en fonction des variations de profils protéiques par rapport au témoin. De plus, seules les protéines identifiées et pour lesquelles les fonctions ont été déterminées sont discutées ci-après.

### 3.2.1 Variations d'expressions protéiques induites par la phloridzine

Lors de la première analyse réalisée sur *A. pisum*, seuls 6 spots ont pu être piqués. Ce faible nombre pourrait être justifié par des modifications minimales des expressions protéiques engendrées par la phloridzine (25 µg/ml). Toutefois, il a été constaté que l'inhibiteur a induit une surexpression protéique et ce, pour l'ensemble des 6 spots. La deuxième analyse 2D-DIGE a souligné que l'ajout de phloridzine (10 µg/ml) à la diète entraîne une faible variation du profil protéique de *M. persicae*. C'est pourquoi, seules 5 protéines (spots 4042, 4057, 3554, 2051 et 3927) ont montré une expression significativement différente du témoin.

Ce petit nombre de protéines ayant été mis en évidence dans les deux études pourrait être justifié par la similarité des profils protéiques entre le témoin et la modalité phloridzine constatée dans le cas de *M. persicae*. Cette ressemblance entre les profils pourrait être due à l'effet dissuasif de la phloridzine. En effet, il semblerait que les résultats protéomiques corroborent l'hypothèse posée pour les diètes artificielles dans le cas de cet inhibiteur (section 3.1.2). Ainsi, l'effet dissuasif de la phloridzine serait responsable d'une alimentation très faible voire nulle chez les pucerons et engendrerait que très peu de variabilité au niveau de l'expression des protéines identifiées.

La protéine « *Symbionin symL – pea aphid* » correspondant aux spots 1323 et 3927, respectivement pour *A. pisum* et *M. persicae*, a été surexprimée par rapport à la modalité témoin dans les deux analyses. Cette protéine, abondamment produite par l'endosymbiote bactérien *Buchnera aphidicola* (Fukatsu & Ishikawa, 1992), a longtemps été la seule HSP60 (*Heat shock protein*) caractérisée chez les pucerons (Stanley & Fenton, 2000). Ce symbiote primaire obligatoire joue un rôle prédominant dans l'écologie nutritionnelle des insectes. Ce dernier fournit les nutriments essentiels qui sont limitants ou manquants dans la diète. De même, il aide dans la digestion et la détoxification des aliments (Su et al., 2013). Sachant cela, il est possible que la surexpression protéique soit due à une alimentation réduite ou absente chez le puceron. Dans ce cas, la colonie du symbiote se développerait davantage afin de contrecarrer le déficit alimentaire et de détoxifier l'alimentation ingérée pourvue de phloridzine. Ceci se traduirait alors par une production plus importante de cette protéine et donc par sa surexpression. Bien entendu, ceci reste une hypothèse à vérifier.

Cette protéine (*Symbionin symL – pea aphid*) a été l'unique protéine commune ayant été surexprimée dans les deux analyses protéomiques. L'absence d'autres similarités pourrait être expliquée par la différence de concentrations en phloridzine testées. De plus, il est également possible que ceci résulte du fait que les deux pucerons étudiés n'appartiennent pas à la même espèce.

Lors de la 2D-DIGE réalisée sur *A. pisum*, le *picking* du spot 3239 a permis d'identifier un mixte de protéines : « *v-type proton ATPase subunit B-like [A. pisum]* » et « *protein disulfide-isomerase A3-like [A. pisum]* ». La surexpression observée pourrait donc être causée par une seule de ces protéines ou par les deux protéines simultanément. Or, la protéine « *v-type proton ATPase subunit A-like [A. pisum]* » a été surexprimée au spot 3222. De ce fait, il apparaît fort probable que la protéine ayant entraîné la variation de l'expression protéique soit la « *v-type proton ATPase subunit B-like [A. pisum]* » plutôt que la deuxième comprise dans le mixte.

Les ATPases de type vacuolaire (v-ATPases) sont omniprésentes dans les membranes des compartiments intracellulaires tels que les vacuoles ou les lysosomes (Thakur et al., 2014). Ces enzymes ont également été rapportées dans de nombreux épithéliums d'insectes transportant des ions (Wieczorek et al., 2009). De plus, elles sont retrouvées dans la membrane plasmique de nombreux types de cellules animales et sont impliquées dans l'homéostasie du pH ainsi que dans la dynamisation de la membrane (Thakur et al., 2014). De manière générale, les ATPases ont pour rôle d'hydrolyser l'ATP en ADP par pompage des ions  $H^+$  dans le lumen des organelles, ce qui conduit à l'acidification de ces derniers (Wieczorek et al., 2000). Dans le cas de l'ajout de la phloridzine, ces v-ATPases ont été surexprimées. Ainsi, il est fort probable que cette surexpression ait pu engendrer une consommation d'une grande partie de l'ATP du puceron voire même la totalité. Dans ces conditions, le puceron pourrait avoir été vidé progressivement de son énergie avec, comme dommage collatéral, une acidification du lumen de ses organelles. Cette perte d'énergie aurait comme conséquence une diminution du métabolisme de l'insecte entraînant sa mort. Cette théorie corrobore l'hypothèse de la réduction ou de l'absence de la prise alimentaire suite à l'ajout de phloridzine dans la diète. En effet, un manque d'alimentation peut engendrer une perte d'énergie et, dans les cas extrêmes, conduire à la mort de l'organisme.

L'analyse protéomique sur *A. pisum* a également mis en évidence la surexpression d'une protéine liée aux ribosomes (*40S ribosomal protein SA-like [A. pisum]*) ainsi que d'une protéine dont la fonction est indéterminée (*protein LOC100167736 [A. pisum]*). Bien que cette dernière ne soit pas connue, les travaux de Meng et al. (2014) ont souligné la surexpression de cette protéine chez les souches de *M. persicae* sensibles à l'imidaclopride. La surexpression de cette protéine dans le cas d'*A. pisum* pourrait donc être interprétée comme une sensibilité de celui-ci vis-à-vis de la phloridzine. Néanmoins, ceci ne reste qu'une supposition.

Il est à souligner que l'« *Actin related protein* » a été surexprimée lors de la 2D-DIGE réalisée sur *A. pisum* alors qu'elle a été sous-exprimée de manière non-significative par rapport au témoin durant le test effectué sur *M. persicae*. Ces divergences d'expressions pourraient être liées à l'espèce de pucerons. Cependant, cette constatation complexifie l'interprétation des résultats et remet en doute l'implication de cette protéine dans le mode d'action de la phloridzine.

De même, dans le cas de la 2D-DIGE effectuée sur *M. persicae*, le spot 4057 correspondant à la protéine « *ATP synthase subunit alpha, mitochondrial [A. pisum]* » a été surexprimé. Or, cette protéine a été identifiée à deux autres spots (4071, 4072) pour lesquels son expression s'est montrée similaire au témoin voire même quelque peu diminuée. Ainsi, il semblerait convenable de penser qu'un clivage de la protéine ait eu lieu pour les deux modalités (témoin et phloridzine). La surexpression serait alors due à un clivage différent entre ces deux traitements et ne résulterait pas d'une consommation de phloridzine ou d'une non-alimentation de la part du puceron.

Les trois dernières protéines piquées et identifiées (spots 4042, 3554 et 2051) lors de l'analyse protéomique sur *M. persicae* ont toutes été sous-exprimées par les pucerons de la modalité phloridzine (10 $\mu$ g/ml). Ces dernières appartiennent chacune à un groupe distinct à la vue de leurs fonctions différentes.

Premièrement, l'« *Actin-I, partial [A. pisum]* » possède des fonctions liées aux muscles et au cytosquelette de l'insecte. Constituant structural du cytosquelette, cette protéine intervient dans l'organisation de celui-ci ainsi que dans le développement des jonctions neuromusculaires (UniProt, 2017a). Dès lors, il est envisageable que la sous-expression de cette protéine lors du traitement avec la phloridzine ait engendré des dommages aux muscles de *M. persicae* ainsi qu'au niveau de son cytosquelette. Cette diminution de l'abondance de cette protéine pourrait être due à un affaiblissement de l'insecte causée par l'effet dissuasif que possède la phloridzine. Il est à souligner que ces fonctions proviennent de la protéine « *Actin -57B* » de *Drosophila melanogaster* Melgen [Diptera : Drosophilidae] partageant une identité de 86% et une *e-value* de  $5 \cdot 10^{-81}$  avec la protéine de puceron. Ces deux protéines ont donc été considérées assez semblables que pour partager les mêmes fonctions.

L'« *Elongation factor 1-alpha [A. pisum]* » fait quant à lui partie des protéines ayant une fonction liée à l'ADN ou l'ARN. En plus de son activité GTPase, ce dernier intervient dans la traduction (UniProt, 2017c). Cette protéine étant sous-exprimée par addition de phloridzine dans la diète, il se pourrait que la traduction de l'insecte ait été perturbée. Enfin, la « *calpain-A isoform XI [A. pisum]* » s'avère intervenir dans la protéolyse grâce à son activité endopeptidase (UniProt, 2017b). Les effets de la sous-expression de cette protéine restent à élucider.

Bien que complexe à l'interprétation, les résultats obtenus grâce à ces deux analyses protéomiques ont permis de souligner l'impact que pouvait avoir la phloridzine sur l'organisme du puceron. La non-présence de modifications au niveau de la tréhalase pousse à croire que cet inhibiteur a engendré la mort de l'insecte sans toutefois inhiber cette enzyme. Comme discuté dans cette partie, l'hypothèse de la dissuasion de la phloridzine vis-à-vis de l'alimentation a pu être renforcée notamment par la surexpression des v-ATPases. Cependant, des études approfondies restent nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme de la phloridzine. Finalement, il apparaît convenable d'affirmer que la phloridzine possède des propriétés bio-insecticides exploitables dans le cadre d'une lutte intégrée.

### 3.2.2 Variations d'expressions protéiques induites par l'amygdaline et la validamycine A

Comme précisé auparavant, l'étude protéomique menée sur *M. persicae* a permis de constater que l'incorporation de validamycine A ou d'amygdaline (10 µg/ml) dans les diètes artificielles engendre une modification du profil protéique du puceron. Pour chaque protéine identifiée, ces deux inhibiteurs induisent une expression inverse à celle du témoin. En d'autres termes, les protéines surexprimées dans le cas du témoin apparaissent sous-exprimées par les inhibiteurs et inversement.

