



HAL
open science

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

Tarek Dardouri

► To cite this version:

Tarek Dardouri. 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. Autre [q-bio.OT]. Université d'Avignon, 2018. Français. NNT : 2018AVIG0702 . tel-02178970

HAL Id: tel-02178970

<https://theses.hal.science/tel-02178970>

Submitted on 10 Jul 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

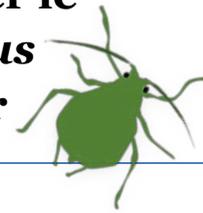
UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

Ecole Doctorale 536 « Sciences et Agro-sciences »

Thèse

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (UAPV)

**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 pêcher**



par **Tarek DARDOURI**

préparée à l'INRA-UR1115, Plantes et Système de culture
Horticoles (PSH), INRA d'Avignon

Soutenue publiquement le 27 novembre 2018 devant le jury :

Sylvia ANTON	Directrice de Recherche à l'INRA d'Angers	Rapporteur
Arnaud AMELINE	Maître de conférences-HDR à l'UPJV, Amiens	Rapporteur
Lise ROY	Maître de conférence à l'UPV, Montpellier	Examinatrice
Laurent URBAN	Professeur à l'UAPV, Avignon	Examineur
Hélène GAUTIER	Directrice de recherche à l'INRA d'Avignon	Directrice de thèse
Laurent GOMEZ	Ingénieur de Recherche à l'INRA d'Avignon	Directeur de thèse

Résumé

La recherche de solutions alternatives à l'usage de pesticides en production horticole est devenue une exigence de santé publique. Ainsi, l'introduction de plantes de service (PdS) est une méthode écologique qui peut contribuer à diminuer le recours à la lutte chimique contre *Myzus persicae*, le puceron vert du pêcher. L'intérêt de certaines de ces PdS réside dans leur capacité à perturber l'installation du puceron sur son hôte et/ou à diminuer ses performances grâce à l'émission des composés organiques volatils (COV). Cependant, un obstacle majeur à leur utilisation est que leur efficacité se limite à un périmètre restreint et que leur production olfactive est sensible à de nombreuses variables biotiques et abiotiques. Identifier les plantes les plus performantes, comprendre leur mode d'action et chercher à optimiser leur efficacité est donc une démarche propre à favoriser leur emploi en horticulture. L'analyse de l'environnement olfactif est une clé pour évaluer et comprendre les interactions PdS-plante hôte-puceron.

Au laboratoire, un typage avec un olfactomètre en Y a permis de sélectionner deux PdS émettrices de mélanges de COV ayant un effet répulsif marqué sur *M. persicae* : le basilic (*Ocimum basilicum*) qui agit directement sur l'insecte, et l'œillet d'Inde (*Tagetes patula*) qui agit indirectement via la plante hôte. Ainsi, les COV émis par *T. patula* rendent la plante-hôte (le poivron, *Capsicum annuum*) répulsive. En effet, lors des tests de choix, les pucerons s'orientent vers les poivrons seuls mais évitent les COV émis par des poivrons précédemment mis en culture associée pendant 5 jours avec l'œillet d'Inde. Deux composés, le (*E*)- β -farnésène (EBF) et l'eugénol ont de fortes propriétés répulsives envers *M. persicae*.

Différents facteurs peuvent affecter l'efficacité répulsive de ces plantes (climat, conduite, génétique). Nous avons comparé les COV émis selon les espèces et les chémotypes et testé l'effet répulsif individuel des COV. Cet effet « génotype » a été examiné en étudiant le comportement olfactif de *M. persicae* en présence des COV individuels émis par différents clones de Romarin (*Rosmarinus officinalis*). Cinq composés sont répulsifs, l'acétate de bornyle, le camphre, l' α -terpinéol, le terpinène-4-ol et le géranylé acétone. Seul le clone de romarin Voltz Splindler s'est avéré répulsif, alors que les autres clones contiennent également ces 5 composés répulsifs mais dans des proportions différentes. On peut donc conclure que la présence de ces composés ne suffit pas à induire une perturbation du comportement olfactif du puceron et que la concentration, la proportion, voire l'association des COV présents dans les bouquets olfactifs libérés, sont à l'origine de ces résultats contrastés.

Par la technique d'électropénétrographie (EPG), nous avons mis en évidence un deuxième effet des COV émis par *O. basilicum* au stade végétatif et par *T. patula* au stade floraison sur le puceron. Ils perturbent fortement son comportement alimentaire, en réduisant notamment la durée d'ingestion du phloème qui se traduit par une baisse des ressources nutritionnelles et aboutit à une diminution de sa fécondité. Un suivi de la fécondité sur organe détaché nous a permis de mettre en évidence l'importance du stade phénologique de la PdS sur la composition et l'efficacité du mélange olfactif libéré.

Une dernière étape de mon travail a permis de confirmer dans des conditions de cultures sous tunnels, l'effet de COV émis par ces deux PdS sur la démographie de *M. persicae* liée à une baisse de sa fécondité.

En conclusion, cette thèse a mis en évidence que les COV émis dans l'environnement d'une plante hôte par des plantes voisines peuvent fournir un service aux cultures en réduisant les performances de ravageurs tels que *M. persicae*. Nous avons montré que des variables comme le chémotype ou le stade phénologique de la PdS peuvent modifier son message olfactif et constituer un moyen d'optimiser ce service. Nous avons ainsi identifié des PdS perturbatrices et des COV répulsifs envers *M. persicae*, première étape vers le développement de la composante 'push' d'une stratégie de détournement stimulo-dissuasif visant à réduire le recours aux pesticides de synthèse contre *M. persicae*. Il reste maintenant à étudier comment la conduite de culture peut modifier l'efficacité de ces PdS et à valider ces résultats par des essais systèmes.

Mots clés : agroécologie, composés organiques volatils (COV), comportement, plantes de service (PdS), puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*), performances, répulsion

Abstract

The search for alternatives to the use of pesticides in horticultural production has become a public health requirement. Thus, the introduction of Companion plants (CP) is an ecological method that can help reduce the use of chemical control against *Myzus persicae*, the green peach aphid. The interest of some of these CP lies in their ability to disturb the installation of the aphid on its host plant and/or to reduce its performance through the emission of volatile organic compounds (VOCs). However, a major obstacle to their use is that their effectiveness is limited to a limited scope and their olfactory production is sensitive to many biotic and abiotic variables. Identifying the most efficient plants, understanding their mode of action and seeking to optimize their effectiveness is therefore an appropriate approach to promote their use in horticulture. Olfactory environment analysis is a key to assessing and understanding CP-host plant -aphid interactions.

In the laboratory, we selected with a Y-olfactometer two CP producing VOC mixtures with a marked repellent effect on *M. persicae*: basil (*Ocimum basilicum*) which acts directly on the insect, and french marigold (*Tagetes patula*) which acts indirectly via the host plant. Thus, the VOCs emitted by *T. patula* make the host plant (pepper, *Capsicum annuum*) repellent: during the choice tests, the aphids move towards the peppers alone but avoid the VOCs emitted by peppers previously grown intercropped for 5 days with the french marigold. Two compounds, (E)- β -farnesene (EBF) and eugenol have strong repellent properties against *M. persicae*. Different factors can affect the repellent effectiveness of these plants (climate, plant management, genetics). We compared the VOCs emitted by species and chemotypes and tested the individual repellent effect of VOCs. This "genotype" effect was examined by studying the olfactory behaviour of *M. persicae* in the presence of individual VOCs emitted by different clones of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Five compounds are repellent, bornyl acetate, camphor, α -terpineol, terpinene-4-ol and geranyl acetone. Only the rosemary clone Voltz Splindler was found to be repellent, while the other clones also contain these 5 repellent compounds in varying proportions. It can therefore be concluded that the presence of these compounds is not sufficient to induce a disturbance of the aphid's olfactory behaviour and that the concentration, proportion or even association of VOCs present in the released olfactory bouquets are at the origin of these contrasting results. By the electropetrography (EPG) technique, we have demonstrated a second effect of the VOCs emitted by *O. basilicum* in the vegetative stage and by *T. patula* in the flowering stage on the aphid. They strongly disrupt its feeding behaviour, in particular by reducing the duration of phloem ingestion, which results in a decrease in nutritional resources and leads to a decrease in its fertility. A fertility monitoring on detached organs has allowed us to highlight the importance of the phenological stage of the CP on the composition and efficacy of the olfactory mixture released. A final step in my work confirmed, under tunnel conditions, the effect of VOCs emitted by these two CP on the demographics of *M. persicae* due to a decrease in its fertility.

In conclusion, this thesis highlighted that VOCs emitted into the environment of a host plant by neighbouring plants can provide a service to crops by reducing the performance of pests such as *M. persicae*. We have shown that variables such as chemotype or phenological stage of the CP can modify its olfactory message and provide a way to optimize this service. We have thus identified disruptive CP and VOCs repellent to *M. persicae*, the first step towards the development of the push component of a stimulodissuasive diversion strategy to reduce the use of synthetic pesticides against *M. persicae*. It now remains to study how cultivation management can modify the effectiveness of these CP and to validate these results through system tests.

Keywords: agroecology, volatile organic compounds (VOCs), behaviour, Companion plant (CP), green peach aphid (*Myzus persicae*), performance, repulsion

Laboratoire d'accueil

INRA – Institut National de la Recherche Agronomique

UR1115 – Plantes et Système de culture Horticoles (PSH)

Equipe Régulation des Bioagresseurs par les Plantes (RBP)

Domaine Saint Paul, INRA Centre de recherche PACA, 228 route de l'Aérodrome CS 40509.
Avignon – France.

« L'agriculture devrait être la première activité de santé.

Le paysan doit précéder le médecin »

Pierre Rabhi

Aux présents, aux absents

Remerciements

Je souhaite remercier chaleureusement ceux qui ont contribué, de près ou de loin, au bon déroulement de cette thèse qui n'aurait pas été possible sans leurs aides et leurs soutiens.

Cette thèse a bénéficié du financement Tunisien qui m'a donné l'opportunité de continuer mes études en France.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mme Hélène GAUTIER, Directeur de Recherche, et mon maître de stage, M. Laurent GOMEZ, Ingénieur de Recherche à l'INRA d'Avignon, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire, me permettant, ainsi de m'impliquer dans les travaux de recherche en lien avec le sujet de ce mémoire. Ils m'ont fait confiance dès mon stage de Master 2 qui m'a permis d'acquérir des compétences en écologie chimique des pucerons et sur les techniques d'analyse des COV. Le bon déroulement de ce stage, mon intérêt pour cette thématique et pour le projet de recherche proposé, et l'excellente ambiance rencontrée au sein de l'unité PSH m'ont poussé à poursuivre mes travaux et à m'engager à faire cette thèse sous l'encadrement d'Hélène et de Laurent.

Je remercie les deux rapporteurs Sylvia ANTON et Arnaud AMELINE d'avoir bien voulu prendre le temps d'évaluer ce travail. Je suis également très reconnaissant aux membres du jury Lise ROY et Laurent URBAN, ainsi qu'aux membres de mes deux comités de thèse Alexandra SCHOENY, Emilie DELETRE, Marie-Hélène SAUGE, Michael STAUDT, Frédéric FRANCIS pour m'avoir fait profiter de leurs expériences.

J'adresse également un remerciement particulier à Arnaud AMELINE et les membres de son équipe « Écologie et Dynamique des Systèmes Anthropisés, Amiens », particulièrement Quentin CHESNAIS pour la formation sur la technique d'électropénétrographie et pour nos discussions intéressantes.

Je tiens également à remercier Guy COSTAGLIOLA, Ingénieur d'Etudes, pour m'avoir transmis ses précieuses connaissances sur les techniques d'analyses des composés volatils.

J'exprime aussi toute ma gratitude et mes très sincères remerciements à Patrick SIGNORET & Michel PRADIER, pour leur aide constante, leur sympathie et la convivialité de nos échanges toujours très intéressants.

Je remercie aussi les stagiaires qui ont participé à réussir ce travail : Hugo PACHOLSKI, Charles ROMAN, Lorraine HERRIER et Aurélien DAVOINE.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous les personnels de l'unité PSH et à toutes les personnes qui m'ont aidé lors de mes manipulations, qui m'ont permis d'améliorer mes compétences, et qui ont partagé avec moi de bons moments.

Je remercie également mes amies Camille et Blanche, doctorantes, pour leurs conseils judicieux, pour l'amitié, pour nos échanges professionnels et amicaux.

Je tiens à exprimer aussi mes plus sincères et mes très vifs remerciements à mes professeures à l'ISA de Chatt-Mèriem.

Je remercie toute ma famille de m'avoir encouragé, spécialement ma mère Naima Mabrouk qui a toujours cru en moi et mes frères Asma, Riadh, Ramzi et Sadok.

Un grand merci à tous mes chers amis et toutes les belles rencontres que j'ai pu faire dans cette merveilleuse ville, Avignon.

A l'âme de mon père Hamda DARDOURI et à celle de Marie-hélène SAUGE.

Tarek DARDOURI

Table des matières

Laboratoire d'accueil.....	iii
Remerciements	vi
Table des matières	viii
Liste des figures	xii
Liste des tableaux.....	xv
Introduction générale	1
Synthèse bibliographique	4
1.1 L'écologie chimique un moyen de lutte contre les ravageurs	4
1.2 Le puceron vert du pêcher	7
1.2.1 Taxonomie, biologie et cycle de vie.....	7
1.2.2 Dégâts et importance agronomique	9
1.2.3 Localisation et choix de la plante hôte par le puceron	10
1.2.4 Rôle des COV dans la localisation et l'acceptation de la plante hôte	11
1.2.5 Structure et spécificité du système olfactif des pucerons.....	11
1.3 Généralités sur les émissions des composés organiques volatils par les plantes.....	12
1.3.1 Nature, fonctions écologiques et diversité des composés volatils dans les végétaux	12
1.3.2 Facteurs intrinsèques qui contrôlent les émissions des composés volatils par les plantes.....	14
1.4 Utilisation des COV dans la gestion des ravageurs	16
1.4.1 Les familles de plantes de service utilisées dans la gestion des ravageurs	16
1.4.2 Rôle des COV dans la répulsion ou la perturbation olfactive	16
1.4.3 Rôle des COV sur le comportement alimentaire du puceron	19
1.4.3.1 La gustation chez les pucerons	19
1.4.3.2 Les facteurs affectant le comportement alimentaire du puceron	21
1.4.4 Modes d'action des COV dans les interactions plante – plante - insecte	22
Chapitre 2	28
Répulsion envers <i>Myzus persicae</i> (Sulzer) : mise en évidence de deux modes d'action des composés volatils des plantes aromatiques sélectionnées	
1 Introduction	30
2 Material and methods	32

2.1 Plant material.....	32
2.2 <i>Myzus persicae</i> insects.....	32
2.3 Response of aphids to companion plant volatiles (Y-tube olfactometer bioassays)	33
2.4 Collection and analysis of volatile compounds	34
2.5 Chemical standards and reagents	35
2.6 Aphids' response to individual volatile compounds (still-air olfactometer bioassays)	35
2.7. Statistical analysis.....	37
3 Results.....	37
3.1 Effect of companion plant volatiles on aphid olfactory response.....	37
3.2 Analysis of the volatile profiles of companion plants.....	40
3.3 Effect of individual compounds on aphid olfactory response	40
4 Discussion.....	47
5 References.....	52
Chapitre 3.....	57
Effets de clones de romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) sur le comportement olfactif du puceron vert du pêcher, <i>Myzus persicae</i> (Sulzer)	
1. Introduction.....	59
2. Material and methods	61
2.1. <i>Myzus persicae</i> insects	61
2.2. Plant material	61
2.3. Volatile profile characterisation.....	61
2.4. Standards and reagents.....	63
2.5. Olfactometer bioassays with <i>Myzus persicae</i>	63
2.6. Statistical analyses	65
3. Results	65
3.1. Analysis of the VOCs profiles from the rosemary clones	65
3.2. Orientation of <i>Myzus persicae</i> under the influence of olfactory bouquets from rosemary clones.....	68
3.3. Effect of individual VOCs on the orientation of <i>Myzus persicae</i>	69
4. Discussion.....	70
Chapitre 4.....	80
Effets des composés organiques volatils non-hôtes sur la fécondité et le comportement alimentaire du puceron vert du pêcher, <i>Myzus persicae</i> (Sulzer)	

1. Introduction.....	80
2. Matériels et méthodes.....	82
2.1. Les insectes.....	82
2.2. Les plantes.....	82
2.3. Effet des composés organiques volatils sur la fécondité de <i>Myzus persicae</i>	83
2.4. Analyse qualitative des composés volatils en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).....	84
2.5. Etude du comportement alimentaire de <i>Myzus persicae</i> en électro-pénétrographie (EPG).....	86
2.6. Analyses statistiques.....	88
3. Résultats.....	89
3.1. Effet de composés organiques volatils sur la fécondité journalière de <i>Myzus persicae</i>	89
3.2. Caractérisation de composés organiques volatils.....	91
3.3. Effet des composés organiques volatils de plantes de service sur le comportement alimentaire du <i>M. persicae</i>	91
4. Discussion.....	96
5. Conclusion.....	100
6. Références.....	101
Chapitre 5.....	106
Effets des bouquets volatils émis par des plantes de basilic (<i>Ocimum basilicum</i>) et d'œillet d'Inde (<i>Tagetes patula</i>) sur les performances reproductives de <i>Myzus persicae</i> (Sulzer) sur poivron sous- tunnels	
1. Introduction.....	106
2. Matériels et méthodes.....	108
2.1. Les pucerons.....	108
2.2. Les plantes.....	108
2.3. Suivi de paramètres démographiques de <i>M. persicae</i>	109
2.4. Caractérisation des composés volatils émis par les plantes de service (sous tunnels).....	113
2.5. Suivi météorologique.....	114
2.6. Analyses statistiques.....	115
3. Résultats et discussion.....	115
3.1. Effets des composés volatils de plantes de service sur des paramètres physiologiques de <i>M. persicae</i>	115

3.2. Caractérisation des composés volatils émis par les plantes de service au cours des expérimentations.....	120
Discussion générale.....	131
Conclusions & perspectives.....	139
Références.....	144

Liste des figures

Figure 1.1 : les différents types de plantes de service qui peut être utilisées pour améliorer la gestion de ravageurs, tels que le puceron dans les cultures.	6
Figure 1.2 : Cycle biologique annuel de puceron vert du pêcher <i>Myzus persicae</i> (Sulzer)	9
Figure 1.3 : Nombre de publications annuelles en rapport avec les composés organiques volatils répulsifs contre les pucerons selon des recherches	17
Figure 1.4 : Les pièces bucales d'un puceron	20
Figure 1.5 : Structure d'une feuille	21
Figure 2.1. Schematic representation of the device used for (A) , dynamic sampling of VOCs from living companion plants using the headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) technique and for (B) , to study the effect of plant volatile compounds on <i>Myzus persicae</i> olfactory behavior using the Y-tube olfactometer. (C) , Odor source placed in two airtight glass cages.	34
Figure 2.2. Schematic representation of the vertical tube still-air olfactometer used to study the effect of individual volatile compounds on <i>Myzus persicae</i> olfactory behavior.	37
Figure 2.3. Olfactory behavioral responses of <i>Myzus persicae</i> to living plant odors on a Y-tube olfactometer	40
Figure 2.4. Olfactory behavioral responses of <i>Myzus persicae</i> to individual compounds at three concentrations (0.01, 0.1, and 1%) and two different times (10 and 20 min) in a still-air olfactometer	47
Figure 3.1. Device for static sampling of VOCs emitted from rosemary clones using the headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) technique.	63
Figure 3.2. Dual-choice olfactometer used for the olfactometry bioassays conducted with <i>Myzus persicae</i>	65
Figure 3.3. Principal component analysis obtained from the relative percentages of VOCs from rosemary clones: (A) – correlations circle of the VOCs variables on the two axes F1 and F2; (B) – projection of the 30 samplings of VOCs from the five rosemary clones	68

Figure 3.4. <i>Myzus persicae</i> responders' orientation in the presence of a rosemary clone in one chamber of the olfactometer (grey bars) and control in the other one (empty chamber; white bars).	69
Figure 3.5. <i>Myzus persicae</i> responders' orientation in the presence of a volatile compound (10 µL at 1%) in one chamber of the olfactometer (grey bars) and control in the other one (10 µL of ethanol; white bars).	70
Figure 4.1 : Exemples de tests de fécondité. A : feuille de poivron seule (témoin); B : feuille de poivron avec : 1. feuilles d' <i>O. basilicum</i> ; 2. feuilles de <i>Mentha piperita</i> ; 3. Fleur de <i>T. patula</i> , variétés Bonita Bolero ; 5. Fleur de <i>T. patula</i> , variété Nana ; 5. feuilles de <i>T. patula</i> , variété Nana.	84
Figure 4.2 : Représentation synoptique du protocole de suivi de la fécondité de femelles de <i>M. persicae</i>	85
Figure 4.3 : Prélèvement des composés volatils par micro-extraction en phase solide en mode espace de tête statique « ou Static Headspace » (HS-SPME)	85
Figure 4.4 : Dispositif de prélèvement dynamique des composés organiques volatils émis par des plantes de service entières par SPME.....	86
Figure 4.5 : Dispositif d'électropénétrographie (A). Les ondes enregistrées (B) sont : F ; stress mécaniques (déraillement des stylets) ; G ; stress trophiques (ingestion de sève) ; NP ; non pénétration des stylets ; C ; recherche (trajets extracellulaires) ; E ; alimentation phloémienne (E1 : salivation ; E2 : ingestion).....	88
Figure 4.6 : Fécondité journalière de femelles de <i>Myzus persicae</i> d'âge compris entre 8 et 12 jours et placées sur une feuille de poivron à proximité ou non de feuilles (A, C, E, G, I, J) ou de fleurs (B, D, F, H) de plantes de service (moyenne ± erreur-standard)	91
Figure 5.1 : Photographies représentant les 3 plantes présentes dans le cadre de nos expérimentations (de gauche à droite) : A : Poivron (<i>Capsicum annuum</i>), B : Basilic (<i>Ocimum basilicum</i>), C : Œillet d'inde ou Tagète (<i>Tagetes patula</i>).	109
Figure 5.2 : Plan et périodes expérimentaux.....	112
Figure 5.3 : <i>clip-cages</i> positionnées sur des feuilles d'une plante de poivron	113
Figure 5.4 : Prélèvement de COV sur une plante de service.....	115
Figure 5.5 : Fécondité journalière de femelles de <i>Myzus persicae</i> (moyenne ± erreur-standard) sur des plantes de poivron (en bleu) à proximité ou non de plantes de service <i>O. basilicum</i> (en vert) ou <i>T. patula</i> (en orangé)	118

Figure 5.6 : Évolution des températures moyennes journalières sous tunnel durant les 3 expériences.....	119
Figure 5.7 A : Suivi sur 24 h (nycthémère) des composés volatils (moyenne \pm écart type) émis par <i>O. basilicum</i> réalisé au cours de l'expérience 1 (n=3)	123
Figure 5.7 B : Suivi sur 24 h (nycthémère) des composés volatils (moyenne \pm écart type) émis par <i>T. patula</i> réalisé au cours de l'expérience 1 (n=3).....	124
Figure 5.8 : Évolution du climat sous tunnel pendant le nycthémère lors du prélèvement de COV du 6 avril.....	125
Figure 5.9 : Différences des émissions (moyenne \pm écart type) entre les 3 expériences (n=18)	126

