

Un olfactomètre tubulaire dynamique pour évaluer l'effet répulsif des plantes sur les pucerons

Correspondance

claude.castella@inrae.fr

laurent.gomez@inrae.fr

Claude Castella¹
Hélène Gautier¹
Emma Dieudonné¹

Guy Costagliola¹
Alexandre Gorit¹
Laurent Gomez²

Résumé.

Les pucerons sont d'importants ravageurs des cultures d'autant plus difficiles à contrôler que l'usage d'insecticides de synthèse est de plus en plus contraint par la législation (plan Ecophyto II+). L'utilisation de plantes de service (PdS) répulsives, en revanche, pourrait être, à terme, un levier de contrôle de ces ravageurs : certaines plantes ont, en effet, la capacité d'émettre des composés organiques volatils (COV) pouvant perturber l'installation et la reproduction de ces insectes. En association avec les plantes de rente, les PdS pourraient ainsi maintenir les populations de pucerons à un niveau d'atteinte des cultures économiquement acceptable pour les agriculteurs. L'étude des PdS, et notamment de leur capacité répulsive, constitue donc un pré-requis indispensable à leur utilisation dans des modèles agronomiques. L'outil de choix pour cela est l'olfactomètre qui permet d'étudier l'effet des odeurs sur le déplacement des insectes. Cependant, les olfactomètres actuellement disponibles sont essentiellement utilisés pour mesurer des phénomènes d'attraction (vers les phéromones par exemple) et ne permettent de réaliser des tests de choix qu'entre plusieurs sources d'odeurs. S'ils sont parfois utilisés pour mesurer un effet répulsif, c'est seulement de façon indirecte : l'insecte se dirigeant vers l'odeur qui lui est le moins désagréable. Enfin, ils ne permettent de tester que peu d'individus en simultanée et mobilisent donc beaucoup de temps.

À l'Unité de recherche « Plante et Système de culture Horticole » (INRAE, Avignon), nous avons mis au point un olfactomètre tubulaire en flux d'air dynamique d'un genre nouveau, qui permet d'étudier directement l'effet répulsif de PdS sur une cohorte de pucerons (+ de 40 individus en simultanée). Cet outil nous permet également, à tout moment durant le test de répulsion, de capter les odeurs (COV) émises par les plantes sur des dispositifs tels que cartouche Tenax® et fibre de SPME, puis de caractériser les COV émis par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). De plus, le dispositif est équipé de caméras permettant de suivre le comportement des insectes en temps réel et d'établir un indice de répulsion (IR) pour chaque modalité puceron-plante. Le dispositif a été validé par des tests sur PdS mais aussi sur des témoins négatifs (plantes hôtes ou absence d'odeurs) et positifs (β -farnésène). Enfin, ce dispositif a été conçu pour être évolutif : il est démontable et adaptable à d'autres types d'expérimentations et à différentes sources d'odeurs.

Mots-clés

Olfactomètre, répulsion, plantes de service, pucerons, agroécologie.

¹ INRAE Centre de recherche PACA UR 1115 « Plante et Système de culture Horticole », 228, route de l'Aérodrome CS 40 509 – Domaine Saint Paul, Site Agroparc 84 914 Avignon Cedex 09 France

A dynamic tubular olfactometer to evaluate the repellent effect of plants on aphids

Correspondance

claude.castella@inrae.fr

laurent.gomez@inrae.fr

Claude Castella¹
Hélène Gautier¹
Emma Dieudonné¹

Guy Costagliola¹
Alexandre Gorit¹
Laurent Gomez²

Abstract.

Aphids are important crop pests that are difficult to control, even more that the use of synthetic insecticides is increasingly restricted by legislation (Ecophyto II+ plan). The use of repellent companion plants (CPs) could, in the long term, be a lever for controlling these pests. Some CPs have the capacity to emit volatile organic compounds (VOCs) that can disrupt the establishment and reproduction of these insects. In association with cash crops, repellent CPs could maintain aphid populations at a level of crop damage economically acceptable to farmers. The study of CPs and in particular their repellent capacity is therefore an essential prerequisite for their use in agronomic models. The olfactometer is a tool of choice for studying the effect of odours on insect movement. However, the olfactometers currently available are essentially used to test the choice between several odour sources and are mainly used to measure attraction phenomena (e.g. to pheromones). They are sometimes used to measure a repellent effect, but only in an indirect way: the insect goes towards the odour that is the least unpleasant. They also allow testing only a few individuals at the same time and are thus very time-consuming.

At the « Plants and cropping Systems in Horticulture » research unit (INRAE, Avignon, France), we have therefore developed a new type of dynamic airflow tubular olfactometer that allows us to directly study the repellent effect of CPs on a cohort of aphids (more than 40 individuals simultaneously). We can also capture the odours (VOCs) emitted by the plants on devices such as Tenax® cartridge and SPME fiber at any time during the repellent test, and then characterise the VOCs emitted by gaz chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In addition, the device is equipped with cameras to monitor the insect behaviour in real time and to establish a repulsion index (RI) for each aphid-plant modality. The device was validated by tests on CPs but also on negative controls (host plants or absence of odours) and positive controls (β -farnesene). Finally, this device was designed to be scalable: it can be dismantled and adapted to other types of experiments and different odour sources.

Keywords

Olfactometer, repulsion, companion plants, aphids, agroecology.

¹ INRAE Centre de recherche PACA UR 1115 « Plante et Système de culture Horticole ». 228, route de l'Aérodrome CS 40 509 – Domaine Saint Paul, Site Agroparc 84 914 Avignon Cedex 09 France