Cette observation dans le cas de l'amygdaline (10 µg/ml) appuie le fait que celle-ci ait été consommée. La concentration de 10 µg/ml n'a donc pas eu d'effet dissuasif sur le puceron vis-à-vis de la diète. Néanmoins, ceci n'exclut pas le fait qu'une teneur plus importante telle que la deuxième dose testée en diète artificielle (25µg/ml) diminue la prise alimentaire de *M. persicae*.

Il est à noter que la discussion qui suit a été divisée par groupe par soucis de compréhension. Néanmoins, il est nécessaire de garder à l'esprit que les hypothèses posées forment un ensemble et ne sont pas à prendre indépendamment les unes des autres.

#### **Groupe « énergie » :**

Pas moins de 26 % des protéines identifiées ayant subi une modification de leur expression ont pu être placées dans le groupe de l'énergie. Dans le cas de l'amygdaline et de la validamycine A, toutes ces protéines ont été sous-exprimées. Ainsi, bien que l'expression de la tréhalase n'ait pas été modifiée, 10 protéines impliquées dans le métabolisme énergétique ont vu leur expression diminuer. De ce fait, l'effet létal constaté après 48 heures de consommation d'amygdaline ou de validamycine A (25 µg/ml) pourrait fortement provenir d'une baisse d'énergie chez le puceron.

Sur ces 10 protéines sous-exprimées, quatre d'entre elles interviennent dans la glycolyse, celles-ci sont : la fructose bisphosphate aldolase, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, l'énolase et la pyruvate kinase (Kunieda et al., 2006). Ainsi, la sous-expression de ces quatre enzymes entraîne une diminution de l'activité glycolytique de l'insecte grâce à l'ingestion de validamycine A ou d'amygdaline. Or, la glycolyse est essentielle à ce dernier car elle permet de libérer l'énergie chimique en oxydant le glucose en deux molécules de pyruvate (Reece et al., 2012). Etant donné le fait que la glycolyse libère moins d'un quart de l'énergie emmagasinée dans

une molécule de glucose, le reste de l'énergie est stocké dans ces deux molécules de pyruvate (Campbell & Reece, 2007). Celles-ci peuvent alors être transformées en acétyl-coA et entrer dans le cycle de Krebs afin de libérer l'énergie restante (Reece et al., 2012).

En outre, la sous-expression de la protéine « *citrate synthase 2, mitochondrial [A. pisum]* » induit également une perturbation du métabolisme de l'énergie. En effet, cette dernière est impliquée dans le cycle de Krebs où elle catalyse la transformation de l'oxaloacétate et de l'acétyl-coA en citrate (UniProt, 2017d). Ceci renforce l'hypothèse posée précédemment. En effet, il est fort probable que l'ajout d'amygdaline ou de validamycine A (10 µg/ml) dans les diètes ingérées par *M. persicae* ait engendré une diminution du métabolisme de l'énergie en réduisant l'expression des 5 protéines précitées. Par conséquent, il se pourrait qu'une augmentation de la dose administrée puisse mener jusqu'à la mort du puceron. Cette hypothèse peut être corroborée grâce à la hausse significative du taux de mortalité chez *M. persicae* ayant été observée avec une concentration en inhibiteur de 25 µg/ml.

Cette baisse d'énergie chez le puceron a également été soulignée par la sous-expression d'autres protéines telles que la « *6-phosphoglucolactonase [Drosophila eugracilis]* » impliquée dans la voie des pentoses phosphates (Kruger & von Schaewen, 2003), la « *glutamate deshydrogenase, mitochondrial [A. pisum]* » ou encore la « *dihydrolipoyl deshydrogenase, mitochondrial [Diuraphis noxia]* ».

De même, la réduction du métabolisme de l'énergie chez *M. persicae* a été traduit par une sous-expression de l'ATP synthase. Celle-ci étant le fabricant primaire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Reece et al., 2012), son inhibition a sans aucun doute mené à une diminution de la production d'ATP et donc de l'énergie. Dès lors, la sous-expression des v-ATPases pourraient être justifiée par la baisse d'ATP produits vu que ces enzymes transforment l'ATP en ADP (Wieczorek et al., 2000).

L'analyse du profil d'expressions de ces protéines de type « énergétique » a permis de mettre en lumière la responsabilité de l'amygdaline et de la validamycine A dans la sous-expression de celles-ci. Il apparaît donc juste de conclure que ces inhibiteurs mènent à une baisse du métabolisme de l'énergie. Ainsi, l'effet létal de ces deux inhibiteurs envers *M. persicae* résulterait en partie de cet épuisement énergétique.

Toutefois, il n'y a pas que le métabolisme énergétique qui a subi des modifications au niveau de l'expression de ses protéines. En effet, la présence d'amygdaline et de validamycine A dans l'alimentation du puceron a induit une variation de l'expression de protéines appartenant à d'autres groupes.

### **Groupe « Muscles/cytosquelette » :**

Représentant 13 % de l'ensemble des protéines identifiées, les protéines liées aux muscles et au cytosquelette ont elles aussi montré une variation de leur profil d'expressions suite à la consommation des inhibiteurs par les pucerons. Ce groupe protéique reprend plusieurs isoformes de « *myosin heavy chain* » (MHC) ainsi que la protéine « *actin-1, partial [A. pisum]* ».

A la vue des résultats, il est constatable que les MHC, protéines moteurs des filaments fins musculaires (Wells et al., 1996), ont tantôt été surexprimées tantôt sous-exprimées. Cette constatation est vrai non seulement pour les différents isoformes mais aussi pour un même isoforme représenté par différents spots. La plupart des organismes produisent beaucoup de MCH musculaires avec des modèles d'expressions régulés dans le temps et dans l'espace. Ceci suggère donc que les isoformes de MHC possèdent différentes caractéristiques nécessaires pour définir des propriétés musculaires spécifiques (Wells et al., 1996). De ce fait, il se pourrait que l'ingestion des inhibiteurs ait influencé les propriétés musculaires requises. Ceci expliquerait la variation de l'expression des différents isoformes identifiés.

Quant à la protéine « *actin-1, partial [A. pisum]* », celle-ci a été surexprimée. De manière générale, les actines figurent comme les composants contractiles majeurs des myofibrilles des cellules musculaires ainsi que les composants majeurs du cytosquelette des cellules non-musculaires (Mounier et al., 1992). La protéine identifiée grâce à la 2D-DIGE joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette mais aussi dans le développement des jonctions neuromusculaires et dans l'organisation de la synapse (UniProt, 2017a). Ainsi, la surexpression de cette protéine pourrait causer des dommages non seulement au niveau du cytosquelette mais également à la synapse. Par conséquent, il est possible que cela ait été le cas avec l'ajout des inhibiteurs. Ces derniers pourraient donc avoir endommagé l'activité synaptique de l'insecte. En effet, il a été démontré que les dynamiques de l'actine pré- et postsynaptiques influencent l'activité synaptique (Dillon & Goda, 2005). Il est alors imaginable que l'amygdaline et la validamycine A aient perturbé la transmission synaptique comme c'est le cas pour certains insecticides tels que les carbamates, les organophosphorés ou encore les néonicotinoïdes (Siegwart, 2017).

### **Groupe « Division cellulaire » :**

En plus des protéines discutées précédemment, les protéines liées aux processus de divisions cellulaires ont également subi des modifications au niveau de leur profil d'expressions. Au sein de celles-ci, deux protéines ont été surexprimées alors que 3 autres ont été sous-exprimées.

L'« *Actin related protein 1 [A. pisum]* » (Arp 1) est l'une des deux protéines ayant été surexprimées. Les fonctions des Arps sont aussi variées que leur localisation (Eckley & Schroer, 2003). L'Arp1 est retrouvée dans un complexe régulant les interactions microtubule-membrane basés sur la dynéine cytoplasmique. Lorsqu'une cellule se divise, de nombreuses protéines moteurs génèrent une force entre les microtubules et les membranes. La dynéine moteur joue un rôle dans l'orientation et l'assemblage des fuseaux, le transport des vésicules ainsi que dans la migration nucléaire (Machesky & May, 2001). En outre, l'activité de cette dynéine dans cet événement requière un complexe dynactine incluant au moins 7 protéines différentes dont l'Arp1 (Holleran et al., 1998). La surexpression de cette Arp1 semble être en contradiction avec la sous-expression de la protéine « *Putative dynactin subunit 2 [Fopius arisanus]* ». De plus, les trois autres protéines tantôt sous-exprimées tantôt surexprimées sont aussi en relation directe avec les microtubules. Dès lors, une étude plus approfondie sur ce sujet serait nécessaire. Celle-ci aurait pour but de déterminer les impacts engendrés sur la division cellulaire suite aux variations d'expressions de ces protéines après ingestion de validamycine A ou d'amygdaline. De cette manière, il serait possible de savoir si ces modifications d'expressions sont liées à l'effet létal des inhibiteurs à des concentrations plus élevées (e.g. 25 µg/ml).

### **Groupe « Stress » :**

Ce groupe reprend 13 % des protéines déterminées pour lesquelles les fonctions sont connues. Parmi les protéines liées aux stress, la protéine HSP60 a vu son expression augmenter. Toutes les autres protéines ont été sous-exprimées et apparaissent comme étant des *Heat shock proteins* (HSPs).

La modification de leur expression ne s'avère pas surprenante. En effet, les HSPs sont un groupe de protéines bien connues qui aident les organismes à répondre à un stress environnemental, incluant les stress thermiques et les expositions aux insecticides (Li et al., 2017; King & MacRae, 2015; Sun et al., 2016). En conditions de stress, les HSPs favorisent le repliement correct des protéines et empêchent l'agrégation de protéines dénaturées ou de polypeptides nouvellement synthétisés (Sørensen et al., 2003; Li et al., 2017).

Lors de cette étude, la protéine HSP70 *cognate* s'est vue sous-exprimée dans le cas des inhibiteurs par rapport au témoin. Cette même constatation a été soulignée dans la recherche de Sun et al. (2016) menée sur *Apolygus lucorum* Meyer-Dür [Hemiptera : Miridae] dans laquelle l'insecte a été traité avec du Chlorpyrifos (organophosphoré). Sachant que la HSP70 *cognate* est une protéine de résistance aux stress très importante (Sun

et al., 2016), il est probable que sa sous-expression ait induit une diminution de la résistance de l'insecte envers les inhibiteurs.