Liste des tableaux

Table 2.1. Relative percentages (mean \pm standard deviation) of VOCs emitted by companion plant species. The relative area of each compound was calculated by dividing the peak area of this compound by the total peak area (n = 4). VOCs are listed according to their retention time (RT).....	41
Table 3.1. Relative percentages (mean \pm standard deviation) of the components of the VOC mixtures released by the rosemary clones studied, sampled by SPME and identified by GC-MS (n = 6).	66
Tableau 4.1 : Composition des mélanges de COV libérés par <i>Tagetes patula</i> variété Nana	93
Tableau 4.2 : Composition des mélanges de COV libérés par <i>Ocimum basilicum</i>	94
Tableau 4.3 : Paramètres caractérisant le comportement alimentaire de <i>Myzus persicae</i> placé sur des plantes de poivron en présence ou non (témoin) de plantes de service <i>O. basilicum</i> et <i>T. patula</i> . Les paramètres (moyennes \pm erreur type) sont calculés à l'aide du logiciel « EPG- Calc » sur 8h d'enregistrement en électropénétrographie réalisés sur 35 pucerons par modalité.	95
Table 5.1 : Paramètres caractérisant la démographie de <i>Myzus persicae</i> placé sur des plantes de poivron en présence ou non (témoin) de plantes de service <i>O. basilicum</i> et <i>T. patula</i> . Les paramètres (moyennes \pm erreur type) sont calculés à l'aide du logiciel « DEMP 1.5.4».	116

Liste des abréviations

- ADS : survie adulte
- BMVY : virus de la jaunisse modérée de la betterave
- CMV : virus de la mosaïque du concombre
- COV : composés organiques volatils
- CP : Companion plant
- CRIEPPAM: Centre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales
- CSP : *chemosensory protéines* (protéines chimiosensorielles)
- DEET : N,N-diethyl-3-méthylbenzamide
- DF : fécondité journalière
- DT : temps de doublement de la population
- E2 : phases d'ingestion de sève élaborée
- E1 : phases de salivation
- EAG : électroantennographie
- EBF : (*E*)- β -farnésène
- EPG : Electropénétrographie
- E: Esselte (clone de romarin)
- EI : electron impact mode
- GLVs : *Green Leaf Volatiles* (substances volatiles des feuilles vertes)
- GS-MS : Gas chromatography with mass spectrometry detector (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse)
- HS-SPME: headspace solid phase micro-extraction
- HIPVs : herbivore-induced plant volatiles (volatils émis par une plante suite à une attaque d'herbivore)
- INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
- IPM : Integrated Pest Management (lutte intégrée)
- MEP : voie du méthylerythritol phosphate
- MVA : voie de l'acide mévalonique
- N: Nonza (clone de romarin)
- NIST: National Institute of Standards and Technology
- np : phase de non-pénétration des stylets
- OBP : *odorant-binding protéines*
- P: Pigette (clone de romarin)
- PCA: Principal Component Analysis (Analyse en composantes principales)

PDMS/DVB : Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene
PdS : plantes de service
ppm, ppb : partie par million, partie par billion
PPI, Pepper (*C. annuum*) previously intercropped;
Pr : nombre d'insertion de stylets
PRP : période pré-reproductive
r.h. : relative humidity
Ri : Repulsion index (indice de répulsion)
RT : retention time (temps de rétention)
SB : Sudbery Blue (clone de romarin)
SDDS : *stimulo-deterrent diversionary strategies* (détournement stimulo-dissuasif)
SPME : solid phase micro-extraction
VOCs, volatile organic compounds
VS: Voltz Splindler (clone de romarin)

Introduction générale

Introduction générale

Contexte de l'étude

Parmi les nombreux arthropodes herbivores décrits, les pucerons, notamment, le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera : Aphididae), restent parmi les plus dangereux pour les cultures. Les caractéristiques biologiques de *M. persicae* et son cycle de vie en font un ravageur très nuisible difficile à combattre. En plus de sa polyphagie, il est à l'origine de dégâts considérables sur les cultures, principalement par le prélèvement de sève élaborée qui se traduit par un dépérissement de la plante (Blackman and Eastop, 2000) et par la transmission de plusieurs phytovirus (van Emden *et al.*, 1969; Brault *et al.*, 2010). Ceci aboutit à des pertes, économiquement énormes, estimés à des millions de dollars (van Emden *et al.*, 1969; Blackman and Eastop, 2000).

Depuis toujours, les producteurs ont tenté de maintenir les populations de ce ravageur au-dessous d'un seuil économiquement acceptable. Encore aujourd'hui, la lutte à l'aide de produits phytosanitaires demeure le moyen de lutte le plus utilisé malgré ses limites et les problèmes liés à son utilisation : spécificité insuffisante, phénomène de résistance, déséquilibre écologique, contamination de l'environnement, toxicité, lien établi avec certaines maladies de l'homme (Matson *et al.*, 1997; Bass *et al.*, 2014). Outre ces désagréments liés aux pesticides, la simplification et l'intensification des agrosystèmes, a généré plusieurs problèmes liés à la perte drastique de biodiversité. Divers services éco-systémiques ne sont plus mobilisables dans les agrosystèmes conventionnels, y compris les mécanismes naturels de contrôle des bio-agresseurs (Thies and Tscharrntke, 1999; Tilman *et al.*, 2002; Haaland *et al.*, 2011) de plus, l'installation et la propagation des ravageurs sont favorisées par rapport à leurs antagonistes (Hambäck *et al.*, 2000; Iverson *et al.*, 2014).

Conscients de cette problématique et des enjeux agricoles, la communauté scientifique, les acteurs politiques (plan ECOPHYTO 2, stratégie Europe 2020) et les agronomes s'investissent pour développer de nouvelles approches plus écologiques. Ces initiatives visent d'une part à limiter les risques par la diversification des systèmes horticoles et l'intensification écologique (Altieri and Letourneau, 1982; Vandermeer *et al.*, 1998), et d'autre part à mettre en place des méthodes et des pratiques préventives qui font du recours aux pesticides une mesure complémentaire et non-indispensable (Altieri and Letourneau, 1982; Penvern *et al.*, 2010).

Différentes approches ont été explorées afin d'assurer une agriculture durable, économiquement compétitive et écologiquement intensive. On peut évoquer l'emploi de variétés résistantes, l'utilisation de bio-pesticides, l'amélioration de la protection des plantes par des pratiques culturales, l'utilisation des auxiliaires, etc. (Gurr and Kvedaras, 2010; Stenberg *et al.*, 2015; Stenberg, 2017). Une des approches proposée est l'application de la

stratégie de détournement stimulo-dissuasif appelée « *push-pull* » (Pickett *et al.*, 2014). Cette stratégie basée sur des combinaisons d'actions attractives et d'actions répulsives (Song *et al.*, 2014), permet de repousser les pucerons perturbés loin de la culture, vers des plantes pièges plus attractives que la culture à protéger (Malézieux *et al.*, 2009; Mutiga *et al.*, 2010). Ces actions peuvent être assurées par des plantes dites « plantes de service » (PdS), les plantes attractives étant placées en bordure de la parcelle et les plantes répulsives ou perturbatrices associées aux plantes à protéger (en cultures intercalaires) (Mutiga *et al.*, 2010; Ben Issa *et al.*, 2017b). L'introduction de PdS dans les systèmes de cultures présente une alternative prometteuse pour maintenir les populations de ravageurs en dessous d'un seuil de nuisibilité (Hassanali *et al.*, 2008; Finch and Collier, 2012; Parker *et al.*, 2013; Kahn *et al.*, 2017). Ces plantes non-hôtes ne présentent aucun intérêt pour le ravageur. Leur présence en association avec des plantes-hôtes rend même l'environnement défavorable à son installation et au développement de sa population, particulièrement, par une activité répulsive et/ou perturbatrice des COV qu'elles émettent (Heil and Silva Bueno, 2007; Zhang and Chen, 2015). Elles peuvent aussi agir indirectement, en attirant et en favorisant la présence et le développement des auxiliaires (Song *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2014; Ben Issa *et al.*, 2017b). Toutefois, ce mode de cultures associées se heurte à un manque de validations expérimentales, notamment du fait de la difficulté de réaliser des essais systèmes (Matson *et al.*, 1997; Finch and Collier, 2012; Deletre *et al.*, 2016). Ainsi, le potentiel des PdS à lutter contre la prolifération des ravageurs et les conséquences écologiques et économiques de leur usage sont encore mal appréciés. Ceci pénalise leur introduction dans les systèmes horticoles, d'autant que la production scientifique à ce sujet reste encore insuffisante (Finch and Collier, 2012). Or, si on veut voir ce modèle cultural se développer, il paraît essentiel de comprendre et d'apporter des éléments objectifs sur sa pertinence et son application (Altieri and Letourneau, 1982; Vandermeer *et al.*, 1998). Mais la comparaison de systèmes de cultures nécessite beaucoup de temps (Parolin *et al.*, 2012a). Le développement d'expérimentations en environnement contrôlé doit faciliter cette démarche exploratoire (Tang *et al.*, 2012). En effet, l'étude de l'écologie chimique des pucerons en présence des PdS dans des conditions contrôlées donne la possibilité d'évaluer le potentiel d'une PdS et de ses modes d'action (Tang *et al.*, 2012). Ainsi, ces informations peuvent nous donner les clés d'une utilisation raisonnée et performante de ces PdS pour lutter contre les pucerons en systèmes de culture horticoles

Cette thèse est une contribution au développement de la stratégie de lutte « *push-pull* » contre *M. persicae*, le puceron vert du pêcher. Ainsi les travaux présentés dans ce document, concernent la composante « *push* », dans la mesure où ils portent sur les effets répulsifs ou perturbateurs des COV émis par des plantes aromatiques sur le comportement et les performances du *M. persicae*.

Introduction générale

Nos travaux s'inscrivent dans la continuité d'un premier travail réalisé par [Ben Issa et al.](#) entre 2010 et 2014, au sein de l'unité « Plantes et Système de cultures Horticoles » à l'INRA d'Avignon. En enceinte climatique (conditions contrôlées), ils ont comparé l'effet de 13 plantes aromatiques sur le comportement du puceron *M. persicae* élevé sur le poivron (*Capsicum annuum*). Ils ont mis en évidence l'implication des COV émis par les PdS dans des mécanismes conduisant à la répulsion et/ou à la diminution de l'oviposition des pucerons ([Ben Issa et al., 2016](#)). L'efficacité des PdS les plus prometteuses (romarin, tagète, basilic) a ensuite pu être confirmée dans des conditions de cultures moins confinées (sous-tunnels), mais seulement dans un périmètre restreint autour de la PdS (<0,5 m) ([Ben Issa et al., 2017a](#)). Ce dernier point affecte l'intérêt de ce mode de lutte et constitue un frein indéniable à son adoption, notamment en plein champ, par des producteurs confrontés à des contraintes agronomiques et économiques. Dès lors, établir l'efficacité d'une PdS ne peut constituer qu'une première étape, la suivante consistant à l'optimiser autant que faire se peut. Les voies à explorer pour favoriser la production de COV d'intérêt sont connues et tiennent du génotype, du stade phénologique, de l'environnement ou encore des pratiques culturales. Cependant la connaissance des molécules chimiques impliquées et la compréhension des mécanismes contribuant à l'efficacité de ces PdS peuvent également être un outil préalable de sélection et d'optimisation. C'est en ce sens que nous avons orienté nos recherches.

Ce travail commence par une synthèse bibliographique en trois parties. La première partie rassemble différentes études utilisant l'application de COV répulsifs ou perturbateurs dans l'amélioration de la gestion des pucerons. La seconde présente la biologie du puceron, son importance comme ravageur des cultures, le mode de sélection de sa plante hôte et sa capacité à percevoir des signaux olfactif. Enfin, la troisième fait l'inventaire des COV produits par les plantes et des facteurs modulant leurs émissions, leur rôle en écologie chimique dans les interactions entre plantes et insectes et leurs modes d'action. Cet état de l'art permettra d'introduire mon sujet de thèse et les questions de recherche qui ont guidé mes travaux.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1.1 L'écologie chimique un moyen de lutte contre les ravageurs

L'écologie chimique s'intéresse au rôle des composés chimiques dans des fonctions biologiques et écologiques sur les êtres vivants. Aujourd'hui, l'écologie chimique est de plus en plus présente dans les programmes de lutte contre divers arthropodes nuisibles pour l'homme, les animaux et les cultures. Au-delà de la recherche scientifique, la compréhension et le décryptage de l'écologie chimique des insectes peuvent offrir des opportunités pour développer et améliorer des éco-méthodes pour lutter contre les bio-agresseurs (*e.g.* utilisation des phéromones, les *antifeedants*, etc.) (Wyatt, 2018; Koul, 2008; Mamoci *et al.*, 2012; Fountain *et al.*, 2017). Un volet important de ce vaste domaine de recherche consiste à l'exploitation de composés organiques volatils (COV) répulsifs ou perturbateurs pour gêner et/ou éloigner les insectes nuisibles (Reisenman *et al.*, 2016). Cette méthode, très ancienne, remonte à des milliers d'années (*e.g.* la fumée et différentes huiles de plantes) (Dolan and Panella, 2011; Peterson and Coats, 2001). Longtemps nourries d'observations empiriques, les études sur les répulsifs ont beaucoup évolué et se sont multipliées depuis la découverte en 1953 du DEET (N,N-diethyl-3-méthylbenzamide), le composé répulsif antimoustique sans doute le plus utilisé au monde. Plusieurs composés naturels et synthétiques ont été définis comme des insectifuges ou des agents perturbateurs des performances des insectes (Nerio *et al.*, 2010).

Pour diffuser des COV dans les systèmes de cultures une approche consiste à utiliser des diffuseurs contenant une source de COV (par exemple, des extraits de plantes, des huiles essentielles, des composés synthétiques, etc.) (Lamy *et al.*, 2016). Cette approche a montré son efficacité contre plusieurs insectes (Witzgall *et al.*, 2008). Néanmoins, bien que son application présente certains avantages (*e.g.* pas de perte de surface cultivée, possibilité d'utilisation sur des grandes exploitations), son emploi, notamment en plein champs, nécessite beaucoup de technicité (*e.g.* connaissance sur la concentration adéquate, contrôle de la cinétique de diffusion, etc.) (Deletre *et al.*, 2016). Outre le fait que sa réalisation est délicate, le coût de cette technique est très élevé (Birkett and Pickett, 2003). Une autre approche consiste à trouver des plantes efficaces, qui émettent naturellement les COV d'intérêt sur de longues périodes et jouent le rôle de diffuseurs naturels (Castro *et al.*, 2017). Ces plantes peuvent alors être intercalées ou associées avec les plantes à protéger (Eilenberg *et al.*, 2001; Parolin *et al.*, 2012a).

L'association de culture (le compagnonnage), est une stratégie ancienne, qui consiste à cultiver dans le même temps et le même espace deux ou plusieurs espèces végétales différentes (Gliessman, 1984; Malézieux *et al.*, 2009). Les plantes utilisées pour cette stratégie sont dites des plantes « de service » (PdS). Ces sont des plantes secondaires, à valeur agronomique autre que strictement marchande (Parolin *et al.*, 2012a; Parker *et al.*, 2013), qui favorisent l'espèce végétale cultivée (Gliessman, 1984; Moreno and Racelis, 2015). Plusieurs types de PdS ont été définies dans la littérature en fonction des services et des avantages qu'elles offrent à la culture tels que la gestion des ravageurs, l'amélioration de la fertilité des sols, la diminution des adventices, la lutte contre les nématodes, etc. (Brennan, 2013). Parmi ces PdS, nous étudierons dans cette thèse, celles ayant le potentiel de réduire les effets néfastes des pucerons. Contrairement à une monoculture, les cultures mixtes permettent de réduire les attaques des plantes cultivées par les herbivores en réduisant leur nombre et en favorisant la présence de leurs ennemis naturels (Shrivastava *et al.*, 2010). Elles favorisent leur régulation (1) « *Bottom-up* » par la diminution de la disponibilité en ressource alimentaire et la complexité de localisation de la plante-hôte (densité réduite des plantes adéquates, diversité des stimuli visuels et olfactifs) et (2) « *Top-down* » en favorisant leur contrôle par l'action des ennemis naturels (Guerrieri and Digilio, 2008; Rosenblatt and Schmitz, 2016). Une méta-analyse, réalisée par (Andow, 1991) sur 201 études testant 287 espèces de ravageurs, a montré que pour la majorité des observations, la densité de ravageurs était beaucoup plus importante dans des parcelles en monoculture que dans celles en polyculture. Ainsi, plusieurs publications récentes ont mentionné aussi que l'association des PdS avec les cultures améliore le contrôle de divers bioagresseurs (Broad *et al.*, 2008; Bandara *et al.*, 2009; Ratnadass *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2012; Parolin *et al.*, 2012a; Ben Issa *et al.*, 2017b). Par exemple, l'effet répulsif de la lavande associée à une culture de thé a permis de réduire significativement les dégâts de la cicadelle verte, l'*Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae) (Zhang *et al.*, 2014b). De même, l'attaque de la mouche de la carotte (*Psila rosae*) est diminuée en présence des COV émis par de jeunes plantes d'oignon (Uvah and Coaker, 1984). Les COV produits par des plantes de poireau peuvent protéger les plantes de haricots contre les attaques d'*Ophiomyia phaseoli* (Tryon) (Bandara *et al.*, 2009). La ponte de teigne des choux (*Plutella xylostella* L.) peut être perturbée dans une culture de choux de Bruxelles (*Brassica oleracea gemmifera* L.) par la présence de la sauge (*Salvia officinalis* L.) ou de thym (*Thymus vulgaris* L.) (Dover, 1986).

Mais autant les recherches dans ce domaine ont bien progressé sur certains insectes nuisibles, comme les moustiques, les tiques et les puces, ce volet reste sous-exploité sur les ravageurs des cultures (Peterson and Coats, 2001). L'application agronomique des COV issus de plantes dans la gestion des ravageurs, tels que les pucerons, a rarement été prise en considération malgré son grand intérêt. En effet, des chercheurs ont démontré l'efficacité de certains COV répulsifs ou perturbateurs contre le puceron (Kogel *et al.*, 2000). La plupart des

travaux évaluant les propriétés répulsives des plantes ont utilisé leurs extraits (*e.g.* huiles essentielles) en conditions contrôlées et finalement peu d'études ont été réalisées avec des plantes entières en condition de culture (Ben Issa *et al.*, 2016; Ben Issa *et al.*, 2017a). Comme alternative aux pesticides, il reste donc nécessaire de réaliser des expérimentations validant les conditions d'utilisation et de diffusion des COV pour favoriser leur introduction dans les cultures.

Les PdS à introduire dans les systèmes de culture pour réguler les ravageurs peuvent

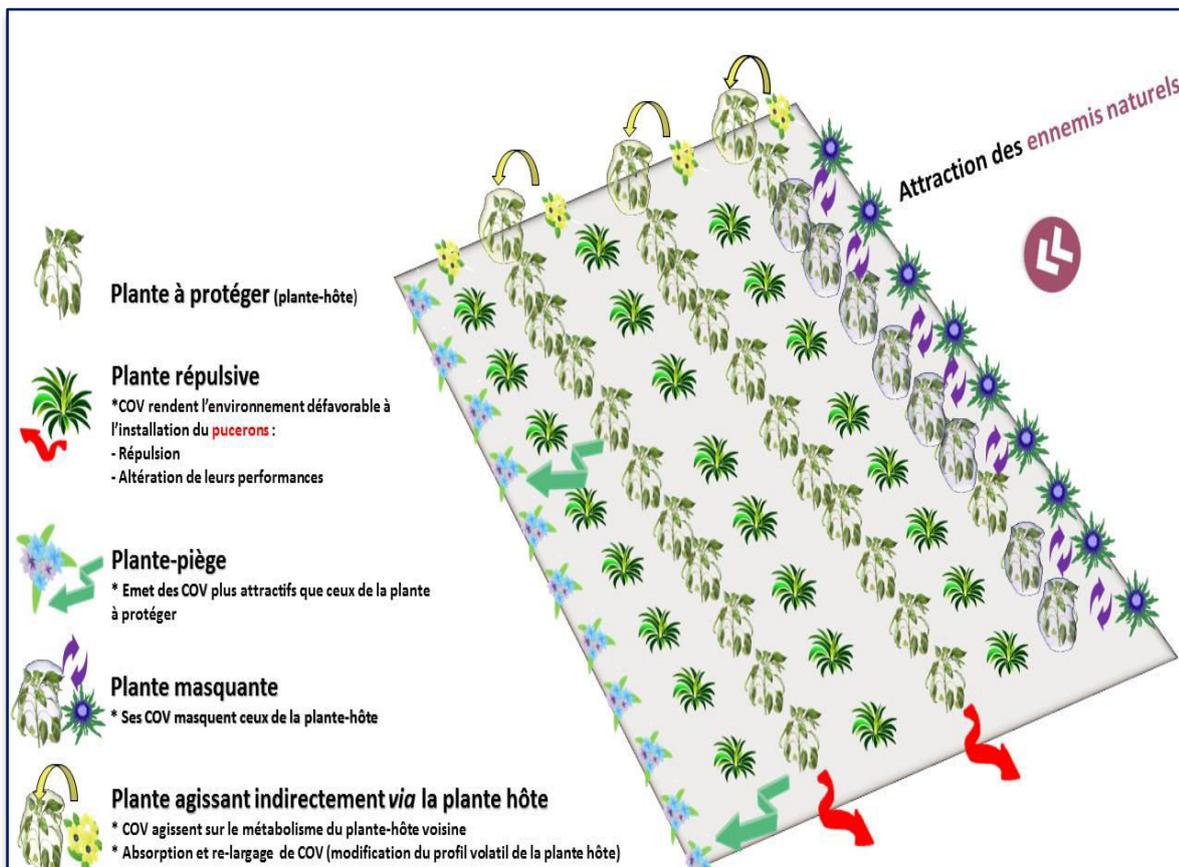


Figure 1.1 : les différents types de plantes de service qui peut être utilisées pour améliorer la gestion de ravageurs, tels que le puceron dans les cultures.

Elles peuvent servir de plantes pièges en attirant le ravageur en bordure de parcelle, de plantes répulsives, de plantes masquantes ou à perturber le puceron en modifiant les plantes-hôtes. Leurs modes d'action liés aux composés volatils qu'elles émettent vont produire différents effets sur les ravageurs (*e.g.* perturbation, répulsion, attraction ou dissimulation) et défavoriser son installation et sa propagation dans la culture à protéger. L'exploitation du potentiel des COV des PdS pour diminuer l'intensité des attaques des ravageurs est devenue un sujet de plus en plus intéressant, notamment dans le développement des approches écologiques comme la stratégie « *push-pull* » (répulsion-attraction) or « *stimulo-deterrent diversionary strategies (SDDS)* » (détournement stimulo-

dissuasif) (Malézieux *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2012; Pickett *et al.*, 2014; Eigenbrode *et al.*, 2016; Lamy *et al.*, 2017). Le principe majeur de cette stratégie est résumé dans son nom ; éloigner le ravageur de la plante à protéger et le diriger vers d'autres plantes sans intérêt agronomique. La composante « Pull » de cette stratégie est assurée par des COV attractifs des plantes-hôte (les plantes pièges plus attractives que la plante à protéger sont placées en bordure) (Ben Issa *et al.*, 2017b). La deuxième composante de cette stratégie (« Push ») permet de repousser et perturber l'installation des pucerons. Elle recourt à des COV répulsifs ou perturbateurs, qui pourraient impacter négativement le comportement et les performances des pucerons et l'empêcher de s'installer et de coloniser la culture à protéger (Kogel *et al.*, 2000; Maia and Moore, 2011). Pour comprendre ces interactions plantes – insectes, je vais présenter la biologie du ravageur qui nous a intéressé durant cette étude, le puceron vert du pêcher *Myzus persicae*, et l'état des connaissances sur son système d'olfaction, puis je présenterai les plantes de services qui sont connues pour leurs propriétés répulsives et enfin les modes d'action des COV sur le puceron.