Introduction

Les pucerons sont des ravageurs notoires des cultures, qui infligent de nombreux dégâts aux plantes lors de la recherche et de la prise de nourriture : prélèvement des ressources de la plante, déformation des organes, transmission de virus à l'origine de nombreuses maladies (mosaïque du concombre, mosaïque de la tomate, jaunisse de la betterave sucrière, Sharka du pêcher, etc.). La production de miellat par les pucerons contribue aussi à perturber le métabolisme de la plante, en obstruant les stomates, et favorise l'apparition de champignons (fumagine). Ces dégâts ont un coût élevé, ce qui rend le contrôle des populations de pucerons incontournable en grandes cultures, en verger ou maraîchage. L'utilisation des pesticides de synthèse reste encore la solution la plus utilisée ; cependant, l'incrémentation des résistances constatées (Simon et Peccoud, 2018), les effets négatifs sur la biodiversité et la demande sociétale d'aller vers une agriculture plus durable et plus respectueuse de l'environnement ont conduit à rechercher des alternatives. Afin de sortir du « tout chimique », de nombreuses solutions, relevant notamment de l'agroécologie, sont actuellement à l'étude. L'un des leviers envisagés comme méthode de substitution à la lutte chimique concerne l'utilisation de plantes de service (PdS). Ces plantes n'ont souvent aucun intérêt agronomique propre mais permettent d'améliorer les conduites agricoles en utilisant moins d'intrants, notamment en réduisant le recours aux pesticides. Parmi les services rendus, les capacités de répulsion envers des ravageurs commencent à être largement étudiées (Ben-Issa, Gomez et Gautier, 2017 ; Dardouri, 2018). L'effet répulsif passe par l'émission aérienne de composés organiques volatils (COV) appartenant essentiellement à la famille des terpènes. Certains d'entre eux conduisent à éloigner les insectes nuisibles des cultures et/ou affectent le comportement alimentaire ou la fécondité des pucerons (Unsicker, Kunert et Gershenzon, 2009 ; Ben-Issa, Gomez et Gautier, 2017). D'autres COV attirent au contraire les insectes, de sorte que des combinaisons plantes répulsives/plantes attractives (méthode push-pull) ont été expérimentées avec succès pour contrôler certains ravageurs (Pickett et al., 1992 ; Khan et al., 2016).

Seuls des tests en laboratoire (Hori, 1998 ; Ben-Issa, Gomez et Gautier, 2017), permettent de mettre en évidence et d'évaluer l'effet répulsif de certaines plantes en le dissociant d'autres effets potentiels sur la fécondité, le comportement alimentaire ou encore l'attraction d'auxiliaires, qui peuvent impacter la dynamique de croissance d'une population de pucerons.

Pour évaluer l'effet répulsif de plantes sur des insectes, on a recours à des olfactomètres, à savoir des dispositifs plus ou moins sophistiqués, en forme de Y (Hori, 1998 ; Dardouri, Gautier, et al., 2019) ou en arène (Pettersson, 1970 ; Turlings, Davison et Tamò, 2004 ; Kulkarni et al., 2017), dans lesquels on observe le comportement d'orientation d'un ou plusieurs pucerons en présence de COV produits par des plantes. Ce-

pendant, ces divers dispositifs permettent de réaliser des tests de choix entre deux ou plusieurs odeurs, et l'effet répulsif d'une plante ne peut être apprécié qu'indirectement en testant différentes modalités. Par exemple, le choix entre une odeur répulsive et un témoin ne permet pas d'évaluer directement un comportement de fuite (Hori, 1998). D'une manière comparable, le choix de plusieurs odeurs dans des modèles en arène (généralement utilisés pour tester des mélanges d'odeurs en flux statique ou non) ne constitue pas une approche pertinente afin d'évaluer un comportement de fuite direct (Pettersson, 1970). En outre, les pucerons sont le plus souvent testés individuellement ou en petit nombre, ce qui rallonge notablement la durée des expérimentations si l'on veut disposer de suffisamment de données pour des statistiques solides (Hori, 1998 ; Dardouri, Gomez, et al., 2019). Les dispositifs existants ne permettent donc pas d'évaluer l'effet répulsif de façon directe sur un nombre important de pucerons (cohortes).

Nous avons donc mis au point, à l'Unité de recherche « Plante et Système de culture Horticole » (INRAE, Avignon), un olfactomètre tubulaire dynamique permettant d'apprécier directement et spécifiquement l'effet répulsif de PdS sur plusieurs dizaines de pucerons. Cet olfactomètre est, de plus, équipé de caméras permettant d'enregistrer de manière fiable des données sur le déplacement des pucerons exposés à un flux d'air porteur de COV libérés par des plantes placées en amont dans une enceinte en verre.

Ce dispositif permet d'évaluer et de comparer, pour un patho-système donné (ex. puceron cendré/pommier), les capacités répulsives de différentes PdS, en calculant pour chacune d'elles un indice de répulsion (IR). Celui-ci s'apprécie toujours au vu des IR obtenus avec un témoin négatif (air pur ou plante hôte), voire un positif (le β -farnésène : la phéromone d'alerte du puceron). Le dispositif offre également la possibilité de capter les COV en cours de test, soit dans l'enceinte en verre en exposant une fibre de SPME (Solid Phase Micro Extraction, Supelco®, EU), soit sur le circuit d'air en sortie d'enceinte par prélèvement à l'aide d'une cartouche Tenax®TA (PerkinElmer®, EU). Ces prélèvements sont ensuite analysés par CPG-SM afin d'établir, pour chaque plante testée, un spectre d'émission, puis d'associer cette « signature COV » à l'IR mesuré. En multipliant les modalités testées, cette démarche nous aide à identifier, à l'aide d'ACP (Analyse en Composantes Principales), les molécules et les mélanges de molécules plus particulièrement responsables de l'effet répulsif des PdS. La nature et le niveau d'émission des COV nous permet également d'apprécier la qualité des conditions opérationnelles du test, en particulier de détecter une pollution ou un dysfonctionnement métabolique des plantes, le plus souvent imputable à un stress.

Description du dispositif (Figures 1-5)

La figure 1, par souci de simplification, présente une unité fonctionnelle avec une seule chambre olfactométrique, mais on peut installer deux à trois chambres en parallèle par enceinte (représentées en filigrane) grâce à une station à trois débitmètres secondaires (DMS). Le dispositif complet (Figure 2) comprend deux unités fonctionnelles permettant de tester, en simultanée, une PdS et un témoin (air ou plante hôte).

Situation : Le dispositif a été installé dans une pièce blanche. La température est régulée par une climatisation ($22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, 50-70 % humidité relative) et la lumière dispensée par un jeu de tubes fluorescents ($10\ \mu\text{mol}$ de photons par m^2

et par s). L'air de la pièce est renouvelé directement par une conduite d'arrivée d'air extérieur et un extracteur installé dans le plafond.