Quant à la surexpression la protéine HSP60 constatée lors de la 2D-DIGE réalisée sur *M. persicae*, celle-ci ne coïncide pas avec l'étude de Li et al. (2017). Dans cette dernière, les traitements contenant de la  $\beta$ -cyperméthrine (pyréthrianoïde) à des doses sublétales ont entraîné une diminution de l'expression de la HSP60 de *Rhopalosiphum padi* (L.). Cependant, la « *Symbionin symL – pea aphid* », longtemps considérée comme la seule HSP60 chez les pucerons (Stanley & Fenton, 2000), a vu son expression baisser avec l'ingestion de validamycine A et d'amygdaline. Ceci pourrait s'expliquer par des conditions non favorables à la vie de *Buchnera aphidicola*. En effet, il a été prouvé que la population de cet endosymbiote diminuait drastiquement avec les chocs thermiques (Su et al., 2013). Il est donc possible que les deux inhibiteurs testés aient engendré un effet similaire sur la colonie de *B. aphidicola*. Ainsi, une réduction de la population pourrait justifier la sous-expression de la protéine ayant été observée.

Dans tous les cas, les variations d'expression des HSP ont permis de confirmer que la validamycine A et l'amygdaline induisent bel et bien un stress chez le puceron. Ainsi, leur potentiel en tant que bio-insecticide a pu être renforcé.

#### **Groupe « ADN/ARN » :**

Dans le groupe des protéines liées à l'ADN ou à l'ARN, trois protéines sur quatre ont été sous-exprimées par rapport au témoin. Il se pourrait alors que l'ingestion des inhibiteurs testés induisent une perturbation des processus liés à l'ADN et l'ARN.

Premièrement, la « *CAD protein [A. pisum]* » est une protéine de fusion codant les trois premières activités enzymatiques de la voie de biosynthèse des pyrimidines, à savoir la carbamoylphosphate synthétase, l'aspartate transcarbamylase et la dihydroorotase (Moulton & Wiegmann, 2004). Par conséquent, il est fort probable que la baisse de l'expression de cette protéine causée par la validamycine A et l'amygdaline ait entraîné une diminution de la production de pyrimidines.

De plus, un facteur d'initiation de la traduction et une protéine ribosomale ont elles aussi vu leur expression baisser. La réduction de l'expression du facteur d'initiation de la traduction pourrait être mis en relation avec le nombre total de protéines ayant été sous-exprimées. En effet, l'ingestion de validamycine A et d'amygdaline ont montré des profils avec des expressions généralement sous-exprimées par rapport au témoin. Par conséquent, il se pourrait que ces sous-expressions aient réduit le nombre de traduction et donc l'expression du facteur d'initiation de cette dernière. Toutefois, il est à garder à l'esprit que ceci ne reste que des hypothèses et qu'aucune conclusion valable ne peut être tirée sans expérimentations supplémentaires. D'ailleurs, le facteur d'élongation  $\alpha$ -1 a été surexprimé, ce qui apparaît incohérent suite à la sous-expression du facteur d'initiation de la traduction. Ceci appuie donc la nécessité de recherches complémentaires à celle-ci.

#### **Groupe « Autres » :**

A l'exception de 3 protéines, toutes les protéines de ce groupe ont été sous-exprimées. Dans ce dernier est retrouvé une multitude de protéines aux fonctions variées. Cependant, certaines d'entre elles ont su se démarquer. C'est notamment le cas de la protéine « *4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial [Diuraphis noxia]* » possédant une fonction relative à l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA).

L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est libéré par les neurones moteurs inhibiteurs et supprime la dépolarisation musculaire en causant un influx de  $\text{Cl}^-$  responsable d'une hyperpolarisation du sarcolemme (Harrison et al., 2012). En d'autres termes, le GABA permet la décontraction musculaire. A contrario, le

glutamate (ou acide glutamique), neurotransmetteur impliqué dans divers processus biologiques chez les insectes (Hillyer et al., 2015), est excrété par les neurones moteurs excitateurs au niveau de la jonction neuromusculaire, ce qui initie la dépolarisation du sarcolemme et mène à la contraction musculaire (Harrison et al., 2012). A ce stade, il est facilement compréhensible qu'une perturbation d'un de ces neurotransmetteurs puisse mener à de graves conséquences pour le puceron. Parmi les canaux ioniques et/ou les récepteurs membranaires ciblés par les insecticides, les récepteurs ionotropes de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABARs) sont considérés comme des sous-unités protéiques complexes vitales favorisant la transmission inhibitrice rapide dans le système nerveux central (Murillo et al., 2011). De ce fait, certains insecticides (e.g. phenylpyrazoles) peuvent induire une hyperexcitation neuronale ainsi que des convulsions en bloquant le glutamate ou l'action inhibitrice du GABA (Janssen et al., 2010; Narahashi et al., 2010; Law & Lightstone, 2008; Raymond-Delpech et al., 2005; Raymond et al., 2000). Cependant, la 4-aminobutyrate aminotransférase est responsable du catabolisme du GABA (NCBI, 2017) et a été sous-exprimée sous l'influence de la validamycine A et de l'amygdaline lors de cette étude. Ceci signifie que les inhibiteurs testés n'ont pas eu le même mode d'action que celui discuté dans le paragraphe précédent. Toutefois, il se pourrait que la sous-expression de cette protéine ait tout de même induit des perturbations au niveau neuronal de l'insecte. En effet, la baisse du catabolisme du GABA pourrait entraîner une augmentation de la concentration en ce dernier. Dans ce cas, il se pourrait que les inhibiteurs testés aient induit une suppression accrue de la dépolarisation musculaire par accumulation de GABA. Si l'hypothèse s'avère correcte, il est probable que cette suppression importante de dépolarisation musculaire ait entraîné une impossibilité de contraction des muscles de l'insecte. Ainsi, il est possible que cette réduction des contractions musculaires puisse, sur le long terme ou à des doses en inhibiteur plus importantes, réduire la mobilité du puceron et mener à sa mort. Il est à garder à l'esprit que ceci est une hypothèse nécessitant une vérification par le biais d'expériences additionnelles.

Enfin, une deuxième protéine de ce groupe apparaît intéressante. Celle-ci est l'acide L-aminé aromatique décarboxylase également connue sous le nom de DDC (Dopa décarboxylase) (De Luca et al., 2003). L'analyse protéomique a mis en évidence une sous-expression de cette protéine lors de l'ingestion de validamycine A et d'amygdaline. Or, cette enzyme catalyse les décarboxylations menant à la formation de dopamine et de sérotonine (Blenau & Baumann, 2001). Cette dernière s'avère donc nécessaire à la production de dopamine et de sérotonine dans le système nerveux centrale mais aussi dans l'hypoderme de l'insecte où elle est nécessaire à la sclérotisation et la mélanisation de la cuticule (Lunan & Mitchell, 1969). En outre, ces deux neurotransmetteurs jouent un rôle dans le comportement d'accouplement, la fertilité, les rythmes circadiens ainsi que dans les sécrétions endocrines (Blenau & Baumann, 2001). Sachant cela, il est possible d'avancer que la sous-expression de la DDC a manifestement eu de nombreuses conséquences sur l'organisme de *M. persicae*. Ainsi, il se pourrait que des doses plus élevées en inhibiteur, telles que celle ayant été testée dans ce TFE (25 $\mu$ g/ml), puissent mener à une réduction drastique de l'expression de cette protéine et tuer le puceron.

### **3.3 Passage sur plantes**

Après les expérimentations sur diète artificielle et l'approche protéomique visant une meilleure compréhension du/des mode(s) d'action des inhibiteurs, le passage sur le modèle plante apparaissait comme attrayant.

L'expérimentation dans laquelle l'aspersion des inhibiteurs (phloridzine, amygdaline ou validamycine A ; 25 $\mu$ g/ml) a été réalisée après infestation préalable des plants de tabac avec *M. persicae* a permis de mettre en évidence une différence significative entre le témoin et l'application de validamycine A. Les modalités amygdaline et phloridzine n'ont quant à elles pas engendré de différence significative en termes de taux de mortalité. En d'autres termes, seule la validamycine A diluée à 25  $\mu$ g/ml a montré une augmentation significative du nombre de pucerons morts.



Néanmoins, il est possible de constater grâce aux comparaisons de Fisher par paires que deux groupes ont pu être formés, le premier reprenant les 3 inhibiteurs et le deuxième incluant le témoin, la phloridzine ainsi que l'amygdaline. Ceci signifie que la modalité validamycine A n'a pas entraîné significativement plus de morts que les autres inhibiteurs.

Plusieurs hypothèses suite à ces constatations peuvent être établies. Premièrement, il est imaginable que la validamycine A, contrairement aux autres inhibiteurs, ait pu traverser la cuticule foliaire et atteindre le phloème. Dans cette hypothèse, le phloème pourvu de cet inhibiteur aurait été consommé par les pucerons entraînant alors la mort de ces derniers.

Une deuxième hypothèse relativement plus plausible serait que certains pucerons aient ingéré non pas le phloème contenant la validamycine A mais bel et bien les gouttelettes elles-mêmes. Ceci pourrait expliquer pourquoi seule la modalité validamycine A a présenté une différence significative par rapport au témoin. Comme déjà discuté auparavant, la phloridzine et l'amygdaline possèdent tous deux une propriété dissuasive vis-à-vis de l'alimentation, ce qui n'a pas été prouvé dans le cas de la validamycine A. Cette propriété de dissuasion pourrait alors être responsable de la mortalité plus faible observée pour ces deux modalités. Ainsi, les différences non significatives de l'amygdaline et de la phloridzine par rapport au témoin seraient dues à une préférence du puceron à consommer le phloème plutôt que les gouttes contenant ces inhibiteurs. Dans cette hypothèse, les inhibiteurs testés n'auraient donc pas pénétré jusqu'au phloème des feuilles traitées.

Une dernière hypothèse serait que la mortalité constatée n'ait pas été induite par l'ingestion de la validamycine A mais plutôt par contact avec celle-ci. Pour vérifier cette théorie, des recherches supplémentaires seraient nécessaires. Celles-ci n'ayant pas été réalisées, il n'est pas possible de confirmer ou d'écarter cette dernière.

Lors de l'expérimentation visant à appliquer les inhibiteurs en préventif, soit 24 heures avant l'infestation par *M. persicae*, aucune différence significative n'a été soulignée par rapport au témoin et ce, pour l'ensemble des traitements. Dès lors, ces résultats permettent d'appuyer l'hypothèse discutée précédemment concernant la consommation de gouttelettes contenant de la validamycine A. Cette absence d'effet létal de la part des inhibiteurs serait donc liée à une évaporation des gouttelettes sans que ces derniers n'aient pu pénétrer dans la feuille pour atteindre le phloème.