1.2 Le puceron vert du pêcher

1.2.1 Taxonomie, biologie et cycle de vie

Les pucerons (classe des Insecta) sont des Hémiptères phloémophages, qui font partie du sous-ordre des Sternorrhynques, de la super famille des Aphidoidea et sont répartis en trois familles : les Aphididae, les Adelgidae et les Phylloxeridae. Les Aphididae regroupent la plupart des pucerons. Sous différentes conditions environnementales, plus de 4000 espèces sont décrites dans le monde entier incluant 700 espèces en France. La grande majorité des aphides sont des monophages et se nourrissent spécifiquement sur des hôtes appartenant à la même espèce végétale. Les autres sont des oligophages (associés à quelques espèces) ou des polyphages qui se nourrissent sur une vaste gamme des végétaux appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces derniers sont minoritaires (Blackman and Eastop, 2000).

Nous étudions dans cette thèse un des pucerons les plus dangereux pour les cultures, le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer). Cette espèce de petite taille (1.2 à 2.1 mm) est très répandue dans le monde, particulièrement, dans les régions tempérées. Plusieurs caractéristiques biologiques en font un puceron difficile à combattre, notamment sa polyphagie. Cette espèce, peut se développer sur nombreuses plantes hôtes (près de 400 espèces) qui appartiennent à 40 familles botaniques dont plusieurs sont des plantes cultivées. Ce puceron alterne entre hôtes primaires (souvent des plantes ligneuses du genre *Prunus* : le pêcher ou le prunier) et divers hôtes secondaires (plantes herbacées). Parmi ces dernières, un nombre important d'espèces maraîchères, pomme de terre, tomate, laitue, chicorée, épinard, chou, carotte, concombre, courgette, melon, et poivron cultivées en plein champ et sous abri (serre, tunnel)(van Emden *et al.*, 1969).

Synthèse bibliographique

M. persicae est un insecte hétérométabole (à métamorphose incomplète). Sa phase pré-reproductive (4 stades larvaires de L1 à L4) dure entre 7 à 10 jours. Il est hémimétabole ; ses différents stades larvaires ressemblent au stade adulte. La durée de vie de *M. persicae* est en moyenne de 20 à 30 jours (Dixon, 1997). Cependant, la durée pré-reproductive et la durée reproductive (stade imago) varient en fonction des conditions climatiques, de la disponibilité en ressources alimentaires et divers autres facteurs.

En lien étroit avec le spectre de leurs plantes-hôtes, un cycle de vie (figure 2.1), holocyclique, hétérociclique et flexible, permet à *M. persicae* de s'adapter aux diverses conditions et contraintes environnementales de son milieu (e.g. conditions climatiques défavorables, surpopulation, limitation des ressources, attaques des prédateurs, etc.) (Kindlmann *et al.*, 2010).

Le cycle de développement de *M. persicae* se caractérise par un mécanisme particulier de reproduction (polyphénismes) qui lui donne la propriété de se reproduire de deux façons alternées : sexuée et asexuée (Hardie, 2017).

En automne, *M. persicae* a une phase de reproduction sexuée (reproduction ovipare). Des mâles et des femelles s'accouplent et pondent leurs œufs sur une hôte primaire (diverses espèces ligneuses du genre *Prunus*). L'œuf rentre en diapause constituant une forme de résistance aux conditions défavorables de l'hiver. Au moment du débourrement des bourgeons (en printemps) un nouveau cycle de vie débute, les œufs éclosent et donnent naissance à des femelles parthénogénétiques appelées fondatrices. Ensuite, une phase asexuée (prolifération par parthénogenèse) domine son cycle où les générations ne comptent que des femelles parthénogénétiques. Cette parthénogenèse (reproduction larvipare) lui permet de se multiplier et de former très rapidement des colonies (une centaine de larves par femelle) (Hullé *et al.*, 1998; Kindlmann *et al.*, 2010).

M. persicae possède des caractéristiques biologiques spécifiques qui lui donnent la capacité de produire deux types de morphes (*i.e.* aptères et ailés). Les individus aptères ont un rôle essentiellement reproductif et assurent la survie de leur population dans des conditions favorables. Au contraire, les individus ailés assurent la dispersion et la colonisation de nouvelles plantes. Généralement, lorsque la densité de leurs individus augmente et les conditions deviennent inappropriées, des femelles ailées apparaissent et migrent vers d'autres plantes adéquates et vers des hôtes secondaires pour établir de nouvelles colonies. *M. persicae* a plusieurs générations par an (plurivoltins) (Kindlmann *et al.*, 2010; Blackman and Eastop, 2000).

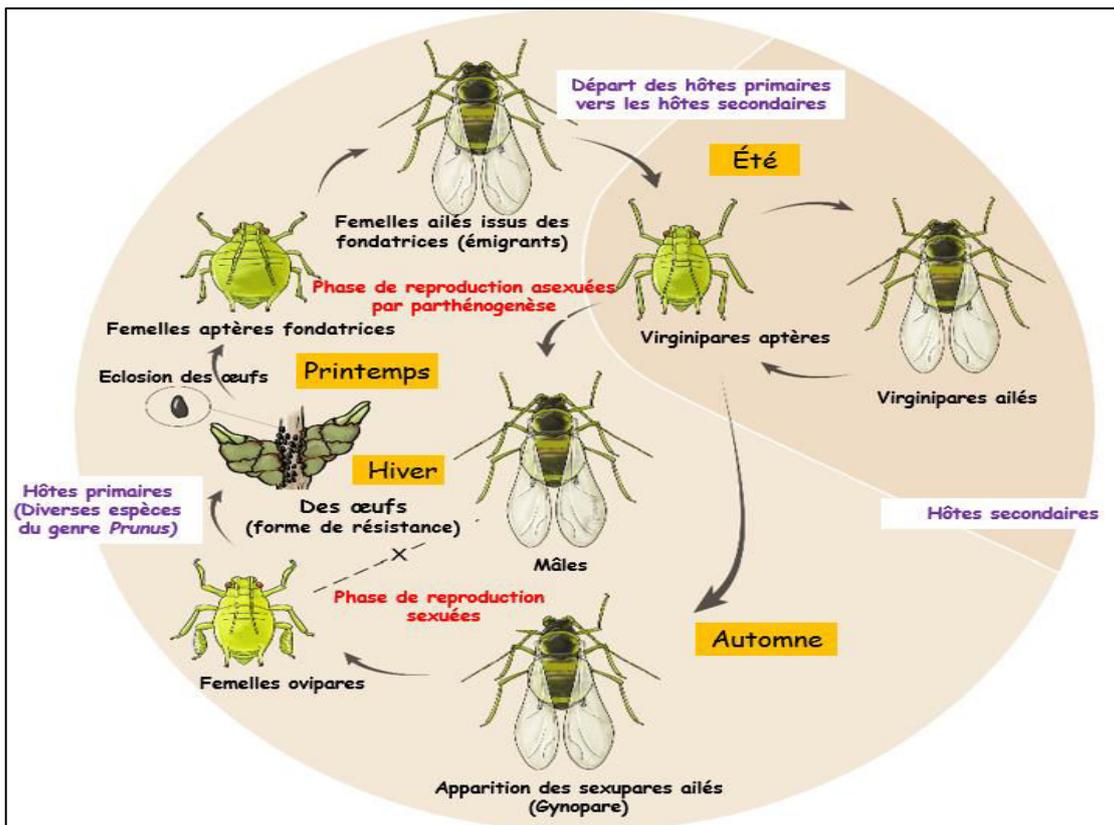


Figure 1.2 : Cycle biologique annuel de puceron vert du pêcher *Myzus persicae* (Sulzer) : holocyclique ; cycle biologique complet caractérisé par une phase sexuée en alternance avec une phase asexuée et hétérocyclique ; alternance entre hôtes primaires et hôtes secondaires appartenant à des familles botaniques différentes (modifiées à partir de <http://www.mesaschumacher.com/entomology-2/>).

1.2.2 Dégâts et importance agronomique

Près de 25 % des espèces végétales terrestres peuvent être attaquées par les pucerons (Dixon, 1998). Par le prélèvement de la sève élaborée, le puceron s'ajoute comme un puits supplémentaire pour la plante et perturbe ses relations source-puits. Ce mode d'alimentation phloémien induit des dégâts difficilement détectables au début de l'attaque mais qui deviennent très visibles avec l'extension des colonies. Les piqûres (perforations dans les tissus végétaux), les prélèvements extensifs de la sève phloémienne et l'injection de salive toxique provoquent des stress mécaniques et chimiques chez les plantes attaquées. Ceci engendre un déséquilibre physiologique profond qui se manifeste souvent sous forme de modifications morphologiques comme l'enroulement des feuilles qui réduit l'activité photosynthétique, la dépigmentation, la crispation, la déformation et l'apparition de taches nécrotiques (Goggin, 2007; Dedryver *et al.*, 2010). La croissance de la plante peut en être perturbée et

significativement freinée, ce qui peut aboutir à un flétrissement général (van Emden *et al.*, 1969).

D'autres dégâts peuvent être causés indirectement par le puceron. Ainsi, la production de miellat sur les feuilles peut entraîner l'obstruction des stomates, empêcher la respiration et réduire la photosynthèse (Comeau, 1992). Le miellat favorise aussi l'apparition et le développement des champignons saprophytes, agents de fumagines, ce qui rend les produits impropres à la commercialisation.

D'autre part la transmission et la dissémination de maladies virales par les pucerons peuvent engendrer des dégâts très dangereux contre lesquels on ne dispose d'aucun moyen de lutte (Brault *et al.*, 2010). *M. persicae*, qui fera l'objet de notre étude, est capable de transmettre une centaine des phytovirus sur plusieurs plantes cultivées (Blackman et Eastop, 1984, Nault, 1997), dont la Sharka du prunier ou du pêcher reste la plus redoutable. *M. persicae* peut aussi transmettre divers virus aux plantes herbacées, comme la mosaïque de la pomme de terre (virus Y), la mosaïque du concombre (CMV) et la jaunisse modérée de la betterave (BMYV) (Dancewicz et Gabry, 2008 ; Pavela *et al.*, 2009). La polyphagie de cette espèce amplifie les risques de transmission des phytovirus à différentes échelles (parcelle, région, pays).

1.2.3 Localisation et choix de la plante hôte par le puceron

Après la dispersion, le puceron, caractérisé par un vol lent, cherche pendant plusieurs heures de nouvelles plantes pour assurer ses besoins nutritionnels et sa reproduction. Durant cette phase de localisation de sa plante-hôte et de son habitat, il se laisse surtout porter par le vent, il fait plusieurs atterrissages sur différentes plantes afin d'en sélectionner une qui lui convienne. L'atterrissage peut être aléatoire sur n'importe quelle plante, surtout par vent fort (Storer, 1999), ou après localisation volontaire basée sur la spécificité de la plante, à savoir la perception de signaux physico-chimiques décisifs (Han *et al.*, 2012), tels que les caractères morphologiques, la texture de la feuille et la composition chimique de la plante (Bruce *et al.*, 2005b). Grâce à ses systèmes sensoriels bien développés, le puceron utilise ces stimuli visuels, olfactifs, tactiles ou gustatifs pour discriminer les plantes appropriées de celles inappropriées (*e.g.* toxiques, répulsives, pauvres en éléments nutritifs) (Stam *et al.*, 2014). Comme premier critère de sélection, le puceron utilise ses yeux composés, constitués par plusieurs sous-unités appelées ommatidies, pour détecter des signaux visuels. Or, dans des couvertures végétales denses, sa mauvaise acuité visuelle (Holopainen *et al.*, 2009; Döring, 2014) ne lui permet pas de cibler sa plante-hôte, notamment si elle est trop petite (ne dépasse pas quelques millimètres au-dessus du sol) ou bien cachée par d'autres obstacles. Dans ce cas, d'autres stimuli, notamment des substances volatiles odorantes, lui permettent de localiser l'hôte (Döring, 2014; Döring and Röhrig, 2016).

1.2.4 Rôle des COV dans la localisation et l'acceptation de la plante hôte

Les rôles des COV présents dans l'air sur le comportement du puceron sont restés longtemps incertains. En se basant sur l'argument que le puceron peut atterrir à la fois sur des plantes-hôtes et non hôtes, des auteurs ont pu considérer par le passé que les COV des végétaux n'avaient pas un rôle conséquent dans la recherche de l'hôte et que l'olfaction du puceron n'intervenait qu'après l'atterrissage sur la plante (Kennedy *et al.*, 1959). Or, des recherches plus récentes ont mis en évidence l'importance du sens olfactif dans l'écologie chimique du puceron (Chapman *et al.*, 1981; Nottingham *et al.*, 1991). Il est maintenant bien établi que les COV peuvent influencer le vol du puceron à des distances supérieures à un mètre (Chapman *et al.*, 1981), son atterrissage (Nottingham and Hardie, 1993) et sa décision de rester ou non sur la plante (Pickett *et al.*, 1992; Webster, 2012) avant, au cours et après son installation (Storer *et al.*, 1996). L'olfaction (perception sensorielle des COV) offre au puceron la capacité de déterminer s'il s'agit ou non d'un bon hôte, et même d'établir une préférence entre plusieurs plantes-hôtes. L'analyse des mélanges olfactifs permet également au puceron de différencier les plantes saines des virosées (Alvarez *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2015), ou encore les plantes attaquées par des ravageurs de celles non-attaquées (Hegde *et al.*, 2011).

1.2.5 Structure et spécificité du système olfactif des pucerons

Au cours de l'évolution et comme tous les insectes, le puceron a développé des systèmes sensoriels (système de perception) adaptés aux conditions de son environnement (Holopainen, 2008). Des sensilles olfactives (rhinaries) (Bromley and Anderson, 1982; Bruno *et al.*, 2018) présentes sur leurs deux antennes (de 3 à 6 segments) lui permettent de détecter les COV diffusés dans l'air (Schmucker *et al.*, 2007). On distingue des rhinaries primaires localisées au niveau du 5^e et 6^e segment des antennes et des rhinaries secondaires sur le 3^e et le 4^e segment (Visser and Piron, 1995a).

Chaque espèce possède des récepteurs olfactifs spécifiques de certains composés ou d'une gamme de composés. Les mécanismes d'olfaction font intervenir des protéines chimiosensorielles « *chemosensory protéines* (CSP) » qui solubilisent les COV, des protéines liant les COV dans la lymphe sensillaire de leurs antennes « *odorant-binding protéines* (OBP) », et de nombreux neurones olfactifs (organisés en glomérules) (Picimbon, 2002; Hallem and Carlson, 2006). La perception des COV génère des influx nerveux permettant au puceron de décoder, moyennant son système nerveux (système d'intégration), les COV perçus (Kollmann *et al.*, 2011). L'activité olfactive peut être étudiée par la technique d'électroantennographie (EAG). Des récepteurs permettent au puceron de déterminer les COV des plantes hôtes, tandis d'autres lui indiquent les COV des plantes non-hôtes (Pickett *et al.*, 2017; Nottingham *et al.*, 1991). Un récepteur peut être activé par plusieurs composés et un

composé peut activer plusieurs récepteurs olfactifs, ce qui procure un nombre très élevé de combinaisons actives sur le comportement des pucerons (Hallem and Carlson, 2006; Schmucker *et al.*, 2007). Pour ceci, les systèmes chimiosensoriels, surtout les généralistes, ont une sensibilité olfactive élevée (Zhang *et al.*, 2017).

La chimiosensibilité olfactive diffère selon l'espèce de puceron. En effet, la réponse à la perception d'un même composé ou d'un même mélange de COV, n'est pas souvent analogue pour des espèces différentes (Bruce *et al.*, 2005a; Legeay *et al.*, 2018). Ceci dépend de divers facteurs, principalement liés à l'anatomie des systèmes olfactifs mais aussi à des facteurs environnementaux qui modulent leurs réponses. Chaque espèce possède des récepteurs olfactifs spécialisés à certains composés spécifiques (Visser and Piron, 1995a). L'activité des rhinaries, de nombre et de forme variables selon l'espèce, change en fonction des caractéristiques des COV perçus (type de composé, forme, nombre de carbone, groupe fonctionnel, etc.) (Pickett *et al.*, 1992; Haddad *et al.*, 2008; Webster, 2012; Bruno *et al.*, 2018) et selon l'expression de CSP et d'OBP également variable selon les espèces.

1.3 Généralités sur les émissions des composés organiques volatils par les plantes

1.3.1 Nature, fonctions écologiques et diversité des composés volatils dans les végétaux

Incapable de se déplacer, les végétaux sont exposés aux agressions du milieu et ne peuvent s'en soustraire (Dong *et al.*, 2016). Au cours de leur évolution, ils ont compensé cette inaptitude par diverses stratégies basées sur des mécanismes morpho-anatomiques ou chimiques. Un de ces mécanismes chimiques consiste à produire des métabolites secondaires (Bruce, 2014). Ces molécules ne sont pas impliquées directement dans des fonctions physiologiques essentielles pour la plante (sa croissance et son développement), généralement assurés par des métabolites primaires. Cependant, elles interviennent dans diverses fonctions écologiques (Swain, 1977; Dudareva *et al.*, 2013), les interactions intra- et inter-organismes (les mutualismes, l'attraction des pollinisateurs), la défense contre divers dangers, la protection, (Birkett and Pickett, 2003; Bruce *et al.*, 2005b; Ueda *et al.*, 2012; Fernandez-Grandon *et al.*, 2013) en réponse à des facteurs biotiques ou abiotiques.

Chez les végétaux, on distingue un nombre important de métabolites secondaires, classés selon leur origine biosynthétique et leur nature biochimique, en trois grandes familles chimiques : les terpènes (=terpénoïdes), les composés azotés (les alcaloïdes) et les molécules phénoliques (les composés aromatiques).

Parmi ces métabolites, on distingue les COV (Baldwin, 2010; Dudareva *et al.*, 2013). Ces sont des composés carbonés (organiques), hydrophobes, de petite taille, souvent

lipophiles. Caractérisés par une pression de vapeur élevée et un faible poids moléculaire (< 300 Da), ces composés ne sont pas limités aux tissus végétaux et peuvent transiter vers l'atmosphère environnante (ou dans le sol par des racines) à la température ambiante (Dudareva *et al.*, 2006).

Le règne végétal synthétise des milliers de COV différents dont plus de 1700 ont été identifiés. Ils sont libérés, généralement, par divers organes de la plante (racines, feuilles, tiges, fleurs, fruits et des structures spécialisées tels que les trichomes) (Maffei, 2010). Ces COV appartiennent principalement à quatre grandes familles dont la nature chimique et le processus de biosynthèse sont différents. Premièrement, les terpènes regroupant le nombre le plus important des COV biogéniques. Ils sont biosynthétisés par les deux voies de l'acide mévalonique (MVA) et du méthylerythritol phosphate (MEP) spécifiquement dans les plastes (les isoprènes (C₅), les monoterpènes (C₁₀), les diterpènes (C₂₀)) et dans le cytosol (sesquiterpènes (C₁₅)) (Holopainen, 2008). Les 3 autres catégories de COV sont : les phénylpropanoïdes/benzénoïdes obtenus par la voie de la phénylalanine (dans le cytosol), les composés verts par la voie de l'acide linoléique (dans les chloroplastes) et les composés soufrés par des voies de biosynthèse spécifiques (Dudareva *et al.*, 2006; Baldwin, 2010; Dudareva *et al.*, 2013).

La majorité des COV qui possèdent des effets sur le comportement olfactif de puceron appartiennent à la famille des terpènes (Tholl and Lee, 2011). Ce sont principalement les monoterpènes (C₁₀) et les sesquiterpènes (C₁₅) qui peuvent subir une oxygénation et donner d'autres COV oxygénés actifs. Ces molécules sont les composants principaux des huiles essentielles aromatiques. De nombreux COV sont toxiques et délétères pour divers organismes dont la plante productrice elle-même. Pour cette raison, ils sont stockés généralement dans des structures externes spécialisées comme les trichomes glandulaires (Marin *et al.*, 2006).

Le puceron perçoit un nombre très important des COV présents dans son atmosphère. Parmi ces COV, de nombreux médiateurs chimiques, appelés aussi des infochimiques ou des sémiachimiques, assurent les interactions du puceron avec son environnement (Guerrieri and Digilio, 2008; Smart *et al.*, 2014). Ces médiateurs chimiques sont nommés phéromones (d'alarme, sexuelle, etc.) si leur action est intra-spécifique et substances allélochimiques si leur action est interspécifique (Herrbach, 1985a). Ces composés sont divisés en synomones (bénéfiques à la fois pour l'émetteur et pour le récepteur), en kairomones (bénéfiques pour le récepteur) et en allomones qui induisent une réponse comportementale ou physiologique défavorable (Herrbach, 1985b; Smart *et al.*, 2014). Ces COV, bénéfiques ou défavorables, peuvent avoir diverses origines dont les végétaux, les insectes (pucerons, ennemis naturels...) et les micro-organismes (bactérie, champignons...), ainsi qu'une d'origine anthropique (relatif à l'activité humaine). Néanmoins, en lien avec le contexte de la présente étude, nous ne nous intéresserons spécifiquement qu'aux sémiachimiques produits par les plantes.

1.3.2 Facteurs intrinsèques qui contrôlent les émissions des composés volatils par les plantes

Les profils des COV émis par diverses espèces végétales ont été caractérisés dans plusieurs études. Cependant, les bouquets des volatils émis par la même espèce varient, de façon qualitative et/ou quantitative, d'une étude à une autre. Cette variabilité peut être due à l'utilisation de méthodes de prélèvement et d'analyse des COV différentes (Bracho-Nunez *et al.*, 2011). Mais, ce n'est pas la seule source de variabilité. En effet, divers facteurs à la fois biotiques et abiotiques peuvent moduler la nature et la quantité des COV émis par une plante vivante (Pichersky and Gershenzon, 2002; Penuelas and Staudt, 2010; Bracho-Nunez *et al.*, 2011).

Un des facteurs majeurs, la variabilité génétique, influence, quantitativement et qualitativement, la production et l'émission des COV (Tholl and Lee, 2011). En effet, les profils de COV diffèrent d'une espèce végétale à une autre. Certains COV sont émis par la majorité des espèces. Cependant, d'autres composés sont spécifiquement émis par certaines espèces ou par des plantes appartenant à certaines familles ou à certains genres. On peut aussi distinguer une variabilité des émissions entre les variétés (ou clones) de la même espèce (effet génotype) (Dardouri *et al.*, annexe 1; Tholl and Lee, 2011; Schröder *et al.*, 2015).

En plus de la variabilité génotypique, la nature et la quantité des émissions des COV sont également variables en fonction de l'âge de la plante (notamment l'âge de la feuille) (Bracho-Nunez *et al.*, 2011) et de son stade de développement ou stade phénologiques (*e.g.* stade végétatif, stade floraison...), et ce d'autant plus que certains COV ne sont émis que par un organe spécifique de la plante (racine, feuille, fleur, fruit, etc.) (Pichersky and Gershenzon, 2002).

D'autre part, tout type de stress subit par la plante, qu'il soit biotique ou abiotique, engendre généralement des changements marqués dans la composition et les quantités de COV émis. Ces changements sont variables en fonction de l'agent et de l'intensité du stress subit (Tholl *et al.*, 2006; Moayeri *et al.*, 2007; Holopainen and Gershenzon, 2010).

Les blessures provoquées par les attaques de bioagresseurs sur les feuilles de la plante peuvent engendrer à la fois, un stress mécanique par les piqûres et un stress chimique par les sécrétions salivaires. Pour se défendre et pour faire fuir les phytophages (Oluwafemi *et al.*, 2010; Hegde *et al.*, 2012), la plante réagit par des réponses spécifiques (Stam *et al.*, 2014). Elle commence par une réponse passive, à savoir la libération des COV stockés dans les tissus végétaux attaqués. Ensuite, elle répond par un changement systémique en produisant et émettant des COV antagonistes (réponse active) (Paré and Tumlinson, 1999; Maffei *et al.*, 2007). Les composés induits par les attaques des herbivore « *herbivore-induced plant*

volatiles: HIPVs » permettent aussi l'attraction des entomophages (Choh *et al.*, 2004; Mutyambai *et al.*, 2016). Ainsi, des changements dans le métabolisme secondaire de la plante stimulent la synthèse et la libération des substances volatiles des feuilles vertes « *Green Leaf Volatiles* (GLVs) » (*e.g.* (Z)-3-hexénal, (Z)-3-l'acétate d'hexenyl et (Z)-3-hexène-1-ol) (Dudareva *et al.*, 2006; Darshanee *et al.*, 2017).