Circuit d'air (Figures 1 et 2)

L'ensemble du circuit d'air du dispositif est réalisé avec du tuyau Téflon et des robinetteries inox autobloquantes (EZ-FITT, France). L'air est capté à l'extérieur du bâtiment par une pompe à membrane (40 L/min, mod. N035AN18, KNF, Allemagne), puis acheminé à un débitmètre principal (DMP) (Cole-Parmer, EU) réglé sur 8 L/min. Ce débitmètre alimente un circuit comprenant une enceinte en verre puis un débitmètre secondaire (DMS) permettant d'alimenter une

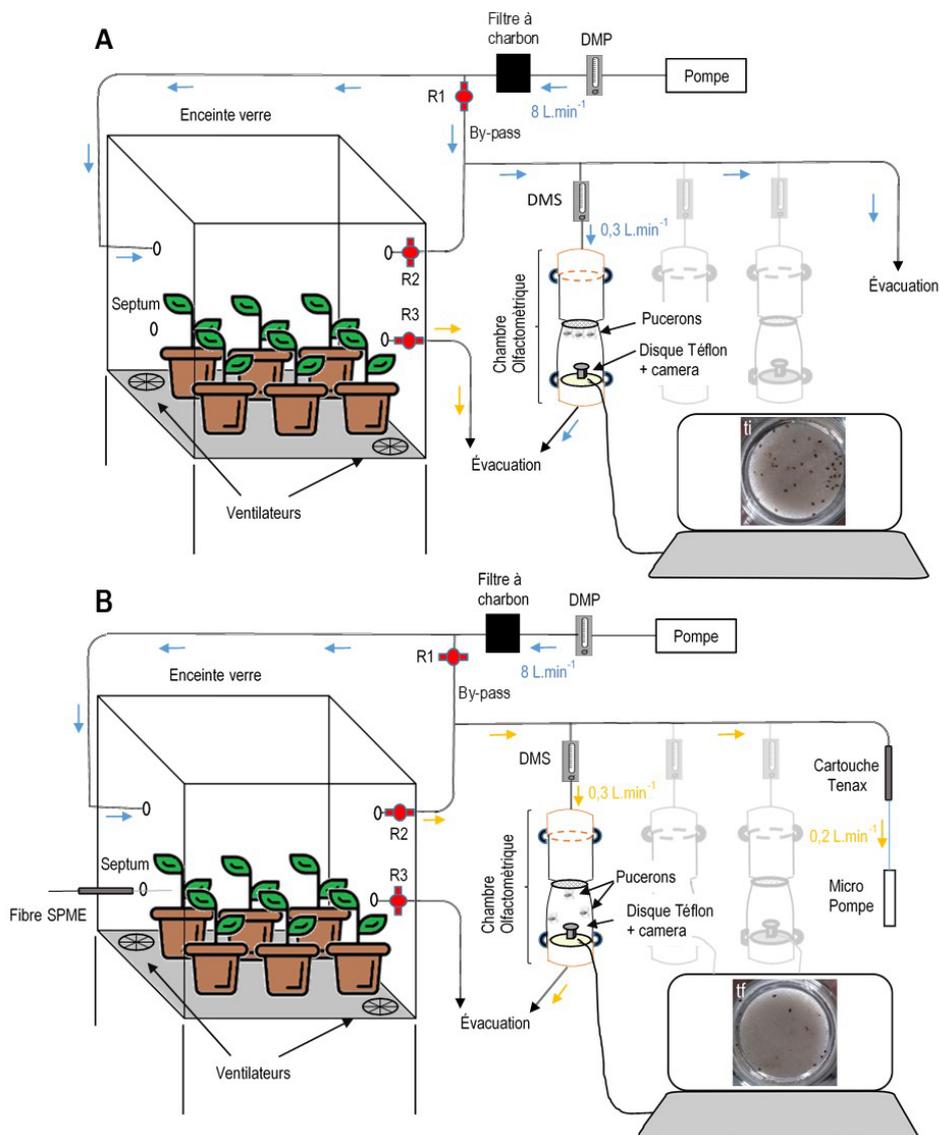


Figure 1. Représentation simplifiée d'une unité fonctionnelle du dispositif : A/ Situation lors de la stabilisation avant d'effectuer un test de répulsion (robinet R1 et R3 ouverts, R2 fermé) ; l'air propre circule dans l'enceinte et la ou les chambre(s) par le « by-pass ». L'air contenant les COV est évacué par R3. B/ Situation durant le test (robinet R1 et R3 fermés, R2 ouvert) ; l'air contenant les COV circule vers la ou les chambre(s). Le prélèvement des COV s'effectue sur fibre de SPME directement dans l'enceinte (septum) et/ou sur cartouche TENAX® au niveau des DMS. DMP : débitmètre principal, DMS : débitmètre secondaire, R : robinet, flèche bleue : air pur, flèche jaune : air chargé en COV, t_i : temps initial, t_f : temps final. (Schéma modifié d'après E. Dieudonné et al, 2022)

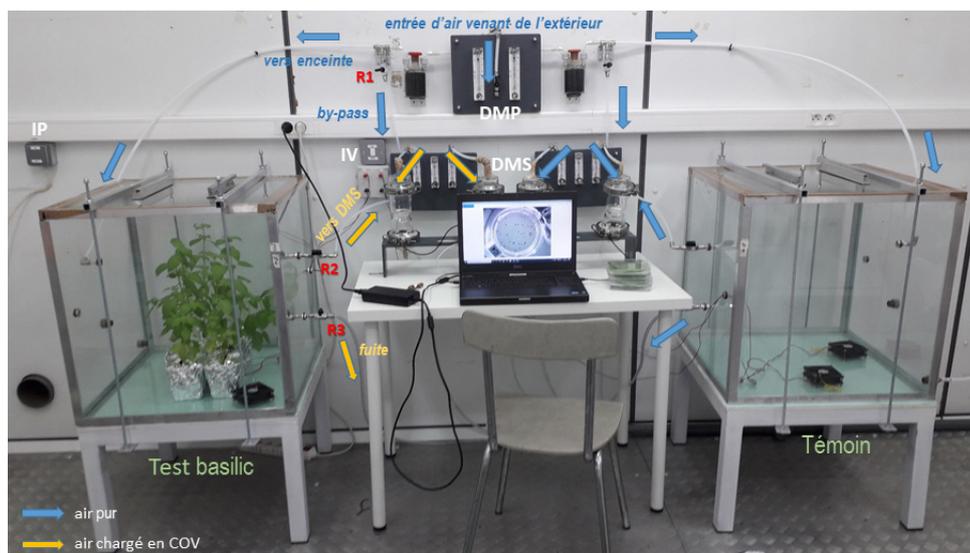


Figure 2. Vue d'ensemble de l'olfactomètre tubulaire dynamique durant un test de répulsion avec du basilic (*Ocimum basilicum* L). Le sens du flux d'air pur est indiqué par une flèche bleue. L'air chargé en COV est signalé par une flèche jaune. Pour éviter tout contaminant chimique, l'ensemble du dispositif est réalisé en Teflon, inox et verre. Sur l'écran de l'ordinateur, on peut apercevoir une vue du fritté avec des pucerons. R1 : robinet de sélection enceinte-bypass, R2 : robinet vers DMS, R3 : robinet d'évacuation (fuite), DMP : débitmètres principaux, DMS : débitmètres secondaires, IP : interrupteur pompe, IV : interrupteur ventilateurs.

chambre olfactométrique. L'air est d'abord purifié en traversant un flacon de charbon actif. Un robinet « by-pass » (R1) permet ensuite de l'envoyer uniquement dans l'enceinte et/ou vers la chambre via le DMS. En sortie d'enceinte, l'air peut être véhiculé au choix vers le DMS ou vers l'extérieur de la pièce, via un tuyau d'évacuation (R3).