Il est à garder à l'esprit que la plupart des insecticides sont appliqués sous forme liquide ou en spray et utilisent l'eau en tant que transporteur (Sarwar et al., 2011; Sarwar, 2015a). Or, les inhibiteurs ont été dilués seuls dans de l'eau. Bien que les résultats ne soient pas tous concluant, ceci réconforte sur la pertinence du test réalisé dans ce TFE.

Pour rappel, une substance active peut être une substance qui empêche, tue ou repousse un ravageur et une formulation consiste en une substance active ou un mélange de substances actives auquel est ajouté plusieurs matières inertes appelées adjuvants (Sarwar, 2015a). Dans ces conditions, il apparaît correct de considérer les inhibiteurs testés en tant que substances actives non formulées.

Une formulation a pour but d'améliorer les propriétés de la substance active pour la manipulation, le stockage et l'application. De même, une formulation influence l'efficacité et la sécurité (Burges, 1998; Sarwar, 2015a). De ce fait, les adjuvants ajoutés à cette dernière servent également à rendre les substances actives plus efficaces (Hazen, 2000). Les adjuvants sont définis comme des matières actives inertes qui améliorent les propriétés physiques d'une substance active et qui ne possèdent pas eux-mêmes de propriétés destructrices (Sarwar, 2015a). Dans les adjuvants, il est possible de retrouver des agents mouillants (permettant aux poudres mouillables de se disperser dans l'eau), des dispersants (permettant aux pesticides de former une couche de

revêtement uniforme sur la surface traitée), des agents pénétrants (permettant aux pesticides de traverser la surface extérieure et de pénétrer à l'intérieur de la zone traitée) et bien d'autres (Sarwar, 2015a).

D'après Hazen (2000), les agents mouillants permettent aussi de diminuer l'angle de contact des gouttes sur le substrat. Cela signifie que les gouttes deviennent moins sphériques et tendent à s'aplatir au point de contact avec le substrat. De plus, les agents mouillants diminuent la tension de surface interne de la goutte. Toujours d'après cet auteur, la réduction de la tension superficielle d'équilibre de la goutte et la formation d'une fine couche sur la surface foliaire nécessite un surfactant adéquat et à bonne concentration. Sachant cela, il est fortement probable que la présence d'un agent mouillant aurait permis une meilleure dispersion du traitement sur la surface des feuilles de tabac. En outre, un agent pénétrant aurait également été nécessaire lors du test. Ce dernier, assistant la substance active dans ces mouvements jusqu'à l'absorption (Hazen, 2000), aurait sans doute facilité l'absorption des inhibiteurs ainsi que leur présence dans le phloème.

Dans le cas de l'utilisation en préventif des inhibiteurs, il aurait certainement été opportun d'ajouter un agent humectant. En effet, Hazen (2000) affirme qu'une substance active tend à se cristalliser et à être moins disponible pour l'absorption lorsque la gouttelette sèche. De même, ce dernier souligne le potentiel que possède un agent humectant dans la réduction du taux de séchage des gouttes. Dès lors, il est aisément compréhensible que la présence d'un tel agent aurait ralenti le séchage des gouttes et permis à la substance active (inhibiteur) de rester le plus disponible possible pour l'absorption.

Dans tous les cas, la recherche d'une formulation adéquate et en accord avec l'aspect biologique des bio-insecticides sera nécessaire pour une efficacité optimale des inhibiteurs.

## V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de fin d'études a permis de mettre en évidence le potentiel bio-insecticide de trois inhibiteurs de tréhalase (validamycine A, l'amygdaline et la phloridzine) envers *M. persicae*. En effet, il a été démontré qu'une concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml de diète artificielle est suffisante pour apprécier une mortalité significativement plus élevée endéans les 48 heures pour les inhibiteurs par rapport au témoin, ce qui n'est pas le cas pour une dose de 10 µg/ml. Cependant, il est à garder à l'esprit qu'une grande marge non-négligeable sépare les deux doses testées. Pour cette raison, une étude supplémentaire serait nécessaire afin de trouver, pour chaque inhibiteur, la dose précise à partir de laquelle il y a un effet significatif sur la mortalité des modèles entomologiques étudiés.

Cet effet bio-insecticide étant intéressant dans une optique de réduction de l'utilisation de produits phytosanitaires en cultures de Solanacées, cette partie de la recherche est à développer et d'autres facteurs (fécondité, développement, etc.) sont à prendre en compte. Par exemple, des investigations pourraient être réalisées afin de déterminer la DL50 de cet inhibiteur. De même, les résultats de ce TFE ont montré la nécessité de formuler ces inhibiteurs pour une meilleure efficacité de ces derniers lors de l'application sur plantes. Sur le long terme, des recherches sur des formulations adéquates et une analyse des risques pourraient être envisageables. Toutefois, des études de marché devraient être effectuées afin d'évaluer les possibilités commerciales de ces inhibiteurs. Celles-ci permettraient d'apprécier les éventuelles opportunités qu'ils offrent pour la lutte en cultures de Solanacées.

En outre, ce travail a également souligné l'absence d'effet létal de la part des inhibiteurs sur les larves de *T. absoluta* avec des teneurs de 25, 50 et 100 µg/ml dans un délai de trois jours. Ainsi, la validamycine A, l'amygdaline et la phloridzine ne doivent pas être considérées en tant que bio-insecticides potentiels pour ce ravageur car ces inhibiteurs ne permettent pas de lutter contre ce dernier avec des doses et dans des délais économiquement raisonnables. Pour des études futures, d'autres voies telles que celle des mévalonates pourraient apparaître intéressantes. De même, des recherches complémentaires sur d'autres inhibiteurs que ceux de la tréhalase pourraient mener à des résultats concluants. Dans tous les cas, ce TFE a montré que des investigations supplémentaires sur les inhibiteurs de tréhalase testés ne seraient pas rentables si le but est de lutter à court terme contre *T. absoluta*. Par contre, il serait peut-être intéressant d'évaluer des paramètres autres que la mortalité afin de connaître l'impact de ces inhibiteurs sur le long terme.

L'étude multitrophique réalisée dans le cadre de ce TFE a montré une absence d'effet létal des inhibiteurs sur l'ennemi naturel *M. pygmaeus*, ce qui est prometteur dans le cadre de la lutte intégrée. En effet, il a été démontré qu'il est possible de lutter contre *M. persicae* en utilisant l'un de ces 3 inhibiteurs sans pour autant tuer *M. pygmaeus*, prédateur de ce puceron et de *T. absoluta*. Cependant, cette partie du travail n'a pris en compte que la mortalité sur un délai de 72 heures. Par conséquent, l'impact de ces inhibiteurs sur d'autres paramètres tels que le développement, la fécondité ou encore durée de vie doit être évalué. Sans quoi, il est impossible d'avancer l'absence de perturbations sur l'organisme du prédateur lors de l'utilisation de ces derniers. Ces résultats ouvrent donc la porte à ces autres interrogations qu'il serait nécessaire d'approfondir au cours de recherches postérieures.

Finalement, les analyses protéomiques ont révélé une variation des profils protéiques différant selon les inhibiteurs incorporés (10 µg/ml) dans la diète artificielle. D'une part, la tendance de la phloridzine à suivre un profil d'expressions similaire à celui du contrôle appuie sa capacité de dissuasion vis-à-vis de l'alimentation. Dans ce cas, l'hypothèse concernant la mort des pucerons induite par une sous-alimentation ou à l'absence complète de prise alimentaire a été posée et appuyée. Afin de vérifier cette dernière, d'autres études telles que des études comportementales ou de l'électropénétrographie pourraient être réalisées.

D'autre part, l'amygdaline et la validamycine A ont montré des profils d'expressions inverses à ceux du témoin. Ceci a permis de souligner que ces deux inhibiteurs diminuent le métabolisme énergétique de *M. persicae*. En outre, ils induisent également un stress chez le puceron qui se traduit par une modification d'expressions des HSPs. De plus, l'analyse protéique comparative a mis en lumière des bouleversements au niveau de la division cellulaire, de l'ADN et l'ARN ainsi qu'au niveau des muscles et du cytosquelette. De ce fait, il a été constaté que ces deux inhibiteurs engendrent des variations d'expressions qui pourraient être responsables de la mort des pucerons lors de l'augmentation de la concentration.

Enfin, aucune modification de la tréhalase n'a été observée suite aux traitements testés (10 µg d'inhibiteur/ml). Ceci permet de mettre l'accent sur l'ensemble des impacts engendrés par l'incorporation des inhibiteurs dans la diète. Par conséquent, cette étude a montré que les inhibiteurs de tréhalase ne perturbent pas uniquement cette enzyme mais également de nombreux autres mécanismes. Ce TFE a donc permis une ébauche de compréhension de l'impact de ces inhibiteurs sur l'organisme du puceron. De ce fait, cette recherche a ouvert des pistes à investiguer afin de mieux appréhender les modes d'action de ces inhibiteurs de tréhalase.

Ainsi, plusieurs perspectives pourraient faire suite aux résultats protéomiques de ce TFE. Par exemple, il serait intéressant d'analyser s'il existe une relation entre la concentration en inhibiteur et les modifications de profils d'expressions. De plus, il se pourrait que ces variations d'expressions puissent aussi dépendre du temps. C'est pourquoi, la relation entre ces modifications et ce facteur apparaît comme une perspective plus qu'intéressante. Ceci permettrait de savoir si les différentes cibles des inhibiteurs sont toutes ciblées en même temps ou si ces derniers possèdent un mode d'action impliquant des cibles qui sont différées dans le temps.

## VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aktar W.M., Sengupta D. & Chowdhury A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture : their benefits and hazards. *Interdisc. Toxicol.*, **2**(1), 1–12.
- Albajes R. & Alomar Ò., 1999. Current and Potential use of Polyphagous Predators. In: R. Albajes et al., eds. *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Kluwer Academic Publishers, 265–275.
- Alomar Ò., Goula M. & Albajes R., 2002. Colonisation of tomato fields by predatory mirid bugs (Hemiptera: Heteroptera) in northern Spain. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **89**, 105–115.
- Ameixa O.M.C.C., 2010. Aphids in a Changing World. In: P. K. et al. (eds.), ed. *Aphid Biodiversity under Environmental Change*. Springer.
- Arnó J. et al., 2009. *Implementation of IPM programs on European greenhouse tomato production areas: Tools and constraints* UdL., Available at: <http://www.recercat.net/handle/2072/86738>.
- Arnó J. et al., 2009. *Tuta absoluta*, a new pest in IPM tomatoes in the northeast of Spain. *IOBC/WPRS Bulletin*, **49**, 203–208.
- Arnó J. & Gabarra R., 2011. Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Pest Science*, **84**, 513–520.
- Asano N. et al., 1990. Trehalase inhibitors, Validoxyamine A and related compounds as insecticides. *Structure*, **XLIII**(6), 722–726.
- De Backer L. et al., 2014. *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) as an efficient predator of the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick) in Europe. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **18**(4), 536–543.
- De Backer L., Wäckers F.L., et al., 2015. Predation of the Peach Aphid *Myzus persicae* by the mirid Predator *Macrolophus pygmaeus* on Sweet Peppers: Effect of Prey and Predator Density. *Insects*, **6**, 514–523.
- De Backer L., Caparros Megido R., et al., 2015. *Tuta absoluta*-induced plant volatiles: attractiveness towards the generalist predator *Macrolophus pygmaeus*. *Arthropod-Plant Interactions*, **9**, 465–476.
- Barron Colin Ashton J.J. & Geary L., 2011. The Effects of Temperature on pH Measurement. *Reagecon Delivering the Correct Result Shannon Co. Clara Ireland*, 1–7.
- Bawin T. et al., 2016. Ability of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) to develop on alternative host plant species. *Can. Entomol.*, **148**, 434–442.
- Bawin T. et al., 2015. Could alternative solanaceous hosts act as refuges for the tomato leafminer, *Tuta absoluta*? *Arthropod-Plant Interactions*, **9**(4), 425–435.
- Becker A., Steele J.E. & Wegener G., 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*, **52**, 433–439.
- Biobest, 2017. Fiche technique *Macrolophus*-System. *Biobest Sustainable Crop Management*, 79–80. Available at: [http://sideeffect.biobest.be/images/uploads/public/7604093217\\_Macrolophus-System.pdf](http://sideeffect.biobest.be/images/uploads/public/7604093217_Macrolophus-System.pdf) [Accessed April 10, 2017].
- Biondi A. et al., 2013. Indigenous Natural Enemies Attacking *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae) in Southern France. *Egyptian Journal of Biological Pest Control.*, **23**(1), 117–121.
- Blackman R.L., 1974. Life-cycle variation of *Myzus persicae* (Sulz.) (Horn., Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype and environment. *Bull. ent. Res.*, **63**, 595–607.
- Blackman R.L. & Eastop V.F., 1994. *Aphids on The World's Trees. An Identification and Information Guide* CAB Intern.,
- Blackman R.L. & Eastop V.F., 2007. Taxonomic Issues. In: *Aphids as Crop Pests*. Oxfordshire, 1–29.
- Blancard D. et al., 2009. *Les maladies de la tomate: Identifier, connaître, maîtriser* Quae., Paris, France.
- Blancard D., 2017. *Tuta absoluta*. Bioagresseur émergent en France. *Ephytia Identifier / connaître / maîtriser*. Available at: <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5150/Tomate-Tuta-absoluta> [Accessed March 21, 2017].
- Blenau W. & Baumann A., 2001. Molecular and Pharmacological Properties of Insect Biogenic Amine Receptors: Lessons From *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry*

- and *Physiology*, **48**, 13–38.
- Bloem S. & Spaltenstein E., 2011. New Pest Response Guidelines. Tomato Leafminer (*Tuta absoluta*). USDA.
- Bonny S., 2011. L'agriculture écologiquement intensive : nature et défis. *Cah. Agric.*, **20**, 451–462.
- Braham M. & Hajji L., 2012. Management of *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae) with Insecticides on Tomatoes. In: F. Perveen, ed. *Insecticides - Pest Engineering*. InTech, 333–354.
- Braut V. et al., 2010. Aphids as transport devices for plant viruses. *C. R. Biologies*, **333**, 524–538.
- Burges H.D., 1998. Formulation of mycoinsecticides. In: *Formulation of Microbial Biopesticides, Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 131–185.
- Campbell N. & Reece J., 2007. *Biologie, 7e édition*, ERPI.
- Candy B.Y.D.J. & Kilby B.A., 1961. The Biosynthesis of Trehalose in the Locust Fat Body. *Biochem. J.*, **78**, 531–536.
- Candy D.J., Becker A. & Wegener G., 1997. Coordination and Integration of Metabolism in Insect Flight. *Comp. Biochem. Physiol.*, **117B**(4), 497–512.
- Caparros Megido R., Haubruge E. & Verheggen F.J., 2012. First evidence of deuterotokous parthenogenesis in the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J Pest Sci*, **85**, 409–412.
- Castañé Cristina C. et al., 2011. Plant damage to vegetable crops by zoophytophagous mirid predators. *Biological Control*, **59**, 22–29.
- Chamont S., 2016. Les punaises prédatrices. *Ephytia Identifier / connaître / maîtriser*. Available at: <http://ephytia.inra.fr/fr/C/11528/hypp-Punaises-predatrices-Hemiptera> [Accessed April 9, 2017].
- Cherqui A. & Tjallingii W.F., 2000. Salivary proteins of aphids, a pilot study on identification, separation and immunolocalisation. *Journal of Insect Physiology*, **46**, 1177–1186.
- Cuthbertson A.G.S. et al., 2013. Population development of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) under simulated UK glasshouse conditions. *Insects*, **4**, 185–197.
- Damalas C.A. & Eleftherohorinos I.G., 2011. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **8**, 1402–1419.
- Dedryver C., Le Ralec A. & Fabre F., 2010. The conflicting relationships between aphids and men : A review of aphid damage and control strategies. *C. R. Biologies*, **333**, 539–553.
- Deravel J., Krier F. & Jacques P., 2014. Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **18**(2), 220–232.
- Desneux N. et al., 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J Pest Sci*, **83**, 197–215.
- Desneux N. et al., 2011. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: The new threat to tomato world production. *Journal of Pest Science*, **84**, 403–408.
- Dillon C. & Goda Y., 2005. The Actin Cytoskeleton: Integrating Form and Function at the Synapse. *Annu. Rev. Neurosci.*, **28**, 25–55.
- Dreyer D.L. & Jones K.C., 1981. Feeding deterrence of flavonoids and related phenolics toward *Schizaphis graminum* and *Myzus persicae*: aphid feeding deterrents in wheat. *Phytochemistry*, **20**(11), 2489–2493.
- Eckley D.M. & Schroer T.A., 2003. Interactions between the Evolutionarily Conserved, Actin-related Protein, Arp11, Actin, and Arp1. *Molecular Biology of the Cell*, **14**, 2645–2654.
- Ehler L.E., 2006. Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest Manag Sci*, **62**, 787–789.
- Elbein A.D. et al., 2003. New insights on trehalose : a multifunctional molecule. *Glycobiology*, **13**(4), 17–27.
- Ephytia, 2013. *Myzus persicae*. Caractéristiques du ravageur et de ses dégâts. *Ephytia Identifier / connaître / maîtriser*.
- EPPO, 2005. Data sheets on quarantine pests *Tuta absoluta*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **35**, 434–435.
- Estay P., 2000. Polilla del Tomate. *Tuta absoluta* (Meyrick). *INIA La Platina*.
- Eubanks M.D. & Denno R.F., 1999. The ecological consequences of variation in plants and prey for an omnivorous insect. *Ecology*, **80**(4), 1253–1266.

- Fantinou A.A. et al., 2009. Preference and consumption of *Macrolophus pygmaeus* preying on mixed instar assemblages of *Myzus persicae*. *Biological Control*, **51**, 76–80.
- Fantinou A.A. et al., 2008. Prey killing without consumption: Does *Macrolophus pygmaeus* show adaptive foraging behaviour? *Biological Control*, **47**, 187–193.
- FAO, 2017. Crops. *FAOSTAT*. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Accessed February 21, 2017].
- FAO, 2016. Pesticides Use. *FAOSTAT*. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP> [Accessed February 21, 2017].
- Fauvel G., Malausa J.C. & Kaspar B., 1987. Etude en laboratoire des principales caractéristiques biologiques de *Macrolophus caliginosus* [Heteroptera: Miridae]. *Entomophaga*, **32**(5), 529–543.
- Fereres A. & Moreno A., 2009. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research*, **141**, 158–168.
- Fernandez S. & Montagne A., 1990. [Biology of the tomato borer, *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)]. *Boletín de Entomología Venezolana*, **5**, 89–99.
- Ferreira C., Parra J.R.P. & Terra W.R., 1997. The effect of dietary plant glycosides in larval midgut  $\beta$ -glycosidases from *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **27**, 55–59.
- Foster S.P., Denholm I. & Thompson R., 2003. Variation in response to neonicotinoid insecticides in peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Manag Sci*, **59**, 166–173.
- Francis F. et al., 2006. Proteomics in *Myzus persicae*: Effect of aphid host plant switch. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **36**, 219–227.
- Franco K., Jauset A. & Castañé C., 2011. Monogamy and polygamy in two species of mirid bugs: A functional-based approach. *Journal of Insect Physiology*, **57**, 307–315.
- Fraival A., 2006a. Les pucerons - 1ère partie. *Insectes*, **141**(2), 3–8.
- Fraival A., 2006b. Les pucerons - 2e partie. *Insectes*, **142**(3), 27–32.
- Fukatsu T. & Ishikawa H., 1992. Synthesis and localization of symbionin, aphid endosymbiont protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **22**(2), 167–174.
- Gemeno C. et al., 2007. Mating periodicity and post-mating refractory period in the zoophytophagous plant bug *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). *Eur. J. Entomol.*, **104**, 715–720.
- Ghoneim K., 2014. Predatory insects and arachnids as potential biological control agents against the invasive tomato leafminer, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), in perspective and prospective. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, **2**(2), 52–71.
- Giordanengo P. et al., 2010. Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses. *C. R. Biologies*, **333**, 516–523.
- Godin C. & Boivin G., 2002. *Guide d'identification des pucerons dans les cultures maraîchères au Québec AAC-CRDH /.*
- Gontijo P.C. et al., 2013. Spatial and temporal variation in the control failure likelihood of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. *Annals of Applied Biology*, **162**, 50–59.
- Guedes R.N.C. & Picanço M.C., 2012. The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: Pest status, management and insecticide resistance. *EPPO Bulletin*, **42**(2), 211–216.
- Halarewicz A. & Gabrys B., 2012. Probing behavior of bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) on native bird cherry *Prunus padus* L. and alien invasive black cherry *Prunus serotina* Erhr. in Europe and the role of cyanogenic glycosides. *Arthropod-Plant Interactions*, **6**, 497–505.
- Hardy N.B., Peterson D.A. & von Dohlen C.D., 2015. The evolution of life cycle complexity in aphids: Ecological optimization or historical constraint? *Evolution*, **69**(6), 1423–1432.
- Harmel N. et al., 2008. Physiologie des interactions entre pomme de terre et pucerons : vers une nouvelle stratégie de lutte basée sur les systèmes de défense de la plante. *Cahiers Agricultures*, **17**(4), 395–400.
- Harmel N., Haubruge É. & Francis F., 2010. Étude des salives de pucerons : un préalable au développement de nouveaux bio-insecticides. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **14**(2), 369–378.
- Harrison J.F., Woods H.A. & Roberts S.P., 2012. *Ecological and Environmental Physiology of Insects*, New