D'autre part, suite à des déficits en eau ou en éléments nutritifs, les plantes augmentent quantitativement l'émission de certaines molécules et baissent la quantité d'autres, elle peut émettre également des COV spécifiques (Branco *et al.*, 2010; Holopainen and Gershenzon, 2010). Aussi, des interventions comme la taille, en provoquant un stress mécanique, impactent considérablement les émissions des plantes (Llandres *et al.*, 2018). De ce fait, la conduite culturale (*e.g.* l'irrigation, la fertilisation, la taille, etc.) peut relativement moduler la quantité et la qualité de COV émis.

Les facteurs climatiques contrôlent aussi considérablement les émissions des plantes. Ceci explique les changements des émissions des plantes au cours de la journée et en fonction de la saison (Hendel-Rahmanim *et al.*, 2007). La température agit sur la pression de vapeur des molécules et la lumière est impliquée dans la biosynthèse de composés (Holopainen and Gershenzon, 2010). Dans certains cas, l'humidité relative peut également agir sur les émissions de la plante (Loreto *et al.*, 1996). Pareillement, les changements gazeux dans l'atmosphère, tels que les concentrations en CO₂ (Boullis *et al.*, 2017), peuvent engendrer des modifications dans le métabolisme de la plante et induire ainsi, des changements dans la composition de son profil de COV (Penuelas and Staudt, 2010; Boullis *et al.*, 2015).

Aussi, en fonction de divers besoins (*e.g.* pour favoriser sa reproduction), les plantes peuvent varier leurs émissions, et libérer des COV pour attirer des insectes pollinisateurs et des insectes qui favorisent la dispersion de ses graines (Pichersky and Gershenzon, 2002).

Dernier facteur, mais non le moindre, les interactions allélopathiques de la plante avec ses plantes voisines peuvent aussi modifier, qualitativement et quantitativement, le profil de COV qu'elle émet (Llandres *et al.*, 2018). La nature et les quantités des COV produits par la plante réceptrice peuvent varier en fonction de la composition et de la concentration en certains COV émis par une plante émettrice (Ueda *et al.*, 2012). En effet, les changements engendrés sont fonction de tous les facteurs qui peuvent agir sur les émissions de la plante émettrice (Glinwood *et al.*, 2004; Zhu and Park, 2005) mais également de la plante réceptrice.

Ainsi, de nombreux facteurs peuvent agir sur l'efficacité des COV de la PdS à utiliser. Cependant, à ce jour, leurs impacts sur les émissions des plantes vivantes, notamment en faisant le lien avec les réponses comportementales des insectes, sont exceptionnellement étudiés. Si l'on se recentre sur notre problématique du fait de la grande diversité des COV émis

par les végétaux, on comprend que les PdS puissent agir de différentes façons contre les pucerons. Ces modes d'action seront présentés dans la section 1.5.

1.4 Utilisation des COV dans la gestion des ravageurs

1.4.1 Les familles de plantes de service utilisées dans la gestion des ravageurs

Les savoir-faire traditionnels (Shrivastava *et al.*, 2010), enrichis par les recherches scientifiques ont permis d'identifier des espèces végétales produisant des COV et/ou des mélanges de COV qui repoussent et perturbent le comportement des pucerons (Parolin *et al.*, 2012a; Ben Issa *et al.*, 2017b). Majoritairement, ces molécules volatiles sont produites par des plantes aromatiques (Tang *et al.*, 2012) de la famille des Lamiacées (*e.g.* menthe, thym, romarin, lavande, basilic) (Hori, 1998; Hori, 1999; Digilio *et al.*, 2008; Ikeura *et al.*, 2012; Wubie *et al.*, 2014; Ben Issa *et al.*, 2016; Ben Issa *et al.*, 2017a; Pascual-Villalobos *et al.*, 2017). La famille des Asteraceae comportent aussi de nombreux espèces ayant des propriétés répulsives envers le puceron tels que les *Tagetes* (Tomova *et al.*, 2005). Des plantes comme l'ail (*Allium sativum*), le poireau (*Allium porum*) et la ciboulette appartenant à la famille des Alliaceae perturbent aussi le comportement olfactif de *M. persicae* (Thibout and Auger, 1997; Amarawardana *et al.*, 2007). D'autres espèces appartenant à diverses familles botaniques ont également des effets répulsifs contre *M. persicae*, comme le Lilas de Perse (*Melia azedarac*) (Marangoni *et al.*, 2004), l'Armoise (*Artemisia absinthium* L.) et la tanaïs (*Tanaceum vulgare* L.) (Dancewicz and Gabryś, 2008).

1.4.2 Rôle des COV dans la répulsion ou la perturbation olfactive

L'olfaction permet au puceron de décoder et discriminer certains COV parmi un grand nombre de substances volatiles présentes dans son environnement (Pickett *et al.*, 1992; Webster, 2012). Selon leurs effets, on distingue des molécules attractives qui oriente le puceron vers ses plantes-hôtes, des molécules neutres sans aucun effet et des molécules exerçant un effet « *arrestant* » ou répulsif (Robert, 1986; Ben Issa *et al.*, 2017b).

La répulsion est généralement décrite comme un comportement d'éloignement ou de fuite de l'insecte provoqué par un stimulus (agent d'action) (Dolan and Panella, 2011). Ce stimulus répulsif peut agir à distance (par des composés volatils) en empêchant l'insecte d'atteindre sa cible ou en perturbant son installation. Il peut aussi agir par contact, le puceron pouvant toucher avec ses antennes certains composés peu volatils présents sur la surface des feuilles et qui l'incitent à s'éloigner (Powell *et al.*, 1999). Contrairement à un composé toxique, ce composé répulsif provoque des phénomènes d'aversion sans conduire généralement à la mort de l'insecte.

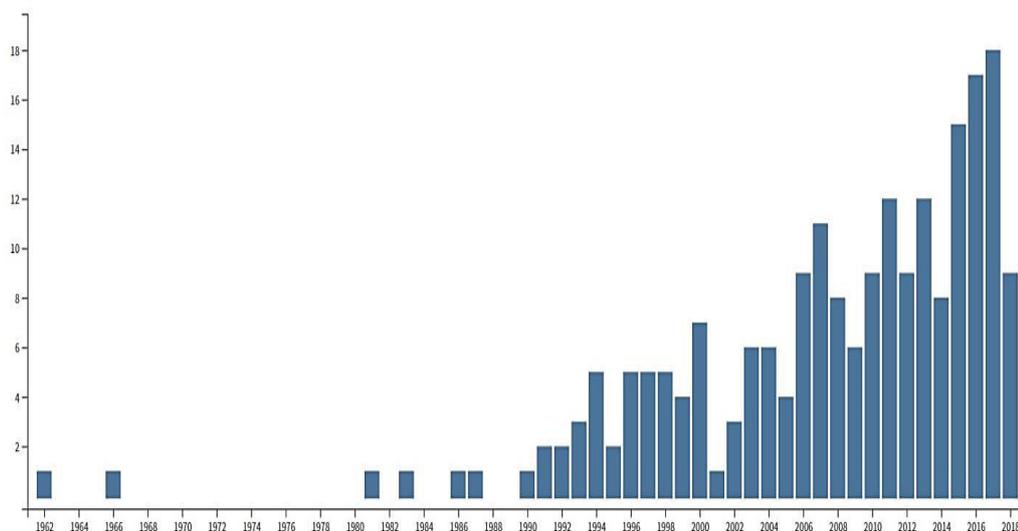


Figure 1.3 : Nombre de publications annuelles en rapport avec les composés organiques volatils répulsifs contre les pucerons selon des recherches « Web of Science TM, All Databases », pour les mots clés : « Aphid* » OR « Aphididae » OR « Buchnera » AND « Repellent* OR Repel OR repellency AND Volatil organic compound* OR VOC* », depuis 1962 jusqu'au 30 septembre 2018).

Bien que la répulsion des pucerons par des COV puisse contribuer de façon conséquente au développement de méthodes de lutte alternatives à la lutte chimique, elle reste relativement peu investiguée. Selon les données de Web of Science TM (Figure 1.3), le nombre de publications en lien avec cette thématique est très faible (210 publications) par rapport à ce qui concerne d'autres insectes comme les moustiques, les cafards et les ravageurs des produits stockés (Pascual-Villalobos *et al.*, 2017). Néanmoins, ce volet de recherche est de plus en plus étudié ces dernières années.

Dans la nature, plusieurs éléments de l'environnement peuvent repousser ou perturber l'installation des pucerons. Cependant, les COV répulsifs restent parmi les insectifuges les plus importants dans l'écologie des pucerons. La répulsion se produit après un nombre de réactions physiologiques ou biochimiques qui suivent la perception olfactive de certaines odeurs répulsives (Bruno *et al.*, 2018). Alors que certains composés bloquent l'activité des récepteurs olfactifs et inhibent la détection d'autres COV (Peterson and Coats, 2001), des composés agissent négativement sur les systèmes sensoriels et nerveux de l'insecte par l'activation de certains récepteurs (Gadenne *et al.*, 2016; Legeay *et al.*, 2018). Ces activités répulsives ont été prouvées sur des pucerons aptères et ailés, cependant les mécanismes d'action impliqués n'ont pas été bien décrits.

Bien que les pucerons aptères soient très peu mobiles, certains COV répulsifs peuvent les pousser à quitter une plante-hôte pourtant adéquate (Pettersson *et al.*, 2007; Ben Issa *et al.*, 2016). Le cas le plus connu est celui de l'(E)- β -farnésène (EBF), composé majeur des

phéromones d'alarmes pour la majorité des espèces de puceron. Suite à sa perception, les pucerons aptères se laissent tomber sur le sol (phénomène de « *dropping behavior* ») et partent généralement, pour chercher d'autres habitats et éviter un danger potentiel (Hatano *et al.*, 2010; Harrison and Preisser, 2016).

De nombreuses molécules volatiles, principalement issus d'huiles essentielles, ont été décrites comme répulsives pour le puceron. Parmi ces composés testés individuellement, le linalol, le camphre, l' α -terpinéol, le bornyle acétate, l' α -terpinéol, le terpinène et le géranyl acétone ont des propriétés répulsives envers *M. persicae* (Hori, 1998; Dardouri *et al.*, annexe 1; Aharoni *et al.*, 2003). D'autres molécules ont été démontrées répulsive pour d'autres espèces, tels que l'eucalyptol, le β -citronellol, le farnésol, le géraniol, le TMTT, le germacrene D, le (*Z*)-3-acétate hexényle, le salicylate de méthyle, l'artémisia cétone, la limonène, le pinène, le bisabolène, le β -caryophyllène (Hori and Komatsu, 1997; Tomova *et al.*, 2005; Bruce *et al.*, 2005a; Halbert *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2015; Bruno *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017; Pascual-Villalobos *et al.*, 2017). Si certains composés ne sont répulsifs que pour certaines espèces, d'autres molécules volatiles ont des effets négatifs sur la majorité des espèces des pucerons (*e.g.* EBF), voir sur plusieurs insectes appartenant à des familles différentes (*e.g.* Deet (N, N-diéthyl-3-méthylbenzamide)) (Legeay *et al.*, 2018). Par exemple, le linalol a été démontré répulsif contre diverses espèces du puceron, tels que *M. persicae* (Hori, 1998), le puceron noir (*Aphis fabae*) (Webster *et al.*, 2010), le puceron du saule et de la carotte (*Cavariella aegopodii* (Scopoli)) (Chapman *et al.*, 1981), le puceron du coton (*Aphis gossypii* Glover) (Jiang *et al.*, 2016a). Il est reconnu aussi répulsif pour d'autres insectes (Zhang *et al.*, 2014a). S'il n'y a pas encore suffisamment d'information pour savoir si les composés répulsifs agissent par le même mécanisme pour les différents insectes, il a été démontré que la perception et la réponse à un même message olfactif diffère d'une espèce à une autre (Peterson and Coats, 2001).

L'efficacité répulsive d'un bouquet olfactif paraît liée à la composition et aux proportions des COV dans le mélange perçu (Webster *et al.*, 2010; Boevé *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014a). En particulier, les concentrations des COV dans le mélange ont un rôle déterminant sur la réponse olfactive du puceron (Bruce *et al.*, 2005b). Le seuil de détection doit être atteint pour qu'un COV soit identifié et provoque éventuellement une réaction du puceron. Au-delà de ce seuil de détection, la réponse du puceron peut varier avec la concentration, l'intensité de perception des COV (force de la sensation) étant généralement proportionnelle avec sa concentration (Gross-Isseroff and Lancet, 1988). Ainsi, l'augmentation de la concentration d'un COV peut changer son effet de neutre ou attractif à un effet répulsif (Sun *et al.*, 2015).

L'efficacité d'un mélange peut varier en fonction de la proportion relative de chaque COV (Döring, 2014), certains ratios générant un effet maximal de répulsion (Zhang *et al.*, 2014a). Cependant, jusqu'à un certain seuil de concentration, la variation des ratios dans un

mélange de COV, ne semble pas modifier la réponse comportementale du puceron (Najar-Rodriguez *et al.*, 2010).

Dans la nature, le puceron perçoit des mélanges de COV et pas un seul composé. Il peut capter des combinaisons répulsives (ou attractives) contenant à la fois des molécules attractives et des molécules répulsives (Rajabaskar *et al.*, 2013). De ce fait, son comportement dépend plus sûrement de certaines combinaisons particulières que d'un composé individuel présent dans le mélange (Bruce and Pickett, 2011). Cependant, l'absence ou la présence de certains composés dans le profil de COV, peut modifier la réponse du puceron (Webster *et al.*, 2010). L'effet répulsif peut résulter d'un effet additif des plusieurs composés répulsifs (Adams et Bernays 1978), et l'on peut avancer que la composition, les concentrations et proportions des COV dans un mélange déterminent son effet sur les pucerons (Bruno *et al.*, 2018). Mais dans un mélange de COV, les interactions entre molécules volatiles peuvent modifier la réponse attendue des pucerons à certains composés actifs (Bruce *et al.*, 2005a), et des effets synergiques entre certains COV peuvent donner au mélange un effet répulsif (Hori, 1998).

1.4.3 Rôle des COV sur le comportement alimentaire du puceron

1.4.3.1 La gustation chez les pucerons

Insecte piqueur-suceur, le puceron se nourrit aux dépens de la sève élaborée des plantes vasculaires. Il cherche exclusivement dans le phloème les protéines et les sucres indispensables à son développement et à sa reproduction (Sauge *et al.*, 1998). Plusieurs étapes lui sont

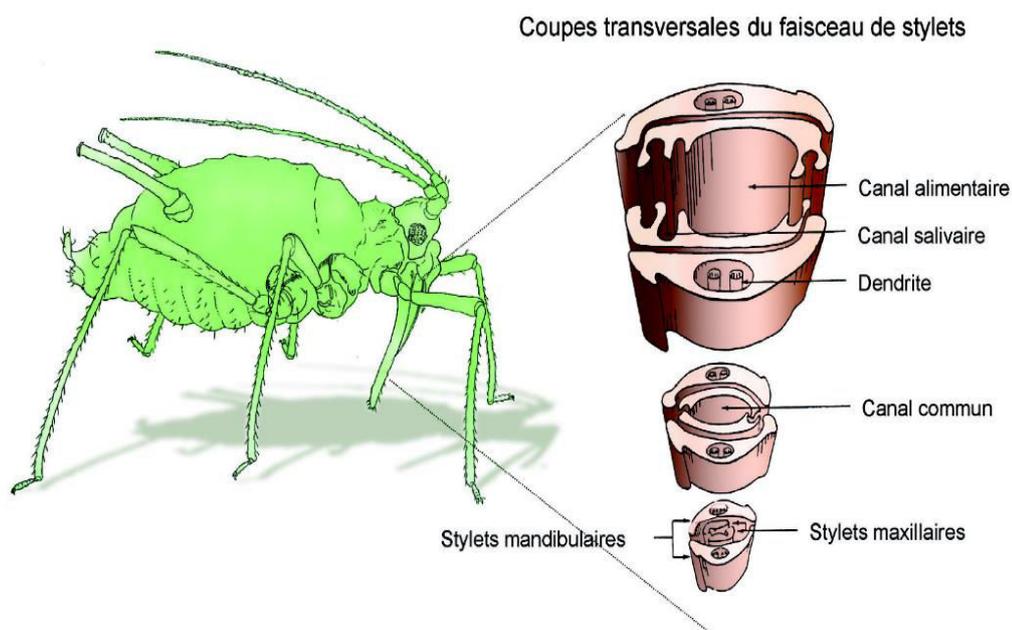


Figure 1.4 : Les pièces bucales d'un puceron (Source d'image : Brault *et al.* 2010)

Synthèse bibliographique

nécessaires pour atteindre sa cible. Ce comportement particulier, influencé par les métabolites des plantes, lui permet de déterminer si la plante est convenable (évaluation de sa compatibilité et de sa qualité alimentaire). Une fois sur la plante, et juste avant de pénétrer son stylet dans les tissus végétaux, le puceron réalise une évaluation superficielle grâce à des organes de gustation (système sensoriel).

Des composés chimiques sont détectés par des sensilles présentes à l'extrémité du labium et lui indiquent si la plante est hôte ou non (Pettersson *et al.*, 2007). Si c'est le cas, il perce ensuite l'épiderme grâce à ses pièces buccales piqueuses hautement spécialisées. Ces dernières sont constituées de quatre stylets (deux mandibulaire et deux maxillaires) regroupés dans un rostre. Ces stylets, souples et longs, lui permettent d'atteindre les tubes criblés du phloème en progressant entre les différents tissus (de façon intracellulaire).

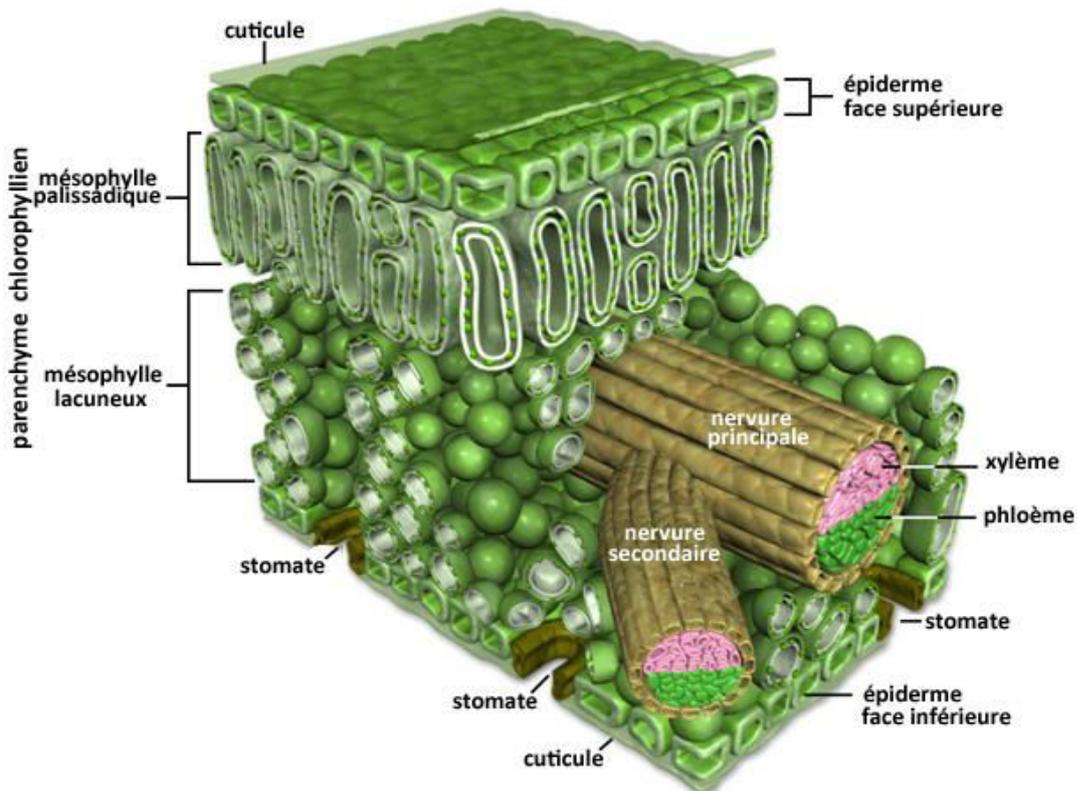


Figure 1.5 : Structure d'une feuille (Source d'image : <http://www.bonsai-club-blesois.fr>)

Après pénétration des stylets, il commence l'évaluation de la compatibilité alimentaire de la plante par de brèves piqûres dans l'épiderme et dans les tissus sous-épidermiques (ponctuations intracellulaires) (Giordanengo *et al.*, 2010), suivi par un prélèvement de petite quantité de cytosol (Powell *et al.*, 2006). Après cette phase de recherche et d'échantillonnage dans divers types cellulaires de la paroi végétale, une dernière étape importante consiste à

l'évaluation de la sève élaborée dans le phloème. S'il se confirme que la plante est appropriée à son alimentation, le puceron enchaîne alors des phases passives d'ingestion dans le phloème (précédé par des phases de salivation) en alternance avec quelques phases actives dans le xylème pour répondre à un besoin en eau.

1.4.3.2 Les facteurs affectant le comportement alimentaire du puceron

La disponibilité en éléments nutritifs et en eau est le facteur le plus déterminant pour l'alimentation du puceron. Une diminution importante de ces ressources l'oblige à quitter la plante et à chercher une autre source d'alimentation. En plus de sa valeur nutritionnelle, d'autres caractères de la plante-hôte, principalement ses mécanismes de résistances (*e.g.* résistance mécanique, abondance des trichomes, antixénose¹ et antibiose²) (Le Roux *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2008) et de défense (*e.g.* production et stockage des molécules toxiques, répulsives, antiappétantes, etc.), sont aussi déterminants pour son alimentation et donc son séjour sur la plante (Stam *et al.*, 2014; Jakobs and Muller, 2018). Ainsi, tous les facteurs qui peuvent stresser la plante (Tariq *et al.*, 2012) et agir sur son métabolisme peuvent également affecter, directement ou indirectement, le comportement alimentaire du puceron. Par exemple, les attaques des ravageurs, l'infestation par des phytovirus (dos Santos *et al.*, 2015; Mauck *et al.*, 2010), la fertilisation (*e.g.* augmentation du ratio C/N, la diminution de la disponibilité en acides aminés et l'accumulation des sucres) (Sauge *et al.*, 2010; Pritchard and Vickers, 2017) ou encore les facteurs génétiques de l'hôte (variété, chémotype etc.) (Jakobs and Muller, 2018) peuvent affecter le comportement alimentaire du puceron. Divers facteurs écologiques et environnementaux peuvent également l'affecter. Notamment, les conditions climatiques comme la température. Son alimentation varie aussi en fonction de la contribution des bactéries symbiotiques qui lui apportent certains éléments (*e.g.* certains acides aminés, des vitamines...) (Powell *et al.*, 1999; Schwarzkopf *et al.*, 2013; Rabatel *et al.*, 2013).

Certains COV potentiellement répulsifs et/ou perturbateurs, sont également captés par les récepteurs gustatifs du puceron (Norris, 1990), ce qui peut également perturber la prise d'alimentation (Pettersson *et al.*, 2007). (Legeay *et al.*, 2018). Ces COV peuvent avoir diverses origines, notamment être émis par des plantes-hôtes fortement attaquées (Quiroz A, 1997), par des ennemis naturels ou encore par des plantes non-hôtes (Pickett *et al.*, 2017).