Enceinte (Figures 3 et 5)

L'enceinte est réalisée en plaques de verre Securit (600 x 600 mm) de 0,5 mm d'épaisseur (Miroiterie Avignonnaise, France) et renforcée par des cornières en aluminium collées au Sikaflex 11 Fc (Sika, Suisse). Les parois latérales comprennent des orifices de 60 mm équipés en robinetteries inox. L'étanchéité du couvercle est assurée par un joint Téflon et des barres métalliques équipées d'un serrage par vis permettant de plaquer le couvercle sur l'enceinte et de minimiser les fuites. L'air est homogénéisé dans chaque enceinte à l'aide de deux ventilateurs (Q-TEC, Pays-Bas) basse tension (12V) de 10 cm de diamètre (Figure 3). L'enceinte est connectée au réseau de tuyau en Téflon (diamètre 8/10 mm en amont du réseau et 6/8 mm en aval). La captation des COV émis par les plantes peut s'effectuer, soit directement dans l'enceinte, à l'aide d'une fibre de SPME introduite par un orifice équipé d'un septum (Figure 5A), soit au niveau des DMS sur cartouche Tenax® (Figure 5B).

NB : Lors du montage des enceintes, l'usage de colle à base de silicone est à proscrire, car générant des pics « parasites » pouvant masquer des COV d'intérêt lors de l'analyse en CPG-SM. Seul le Sikaflex 11 Fc nous a donné satisfaction.

Chambres olfactométriques (Figure 4)

Elles ont été réalisées selon nos plans par la société Legallais (Montferrier sur Lez, France). Elles sont composées d'un cylindre de verre (diam. 70 mm, longueur env. 200 mm) cintré en son centre et séparé en deux parties par un disque en verre fritté (diam. 40 mm, épaisseur 5 mm). Les bords du cylindre sont évasés afin de recevoir, de part et d'autre, une coiffe en verre connectée du côté apical au réseau de distribution d'air, du côté basal à un tuyau d'évacuation de l'air hors de la pièce. L'étanchéité de l'ensemble est assurée par des serre-joints métalliques (Figure 4A). Dans l'espace inférieur du cylindre qui recevra les pucerons, une mini-caméra USB est fixée sur un disque en Téflon qui est positionné au niveau de la jonction cylindre-coiffe, objectif de la caméra orienté vers le fritté (Figure 4B, C et D). La caméra, connectée à un PC, permet de suivre en temps réel et d'enregistrer (photos, films) le déplacement des pucerons tout au long du test, sans manipulation de l'olfactomètre. Le logiciel utilisé (Camera Windows 10, USA) permet de suivre en parallèle plusieurs chambres olfactométriques.

Protocole standard (Figure 6)

Le dispositif a été conçu de façon à être modulable et adaptable en fonction des modalités testées : choix des sources d'odeurs (PdS et/ou plante hôte, huiles essentielles, etc.) ainsi que des insectes (espèces de pucerons, stades des cohortes). Le protocole peut donc être modifié en conséquence. Nous décrivons ici un test de répulsion standard sur une cohorte de pucerons verts du pommier (*Dysaphis plantaginea*) en utilisant de la menthe poivrée comme plante test de répulsion.

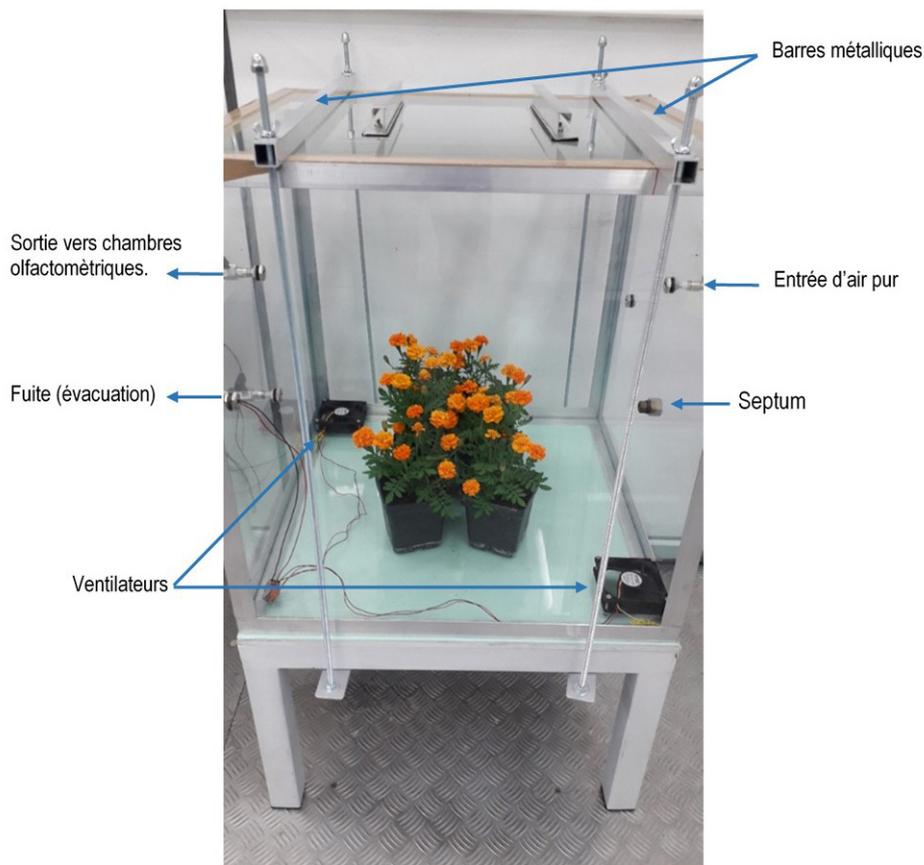


Figure 3. Vue d'une enceinte lors d'un essai avec des tagetes (*T. patula var nana*). Les enceintes sont posées sur un châssis en métal peint. L'étanchéité est obtenue par un système de barre à vis permettant de serrer avec précision le couvercle sur l'enceinte et de minimiser les fuites.