- York: Oxford University Press Inc.
- Hazen J.L., 2000. Adjuvants — Terminology, Classification, and Chemistry. *Weed Technology*, **14**, 773–784.
- Hillyer J.F., Esévez-Lao T.Y. & Mirzai H.E., 2015. The neurotransmitters serotonin and glutamate accelerate the heart rate of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*.
- Hogenhout S.A. et al., 2008. Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annu Rev Phytopathol*, **46**, 327–359.
- Hogervorst P.A.M., Wäckers F.L. & Romeis J., 2007. Effects of honeydew sugar composition on the longevity of *Aphidius ervi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **122**, 223–232.
- Holleran E., Karki S. & Holzbaur E., 1998. The role of the dynactin complex in intracellular motility. *Int Rev Cytol*, **182**, 69–109.
- Hullé M. et al., 2014. Dégâts des pucerons sur les solanacées. *Encyclop'ahid, INRA*.
- Hullé M. et al., 1998. *Les pucerons des arbres fruitiers. Cycles biologiques et activités de vol* INRA édit.,
- Hullé M. et al., 1999. *Les pucerons des plantes maraîchères. Cycles biologiques et activités de vol*. INRA édit.,
- Hunter M.D., Hull L.A. & Schultz J.C., 1994. Evaluation of Resistance to Tufted Apple Bud Moth (Lepidoptera: Tortricidae) Within and Among Apple Cultivars. *Entomological Society of America*, 282–291.
- Ingegno B.L., Pansa M.G. & Tavella L., 2011. Plant preference in the zoophytophagous generalist predator *Macrolophus pygmaeus* (Heteroptera: Miridae). *Biological Control*, **58**, 174–181.
- INRA, 2009a. LC-MS/MS pour “Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.” *Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest*. Available at: <http://pappso.inra.fr/LCMSMS/application.html> [Accessed July 17, 2017].
- INRA, 2009b. MALDI-TOF pour “matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight.” *Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest*. Available at: <http://pappso.inra.fr/MALDITOF/application.html> [Accessed July 17, 2017].
- Janssen D. et al., 2010. Cys-Loop Ligand-Gated Chloride Channels in Dorsal Unpaired Median Neurons of *Locusta migratoria*. *J Neurophysiol*, **103**, 2587–2598.
- Jin L.-Q. & Zheng Y.-G., 2009. Inhibitory effects of validamycin compounds on the termites trehalase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **95**, 28–32.
- Junde Q. & Lidao K., 1984. The influence of secondary plant substances on the growth and development of *Myzus persicae* of Beijing. *Entomol. exp. appl.*, **35**, 17–20.
- Kim K., Kabir E. & Ara S., 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, **575**, 525–535.
- Kindlmann P. & Dixon A.F.G., 2010. Modelling Population Dynamics of Aphids and Their Natural Enemies. In: E. KINDLMANN P., DIXON A.F.G. & MICHAUD J.P., ed. *Aphid Biodiversity under Environmental Change*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 1–20.
- King A.M. & MacRae T.H., 2015. Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause. *Annu.*, **60**, 59–75.
- Klowden M.J., 2013. *Physiological Systems in Insects* Third Ed., Academic Press, Elsevier.
- Kolesár E. et al., 2015. Natural plant toxicant – cyanogenic glycoside amygdalin: characteristic, metabolism and the effect on animal reproduction. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **4**(Special issue 02), 49–50.
- Kono Y. et al., 1993. Lethal Activity of a Trehalase Inhibitor, Validoxylamine A, and its Influence on the Blood Sugar Level in *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.*, **28**(3), 379–386.
- Koppert, 2014a. *Macrolophus pygmaeus*. *Ephytia Identifier / connaître / maîtriser*. Available at: <http://ephytia.inra.fr/fr/C/19952/Biocontrol-Cycle-conditions-de-developpement> [Accessed March 21, 2017].
- Koppert, 2014b. *Tuta absoluta*: Biologie. *Ephytia Identifier / connaître / maîtriser*. Available at: <http://ephytia.inra.fr/fr/C/20062/Biocontrol-Biologie> [Accessed March 26, 2017].
- Krechmer F.D.S. & Foerster L.A., 2015. *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): Thermal requirements and effect of temperature on development, survival, reproduction and longevity. *Eur. J. Entomol.*, **112**(4), 658–663.
- Kruger N.J. & von Schawen A., 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation.



*Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 236–246.

- Kunieda T. et al., 2006. Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Molecular Biology*, **15**(5), 563–576.
- Lambinon J., Delvosalle L. & Duvigneaud J., 2004. *Nouvelle flore de la Belgique, du G.-D. de Luxembourg, du nord de la France et des régions voisines. Edition du Jardin botanique national de Belgique, Meise*.
- Law R.J. & Lightstone F.C., 2008. GABA receptor insecticide non-competitive antagonists may bind at allosteric modular sites. *Intern. J. Neuroscience*, **118**, 705–734.
- Lee M.S., Albajes R. & Eizaguirre M., 2014. Mating behaviour of female *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): polyandry increases reproductive output. *J Pest Sci*, **87**, 429–439.
- Leite G.L. et al., 2004. Intensity of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera : Gelechiidae) and *Liriomyza* spp. (Diptera : Agromyzidae) attacks on *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves. *Ciencia e Agrotecnologia*, **28**, 42–48.
- Leroy P., Capella Q. & Haubruge E., 2009. L'impact du miellat de puceron au niveau des relations tritrophiques entre les plantes-hôtes, les insectes ravageurs et leurs ennemis naturels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13**(2), 325–334.
- Li W. et al., 2016. Novel spectrophotometric approach for determination of validamycin A in fermentation of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **xx**(xx), 1–4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.05.007>.
- Li Y. et al., 2017. Transcription of four *Rhopalosiphum padi* (L.) heat shock protein genes and their responses to heat stress and insecticide ... *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 48–57.
- De Luca M. et al., 2003. Dopa decarboxylase (Ddc) affects variation in *Drosophila* longevity. *Nature Genetics*, **34**(4), 429–433.
- Lunan K.D. & Mitchell H.K., 1969. The Metabolism of Tyrosine-O-Phosphate in *Drosophila* AND tablished that the amino acid derivative accumulates as a normal metabolite in late larval stages of *Drosophila* the substance disappears rapidly. These and collaborators in another Dipteran, di. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **132**, 450–456.
- Lykouressis D. et al., 2008. Assessing the suitability of noncultivated plants and associated insect prey as food sources for the omnivorous predator *Macrolophus pygmaeus* (Hemiptera: Miridae). *Biological Control*, **44**, 142–148.
- Lykouressis D.P., Perdikis D.C. & Gaspari M.D., 2007. Prey preference and biomass consumption of *Macrolophus pygmaeus* (Hemiptera: Miridae) fed *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). *Eur. J. Entomol.*, **104**, 199–204.
- Machesky L.M. & May R.C., 2001. Arps: Actin-Related Proteins. *Results and Problems in Cell Differentiation*, **32**, 213–229.
- Mahdi K., Doumandji-Mitiche B. & Doumandji S., 2011. Effect of temperature on the development cycle of the tomato leafminer *Tuta absoluta* in Algiers. In: *Proc. AFPP – 9. Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture, Montpellier, 26.–27. Octobre 2011*. Montpellier, 308–316.
- Martin B. et al., 1997. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *Journal of General Virology*, **78**, 2701–2705.
- Mazumdar-Leighton S. & Brodway R.M., 2001. Transcriptional induction of diverse midgut trypsin in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **31**, 645–657.
- McDougall G.E. & Steele J.E., 1988. Free fatty acid as a source of energy for trehalose synthesis in the fat body of the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Insect Biochem.*, **18**(6), 591–597.
- McKinlay R.G., Spaul A.M. & Straub R. W., 1992. Pests of Solanaceous Crops. In: R. G. McKinlay, ed. *Vegetable Crop Pests*. London: Palgrave Macmillan UK, 263–326.
- Meng J. et al., 2014. Differential protein expression in the susceptible and resistant *Myzus persicae* (Sulzer) to imidacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **115**, 1–8.
- Moayeri H.R.S. et al., 2006. Odour-mediated preference and prey preference of *Macrolophus caliginosus* between spider mites and green peach aphids. *Journal of Applied Entomology*, **130**(9–10), 504–508.

## VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mohd R.Z. et al., 2009. Biology of *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) predator of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *International Journal of Biology*, **1**(2), 63–70.
- Mollá O. et al., 2013. A comparative life history study of two mirid bugs preying on *Tuta absoluta* and *Ephestia kuehniella* eggs on tomato crops: Implications for biological control. *BioControl*, **59**(2), 175–183.
- Mollá O. et al., 2009. Predation by the mirids *Nesidiocoris tenuis* and *Macrolophus pygmaeus* on the tomato borer *Tuta absoluta*. *IOBC/WPRS Bulletin*, **49**, 209–214.
- Montgomery M.E. & Heinrich A., 1974. Feeding response of *Aphis pomi*, *Myzus persicae*, *Amphorophora agathonica* to phloridzin. *J. Insect Physiol.*, **20**, 413–421.
- Moran N.A., 1992. The evolution of aphid life cycles. *Annu. Rev. Entomol.*, **37**, 321–348.
- Moriwaki N. et al., 2003. High concentrations of trehalose in aphid hemolymph. *Appl. Entomol. Zool.*, **38**(2), 241–248.
- Moulton J.K. & Wiegmann B.M., 2004. Evolution and phylogenetic utility of CAD (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta). *Molecular Phylogenetics and Evolutions*, **31**, 363–378.
- Mounier N. et al., 1992. Insect Muscle Actins Differ Distinctly from Invertebrate and Vertebrate Cytoplasmic Actins. *J Mol Evol*, **34**, 406–415.
- Murillo L. et al., 2011. NeuroToxicology Inhibition of protein kinase C decreases sensitivity of GABA receptor subtype to fipronil insecticide in insect neurosecretory cells. *NeuroToxicology*, **32**, 828–835.
- Nannini M. et al., 2012. Use of predatory mirids for control of the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) in Sardinian greenhouse tomatoes. *EPPO Bulletin*, **42**(2), 255–259.
- Narahashi T. et al., 2010. Glutamate-activated chloride channels: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **97**(2), 149–152.
- NCBI, 2017. ABAT 4-aminobutyrate aminotransferase [*Homo sapiens* (human)]. *NCBI, U.S National Library of Medicine*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/18> [Accessed August 5, 2017].
- Nieto Nafría J.M., 2013. Fauna Europaea: Hemiptera, Aphidoidea. *Fauna Europaea version 2.6.2*. Available at: [http://www.faunaeur.org/full\\_results.php?id=12358](http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=12358) [Accessed February 27, 2017].
- Oliver K.M. et al., 2010. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual review of entomology*, **55**, 247–266.
- Park K.C. & Hardie J., 2004. Electrophysiological characterisation of olfactory sensilla in the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Journal of Insect Physiology*, **50**, 647–655.
- Park K.C. & Hardie J., 2002. Functional specialisation and polyphenism in aphid olfactory sensilla. *Journal of Insect Physiology*, **48**, 527–535.
- Park N.-J., Lim H.K. & Hwang I.T., 2008. An enhanced system to screen trehalase inhibitors using a microplate assay with a housefly enzyme source. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **11**, 161–166.
- Parlement européen et Conseil de l'UE, 2009a. Directive 128/2009/CE. *Journal officiel de l'Union européenne*, **L 309**(24.11.2009), 71–86.
- Parlement européen et Conseil de l'UE, 2009b. Règlement (CE) n° 1107/2009. *Journal officiel de l'Union européenne*, **L 309**(24.11.2009), 1–50.
- Paul D. et al., 2013. *Mass Spectrometry-Based Proteomics in Molecular Diagnostics : Discovery of Cancer Biomarkers Using Tissue Culture*,
- Pentzold S. et al., 2015. Metabolism, excretion and avoidance of cyanogenic glucosides in insects with different feeding specialisations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **66**, 119–128.
- Perdikis D., Kapaxidi E. & Papadoulis G., 2008. Biological Control of Insect and Mite Pests in Greenhouse Solanaceous Crops. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, **2**(Special Issue 1), 125–144.
- Perdikis D. & Lykouressis D., 2000. Effects of Various Items, Host Plants, and Temperatures on the Development and Survival of *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae). *Biological Control*, **17**, 55–60.
- Perdikis D.C. et al., 2003. Discrimination of the closely related biocontrol agents *Macrolophus melanotoma* (Hemiptera: Miridae) and *M. pygmaeus* using mitochondrial DNA analysis. *Bulletin of Entomological Research*, **93**, 507–514.

## VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Perdikis D.C. & Lykouressis D.P., 2004. *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) as Suitable Prey for *Macrolophus pygmaeus* (Hemiptera: Miridae) Population Increase on Pepper Plants. *Environmental Entomology*, **33**(3), 499–505.
- Perdikis D.C.H. & Lykouressis D.P., 2004. *Macrolophus pygmaeus* (Hemiptera: Miridae) Population Parameters and Biological Characteristics When Feeding on Eggplant and Tomato Without Prey. *Journal of Economic Entomology*, **97**(4), 1291–1298.
- Pereyra P.C. & Sanchez N.E., 2006. Effect of Two Solanaceous Plants on Developmental and Population Parameters of the Tomato Leaf Miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop Entomol*, **35**, 671–676.
- Pettersson J., Tjallingii W.F. & Hardie J., 2007. Host-plant Selection and Feeding. In: *Aphids as Crop Pests*. Oxfordshire, UK, 87–114.
- Podsiadlowski L., 2016. Phelogeny of the Aphids. In: *Biology and Ecology of Aphids*. 1–13.
- Polat B., Özpınar A. & Kürşat Şahin A., 2016. Studies of selected biological parameters of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick), (Lepidoptera: Gelechiidae) under natural conditions. *Phytoparasitica*, **44**, 195–202.
- Pollard D.G., 1973. Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera, Aphidoidea): a review. *Bull. ent. Res.*, **62**, 631–714.
- Portakaldali M., Öztemiz S. & Kütük H., 2013. A new host plant for *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Turkey. *J. Entomol. Res. Soc.*, **15**(3), 21–24.
- Portillo N., Alomar O. & Wäckers F., 2012. Nectarivory by the plant-tissue feeding predator *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Heteroptera: Miridae): Nutritional redundancy or nutritional benefit? *Journal of Insect Physiology*, **58**, 397–401.
- Potting R., 2009. Pest risk analysis, *Tuta absoluta*, tomato leaf miner moth. *Plant protection service of the Netherlands*, 24.
- Proffit M. et al., 2011. Attraction and Oviposition of *Tuta absoluta* Females in Response to Tomato Leaf Volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, **37**, 565–574.
- Rafaeli-bernstein A. & Mordue W., 1979. The effects of phloridzin, phloretin and ouabain on the reabsorption of glucose by the malpighian tubules of *Locusta migratoria migratorioides*. *J. Insect Physiol.*, **25**, 241–247.
- Rahbé Y. & Febvay G., 1993. Protein toxicity to aphids: an in vitro test on *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol. exp. appl.*, **67**, 149–160.
- Rakauskas R., 2008. Species of *Aphis* inhabiting European *Oenothera*: their biology, morphology and systematics (Hemiptera: Aphididae). *Central European Journal of Biology*, **3**(3), 307–319.
- Ranga Rao G. et al., 2016. Awareness on Pesticide Residues in Food Crops: A Challenge. In: A. K. Chakravarthy & S. Sridhara, eds. *Economic and Ecological Significance of Arthropods in Diversified Ecosystems: Sustaining Regulatory Mechanisms*. Springer Singapore, 411–422.
- Raymond-Delpech V. et al., 2005. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert Neurosci*, **5**, 119–133.
- Raymond V., Sattelle D.B. & Lapied B., 2000. Co-existence in DUM neurones of two GluCl channels that differ in their picrotoxin sensitivity. *Neuroreport*, **11**(12), 2695–2701.
- Reece J. et al., 2012. *Campbell Biologie, 4e édition*, ERPI.
- Sanchez J.A., La Spina M. & Perera O.P., 2012. Analysis of the population structure of *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae) in the Palaearctic region using microsatellite markers. *Ecology and Evolution*, **2**(12), 3145–3159.
- Sandström J. & Moran N., 1999. How nutritionally imbalanced is phloem sap for aphids? In: S. J. Simpson, A. J. Mordue, & J. Hardie, eds. *Proceedings of the 10th International Symposium on Insect-Plant Relationships*. Dordrecht: Springer Netherlands, 203–210.
- Sarwar M., 2015a. Commonly Available Commercial Insecticide Formulations and Their Applications in the Field. *International Journal of Materials Chemistry and Physics*, **1**(2), 116–123.
- Sarwar M. et al., 2011. Comparative field evaluation of some newer versus conventional insecticides for the

- control of aphids (Homoptera: Aphididae) on oilseed rape (*Brassica napus* L.). *The Nucleus*, **48**(2), 163–167.
- Sarwar M., 2015b. The Dangers of Pesticides Associated with Public Health and Preventing of the Risks. *International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering*, **1**(2), 130–136.
- Schoonhoven L.M. & Derksen-Koppers I., 1976. Effects of some allelochemicals on food uptake and survival of polyphagous aphid, *Myzus persicae*. *Ent. exp. & appl.*, **19**, 52–56.
- Serail, 2016. Fiche technique *Macrolophus pygmaeus*. *Ecophyto*. Available at: [http://cultures-legumieres.ecophytopic.fr/sites/default/files/actualites\\_doccultures\\_legumieres/Fiche\\_Macrolophus\\_pygmaeus\\_cle4d4e21.pdf](http://cultures-legumieres.ecophytopic.fr/sites/default/files/actualites_doccultures_legumieres/Fiche_Macrolophus_pygmaeus_cle4d4e21.pdf) [Accessed April 9, 2017].
- Shukla E. et al., 2015. Insect trehalase : Physiological signification and potential applications. *Glycobiology*, **25**(4), 357–367.
- Siegwart M., 2017. Mode d' action des insecticides. In: *Journées d'Echanges sur les Résistances aux produits de protection des plantes*. Bordeaux.
- Silva M.C.P., Terra W.R. & Ferreira C., 2006. Absorption of toxic  $\beta$ -glucosides produced by plants and their effect on tissue trehalases from insects. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **Part B** **143**, 367–373.
- Silva M.C.P., Terra W.R. & Ferreira C., 2004. The role of carboxyl, guanidine and imidazole groups in catalysis by a midgut trehalase purified from an insect larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**, 1089–1099.
- Silva W.M. et al., 2015. Status of pyrethroid resistance and mechanisms in Brazilian populations of *Tuta absoluta*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **122**, 8–14.
- Silvério F.O. et al., 2009. Synthesis and insecticidal activity of new pyrethroids. *PestManag Sci*, **65**, 900–905.
- Simon J., Stoeckel S. & Tagu D., 2010. Evolutionary and functional insights into reproductive strategies of aphids. *C. R. Biologies*, **333**, 488–496.
- Siqueira H.A.A., Guedes R.N.C. & Picanço M.C., 2000. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agricultural and Forest Entomology*, **2**, 147–153.
- Sørensen J.G., Kristensen T.N. & Loeschke V., 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, **6**, 1025–1037.
- Speranza S. & Sannino L., 2012. The current status of *Tuta absoluta* in Italy. *EPPO Bulletin*, **42**(2), 328–332.
- Stanley K. & Fenton B., 2000. A member of the Hsp60 gene family from the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer.). *Insect Molecular Biology (2000)*, **9**(2), 211–215.
- Stauber E.J. et al., 2012. Turning the “Mustard Oil Bomb” into a “Cyanide Bomb”: Aromatic Glucosinolate Metabolism in a Specialist Insect Herbivore. *PLoS ONE*, **7**(4).
- van der Straten M.J., Potting R.P.J. & van der Linden A., 2011. Introduction of the tomato leafminer *Tuta absoluta* into Europe. *Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet.*, **22**, 23–30.
- Su Q., Zhou X. & Zhang Y., 2013. Symbiont-mediated functions in insect hosts. *Communicative & Integrative Biology*, **6**(3), 1–7.
- Sullivan D.J., 2008. Aphids (Hemiptera: Aphididae). *Encyclopedia of Entomology*, 191–215.
- Sun Y. et al., 2016. Identification of heat shock cognate protein 70 gene (Hsc70) of *Apolgyus lucorum* and its expression in response to different temperature and pesticide stresses. *Insect Sci*, **23**, 39–49.
- Tang B. et al., 2016. Suppressing the activity of trehalase with validamycin disrupts the trehalose and chitin biosynthesis pathways in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.
- Tatun N., Tungjitwitayakul J. & Sakurai S., 2015. Developmental and Lethal Effects of Trehalase Inhibitor (Validamycin) on the *Tribolium castaneum* (Coleoptera : Tenebrionidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 1–8.
- Terra W.R. & Ferreira C., 1994. Insect digestive enzymes : properties , compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, **109B**(1), 1–62.
- Terradot L. & Giblot Ducray D., 2008. La transmission de virus de Solanacées par les pucerons. In: *Virus des Solanacées. Du génome viral à la protection des cultures*. Paris, France, 225–238.
- Thakur N. et al., 2014. Enhanced Whitefly Resistance in Transgenic Tobacco Plants Expressing Double