¹ Antixénose : plante non acceptée

² Antibiose : plante acceptée, mais avec de problème de nutrition

À ce jour, peu d'études concerne l'impact des COV, notamment ceux des plantes non-hôtes, sur les différentes phases d'alimentation des pucerons (Powell *et al.*, 1999). Les rares travaux sur ce sujet font appel à des techniques analytiques ou comportementales comme la technique d'électropénétrographie (EPG) (Sauge *et al.*, 2010). Powell *et al.* (1996) ont démontré que le nombre et la durée des phases de pénétration des stylets diminuent significativement quand *M. persicae* a été exposé au polymodal, un dialdéhyde sesquiterpène ayant des effets répulsif et antinourissant sur *M. persicae* (Prota *et al.*, 2014). La perturbation du comportement alimentaire par les COV, pourrait avoir une incidence sur la physiologie du puceron, en particulier sur sa reproduction. C'est ce que suggère (Amarawardana *et al.*, 2007) pour expliquer l'effet négatif du poireau et de la ciboulette sur *M. persicae*.

1.4.4 Les composés volatils agissent sur la reproduction du puceron

La perception de COV qui le perturbe entraîne généralement la fuite du puceron (Powell *et al.*, 2006; Yarou *et al.*, 2017), cependant, il n'est pas rare que le puceron demeure sur la plante hôte et se reproduise moins (Ben Issa *et al.*, 2016; Ben Issa *et al.*, 2017a). On constate dans la littérature plusieurs confirmations de l'effet des COV sur la reproduction du puceron. Ainsi les COV produits par des huiles essentielles de *Tagetes minuta* réduisent significativement la reproduction des pucerons (jusqu'à 100 % après 5 jours), avec un effet variable selon la quantité d'huile utilisée et l'espèce de puceron (Tomova *et al.*, 2005). Sunita Facknath (2008) a suggéré que la croissance et le développement des nymphes de puceron vert du pêcher sont affectés par des substances volatiles d'*Ayapana triplinervis*. Le salicylate de méthyle agit négativement sur la fécondité de plusieurs pucerons de blé (e.g. *R. padi*, *S. avenae*) (Pickett *et al.*, 2017). Enfin l'exposition prolongée à l'(E)- β -farnésène induit la production de pucerons ailés en prévision d'une migration (Hatano *et al.*, 2010).

Sa forte capacité à se multiplier rapidement assure au puceron le maintien de sa population et sa survie. Cependant, ses performances reproductives peuvent être fortement affectées par la qualité de son alimentation (Bermingham and Wilkinson, 2009). Une mauvaise alimentation consécutive à une perturbation du processus alimentaire a des conséquences sur le nombre des ovarioles présentes dans chacune de deux ovaires du puceron, et sur le développement des embryons dans l'ovariole (Rabatel *et al.*, 2013). On a vu que la présence de COV répulsifs pouvait être responsable d'une perturbation de l'alimentation. On peut donc imaginer un effet en cascade sur la reproduction, même si le lien COV-alimentation-reproduction n'a pas toujours été vérifié (Cao *et al.*, 2014).

1.4.4 Modes d'action des COV dans les interactions plante - plante - insecte

Bien que les concentrations des COV dans l'atmosphère soient relativement faibles (traces de l'ordre du ppm voir ppb), leurs effets sur le puceron sont particulièrement

importants. Tandis que certains composés attractifs l'orientent vers ses plantes-hôtes et favorisent sa colonisation, d'autres, généralement produits par des plantes non-hôtes, agissent négativement sur ce ravageur, provoquant sa fuite ou bien l'altération de ses performances reproductives. Mais, il existe d'autres modes d'action des COV sur les pucerons qui peuvent également perturber le développement d'une colonie.

Ainsi des substances volatiles émises par certaines PdS peuvent masquer les COV attractifs des plantes-hôtes (Held, 2003). Ces composés masquants modifient la composition des COV présents autour de ces plantes d'intérêt et les rendent moins détectables (Nottingham *et al.*, 1991; Schröder, 2008), jouant le rôle d'une barrière chimique.

Par ailleurs, une fois diffusés dans l'environnement, certains COV subissent des transformations chimiques, d'autres COV réagissent entre eux. Des interférences entre les COV de la plante-hôte et des PdS peuvent constituer un autre mode d'action dans la mesure où des mélanges répulsifs sont générés (Fan *et al.*, 2003). Les mécanismes qui expliquent ces interférences sont très peu évoqués (Schröder, 2008).

D'une manière générale, on considère que les COV des PdS répulsives et/ou perturbatrices agissent directement sur les pucerons. Or, certains bouquets olfactifs, sans effet direct sur le puceron, agissent sur les caractères de sa plante-hôte. Ceci peut modifier la qualité d'accueil de cette plante pour le puceron, ou même la perception qu'il en a. On parle alors de mode d'action indirecte des PdS sur le puceron (Heil and Karban, 2010; Dahlin *et al.*, 2014; Ninkovic *et al.*, 2013), dans la mesure où il fait appel à d'autres organismes. Deux types de mode d'action indirect ont été décrits. Le premier est basé sur des interactions plantes-insectes : les entomophages peuvent être attirés par certains composés (HIPVs) émis par des plantes attaquées (Choh *et al.*, 2004; Zhu and Park, 2005; Kaplan, 2012) ou bien par les COV de certaines PdS (Togni *et al.*, 2016). Le second est basé sur des interactions plantes-plantes : des COV émis par certaines PdS peuvent être captés par la plante-hôte ce qui la rend moins attractive et réduit son acceptation par le puceron (Amarawardana *et al.*, 2007; Dahlin *et al.*, 2013; Ninkovic *et al.*, 2013; Dahlin *et al.*, 2014; Mutyambai *et al.*, 2016). Vu le contexte et les objectifs de la présente étude, nous ne nous intéresserons qu'à ce second mode d'action indirect. Plusieurs hypothèses, dont certaines mises en évidence, ont été proposées pour expliquer ce mode d'action. Ainsi certains COV diffusés dans l'atmosphère par une PdS peuvent être adsorbés sur la surface de la plante-hôte, puis relargués progressivement avec les autres composés propres à la plante-hôte modifiant ainsi un mélange olfactif neutre ou attractif en mélange répulsif. Dans un autre cas, les COV de la PdS peuvent rester adhérents aux feuilles de la plante hôte lui donnant un goût désagréable ayant des effets anti-appétants pour les pucerons (Himanen *et al.*, 2010; Dolan and Panella, 2011).

Synthèse bibliographique

Les plantes ne sont pas silencieuses et dialoguent entre elles comme l'ont montré (Baldwin and Schultz, 1983). Une plante attaquée par un herbivore peut ainsi alerter ses voisines de la présence de ce danger. Les feuilles attaquées émettent des composés utilisés comme des signaux communicatifs externes. Ces signaux peuvent être perçus par les feuilles et les organes de la plante elle-même, mais aussi par des plantes occupant le même espace (Heil and Silva Bueno, 2007). La perception de ces signaux chimiques active les systèmes de défense de la plante réceptrice. Par l'intermédiaire d'éliciteurs elle déclenche alors sa défense directe contre les herbivores, notamment en induisant la production de certaines molécules volatiles. Ceci permet aux plantes de minimiser les dégâts en anticipant une attaque de ravageurs (« *priming of defense responses*») (Dudareva *et al.*, 2006). Ce volet de recherche qui examine les interactions entre plantes saines et plantes endommagées, via l'émission de COV, a été investigué pour divers ravageurs, dont le puceron (Kaplan, 2012; Vucetic *et al.*, 2014).

Ainsi, les scientifiques ont démontré que même les plantes voisines saines non-attaquées, communiquent entre elles, non seulement au niveau racinaire (Babikova *et al.*, 2013), mais aussi par des échanges des signaux aériens (allélopathie aérienne) (Glinwood *et al.*, 2004; Bandara *et al.*, 2009; Glinwood *et al.*, 2009; Ninkovic *et al.*, 2013). Ces signaux sont utilisés par la plante réceptrice comme des informations biologiques. Ils peuvent ainsi agir sur ses fonctions physiologiques et peuvent influencer son métabolisme chimique (Ninkovic, 2003). En particulier, une plante peut donc modifier *via* ses COV les émissions d'une plante voisine (Dahlin *et al.*, 2014), y compris d'une espèce différente (Heil and Karban, 2010). Par exemple, l'exposition d'une plante au β -ocimène et (*E*)- β -ocimène induit un changement dans ses mécanismes de défense, et génère un effet négatif sur le puceron (Kang *et al.*, 2018).

Les connaissances sur les modes d'actions de molécules toxiques (Das *et al.*, 2008) ou répulsives pour des insectes comme les moustiques, ont beaucoup progressé ces dernières décennies. Malheureusement ce n'est pas le cas pour le puceron, pour lequel il manque beaucoup d'informations concernant les mécanismes de répulsion/attraction et l'implication du système olfactif du puceron (Dolan and Panella, 2011).

Objectifs de la thèse

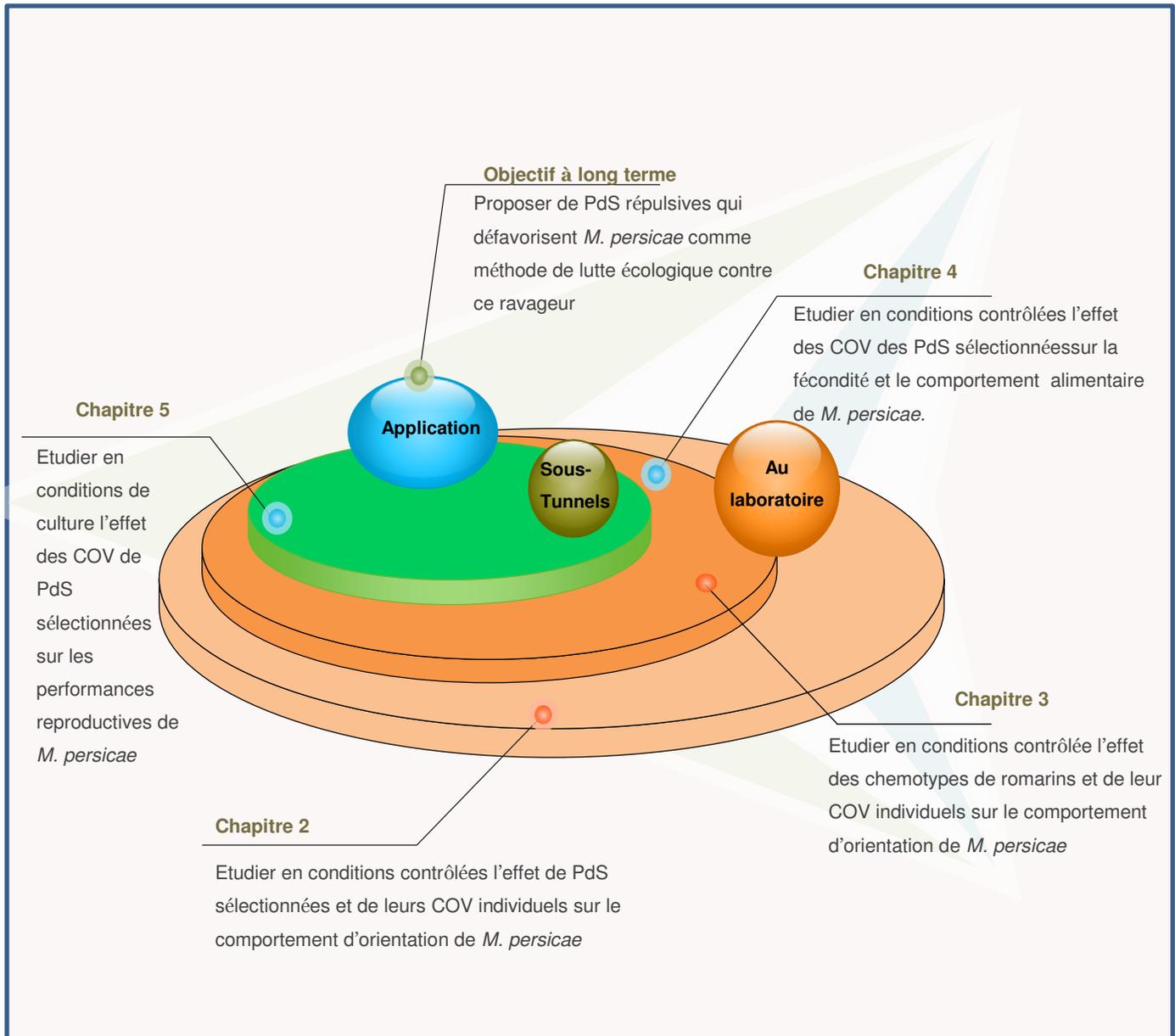
Dans un contexte de recherche de solutions alternatives à l'usage de pesticides, mon sujet de thèse portait sur l'étude de plantes de services émettant des composés répulsifs afin d'identifier quels étaient leurs effets perturbateurs ou répulsifs sur le comportement olfactif et alimentaire, et plus largement sur les performances d'un ravageur d'importance en horticulture, *M. persicae*.

Les rôles des COV dans l'écologie chimique du puceron ne se limitent pas à l'orientation des ailés vers les plantes-hôtes (Webster, 2012) ou à l'estimation de la qualité de son futur habitat (Gadenne *et al.*, 2016). Les aptères, déjà installés sur des plantes-hôtes restent influençables par leur environnement olfactif. Bien que dotés d'une sensibilité olfactive moins élevée, leur réponse à certains composés est quasi équivalente à celle des ailés (Visser et Piron 1997). Certains COV peuvent constituer un obstacle chimique ou physique pour le puceron (Herrbach, 1985b), et leur perception peut impacter négativement le comportement et les performances de ce ravageur (Ben Issa *et al.*, 2016). L'impact de ces composés phytochimiques peut s'exercer à plusieurs niveaux chez le puceron : par voie gustative en empêchant la prise de nourriture ou bien à distance par voie olfactive en les repoussant. Ils peuvent avoir aussi une action sur sa physiologie et sa reproduction. Certaines molécules volatiles peuvent agir sur des paramètres liés à sa « fitness » tels que la croissance, le développement, la fécondité et la longévité.

Les travaux précédents avaient identifié des plantes qui provoquaient la fuite des pucerons ou la diminution de la fécondité des femelles. A partir de ces études, un certain nombre de questions restaient posées. Il était établi que les réponses observées sur puceron étaient liées aux composés volatils émis par les PdS, mais pouvait-on établir des corrélations entre des mélanges de COV efficaces et les réponses des pucerons ? Existait-il des profils de COV différents selon les variétés pour une espèce donnée ? Retrouvait-on à chaque fois un même ensemble de composés répulsifs qui pouvait induire la fuite du puceron ? Par ailleurs, il existait quelques études ayant montré l'effet de composés isolés sur *M. persicae* mais pour d'autres composés émis par les PdS nous n'avons pas d'information sur leur potentiel répulsif vis-à-vis de *M. persicae*. Un des objectifs de cette thèse était d'identifier, dans le mélange de composés volatils émis par les PdS, quels étaient ceux ayant un effet répulsif et si cet effet variait en fonction de leur concentration individuelle. Un second objectif était de caractériser les effets de ces COV sur le puceron, affectaient-ils son comportement de choix lié à son olfaction ? son comportement alimentaire ? sa fécondité ? Un troisième objectif était de déterminer si ces différentes PdS affectaient le comportement des pucerons selon les mêmes mécanismes. Enfin mon travail avait pour objectif de vérifier si les méthodes de screening de

Objectifs de la thèse

PdS mises au point au laboratoire avaient réellement permis de sélectionner des PdS efficaces en conditions moins confinées proches des conditions de culture sous serre.



Plan de la thèse

Après avoir contextualisé notre étude à travers un état des connaissances et posé les questions de sciences (**chapitre 1**), les travaux réalisés pour essayer d'y répondre seront présentés de la façon suivante :

Dans un premier temps, nous allons confirmer l'efficacité de plantes capables d'affecter, par leur présence, le comportement d'orientation du *M. persicae*. Nous avons également vérifié dans quelle mesure la variabilité génétique d'une plante répulsive pouvait moduler cette

Objectifs de la thèse

propriété. En parallèle, nous essayons d'apporter des connaissances sur le mode d'action de ces plantes, notamment par la caractérisation des profils de COV qu'elles libèrent, et en testant individuellement l'effet de certains COV sur le déplacement des pucerons (**chapitres deux et trois**).

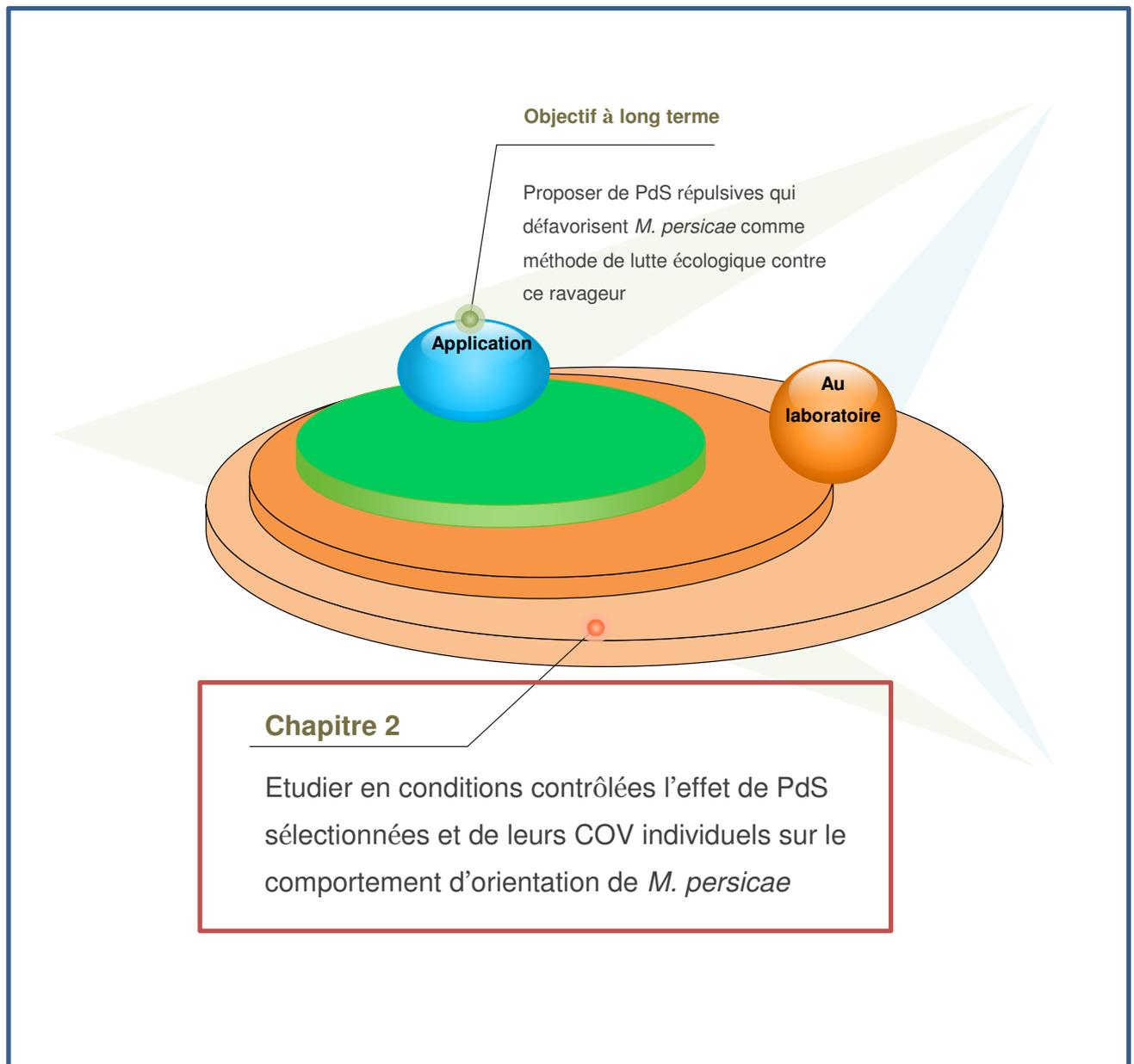
Le deuxième temps de l'étude commencera par la réalisation d'une seconde étape de typage des PdS. Elle sera basée sur l'effet de leur production olfactive sur la reproduction du *M. persicae*, à savoir sur son taux de fécondité journalière. Dans des conditions contrôlées, nous utiliserons une méthode de suivi rapide permettant d'étudier l'effet des COV produits par différents organes aériens d'une PdS. Nous pourrions ainsi préciser le lien entre stade phénologique (et émission d'un mélange de COV capable de perturber la reproduction du puceron. Pour aller plus loin dans la recherche des mécanismes responsables de cet effet, nous évaluerons l'incidence de la présence de PdS sur le comportement alimentaire *M. persicae*. (**Chapitre 4**).

La troisième étape aura pour objet de confirmer en milieu semi-contrôlé, proche des conditions de culture en maraichage sous serre, la capacité des PdS à diminuer le développement de la population du *M. persicae* élevée sur poivron, plus précisément en suivant l'impact sur les performances reproductives de ce ravageur (**chapitre 5**).

Enfin, dans le cadre d'une discussion générale, nous reviendrons sur l'ensemble de nos résultats pour conclure sur les objectifs atteints et les voies de recherche qui se dessinent dans le prolongement de cette thèse.

Chapitre 2

Répulsion envers *Myzus persicae* (Sulzer) : mise en évidence de deux modes d'action des composés volatils des plantes aromatiques sélectionnées



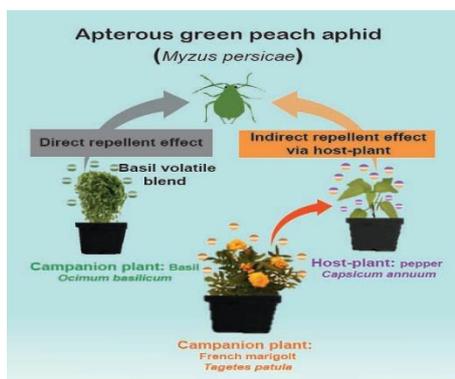
Chapitre 2

Répulsion envers *Myzus persicae* (Sulzer) : mise en évidence de deux modes d'action des composés volatils des plantes aromatiques sélectionnées

“ Repellence towards *Myzus persicae* (Sulzer): evidence of two modes of action of the volatiles from selected living aromatic plants ”

Article soumis (accepté avec révisions mineures) à *Pest Management Science*

Tarek Dardouri, Hélène Gautier*, Refka Ben Issa, Guy Costagliola, Laurent Gomez
UR1115 PSH Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, INRA, F84914, Avignon, France;



Dardouri *et al.* show that companion plants can repel *Myzus persicae* by a direct action of their volatiles (basil) or by an indirect action mechanism (French marigold) *via* the host plant (pepper).

Abstract

BACKGROUND: Intercropping companion plants (CPs) with horticultural crops could be an eco-friendly strategy to optimize pest management. In this research, volatile organic compounds (VOCs) emitted by some CPs were investigated for their repellent properties towards the green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer). In addition, the aim of this study was to understand the modes of action involved: direct effects on the aphid and/or indirect effects *via* the host plant (pepper, *Capsicum annuum* L.).

RESULTS: The present study showed that only the volatile blend from basil (*Ocimum basilicum*) had a direct repellent effect towards *M. persicae*. *Capsicum annuum* plants did not affect aphids' olfactory behavior. The only exception observed was the mixture or previous

intercropping of *C. annuum* plants with *Tagetes patula* cv. Nana. This supports the hypothesis of an indirect effect of *T. patula* VOCs on aphid behavior. This effect was cultivar-dependent and linked to the volatile bouquet. For the 16 compounds present in the *O. basilicum* and/or *T. patula* volatile bouquets tested individually, we found that (*E*)- β -farnesene (EBF) and eugenol reported good repellent properties towards *M. persicae*. Other compounds were repellent at medium and/or at highest concentrations. Thus, the presence of repellent volatiles in the volatile profile of the plant does not mean that it had a repellent propriety.