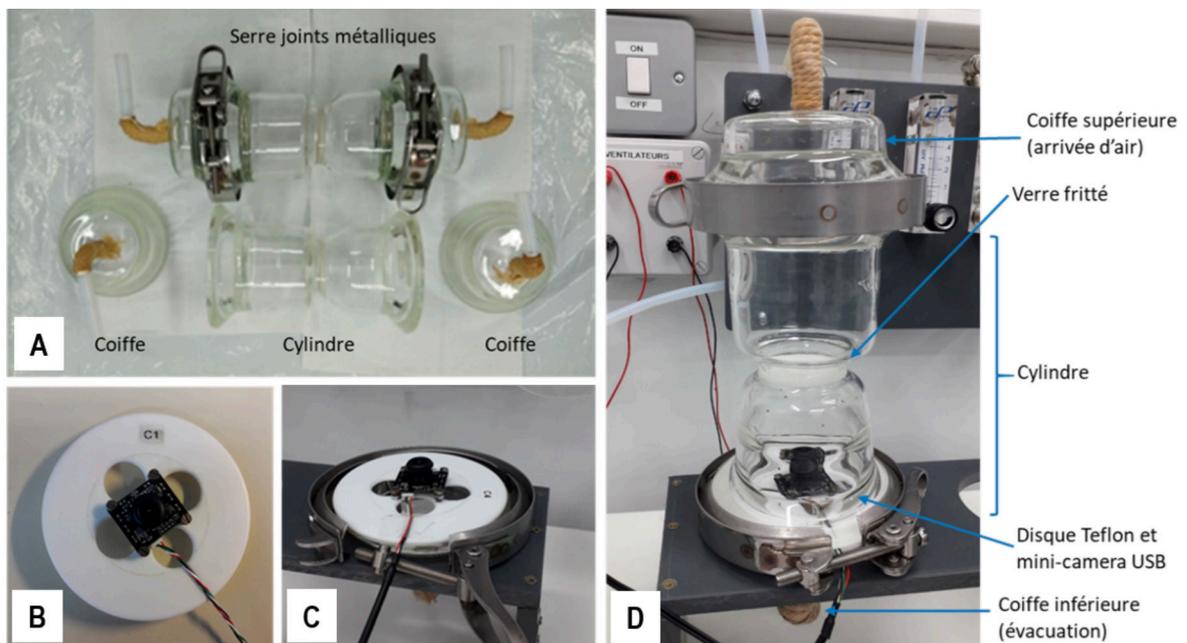


Figure 4. Vues détaillées d'une chambre olfactométrique : A/ Vue montée et éclatée de la chambre, B/ Disque en Téflon avec sa camera, C/ Disque positionné sur la coiffe inférieure avant montage de la chambre, D/ Vue d'ensemble de la chambre olfactométrique et sa camera installée sur son support durant un test de répulsion.

Les plantes

En général, les tests sont réalisés avec six plantes en pots de 1 L (les pots sont recouverts de papier aluminium pour limiter l'émanation de COV du substrat). Avant le test, les plantes sont d'abord stabilisées dans l'enceinte fermée pendant une heure avec un flux d'air constant de 8 L/min (R1 et R3 ouvert, R2 fermé, Figure 1A).

La variété, le stade phénologique et la hauteur d'une plante peuvent impacter sa production de COV, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Afin d'atteindre en quantité de COV un seuil minimum pour lequel on puisse observer un effet répulsif, il est préconisé, avant le début du test proprement dit, de fonctionner transitoirement en statique (arrêt du flux d'air) pendant 20 min au minimum. Cette opération permet d'augmenter, dans l'enceinte, la concentration en COV libérés par les plantes, et en conséquence la quantité de COV ensuite acheminée au niveau des chambres olfactométriques lors du test. On a pu vérifier, en effet, que la production des plantes maintenait ensuite une stabilité satisfaisante du flux de COV tout au long du test.

Les pucerons

Les pucerons destinés au test sont issus d'une même cohorte de 24 h, c'est-à-dire provenant de larves pondues pendant 24 h par des femelles aptères du même clone. Pendant la stabilisation des plantes, 45 pucerons sont mis à jeûner pendant 30 min dans une boîte de Petri en verre. Le jeûne est important car il rend les pucerons plus mobiles. Ils sont toujours manipulés délicatement à l'aide d'un pinceau fin pour éviter de les blesser et limiter leur stress.

Déroulement du test

Après le jeûne, les pucerons sont placés sur la face inférieure du fritté (partie inférieure de la chambre). Du fait de leur géotactisme négatif, les pucerons restent sur le fritté. Les différentes pièces de la chambre sont ensuite assemblées et raccordées au circuit d'air (Figure 4D). Une première photo est prise à (t_0) puis les pucerons sont laissés en stabilisation pendant 30 min sous un flux d'air pur de 0,3 L/min (R1 et R3 ouvert, R2 fermé, Figure 1A). Ceux qui se déplacent et quittent le fritté durant ce laps de temps ne seront pas pris en compte lors du test.

NB : Dans sa conception actuelle, le dispositif autorise jusqu'à 3 chambres connectées en simultané sur une seule enceinte. Avec le même lot de plantes, il est donc possible de tester en même temps jusqu'à 135 pucerons par modalité.

Les prises de vue

Les prises de vues sont effectuées à l'aide du logiciel Caméra Windows 10 (Microsoft, USA) ; plusieurs photos sont réalisées en série.

Une photo est prise au début du test (t_i). Les robinets du by-pass (R1) et de la fuite (R3) sont ensuite fermés, et celui de l'enceinte ouvert (R2) de sorte que le flux d'air achemine les COV émis par les plantes vers la chambre olfactométrique (Figure 1B).

Le test dure une heure au cours de laquelle la caméra permet, si besoin, de contrôler le déplacement des pucerons. Les pucerons repoussés sortent rapidement du champ de prise de vue de la caméra et descendent les parois de la chambre. Ils s'installent au fond car n'ayant plus de possibilité de fuite. En fin de test (t_f), une dernière photo des pucerons encore présents sur le fritté est réalisée. On considère que ces pucerons n'ont pas été perturbés par le flux de COV émanant des plantes.

La captation des COV

Pendant le test, il est possible à tout moment de prélever un échantillon de COV en exposant, généralement pendant 20 min, une fibre de SPME dans l'enceinte par le septum prévu à cet effet, et/ou en installant sur le circuit d'air une cartouche Tenax® durant 5 min, à un débit de 0,2 L/min (Figures 1B et 5).

NB : Le prélèvement sur cartouche est privilégié si l'on ambitionne de quantifier la production olfactive des plantes. Cependant, connaissant la quantité de COV captés dans une cartouche, le volume d'air échantillonné sur celle-ci et le volume d'air entrant dans l'enceinte durant le prélèvement de 5 min, il est possible de déterminer un taux de production de COV par une plante et éventuellement de l'exprimer en fonction de la masse des parties aériennes ou encore de la surface foliaire par unité de temps.