- Stranded RNA of v-ATPase A Gene. *PLoS ONE*, **9**(3), 1–9.
- Thompson S.N., 1999. Blood sugar formation from dietary carbohydrate is facilitated by the pentose phosphate pathway in an insect *Manduca sexta* Linnaeus. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1472**, 565–575.
- Thompson S.N., 2003. *Trehalose - The Insect "Blood" Sugar*,
- Tjallingii W.F., 1995. Regulation of Phloem Sap Feeding by Aphids. In: R. F. Chapman & G. de Boer, eds. *Regulatory Mechanisms in Insect Feeding*. Boston, MA: Springer US, 190–209.
- Tjallingii W.F., 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *Journal of Experimental Botany*, **57**(4), 739–745.
- Tjallingii W.F. & Hogen Esch T., 1993. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology*, **18**, 317–328.
- Torres J.B. et al., 2001. Within-plant distribution of the leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology. *International Journal of Pest Management*, **47**(3), 173–178.
- Tropea Garzia G. et al., 2012. *Tuta absoluta*, a South American pest of tomato now in the EPPO region: biology, distribution and damage. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **42**(2), 205–210.
- Turpeau-Ait Ighil E. et al., 2011. *Les pucerons des grandes cultures. Cycles biologiques et activités de vol*. QUAE. ACTA.,
- Turpeau E., Hullé M. & Chaubet B., 2016. Qu'est-ce qu'un puceron ? Stades de développement. *Encyclop'ahid*, INRA. Available at: <https://www6.inra.fr/encyclopedie-pucerons/Qu-est-ce-qu-un-puceron/Morphologie/Stades-de-developpement> [Accessed March 3, 2017].
- Uchôa-Fernandes M., Della Lucia T. & Vilela E., 1995. Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, **24**, 159–164.
- UniProt, 2017a. Actin-57B, *Drosophila melanogaster* (Fruit fly). *UniProt Knowledgebase*. Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/P53501> [Accessed August 3, 2017].
- UniProt, 2017b. Calpain-A isoform X1. *UniProt Knowledgebase*. Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A1S3D0P2> [Accessed August 3, 2017].
- UniProt, 2017c. Elongation factor 1-alpha 1. *UniProt Knowledgebase*. Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/P08736> [Accessed August 3, 2017].
- UniProt, 2017d. Probable citrate synthase, mitochondrial. *UniProt Knowledgebase*.
- Urbaneja A. et al., 2013. Biology, Ecology and Management of the South American Tomato Pinworm, *Tuta absoluta*. In: J. E. Peña, ed. *Potential Invasive Pests of Agricultural Crops*. 98–125.
- Urbaneja A. et al., 2007. La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma España*, **194**, 16–23.
- Urbaneja A. et al., 2008. La polilla del tomate, *Tuta absoluta*, una nueva presa para los miridos *Nesidiocoris tenuis* y *Macrolophus pygmaeus*. *Agricola Vergel*, **320**, 361–367.
- Urbaneja A. et al., 2012. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest Manag Sci*, **68**, 1215–1222.
- Vercher R., Calabuig A. & Felipe C., 2010. Ecología, muestreos y umbrales de *Tuta absoluta* (Meyrick). *Phytoma España*, **217**, 23–26.
- Vivarium S., 1984. Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. , **59**, 257–290.
- Wäckers F.L., 2000. Do oligosaccharides reduce the suitability of honeydew for predators and parasitoids ? A further facet to the function of insect-synthesized honeydew sugars. *Oikos*, **90**(1), 197–201.
- Wells L., Edwards K.A. & Bernstein S.I., 1996. Myosin heavy chain isoforms regulate muscle function but not myofibril assembly. *The EMBO Journal*, **15**(17), 4454–4459.
- Wheeler A.G.J., 2001. *Biology of the Plant Bugs (Hemiptera: Miridae): Pests, Predators, Opportunists*. Cornell University Press, ed., Comstock Publishing Associates.
- Wieczorek H. et al., 2000. Structure and regulation of insect plasma membrane H<sup>+</sup> V-ATPase. *The Journal of Experimental Biology* **203**, 127–135.
- Wieczorek H. et al., 2009. Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. *The Journal of Experimental Biology*,

212, 1611–1619.

- Will T., Furch A.C.U. & Zimmermann M.R., 2013. How phloem-feeding insects face the challenge of phloem-located defenses. *Frontiers in plant science*, **4**(Article 336), 1–12.
- Williams I.S. & Dixon A.F.G., 2007. Life Cycles and Polymorphism. *In: Aphids as Crop Pests*. Oxfordshire, UK, 69–85.
- Wyatt G.R., 1967. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. *Adv. Insect Physiol.*, **4**, 287–360.
- Yardim E.N. & Edwards C.A., 1998. The influence of chemical management of pests, diseases and weeds on pest and predatory arthropods associated with tomatoes. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **70**, 31–48.
- Yu S.J., 1989.  $\beta$ -glucosidase in four phytophagous Lepidoptera. *Insect Biochem.*, **19**(1), 103–108.
- Zappalà L. et al., 2013. Natural enemies of the South American moth, *Tuta absoluta*, in Europe, North Africa and Middle East, and their potential use in pest control strategies. *Journal of Pest Science*, **86**(4), 635–647.

## VII. ANNEXES

Annexe 1. P-valeurs obtenues grâce aux ANOVA réalisées sur l'ensemble des taux de mortalité relevés chez *A. pisum* après 24 et 48 heures sur diète artificielle.

	Alendronate 1 µg/ml		Alendronate 10 µg/ml	
	24h	48h	24h	48h
<b>p-valeur vis-à-vis du témoin</b>	0,111	0,235	0,676	0,278

Annexe 2. P-valeurs obtenues grâce aux ANOVA réalisées sur l'ensemble des taux de mortalité relevés chez *M. persicae* après 24 et 48 heures sur diète artificielle (concentration de 10 µg d'inhibiteur/ml)

	Phloridzine 10 µg/ml		Amygdaline 10 µg/ml		Validamycine A 10µg/ml	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<b>p-valeur vis-à-vis du témoin</b>	0,123	0,111	0,358	0,810	0,652	0,437

Annexe 3. P-valeurs obtenues grâce aux ANOVA réalisées sur l'ensemble des taux de mortalité relevés chez *M. persicae* après 24 et 48 heures sur diète artificielle (concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml). \* = différence significative vis-à-vis du contrôle.

	Phloridzine 25 µg/ml		Amygdaline 25 µg/ml		Validamycine A 25µg/ml	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<b>p-valeur vis-à-vis du témoin</b>	0,115	0,013 *	0,212	0,037 *	0,283	0,012 *

Annexe 4. P-valeurs obtenues grâce aux tests exacts de Fisher réalisés sur le nombre de larves de *T. absoluta* vivantes et mortes après 24, 48 et 72 heures sur diète artificielle (concentration de 25 ou 50 µg de phloridzine/ml). x = p-valeur incalculable.

	Phloridzine 25 µg/ml			Phloridzine 50 µg/ml		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<b>p-valeur vis-à-vis du témoin</b>	x	x	x	1	1	0,474

Annexe 5. P-valeurs obtenues grâce aux tests exacts de Fisher réalisés sur le nombre de larves de *T. absoluta* vivantes et mortes après 24, 48 et 72 heures sur diète artificielle (concentration de 100 µg de phloridzine/ml).

	Phloridzine 100 µg/ml		
	24h	48h	72h
<b>p-valeur vis-à-vis du témoin</b>	1	1	1

Annexe 6. P-valeurs obtenues grâce aux tests exacts de Fisher réalisés sur le nombre de larves de *T. absoluta* vivantes et mortes après 24, 48 et 72 heures sur diète artificielle (concentration de 100 µg d'amygdaline/ml). x = p-valeur incalculable

	Amygdaline 100 µg/ml		
	24h	48h	72h
p-valeur vis-à-vis du témoin	x	1	1

Annexe 7. P-valeurs obtenues grâce aux tests exacts de Fisher réalisés sur le nombre de larves de *T. absoluta* vivantes et mortes après 24, 48 et 72 heures sur diète artificielle (concentration de 100 µg de validamycine A/ml).

	Validamycine A 100 µg/ml		
	24h	48h	72h
p-valeur vis-à-vis du témoin	1	1	1

Annexe 8. P-valeurs obtenues grâce aux tests exacts de Fisher réalisés sur le nombre de prédateurs vivants et mortes après 24, 48 et 72 heures de consommation de *M. persicae* ayant ingéré la diète artificielle (concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml). x = p-valeur incalculable

	Phloridzine 25 µg/ml			Amygdaline 25 µg/ml			Validamycine A 25µg/ml		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
p-valeur vis-à-vis du témoin	x	1	1	x	x	x	x	x	x

Annexe 9. P-valeurs obtenues grâce aux ANOVA réalisées sur l'ensemble des taux de mortalité relevés chez *M. persicae* 48 heures après l'application des traitements (concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml) par aspersion sur les feuilles de tabac préalablement infestées. \* = différence significative vis-à-vis du contrôle.

	Phloridzine 25 µg/ml	Amygdaline 25 µg/ml	Validamycine A 25µg/ml
p-valeur vis-à-vis du témoin	0,207	0,539	0,011 *

Annexe 10. P-valeurs obtenues grâce aux ANOVA réalisées sur l'ensemble des taux de mortalité relevés chez *M. persicae* 48 heures après l'infestation de plants de tabac préalablement traités (concentration de 25 µg d'inhibiteur/ml).

	Phloridzine 25 µg/ml	Amygdaline 25 µg/ml	Validamycine A 25µg/ml
p-valeur vis-à-vis du témoin	0,188	0,784	0,260