CONCLUSION: We identified two promising repellent companion plant species that can increase protection towards *M. persicae* infestations. Our results underline the specific effectiveness of VOCs blend and shed light on two different mechanisms, a direct VOC repellent effect on *M. persicae* or a VOC effect on the host plant that becomes repellent to the aphid.

Keywords: Olfactory behavior, Companion plant, *Myzus persicae* (Sulzer), Pepper (*Capsicum annuum* L.), Volatile Organic Compound (VOC), repellent,

1 Introduction

For many years, the intensification of agriculture and monocultures has caused various problems, in particular, the fast development of pest populations such as aphids (Hemiptera: Aphididae). Among these, the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) is one of the main agricultural pests in temperate regions. *Myzus persicae* is responsible for considerable damage on crops, the transmission of various viruses, and major economic losses.¹ Mostly, the control of this polyphagous aphid is dependent on chemical measures. However, despite their high effectiveness in reducing pests, they have strong drawbacks as they favor the development of resistant pest populations and contribute to environmental contamination.²

Various alternative methods (e.g. using natural products, release of natural enemies, and push-pull strategy) have been investigated to reduce aphid infestations and limit their damage to an acceptable level. Among these methods, intercropping with companion plants (CPs) is a promising eco-friendly approach.³⁻⁵ These CPs can be suggested as natural diffusers of semiochemicals, primarily monoterpenes (C₁₀H₁₆) and sesquiterpenes (C₁₅H₂₄), which function as repellents or arrestants and can increase the protection of cultivated plants towards aphids.⁶ The perception of potentially repellent plant volatile organic compounds (VOCs) through aphids sensilla (rhinaria – located in the insect antenna), can increase the deterrence effect, keeping populations away from crops, disrupting their settlement and most of all, reducing their performance and thus inhibiting the development of their population.⁴

Several authors state that some plants, belonging to the Lamiaceae and Asteraceae family, produce a number of VOCs with repelling properties against pests, including aphids.⁵ However, most of the studies were carried out with essential oils or plant extracts.^{7,8} Nonetheless, information available on living plants volatile effects is scarce. Various odor effects of aromatic plants with potential to influence aphid behavior were investigated in previous studies. Ben Issa *et al.*⁹ reported that Marigolds (*Tagetes* spp.) produce a large number of VOCs which can affect aphid performance, an aspect also verified in the plant essential oils.¹⁰ Basil (*Ocimum basilicum* L.) volatiles are well known for their repulsive effects on different aphid species.^{5,9,11,12} VOCs from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) plants are effective as a good aphid repellent.^{9,13} Similar properties have been reported for volatiles from lavender (*Lavandula latifolia* L.) and peppermint (*Mentha piperita* L.).^{9,14-16}

Scientists have put great effort into understanding CP volatile effects on pests. The properties of plant VOCs against aphids, such as repellency, have been frequently discussed in previous studies.^{4,6,17-19} In contrast, as it is difficult to monitor whole-system experiments, few studies were focused on their mode of action⁸ or on the underlying mechanisms.²⁰

Nevertheless, in order to optimize the use of CP in pest management, we need not only the confirmation of the effectiveness of the plant VOCs tested but also a greater understanding of the mechanisms involved.³ For this purpose, it is necessary to understand how CP acts and several hypotheses have been proposed for the mode of action of their volatiles towards aphids. By the emission of VOCs, CPs may disrupt aphid behavior directly through repellent activities.⁴ They can also mask the attractant host plant odoriferous stimuli, thus preventing its recognition by the pest.²¹ Therefore, chemical interaction between host plant VOCs and VOCs emitted from the surrounding environment and neighboring plants can also have a combined effect on herbivores. Another mechanism evoked is an indirect effect *via* the airborne communication between an emitter plant (CP) and a receiver plant (host plant).²²⁻²⁴ Without physical contact, some plants can adsorb and re-release VOCs perceived from neighboring plants²⁵ and react to diverse signals. VOCs from neighboring plants can be perceived as biologically relevant information by the receiver plant i.e. aerial allelopathy,²⁶ and consequently modify its biochemical metabolism and/or its volatile emission.^{22,23} Thus, VOCs as plant secondary metabolites can play an important role in plant-plant and plant-aphid chemical interactions and therefore be used as a tool to control aphids.

Furthermore, in order to better understand the action mechanisms of promising CPs, we need to know the effect of their compounds.²⁷ According to the information in literature, numerous single volatile compounds present in volatile mixtures of aromatic plants have been referenced to have a good repellent activity towards aphids and various pests, namely bisabolene, β -caryophyllene, camphor, (*E*)- β -farnesene (EBF), pinene, and linalol^{10,13,16,17,19,28,29}. However, we lack information on the effects of many other compounds towards *M. persicae*. Also, there is a need to obtain more knowledge of the effect of individual compounds on *M. persicae*, in order to limit the field area dedicated to CPs and to find the best cultural practices to promote the emission of efficient VOCs.

The aims of the present study were to investigate the effects of six living aromatic plant species volatiles towards *M. persicae* orientation responses under laboratory conditions, and to define their mode of action. In order to identify the mechanisms triggered by plant repellent volatiles, we examined the aphids' orientation under two conditions: (1) when *M. persicae* were submitted to VOCs emitted by the CPs alone (direct repellency hypothesis); and (2) when they were submitted to interactions between the host plant and CP VOCs (indirect effect of CP VOCs on aphid via host plant). Furthermore, we characterized the VOCs emitted by CPs using GC-MS. For a better understanding of the mechanisms involved, we also tested the repellency of individual compounds to establish the link between their repellent properties and the emitted VOC profile.

2 Material and methods

2.1 Plant material

Pepper plants (six weeks old) (*C. annuum* L., cv. Yolo Wonder) were used as host plants and six CPs [basil (*O. basilicum* L.), lavender (*L. latifolia* L.), peppermint (*M. piperita* L.), rosemary (*R. officinalis* L.) (Lamiaceae) and two French marigold cultivars (*T. patula* L., cvs. Nana and Bonita Bolero) (Asteraceae)] were potted in 1 L pots except, for *L. latifolia* (3 L pots). The choice of these species was mainly based on the previous work of Ben Issa *et al.* (2016) ⁹. For *T. patula*, we tested two cultivars to check another source of variability in volatile emissions so as to determine if genetic variability influences the CP effectiveness. Based on previous works on the effective phenological stage³⁰ against *M. persicae* (Dardouri *et al.*, not published), plants were used at non-flowering stage except for *L. latifolia* and *T. patula*, used at flowering stages. In order to prevent any interaction between their VOCs, CPs and host plants were placed in two separate greenhouses at the National Institute for Agricultural Research (INRA) of Avignon (France). Both greenhouses were maintained under similar climatic conditions (temperature of 20 ± 5 °C; relative humidity (r. h.) of 60%-70%). All plants were cultivated without the use of chemical pesticides or fertilizers and were watered using a drip irrigation system.

Based on the results of the direct effect of plant VOCs on *M. persicae* (Y-tube olfactometer), we selected two species to test the indirect effects of their volatiles on aphids' orientation i.e. *O. basilicum* (direct repellent effect), *T. patula* cv. Nana (no direct repellent effect but a significant repellent effect in the presence of the host plant). CP (emitter) and *C. annuum* (receiver) plants were intercropped in a phytotron (22 ± 2 °C, 60%–70% r. h. and L16:D8 photoperiod cycle) for 5 days before the experiment.²³ We used potted plants arranged in alternate rows of CPs and rows of *C. annuum* plants (20 cm between rows and pots in a row). Pots were placed in pot saucers so as to avoid any interaction between plant roots. Control *C. annuum* plants were grown simultaneously in another phytotron without CPs. Controls and treatment were used in olfactory bioassays. Pepper (*C. annuum*) Previously Intercropped will be further referred to as PPI.

2.2 *Myzus persicae* insects

Viviparous wingless females of *M. persicae* (clone Mp05), originally collected from a peach orchard of the INRA of Avignon, were reared on potted *C. annuum* plants in controlled conditions (temperature of 22 ± 1 °C; r. h. of 60%-70% and L16:D8 photoperiod). Ten-day-old adult aphids (issued from the nymphs laid by females for 24 hours) were used for all olfactory tests.

2.3 Response of aphids to companion plant volatiles (Y-tube olfactometer bioassays)

In order to study the effect of VOCs from CPs on aphid olfactory orientation behavior under controlled conditions (22 ± 1 °C; 60–70% r. h.), we used a tubular Y-shaped olfactometer (one 14 cm length arm and two 15 cm length branched arms, ID = 1.5 cm, angle between branched arms = 110°) (Figure 2.1.A).

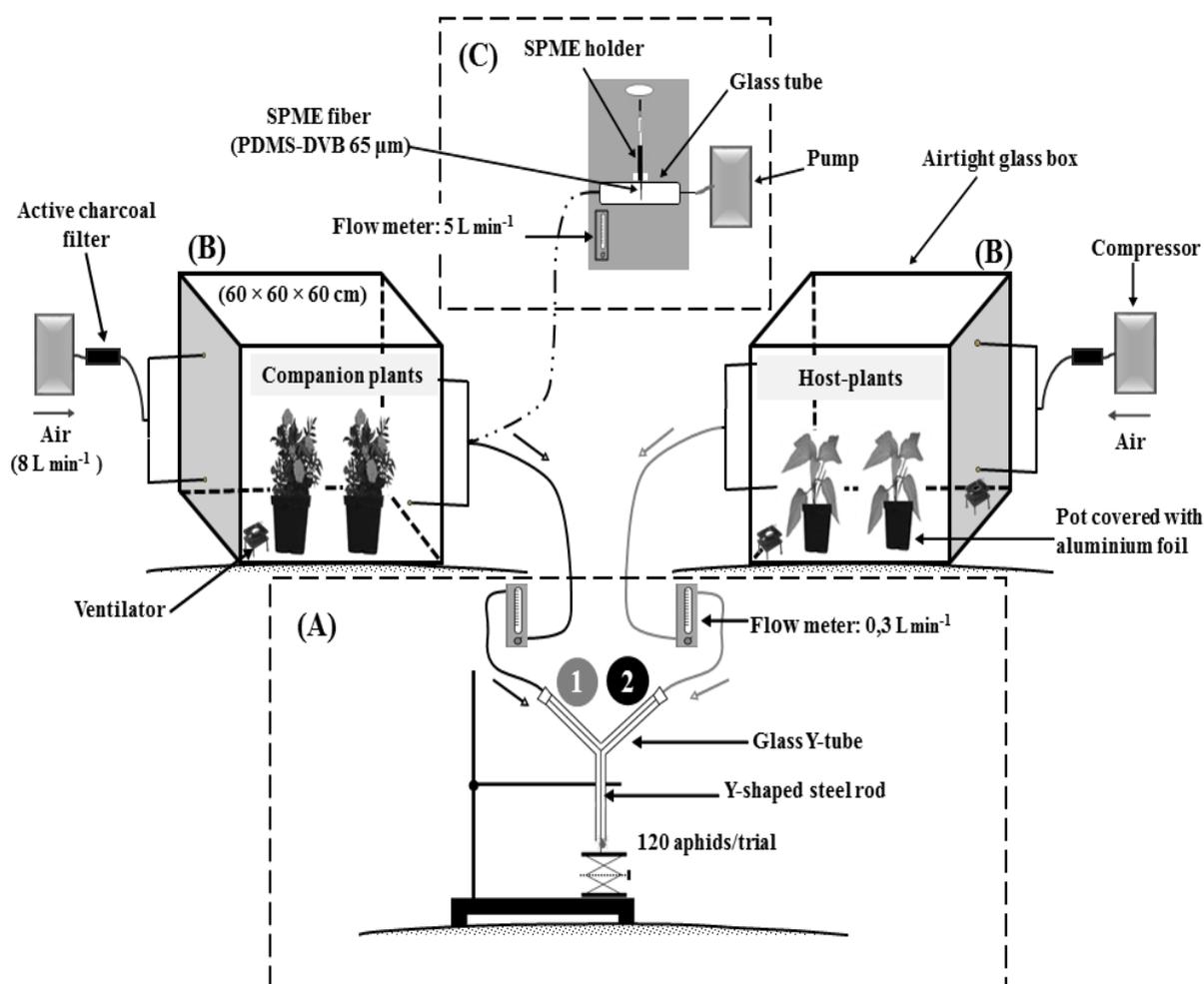


Figure 2.1. Schematic representation of the device used for (A), dynamic sampling of VOCs from living companion plants using the headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) technique and for (B), to study the effect of plant volatile compounds on *Myzus persicae* olfactory behavior using the Y-tube olfactometer. (C), Odor source placed in two airtight glass cages. All connections were made using PTFE (Teflon®) tubing (8 and 10 mm diameter).

A Y-shaped steel rod was placed in the center of the Y-tube glass and the olfactometer was positioned vertically.³¹ Approximately four hours before beginning the bioassay, the plants used as an odor source were placed inside two airtight glass cages (Figure 2.1.B) and the

following choices were tested: (A), six *C. annuum* plants versus (vs) clean air and six CPs vs clean air; (B), six *C. annuum* plants vs six CPs; (C), three CPs and three *C. annuum* plants vs six *C. annuum* plants; and (D), six *C. annuum* plants vs six PPI with CPs. Two other tests (clean air vs clean air and six *C. annuum* plants vs six *C. annuum* plants) were carried out as controls to test for device bias.

During testing, 300 mL min⁻¹ of air (monitored by flow meter) was channeled from each cage (potential VOCs source) into one of the two olfactometer arms. Using a fine paintbrush, a single aphid, starved at least for 2 h before the tests, was placed on the rod at the base of the olfactometer. The aphid could exhibit negative geotaxis and climb on the rod until the Y-junction where it made a choice between one of the two odor sources. The decision was recorded when the aphid reached one of the two olfactometer arms finishing lines, located 8 cm from the Y-junction. Aphids that did not make any choice within 5 min were scored as non-responders and were excluded from statistical analysis. In order to homogenize light in the experimental room and avoid any visual influence, the observations were performed in the dark with a red light lamp placed centrally above the olfactometer. In order to avoid device bias, after testing 10 individuals, the Y-tube was cleaned with ethanol at 70% (v/v) and distilled water and let dry for 5 min in the vacuum oven at 110 °C. Then, the positions of the olfactometer arms were reversed. After each experiment, the device was washed with soapy water (odorless detergent), ethanol (70%) and distilled water. For each modality, 120 responder aphids were individually tested. A permutation of odor sources was carried out between the two cages after each 50% of observations (60 responder aphids). All the olfactory tests were conducted between 1 pm and 5 pm.

2.4 Collection and analysis of volatile compounds

VOCs emitted by CPs were collected in controlled conditions (22± 1 °C; 60–70% r. h.) using HS-SPME (headspace solid phase micro-extraction). Two hours before VOC sampling (at 11 am), six plants of each treatment were enclosed in one of the two airtight glass chambers (60 × 60 × 60 cm) (same device and same plants used for olfactory experiments). A dynamic system was used to sample VOCs (Figure 2.1.C). An airflow (8 L min⁻¹, filtered through an active charcoal filter) was pumped by a compressor into each glass cage containing the odor sources. During sampling, an airflow regulated at a constant rate of 5 L min⁻¹ was pumped from the ventilated glass chamber containing the VOCs source into a glass tube. Then, an SPME fiber (PDMS/DVB, 65 µm; Bellefonte, USA) was inserted into the glass tube through a septum and exposed to the airflow aspired for 30 min. VOC collections were replicated four times for each treatment. After the end of each VOC collection, the SPME fiber was injected directly into a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC-MS) (Trace-ISQ. single quadrupole (Thermo Scientific. Austin. TX. USA)) equipped with an apolar capillary column TR-5MS (Thermo) 20 m; 0.1 mm ID; 0.1 µm film thickness. The fiber was left in the injector for 2 min

at 250 °C followed by a 30 min analysis. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. The oven temperature was set at 40 °C for 2 min and then programmed from 20 °C min⁻¹ to 300 °C. The ionization was by electron impact at 70 eV in the m/z 35-450 range. The integration of the peaks was achieved manually, obtained by using the Thermo Xcalibur software. The identification of peaks and compounds was performed by comparing the mass spectra and retention indices with those obtained from commercial standards (for available compounds), and with those found in the NIST11 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) spectral library.

2.5 Chemical standards and reagents

Based on VOCs profile analyses, the following compounds, identified as major compounds in the volatile profiles of effective plants against *M. persicae* (i.e. *O. basilicum* and *T. patula* cv. Nana) and/or common compounds of these plants, were tested individually in this study (respective standard purity represented in brackets): EBF (93%), eucarvone (99%), eugenol (98%), geranyl acetone (97%), limonene (97%), linalol (97%), methyleugenol (98%), myrcene (90%), ocimene mixture (90%), p-cymene (97%), piperitone (98%), sabinene (75%), terpinolene (90%), verbenone (93%), α -terpineol (96%), and β -caryophyllene (80%). All these compounds were purchased from Sigma-Aldrich® (France). EBF, the main component of the aphid alarm pheromone, was used as a positive control and pure ethanol was used as a negative control. All the tested compounds were diluted at 0.01, 0.1 and 1.0% (v/v) in ethanol. Five compounds (i.e. α -bergamotene, δ -cadinene, β -elemene, germacrene-D, and γ -muurolene) were not tested as they were not available for purchase.

2.6 Aphids' response to individual volatile compounds (still-air olfactometer bioassays)

The *Myzus persicae* olfactory response to single synthetic compounds was tested using the same assay protocol used by Abtew *et al.* 7, with some modifications so as to adapt them to aphids' behavior. The linear tube still-air olfactometer consisted of a glass cylinder (L = 10 cm; ID = 2 cm), which was closed at the top with a screen mesh, a treated filter paper (Whatman® N°1. 4.5 cm²) and a rubber cap, in this order, and was closed at the bottom with a perforated transparent rubber box (L = 2 cm; ED = 2 cm) (Figure 2.2). The olfactometer was divided into three equal parts (3.8 cm per section). A transparent yellow PVC washer (thickness = 0.2 mm; width = 0.5 cm) placed at the end of the top section as a visual cue, combined with the negative geotactic behavior of aphids, naturally pushes the majority of aphids into this section.

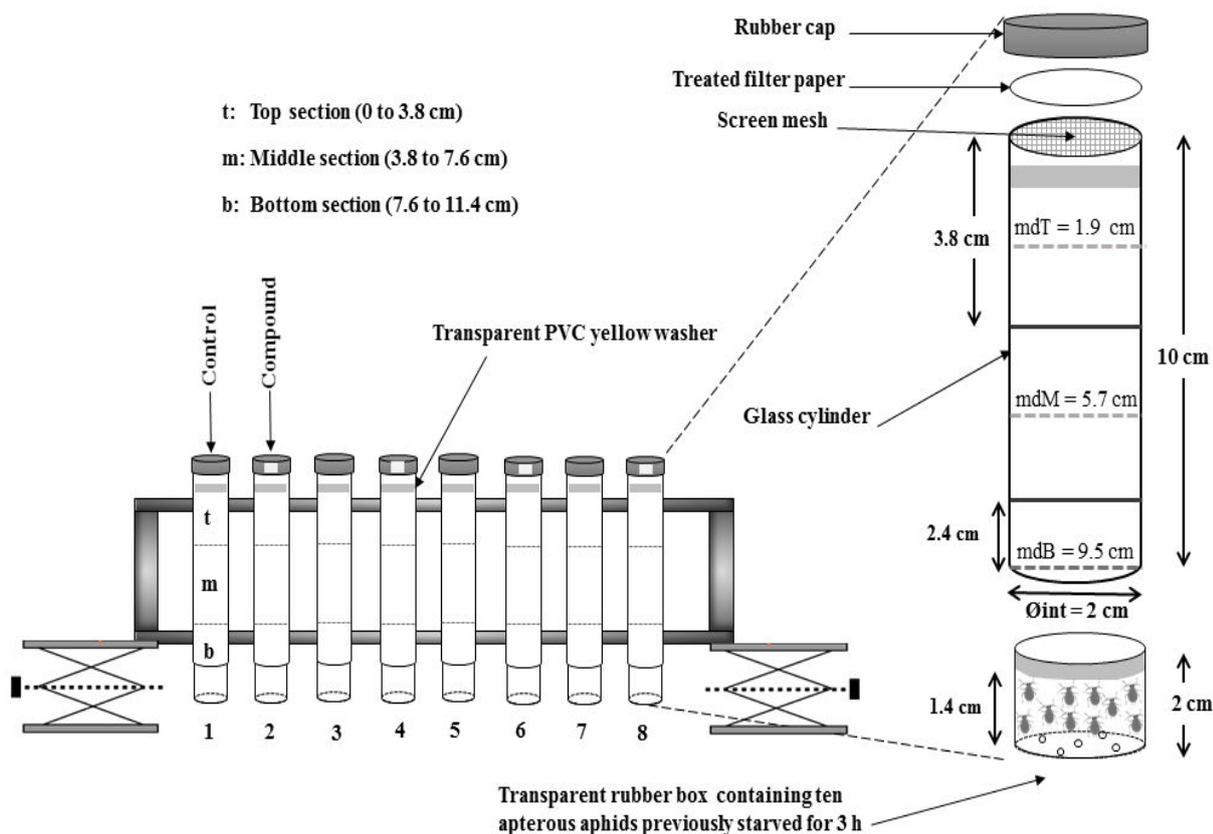


Figure 2.2. Schematic representation of the vertical tube still-air olfactometer used to study the effect of individual volatile compounds on *Myzus persicae* olfactory behavior.

However, aphids prefer to remain in the lower part when the tested compound has a repellent property. Individual compound solutions for each volatile were prepared in absolute ethanol (as a solvent) at 0.01, 0.1 and 1% (v/v), dosed at a volume of 3 μ L on filter paper (odor source), and fixed in the rubber cap which allows closing the top end of the olfactometer. A rubber box containing 10 *M. persicae* females, previously starved for 3 h, were placed at the bottom end of each olfactometer. The number of aphids in each section was recorded 10 and 20 minutes after the test began. The repulsion index was calculated according to the following formula 7:

$$Repulsion\ index\ (Ri) = \frac{((mdT \times t) + (mdM \times m) + (mdB \times b))}{n} = \frac{((1.9 \times t) + (5.7 \times m) + (9.5 \times b))}{(t + m + b)} \quad (1)$$

Where Ri represents the repulsion index; mdT is the mean distance for the top olfactometer part; mdM is the mean distance for the middle section; mdB is the mean distance for the bottom section; t, m, b and n are the number of aphids counted at the top, middle, bottom section and the total number of aphids per olfactometer, respectively.

Each concentration of each compound was repeated eight times simultaneously with eight controls (3 μ L of ethanol). The three concentrations of the same compound were tested per day, from the lowest to the highest concentration. All tests were conducted in controlled conditions

(22 ± 1 °C; 60-70% r. h.), between 8 am and 6 pm, under a fume hood (Geometra®) illuminated from above by fluorescent tubing. The device was washed with odorless detergent, ethanol (70%) and distilled water after each test, and then air-dried for at least 16 h.