Après le test

Une fois le test terminé, le dispositif est démonté et nettoyé, les pucerons éliminés (en les plaçant dans un congélateur à -20 °C) et les plantes retirées de l'enceinte et de la pièce. Pucerons et lot de plantes ne sont utilisés que pour un seul test. L'enceinte et les chambres sont nettoyés au Decon 90 (Decon Lab. Ltd, UK) à 10 % dans de l'eau distillée, rincées à l'eau distillée puis à l'éthanol à 70 %. Les différentes parties des chambres sont ensuite séchées à l'étuve (1 h à 110 °C) pour éliminer toute trace de COV.

Point important : Afin de purger l'ensemble de la tuyauterie d'éventuels COV résiduels, la pompe doit rester en marche avec tous les robinets du circuit ouverts au moins une heure avant la réalisation d'un nouveau test.

Calcul de l'indice de répulsion

Le dénombrement des pucerons en début (t_i) et en fin (t_f) de test permet de calculer l'indice de répulsion (IR) d'une plante

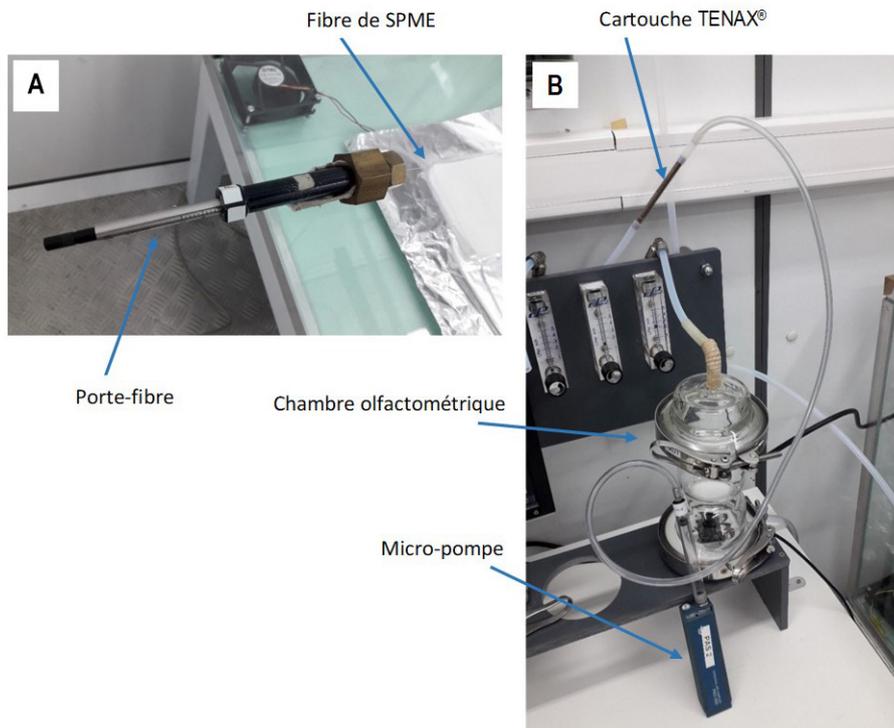


Figure 5. Vues détaillées des dispositifs de captation de COV lors d'un prélèvement : A/ À l'aide d'une fibre de SPME par le biais d'un septum installé dans une paroi de l'enceinte. B/ À l'aide d'une cartouche Tenax® sur une sortie d'un débitmètre secondaire. Le débit calibré à 0,2 L/min est assuré par une micro-pompe. En parallèle une chambre contenant des pucerons en cours de test.

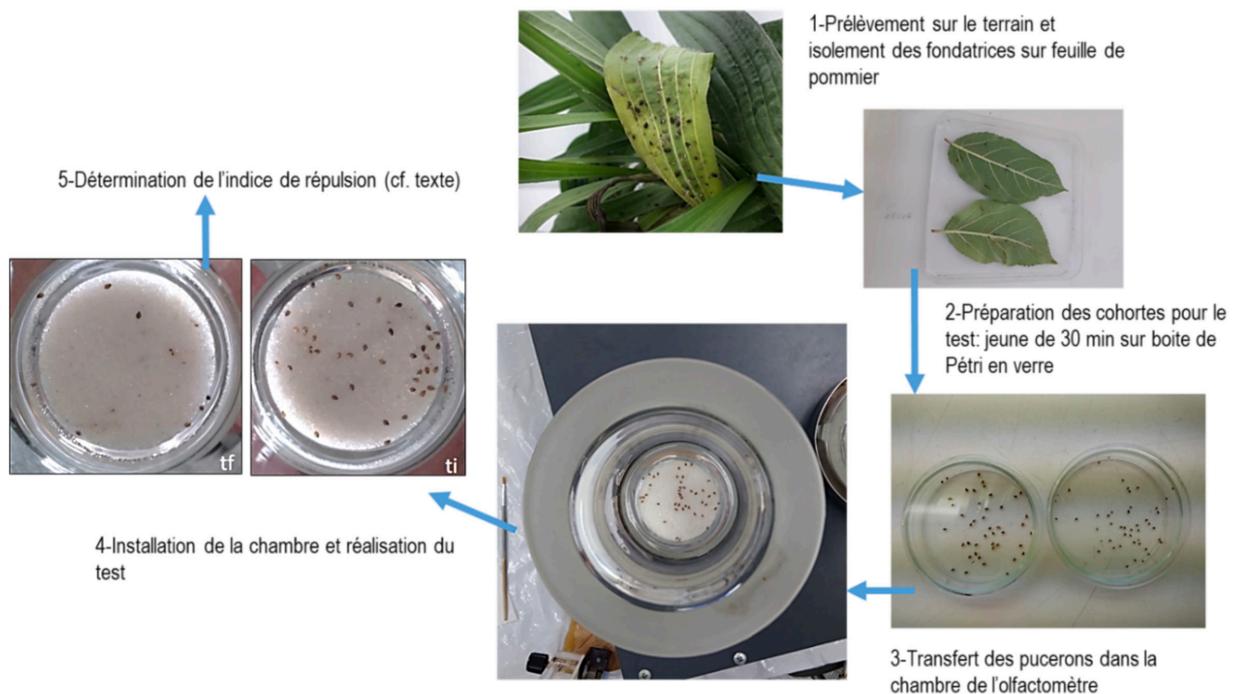


Figure 6. Les différentes étapes de réalisation d'un test de répulsion avec *D. plantaginea*. Les cohortes synchrones de 24 heures sont obtenues en isolant des fondatrices sur des feuilles de pommier fraîches en boîte de Pétri (1). Après une période de jeûne (2), les pucerons sont transférés dans la chambre de l'olfactomètre (3). Celle-ci est installée sur le dispositif et, après un temps de stabilisation, le test est effectué (4, 5). *ti* : temps initial, *tf* : temps final.

selon la formule : $IR = \frac{N_{ti} - N_{tf}}{N_{ti}}$

N_{ti} : nombre de pucerons au départ du test

N_{tf} : nombre de pucerons en fin de test

NB : Comme indiqué plus haut, le dispositif complet comprend deux unités fonctionnelles (Figure 2), pour pouvoir tester simultanément une PdS et un témoin négatif (air pur ou plante hôte). Toutes choses étant égales (y compris la cohorte de pucerons utilisée), l'IR de ce témoin (normalement proche de 0,1), permet de valider les bonnes conditions opérationnelles du test.

Le β -farnésène, phéromone d'alarme chez les pucerons, peut être utilisé comme témoin positif. Cent μ L d'une solution contenant 20 % de β -farnésène et 80 % d'éthanol pur sont déposés sur un papier filtre. Ce papier est par la suite placé au centre d'une enceinte vide. La procédure reste la même qu'avec les plantes. En général, on obtient un IR autour de 0,8 avec ce contrôle positif.

Points de vigilance à observer sur l'utilisation du dispositif

Ce dispositif est simple d'utilisation pour peu que l'on observe quelques règles. D'une part, le flux d'air, afin qu'il soit stable et constant, doit être vérifié et optimisé à la demande en l'ajustant sur les débitmètres et l'étanchéité au niveau du couvercle être soigneusement contrôlée. D'autre part, afin

d'éviter toutes traces de COV, le nettoyage des enceintes et des chambres entre chaque test ainsi qu'une purge du système pendant une heure est primordial (cf. protocole standard). Le charbon doit être régulièrement réactivé (120 °C pendant 20 min) ou changé.

Le bon suivi de ces recommandations doit être régulièrement contrôlé en effectuant des blancs de vérification sur fibre de SPME et cartouche Tenax®, afin de détecter d'éventuelles traces de contamination. En cas de contamination, l'ensemble de la tuyauterie et robinetterie est entièrement démontable. Elle peut être chauffée pour évacuer d'éventuels COV résiduels ou changée.

Exemples d'utilisation du dispositif

Ce dispositif a été utilisé dans le cadre de différents projets (voir plus bas) et des résultats ont fait l'objet de publication (Dieudonné et al, 2022), de rapports de stage de master et de thèses de doctorat (Dardouri, 2018).

La figure 7 illustre des résultats obtenus sur des tests de différentes espèces de PdS répulsives ou non sur des cohortes de pucerons verts du pommier (*D. plantaginea*) élevées sur plantain (*P. lanceolata*) en utilisant le protocole standard précédemment décrit. Les indices de répulsion sont calculés à partir de trois répétitions par modalité au moins. Un écart significatif (facteur 8) entre l'IR de l'air (témoin négatif) et l'IR du β -farnésène (témoin positif) montre que ce dispositif est suffisamment discriminant pour mesurer l'effet répulsif de différentes PdS. Le plantain (plante témoin) a un IR comparable à l'air, il ne semble donc pas être répulsif pour les puce-

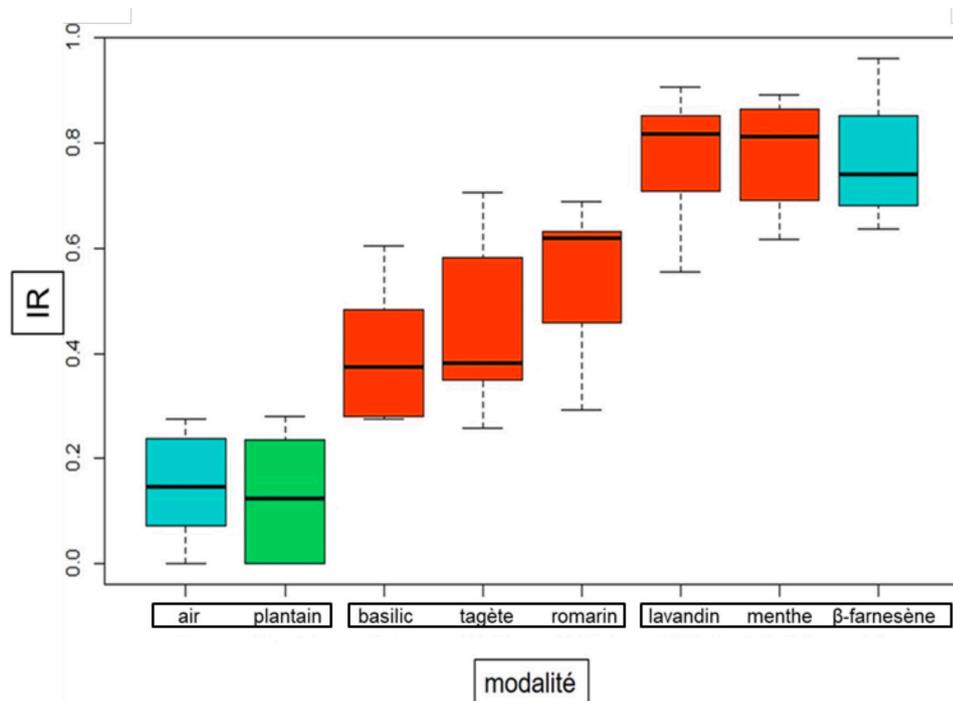


Figure 7. Représentation graphique (diagramme de Tukey) de tests de répulsion de différentes plantes de service obtenus sur cohorte de puceron de *D. plantaginea*. Les indices de répulsion sont calculés à partir de trois répétitions par modalité. Le plantain (plante hôte) est utilisé comme référence négative ainsi que l'air pur. Le β -farnésène est utilisé comme témoin positif. Trois groupes de modalités (encadrement) présentent des différences de moyennes significatives ($p < 0,01$). (D'après E. Dieudonné, 2018)

rons. Les IR obtenus à partir des témoins permettent de valider le dispositif. Toutes les plantes aromatiques testées ont un IR significativement supérieur au contrôle air ($P < 0.01$). Deux groupes se distinguent : le tagète, le basilic et le romarin qui présentent un effet répulsif modéré, puis la menthe poivrée et le lavandin qui ont un IR proche de celui du β -farnésène.

Conclusion et perspectives

L'olfactomètre tubulaire dynamique est un dispositif simple à utiliser qui permet l'évaluation fiable et rapide des capacités répulsives d'une plante. Il permet de discriminer des plantes de service selon leur IR et de hiérarchiser l'intérêt de celles-ci avant de mener des essais sous abri ou au champ.