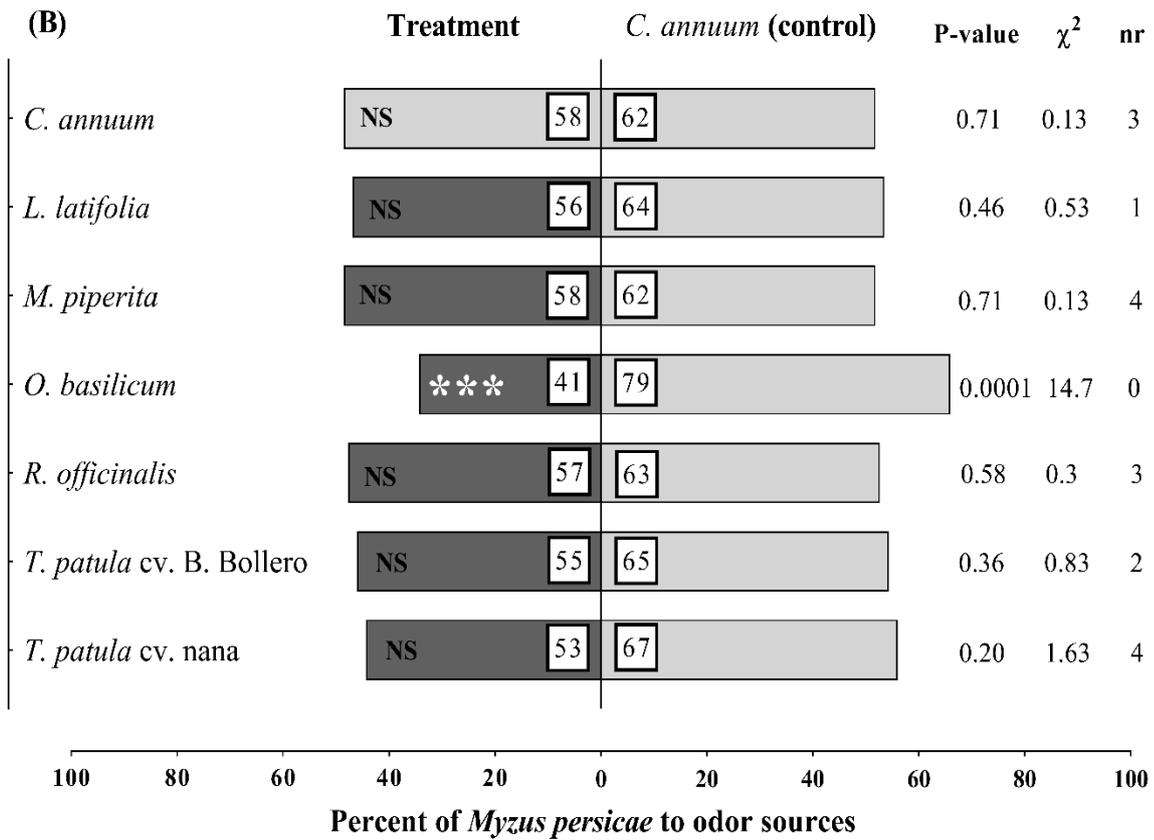
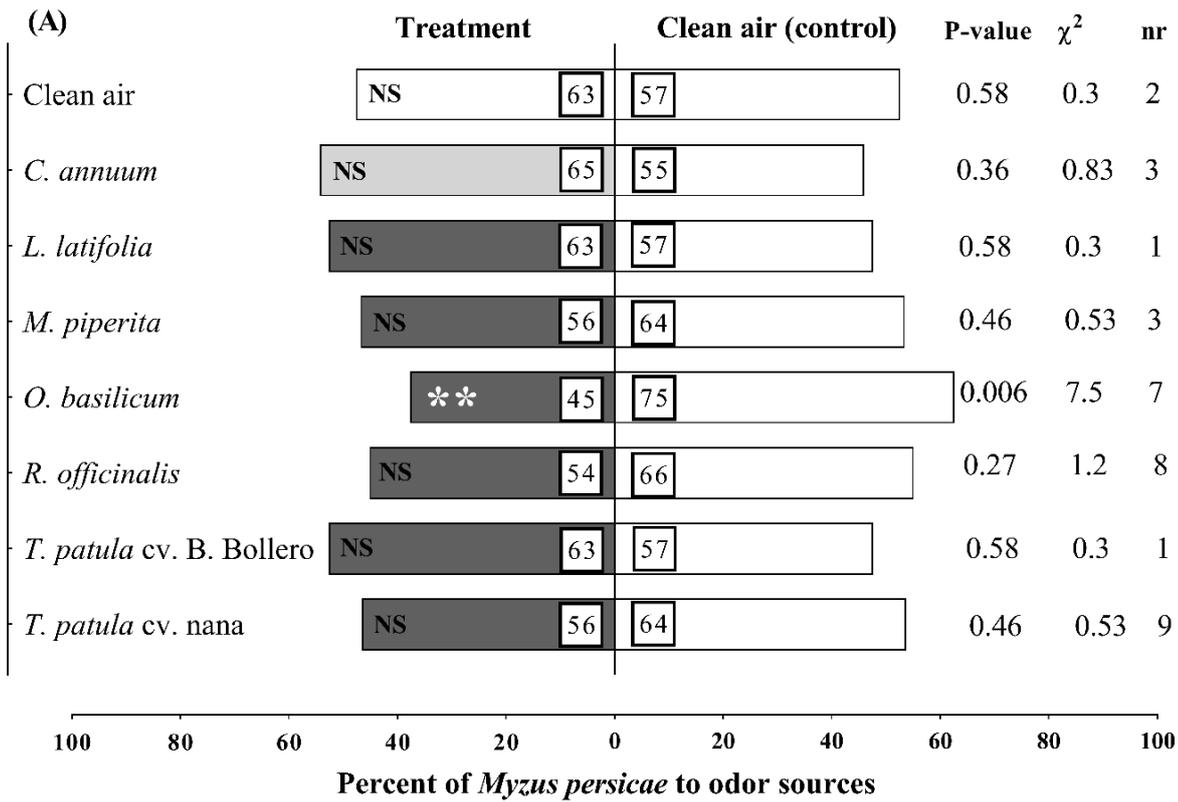
2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with R 3.1.0 software. Concerning Y-tube olfactometer experiments, the distribution of responders on each arm of the olfactometer (odor sources) was analyzed for each treatment conducted by means of Chi-square (χ^2) tests with a 50% expected response ($\alpha=0.05$). The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare the number of non-responders between the different treatments. For still-air olfactometer bioassays, repellency of tested compounds was calculated using the above-mentioned formula. These data were first checked for normality through the Shapiro-Wilk test and for unequal variance using Levene's test. Given that normality and homoscedasticity were not achieved for all data, the non-parametric Wilcoxon test was applied to compare the olfactory responses of *M. persicae* between control (no compound) and treatment (individual compounds).

3 Results

3.1 Effect of companion plant volatiles on aphid olfactory response

The majority of the aphids assayed made a choice; only 3% had no response to the bioassays. The number of non-responders was not statistically different among the various tests (Kruskal–Wallis: $K = 34.89$; P -value = 0.07). For both tests setting similar content in both cages (either clean air *vs* clean air or *C. annuum vs C. annuum*), *M. persicae* responded equally to odors from the two Y-arms, confirming that there was no directional bias (Figure 2.3). No preference for *C. annuum* over the clean air was observed, indicating that the volatile blend from this host plant was not attractive to *M. persicae*. The results showed that of the six CPs tested, *M. persicae* were repelled only by *O. basilicum* volatiles when compared with clean control air or *C. annuum* volatiles (63 % and 66 % of repellency, respectively). *Rosmarinus officinalis*, *M. piperita*, *L. latifolia*, and both *T. patula* cultivars had no significant effect on *M. persicae* orientation responses. However, when the odors of CP and *C. annuum* plants were mixed against *C. annuum* odors, in addition to the significant effect observed with *O. basilicum-C. annuum* mixture (61% repellency), the *T. patula* cv. Nana-*C. annuum* mixture affected the olfactory response of *M. persicae* (63% repellency). Also, when given the choice between *C. annuum* and PPI with CPs, aphids showed a significant preference for *C. annuum* (59 %) only against PPI with *T. patula* cv. Nana.



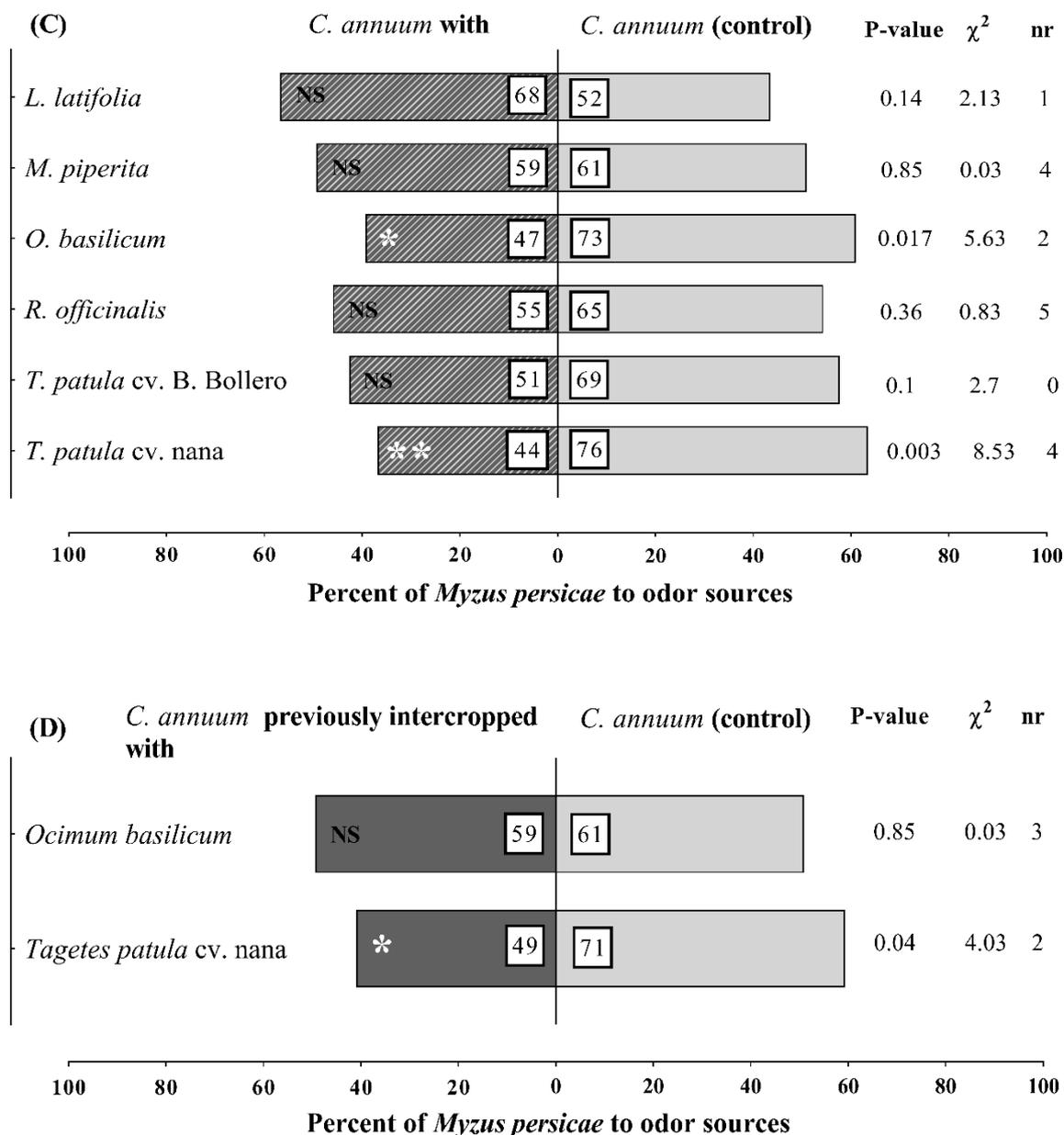


Figure 2.3. Olfactory behavioral responses of *Myzus persicae* to living plant odors on a Y-tube olfactometer: (A), companion plant (CP) volatiles (dark gray bars) or *C. annuum* plant volatiles (light gray bars) vs. clean air (control; white bars); (B), volatiles from CPs vs. *C. annuum* plant volatiles; (C), mixture of CP and *C. annuum* plant volatiles (gray hatched bars) vs. *C. annuum* plant volatiles; and (D), *Capsicum annuum* previously intercropped with CP volatiles (dark gray bars) and vs. *C. annuum* plant volatiles (light gray bars). *Capsicum annuum* and clean air were used as controls. “N”= 120 responding aphids per trial. P-value determined with Chi-square (χ^2) ($\alpha=0.05$) tests with a 50 % expected response (* $P < 0.05$; ** $0.001 < P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS. not significant).

3.2 Analysis of the volatile profiles of companion plants

The GC-MS analyses of volatiles collected from six CPs are shown in Table 2.1. A total of 20, 12, 47, 25, 30, and 30 were identified in the respective volatile profiles of *R. officinalis*, *M. piperita*, *L. latifolia*, *O. basilicum*, *T. patula* cv. Nana, and *Tagetes patula* cv. Bonita Bolero. The main VOCs emitted by *R. officinalis* were borneol (19%), limonene (15%), *o*-cymene (12%), bornyl acetate (9%), camphor (8%), and α -pinene (7%). Few compounds were emitted by *M. piperita*. The major components were menthone (35%), menthofurane (24%), menthol (12%), pulegone (10%), limonene (8%), and menthol acetate (7%). *Lavandula latifolia* emitted important amounts of linalol (42%), camphor (17%), and borneol (18%). The *Ocimum basilicum* VOC blend was characterized by a high content of methyleugenol (76%) and a considerable percentage of EBF (7%), α -bergamotene (6%) and eugenol (5%). The main compound of *T. patula* cultivars Nana and Bonita Bolero was β -caryophyllene (32% and 36%, respectively). They also emitted an equal proportion of limonene (6%). Nevertheless, we observed that chromatographic profiles differed depending on the cultivar. The proportion of terpinolene was higher in Bonita Bolero (17%) than Nana (7%). An important proportion of piperitone (12%), (*E*)- β -ocimene (10%), verbenone (5%), eucarvone (4%), and *p*-cymen-8-ol (3%) were present in the Nana VOC profile. On the other hand, β -elemene (7%), neo-alloocimene (6%) and δ -cadinene (3%) were important volatiles in the Bonita Bolero profile. We verified the absence of EBF in the VOC blend from Nana plants and of α -terpineol in Bonita Bolero's. Finally, we observed that some compounds were equally present in different species. The most frequently detected compounds were eucalyptol, geranyl acetone, limonene, linalol, β -myrcene, and terpinolene (identified in the volatile profiles of four different species). Globally, the compounds identified belong to two chemical groups of compounds of terpenic nature: monoterpenes and sesquiterpenes.

3.3 Effect of individual compounds on aphid olfactory response

Behavioral responses of *M. persicae* to individual compounds emitted in greater proportion (> 1%) by two promising CPs (*O. basilicum* and *T. patula* cv. Nana) were evaluated at three different concentrations and two assessing moments (Figure 2.4). Still-air olfactometer tests demonstrated that among the 16 compounds tested, only six (i.e. eucarvone, methyleugenol, limonene, *p*-cymene, terpinolene, and verbenone) did not have a significant repellent effect on *M. persicae*, whatever the concentration tested. The repellent activity depended on the concentration used. Only EBF and eugenol exhibited repellent action against *M. persicae* at the three concentrations. Aphids were significantly repelled by myrcene and α -terpineol at medium concentration (0.1%), and by myrcene, α -terpineol, linalol, geranyl acetone, ocimene, piperitone, sabinene, and β -caryophyllene at the highest concentration (1%). Globally, responses of *M. persicae* were similar at both exposure times except for α -terpineol, myrcene, sabinene, and linalol.

Table 2.1 (1/4). Relative percentages (mean \pm standard deviation) of VOCs emitted by companion plant species. The relative area of each compound was calculated by dividing the peak area of this compound by the total peak area (n = 4). VOCs are listed according to their retention time (RT).

No.	Compounds	RT	RI	Companion plant species					
				<i>Lavandula latifolia</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Tagetes patula</i> cv. Nana	<i>Tagetes patula</i> cv. Bonita Bolero
1 [†]	α -Pinene	4.51	929	0.02 \pm 0.02	-	0.10 \pm 0.08	7.23 \pm 0.54	-	-
2 [†]	Camphene	4.7	945	0.01 \pm 0.01	-	-	3.12 \pm 0.14	-	-
3 [†]	Sabinene	5.01	968	-	-	0.18 \pm 0.16	-	0.39 \pm 0.11	0.63 \pm 0.53
4 [†]	β -Pinene	5.05	971	-	-	0.06 \pm 0.05	1.50 \pm 0.11	-	-
5 [†]	β -Myrcene	5.2	984	1.08 \pm 0.67	-	0.18 \pm 0.24	1.10 \pm 0.23	0.43 \pm 0.12	0.21 \pm 0.17
6 [†]	α -Phellandrene	5.38	998	-	-	-	1.93 \pm 1	-	-
7 [§]	(<i>Z</i>)-3-hexenyl acetate	5.43	1002	-	-	-	-	3.28 \pm 0.61	1.42 \pm 1.21
8 [†]	<i>o</i> -Cymene	5.64	1017	-	-	-	12.15 \pm 2.37	0.69 \pm 0.48	0.09 \pm 0.08
9 [†]	Limonene	5.69	1022	0.24 \pm 0.22	7.64 \pm 1.02	-	15.38 \pm 1.82	5.68 \pm 0.89	5.94 \pm 3.54
10 [†]	Eucalyptol	5.73	1025	3.12 \pm 1.11	0.26 \pm 0.12	0.40 \pm 0.21	2.67 \pm 0.38	-	-
11 [†]	(<i>E</i>)- β -Ocimene	5.78	1028	-	0.19 \pm 0.05	-	-	9.94 \pm 0.71	3.51 \pm 1.86
12 [§]	1-Hepten-4-ol	5.84	1032	-	0.60 \pm 0.19	-	-	-	-
13 [†]	β -Ocimene	5.95	1042	0.87 \pm 0.59	-	-	-	2.11 \pm 0.04	3.40 \pm 2.94
14 [†]	γ -Terpinene	6.08	1051	0.07 \pm 0.02	-	-	2.84 \pm 0.22	-	-
15 [†]	(<i>Z</i>)- β -Terpineol	6.2	1062	0.03 \pm 0.03	0.71 \pm 0.20	-	1.60 \pm 0.24	-	-
16 [†]	Linalol oxide	6.35	1072	0.20 \pm 0.09	-	-	-	-	-
17 [†]	Terpinolene	6.49	1083	0.31 \pm 0.26	-	0.64 \pm 0.33	0.81 \pm 0.05	7.39 \pm 0.98	17.52 \pm 7.05
18 [†]	Linalol	6.62	1094	42.14 \pm 3.33	-	0.30 \pm 0.13	1.15 \pm 0.16	1.88 \pm 0.71	1.73 \pm 1.51
19 [†]	Neo-allo-ocimene	7.06	1122	1.02 \pm 0.29	-	-	-	1.61 \pm 0.31	6.21 \pm 3.52

Table 2.1 (2/4)

No.	Compounds	RT	RI	Companion plant species					
				<i>Lavandula latifolia</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Tagetes patula</i> cv. Nana	<i>Tagetes patula</i> cv. Bonita Bolero
20 [†]	(Z)-Tagetone	7.31	1138	-	-	-	-	0.87 ± 0.21	0.55 ± 0.23
21 [†]	Camphor	7.34	1141	16.97 ± 2.47	-	0.11 ± 0.12	8.40 ± 0.62	-	-
22 [†]	Menthone	7.47	1148	-	34.88 ± 4.02	-	-	-	-
23 [†]	Menthofurane	7.63	1155	-	24.35 ± 1.93	-	-	-	-
24 [†]	Borneol	7.69	1162	16.77 ± 4.23	-	-	18.88 ± 0.79	-	-
25 [†]	Menthol	7.77	1168	-	12.49 ± 2.20	-	-	-	-
26 [†]	Terpinen-4-ol	7.85	1173	0.15 ± 0.07	-	-	4.44 ± 0.52	-	-
27 [†]	p-Cymen-8-ol	7.99	1182	-	-	-	-	3.35 ± 0.65	0.09 ± 0.07
28§	Crypton	8.07	1187	0.6 ± 0.28	-	-	-	-	-
29 [†]	α-Terpineol	8.08	1188	0.56 ± 0.30	-	0.26 ± 0.24	2.93 ± 0.35	0.83 ± 0.47	-
30§	Myrtenol	8.24	1197	0.17 ± 0.10	-	-	-	-	-
31 [†]	Verbenone	8.41	1207	0.11 ± 0.06	-	-	0.74 ± 0.13	4.77 ± 2.64	0.05 ± 0.05
32§	(Z)-Carveol	8.6	1217	0.19 ± 0.08	-	-	-	-	-
33 [†]	2-Hydroxycineole	8.68	1221	0.12 ± 0.09	-	-	-	-	-
34 [†]	Isobornyl formate	8.78	1226	1.77 ± 0.43	-	-	-	-	-
35 [†]	Pulegone	8.92	1235	-	10.08 ± 0.47	-	-	-	-
36§	Cuminaldehyde	8.98	1237	0.34 ± 0.19	-	-	-	-	-
37 [†]	Carvone	9.04	1241	0.28 ± 0.07	-	-	-	-	-
38 [†]	Linalyl anthranilate	9.18	1248	4.56 ± 0.74	-	-	-	-	-
39 [†]	Piperitone	9.23	1251	0.15 ± 0.06	-	-	-	11.53 ± 3.81	3.29 ± 2.42

Table 2.1 (3/4)

No.	Compounds	RT	RI	Companion plant species					
				<i>Lavandula latifolia</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Tagetes patula</i> cv. Nana	<i>Tagetes patula</i> cv. Bonita Bolero
40 [†]	(+)- <i>p</i> -Mentha-1.8-dien-3-one	9.54	1268	-	-	-	-	0.35 ± 0.23	0.19 ± 0.11
41 [†]	Bornyl acetate	9.78	1281	1.98 ± 0.46	-	0.39 ± 0.29	9.33 ± 1.83	-	-
42 [†]	Menthol acetate	9.9	1287	-	7.39 ± 0.62	-	-	-	-
43 [†]	Cuminol	9.91	1288	0.12 ± 0.09	-	-	-	-	-
44 [‡]	γ-Elemene	10.82	1333	-	-	-	-	0.43 ± 0.14	0.47 ± 0.38
45 [†]	Eucarvone	10.91	1338	-	-	-	-	4.38 ± 2.02	0.72 ± 0.63
46 [§]	Eugenol	11.24	1353	-	-	4.72 ± 2.57	-	-	-
47 [§]	Neryl acetate	11.29	1356	0.73 ± 0.34	-	-	-	-	-
48 [‡]	Copaene	11.62	1372	-	-	0.05 ± 0.02	-	-	-
49 [§]	Geranyl acetate	11.69	1376	1.54 ± 0.83	-	-	-	-	-
50 [‡]	Zingiberene	11.89	1385	0.06 ± 0.04	-	-	-	-	-
51 [‡]	β-elemene	11.94	1387	-	-	0.38 ± 0.22	-	2.45 ± 0.94	6.80 ± 6.73
52 [‡]	α-Guaiene	12.16	1398	-	-	-	-	0.32 ± 0.32	1.27 ± 1.23
53 [‡]	(<i>Z,E</i>)-α-Farnesene	12.21	1401	0.13 ± 0.04	-	-	-	-	-
54 [§]	Methyleugenol	12.23	1402	-	-	76.11 ± 4.73	-	-	-
55 [‡]	(<i>E</i>)-α-Bergamotene	12.43	1411	0.11 ± 0.03	-	-	-	-	-
56 [‡]	β-Caryophyllene	12.55	1417	1.09 ± 0.32	0.60 ± 0.22	-	3.49 ± 0.98	31.95 ± 4.07	35.80 ± 6.45
57 [‡]	Aromandendrene	12.55	1418	-	-	0.22 ± 0.03	-	-	-
58 [‡]	β-ylangene	12.75	1426	0.09 ± 0.04	-	-	-	2.41 ± 1.62	2.07 ± 1.44
59 [‡]	α-Bergamotene	12.85	1431	0.14 ± 0.05	-	5.73 ± 0.58	-	-	-