L'olfactomètre tubulaire dynamique a été conçu pour évaluer directement l'effet répulsif d'une plante de service pour les pucerons. L'IR calculé permet d'évaluer le niveau de répulsion des PdS et de les comparer. Les résultats obtenus lors de nos différents projets (cités plus haut) témoignent de la reproductibilité du test, à condition de bien respecter les consignes expérimentales. Selon la nature du patho-système étudié, il peut cependant être nécessaire de faire évoluer les conditions opérationnelles, comme la durée du jeûne, le temps d'exposition des pucerons au COV, le nombre de plantes dans l'enceinte, voire le nombre de pucerons testés. Pour cela, les IR obtenus avec les témoins négatifs (air pur ou plante hôte) et positifs doivent être un guide. Il est possible également de tester l'effet de différentes combinaisons de plantes ou, du fait de sa modularité (jusqu'à trois chambres par modalité), de tester l'effet répulsif en simultanée sur plusieurs espèces

de pucerons. La possibilité de prélever les COV durant le test permet de relier l'effet répulsif à la production olfactive des plantes. Le fait de pouvoir utiliser en simultané deux types de supports (fibre de SPME et cartouche Tenax®) permet de couvrir un large spectre de captation.

L'usage d'une caméra simplifie la réalisation et le suivi du test. Elle permet de ne pas avoir à manipuler l'olfactomètre et donc de ne pas perturber le comportement des pucerons. De plus, ce système de caméra est évolutif, il serait intéressant, par exemple, de suivre plus précisément le comportement des pucerons (inhibition, disruption ou évitement en plus de la répulsion) par « tracking » à l'aide de plug-ins disponibles sous *Image J* par exemple.

Le dispositif est évolutif et adaptable du fait de sa modularité : les débits de flux d'air et les circuits sont modulables et peuvent s'adapter à des contraintes expérimentales. L'ensemble de la robinetterie et du circuit d'air est facilement démontable et interchangeable. Il peut être manipulable par des non-initiés et modifié pour répondre rapidement aux futures demandes. Les circuits d'alimentation des chambres olfactométriques peuvent être adaptés à d'autres types de sources d'odeurs (huiles essentielles, molécule de synthèse simple ou en mélange, etc.). L'enceinte peut également alimenter d'autres dispositifs comme, par exemple, un tunnel de vol, afin d'évaluer l'effet des odeurs sur des insectes ailés. Pour information, le prix de l'ensemble du dispositif présenté figure 2 s'élève aujourd'hui à environ 5 000 € HT, hors frais de montage, d'installation et de matériel informatique. ■

Financement et contrats liés au dispositif

Cette réalisation a bénéficié du soutien du département AgroEcoSytém INRAE (Pari scientifique 2016). Ce dispositif a été mis en œuvre dans le cadre du projet européen ApiTree (2018-2021) et du projet Ecophyto II Alto (2018-2023).

Le dispositif est actuellement utilisé dans les projets suivants :

- ANR-PPR-CPA « Cultiver et protéger autrement » – Projet CapZeroPhyto, 2021-2026. Porteur : PSH-INRAE
- CASDAR REPULSE « Protection des cultures légumières à l'aide de plantes répulsives/dissuasives », 2020-2023. CTIFL
- CASDAR SIMPA « Systèmes innovants utilisant la combinaison de leviers agroécologiques pour Maitriser les Pucerons des Arbres Fruitières », 2021-2024. CTIFL
- PNRI SerVir « Des plantes de services pour altérer des paramètres épidémiologiques impliqués dans la dynamique de dispersion de jaunisses virales sur betterave » 2021-2023.

Références

Ben-Issa, R., Gomez, L., Gautier, H. (2017). Companion Plants for Aphid Pest Management, *Insects*, 8(4), p. 112. doi:10.3390/insects8040112. Disponible à : (hal-02620982).

Dardouri, T. (2018). Implication des composés organiques volatils dans la capacité des plantes de service à perturber le comportement et les performances de *Myzus persicae* (Sulzer) le puceron vert du verger. Thèse. Université d'Avignon. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02178970>.

Dardouri, T., Gomez, L., Schoeny, A., Costagliola, G., Gautier, H. (2019). Behavioural response of green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) to volatiles from different rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones, *Agricultural and Forest Entomology*, 21(3), p. 336. doi:10.1111/afe.12336. Disponible à : (hal-02267846).

Dardouri, T., Gautier, H., Ben-Issa, R., Costagliola, G., Gomez, L. (2019). Repellence of *Myzus persicae* (Sulzer): evidence of two modes of action of volatiles from selected living aromatic plants. *Pest Management Science*, 75(6), pp. 1571–1584. doi:10.1002/ps.5271. Disponible à : (hal-02620581).

Dieudonné, E., Gautier, H., Dardouri, T., Staudt, M., Costagliola, G., Gomez, L. (2022). Evidence of the repellent effect of aromatic plants on *Dysaphis plantaginea*, using a dynamic olfactometer. *Entomologia Exp Applicata*, doi:10.1111/eea.13194.

Hori, M. (1998). Repellency of rosemary oil against *Myzus persicae* in a laboratory and in a greenhouse. pp. 1425–1432. doi:10.1023/A:1020947414051.

Khan, Z., Midega, C.A.O., Hooper, A., Pickett, J. (2016). Push-Pull: Chemical Ecology-Based Integrated Pest Management Technology. *Journal of Chemical Ecology*, 42(7), pp. 689–697. doi:10.1007/s10886-016-0730-y.

Kulkarni, S.S., Dossdall, L.M., Spence, J.R., Willenborg, C.J. (2017). Seed Detection and Discrimination by Ground Beetles (Coleoptera: Carabidae) Are Associated with Olfactory Cues. *PLOS ONE*, 12(1), p. e0170593. doi:10.1371/journal.pone.0170593.

Pettersson, J. (1970). An Aphid Sex Attractant. *Insect Systematics & Evolution*, 1(1), pp. 63–73. doi:10.1163/187631270X00357.

Pickett, J.A., Whadams, L.J., Woodcock, C.M., Hardie, J. (1992). The Chemical Ecology of Aphids. *Annual Review of Entomology*, 37(1), pp. 67–90. doi:10.1146/annurev.en.37.010192.000435.

Simon, J.-C., Peccoud, J. (2018). Rapid evolution of aphid pests in agricultural environments. *Current Opinion in Insect Science*, 26, pp. 17–24. doi:10.1016/j.cois.2017.12.009.

Turlings, T.C.J., Davison, A.C., Tamò, C. (2004). A six-arm olfactometer permitting simultaneous observation of insect attraction and odour trapping. *Physiological Entomology*, 29(1), pp. 45–55. doi:10.1111/j.1365-3032.2004.0362.x.

Unsicker, S.B., Kunert, G., Gershenson, J. (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), pp. 479–485. doi:10.1016/j.pbi.2009.04.001.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.