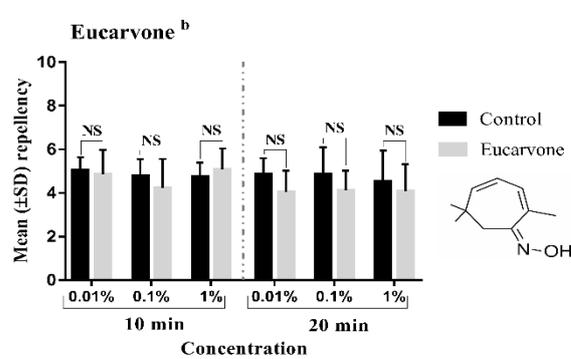
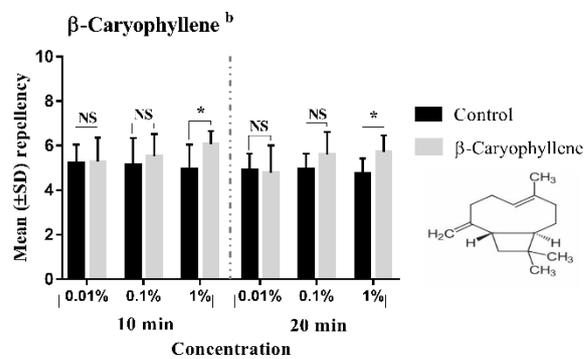
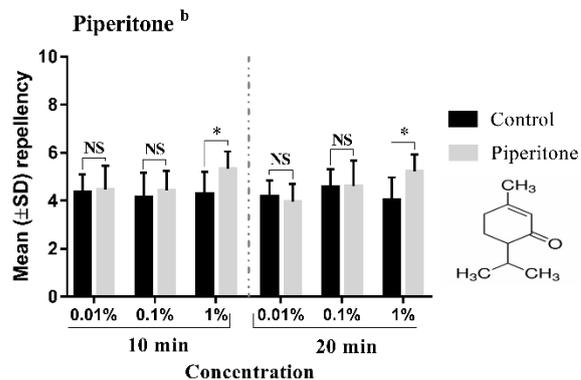
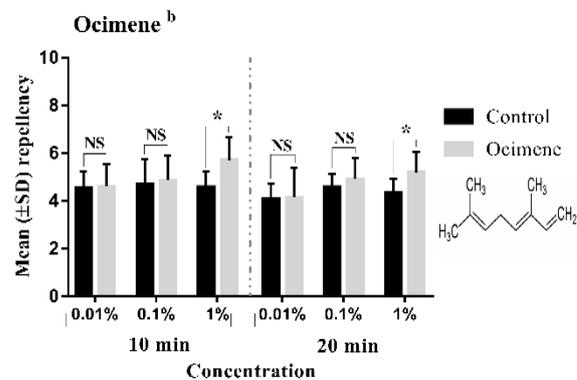
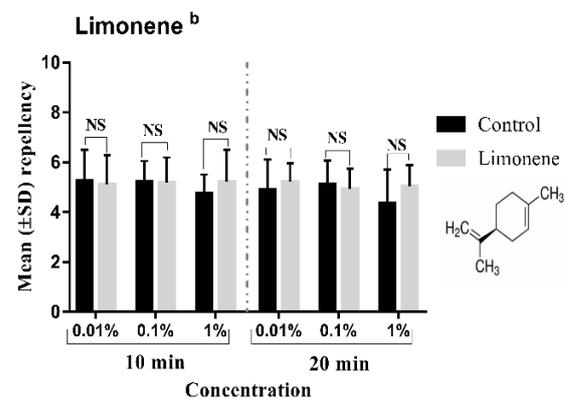
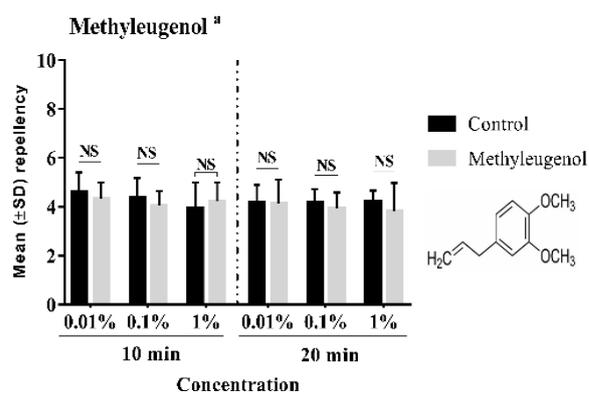
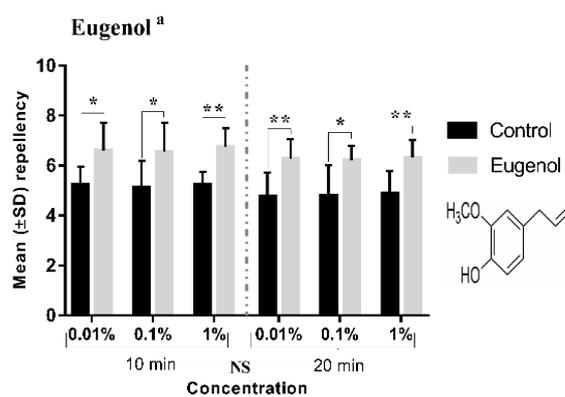
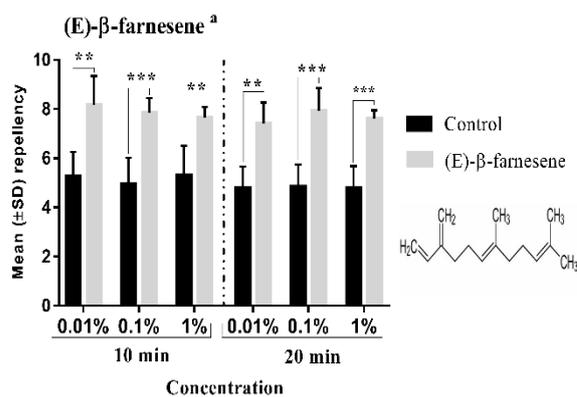
Table 2.1 (4/4)

No.	Compounds	RT	RI	Companion plant species					
				<i>Lavandula latifolia</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Tagetes patula</i> cv. Nana	<i>Tagetes patula</i> cv. Bonita Bolero
60§	Geranyl acetone	13.14	1445	-	0.81 ± 0.16	0.36 ± 0.04	0.30 ± 0.10	0.09 ± 0.07	0.45 ± 0.20
61‡	(<i>E</i>)-β-Farnesene	13.25	1449	0.35 ± 0.20	-	7.04 ± 1.28	-	-	1.88 ± 2.13
62‡	Humulene	13.25	1450	-	-	-	-	0.41 ± 0.32	0.38 ± 0.38
63‡	Linalyl isobutyrate	13.41	1457	0.08 ± 0.03	-	-	-	-	-
64‡	β-Cuvebene	13.47	1459	0.03 ± 0.02	-	-	-	0.06 ± 0.02	0.15 ± 0.15
65‡	β-Copaene	13.49	1460	0.04 ± 0.02	-	-	-	-	-
66‡	Germacrene-D	13.87	1478	0.03 ± 0.01	-	0.24 ± 0.14	-	0.97 ± 0.53	1.37 ± 1.01
67‡	(<i>Z</i>)-β-Farnesene	13.9	1480	-	-	0.08 ± 0.01	-	-	-
68§	Isomethyleugenol	14.12	1489	-	-	1.07 ± 0.17	-	-	-
69‡	α-Selinene	14.26	1497	0.03 ± 0.02	-	-	-	-	-
70‡	α-Farnesene	14.35	1500	-	-	-	-	0.20 ± 0.08	0.44 ± 0.44
71‡	α-Bulnesene	14.37	1501	-	-	0.39 ± 0.18	-	-	-
72‡	β-Bisabolene	14.4	1503	-	-	-	-	0.14 ± 0.08	0.32 ± 0.32
73‡	γ-Muurolene	14.54	1509	0.81 ± 0.39	-	0.52 ± 0.40	-	0.51 ± 0.39	0.55 ± 0.56
74‡	δ-Cadinene	14.72	1517	0.11 ± 0.04	-	0.13 ± 0.03	-	0.56 ± 0.35	2.51 ± 2.39
75‡	Caryophyllene oxide	16.06	1579	0.19 ± 0.10	-	-	-	-	-
76§	Cubenol	16.72	1611	0.06 ± 0.04	-	-	-	-	-
77§	α-epi-Cadinol	17.24	1638	0.43 ± 0.32	-	0.34 ± 0.18	-	-	-
Σ of VOCs areas				55.6E+08 ± 40.9E+08	3.33E+08 ± 1.48E+08	16.5E+08 ± 11.5E+08	9.79E+08 ± 0.80E+08	2.86E+08 ± 1.90E+08	2.93E+08 ± 1.27E+08

RI, retention indices relative to (C8–C20) n-alkanes series on a TR-5MS column;

Compounds with relative percentages higher than 1% are represented in bold;

“-”not detected; † Monoterpene; ‡ Sesquiterpene; § Others.



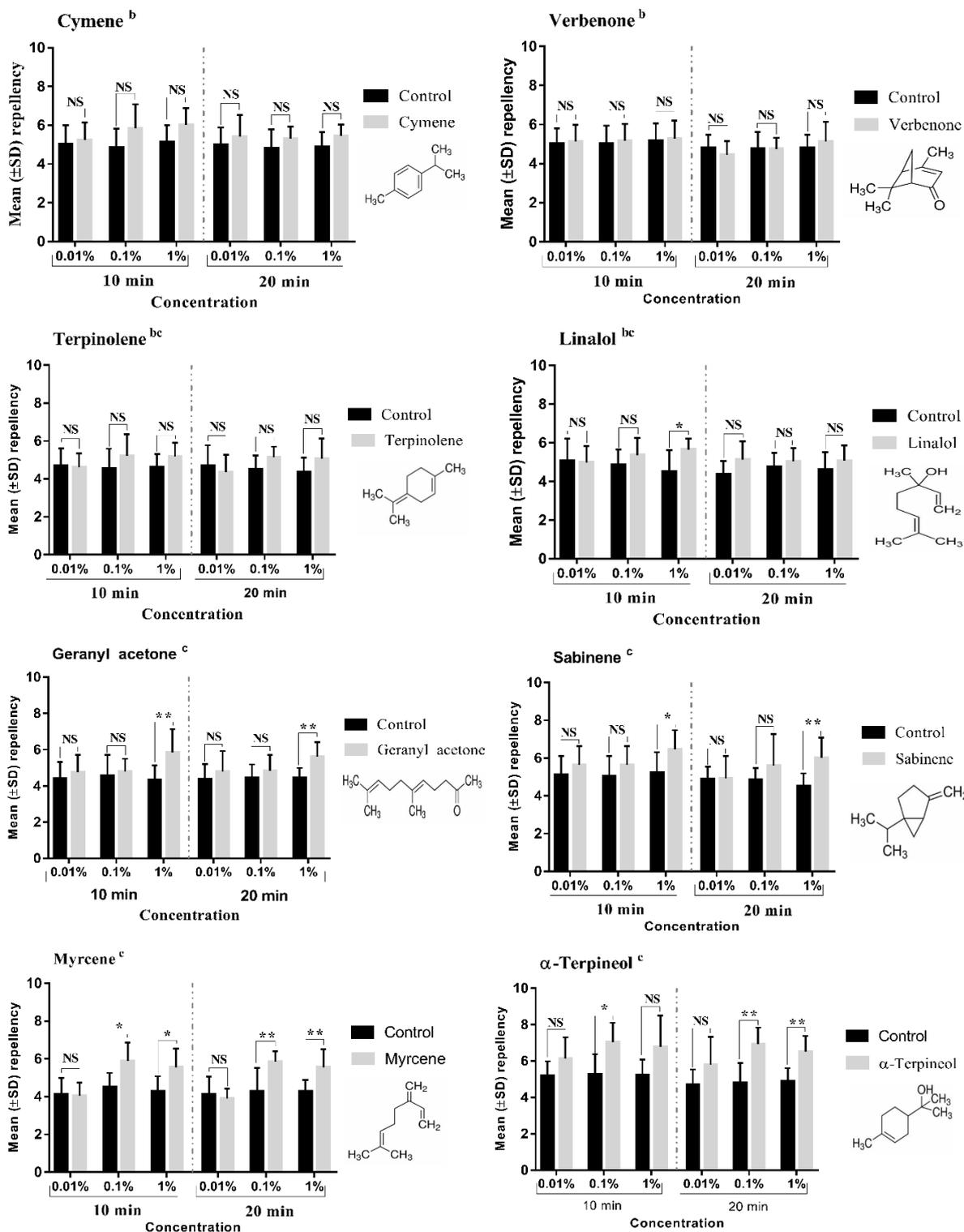


Figure 2.4. Olfactory behavioral responses (mean \pm standard deviation) of *Myzus persicae* to individual compounds at three concentrations (0.01, 0.1, and 1%) and two different times (10 and 20 min) in a still-air olfactometer. Black bars represent the control (no compound) and gray bars represent compounds at a defined concentration and time. a: *O. basilicum* major compound, b: *T. patula* cv. Nana major compound and c: compound shared between *O. basilicum* and *T. patula* cv. Nana; error bars represent standard deviation, *P*-value determined with Wilcoxon's test ($\alpha=0.05$): **P* < 0.05; **0.001 < *P* < 0.01; ****P* < 0.001; NS. not significant. (ocimene mixture: composed of 69% of β -ocimene and 31% of neo-allo-ocimene).

4 Discussion

The screening performed in the present study to evaluate the effectiveness of VOCs emitted by living aromatic plants against *M. persicae* confirmed recent works reporting that VOCs from aromatic plants could affect the olfactory behavior of aphids.^{4,9,23} Among the six aromatic plant species tested, only two were repellent plants. The *Myzus persicae* olfactory response was directly affected by *O. basilicum* VOCs. In addition, the VOCs of *T. patula* cv. Nana only acted on their olfactory orientation in the presence or *via* the host plant (*C. annuum*). Contrary to other studies, our findings demonstrated that none of the headspace volatiles from *L. latifolia*, *M. piperita* or *R. officinalis* plants exhibited significant negative effects against *M. persicae*.^{9, 10, 13-16} Differences between results were probably related to a qualitative (presence/absence of specific VOCs) and quantitative variations among the chemical composition of volatiles perceived by aphids.¹⁸ Variations in volatile profiles of the same plant species can be related to genetic differences and to various biotic and abiotic factors linked to plant nutritional status, stress conditions and phenological stages.^{20,30,32,33} In addition, aphid olfactory responses to headspace volatiles released from living plants can be different from those of essential oils.³⁴ Aphid genotype could also account for the variability between studies as behavioral responses differ according to aphid species.^{7,35}

One very interesting point in these findings is the specific response depending on the cultivar of *T. patula*: a significant effect was observed with the Nana cultivar while no significant effect was recorded with Bonita Bolero. This result may be related to a qualitative (e.g. absence of α -terpineol in Bonita Bolero) and/or a quantitative variability of VOCs emissions. The variation between the volatile profiles of the two cultivars is likely to have generated different interactions with the neighboring *C. annuum* plants³⁶ and consequently, a different aphid olfactory response³³. These results support the idea that aphids are very sensitive to detect even a low chemical variability in the perceived volatile blend.³⁷

From our observations, we showed that promising CP VOCs act by two different mechanisms. First, and in line with previous works^{9,11}, the findings of the present study confirmed that *O. basilicum* VOCs have a direct negative effect towards *M. persicae* olfactory behavior. These results are consistent with Digilio *et al.*¹² observation that vapors of basil essential oils have a repellent effect against two aphid species i.e. *M. persicae* and *Acyrtosiphon pisum*. According to Tiroesele and Matshela⁵, *O. basilicum* repels *Brevicoryne brassicae* L. in kale cultivation. *O. basilicum* is also known for its negative effects on many pests.³⁸ For example, its essential oil volatiles have repellent activities against mosquitoes³⁹ and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae).⁴⁰

Probably, the repellent property of *O. basilicum* against *M. persicae* may result from the individual action of one or more of its volatile compounds.²⁷ In this sense, according to our results of the still-air olfactometer bioassay, it can be mainly related to their two predominant compounds demonstrated as repellent when tested individually i.e. EBF and eugenol. In this respect and as previously discussed, EBF, the main component of the aphid alarm pheromone, was repeatedly demonstrated in many studies as a good olfactory repellent against aphids.⁴¹⁻⁴⁴ However, other authors suggested that aphids could determine whether the EBF came from an aphid (pulsed emission) or a plant (continuous emission) and reported that the EBF emitted by a plant had no direct effect on their olfactory behavior.^{42,43,45} The effectiveness of eugenol was consistent with previous studies reporting that eugenol has repellent activity against *M. persicae*²⁹ and other insects.^{40,46,47} Despite the fact that the repellent effect of *O. basilicum* could be attributed to dominant VOCs^{27,41}, the role of other minor compounds cannot be disregarded⁴⁸ since they can be behaviorally active even in low doses.⁴⁹ As minor compounds emitted from *O. basilicum*, α -terpineol, myrcene, geranyl acetone, and sabinene were demonstrated as repellent at one or more concentrations tested. Our results corroborate previous reports on the repellency of these compounds against aphids and other insects.^{10,13,17,27,28,44,48,49}

It is interesting to note that repellent and non-repellent plants share some VOCs that have shown such activity. For example, EBF was present in the odor bouquet of *L. latifolia*, *O. basilicum*, and *T. patula* cv. Bonita Bolero. Odor blends from *L. latifolia*, *O. basilicum*, *R. officinalis*, and *T. patula* contain α -terpineol, which was associated with *M. persicae* repellent effects.¹³ Our results confirmed that aphid responses to some individual compounds were not the same when these compounds were mixed with others.²⁰ The repellent activity of some compounds could be modulated by other compounds which can either inhibit or mask their effects.⁵⁰ Thus, the absence of repellent activity of a blend containing active compounds can be linked to synergic and antagonistic interactions between the VOCs perceived by aphids.^{13,27} For example, Webster *et al.*⁴⁹ demonstrated that the volatile blend of *Vicia faba* (*Aphis fabae* attractive host plant) contains 10 compounds that repelled the aphid when individually tested. Recently, we showed that five rosemary clones all emitted a number of repellent compounds against aphids, whereas only one clone presented a repellent activity on *M. persicae* (Dardouri *et al.*, not published). The presence of repellent or attractive compounds in the plant volatile headspace does not necessarily mean that this plant is repulsive or attractive to the insect.²⁸ The function of volatile compounds varies according to volatile combinations.⁴⁹ For example the β -caryophyllene was reported as an effective compound against *M. persicae*¹⁰ and as an inhibitor of EBF repellent activity.^{28,45} Also, using a Y-tube olfactometer and different *Medicago* species, Mostafavi *et al.*⁵¹ showed that *A. pisum* Harris and *A. kondoi* Shinji were only repelled by volatile blends released by the species with high ratios of EBF relative to β -

caryophyllene. These hypotheses could probably explain why volatile blends of the *T. patula* cultivar cv. Bonita Bolero and *L. latifolia* had no repellent effect on *M. persicae* despite containing EBF. Thus, aphids have more sensitivity to specific ratios than to single compounds.^{37,48} Our findings also show that some individual compounds were behaviorally active only when their concentration exceeded a detection threshold (high concentration) *i.e.* ocimene, piperitone, β -caryophyllene, linalol, sabinene, and geranyl acetone.⁴⁹ Repellency response to volatile compounds depends on their concentration in the blend perceived by the insect.²⁷ The same compounds can be attractive at a concentration and repulsive at another and can function as either a kairomone or an allomone. Obviously, most of the plant repellent properties were related to the mixture of VOCs from these plants and were not only generated by one compound alone.⁴⁹ Further testing should be conducted in order to investigate the interaction between different combinations of VOCs and to establish a dose-response relationship that would identify profiles that may have a direct repellent effect on *M. persicae*.⁵⁰

In general, effective repellent CPs directly influence aphids' behavior through their VOCs. Nevertheless, in line with previous studies^{20,22,23,36,52,53}, our work showed that some plants can act by means of a second mechanism that requires the presence of the host plant. We demonstrated that *C. annuum* and *T. patula* volatiles alone did not exhibit a significant effect on *M. persicae* aphids, nevertheless, the mixture of these two plants acts significantly on *M. persicae* olfactory behavior. Since the odors of the host plant were not attractive to *M. persicae*, the hypothesis that *T. patula* VOCs can mask the *C. annuum* odor²¹ can be ruled out. *Tagetes patula* cv. Nana seems to have a repellent effect on aphids' behavior that requires the presence of *C. annuum*. Two possible mechanisms may be involved: i) the volatile combination of *C. annuum* and *T. patula* cv. Nana plants has repellent effects on *M. persicae*, ii) *T. patula* cv. Nana volatiles changed the *C. annuum* plant emission from a neutral volatile profile into a repulsive blend.^{23,52}

In order to answer this question, we compared the choice of *M. persicae* between *C. annuum* (control) and PPI with CPs during five days. Olfactory test results show a significant preference of *M. persicae* for control *C. annuum* only when given the choice between *C. annuum* and PPI with *T. patula* cv. Nana. Our results show that the volatile profile of PPI with *T. patula* cv. Nana apparently becomes repellent to *M. persicae*. Although the information concerning an indirect effect of neighboring plants on pests *via* their host plants is rare, our results are consistent with previous works. Results obtained by Dahlin *et al.*²² confirmed that chemical changes can be induced on host plants by an interaction with neighboring plant VOC profiles, thus becoming repellent to *M. persicae*. The same observations were shown in the study by Ninkovic *et al.*²³, who demonstrated that attractive potato plants have turned into

repulsive to *M. persicae* after their exposure to volatiles from onion plants. In addition, these authors showed that a synthetic mixture simulating the volatile bouquet emitted from the potato exposed to the onion plant VOCs was more repellent to *M. persicae* than a synthetic blend that mimicked the headspace from unexposed potato plants. Our results corroborate those of Amarawardana *et al.*⁵³, who demonstrated that *C. annuum* plants previously exposed to chive volatiles became repellent to *M. persicae*. This mode of action was also observed with other aphids and other pests. For example, exposing barley plants to volatiles from various thistle species may change their volatile profile and reduce their attractiveness to *Rhopalosiphum padi*⁵². Bean fly infestations were reduced when bean plants were exposed to volatiles from leek plants.⁵⁴

Thus, the closest reason for the repellent effect of CPI with *T. patula* cv. Nana compared to unexposed plants is a change in its volatile profile.³⁶ Unfortunately, the headspace sampling using SPME and the analysis of volatiles emitted by *C. annuum* compared to CPI with *T. patula* did not allow us to identify qualitative differences (data not shown). It seems that the difficulty could be linked to the small quantities of volatiles collected from the *C. annuum* plant headspace. Any changes in emitted VOCs should be investigated in future studies with other volatile extraction techniques.⁵⁵ On the other hand, electroantennographic assays (EAG) can be used to investigate aphid olfactory responses to very small peaks and to distinguish active *C. annuum* volatiles modulated by the presence of CPI with *T. patula* cv. Nana.^{35,56}

Nevertheless, we can propose two conceivable hypotheses that can explain our results: (1) either the *T. patula* cv. Nana volatiles can adhere by adsorption to the surface of *C. annuum* plants and be re-released (passive mechanism)²⁵, or (2) the *T. patula* cv. Nana volatiles induced a chemical change of the *C. annuum* plants *via* changes in their physiology (active mechanism).^{36,54} Since we observed a significant effect on aphids' orientation just after a short time of exposure of *C. annuum* to *T. patula* cv. Nana volatiles (i.e. tests started 4 hours after placing the mixture of CP and *C. annuum* plants inside the glass cage), the first hypothesis seems closer than the second one. However, all assumptions remain valid. The exposure of a receiver plant to particular VOCs (for example β -ocimene and (*E*)- β -ocimene present in *T. patula* volatile profiles), can cause a change in its defense mechanisms, and can generate definite aphid responses.⁵⁷ In addition, receiver plants can modify their metabolism²⁴ and their biomass allocation.^{58,59} For example, Godard *et al.*²⁶ showed that the methyl jasmonate accumulation of intact *Arabidopsis thaliana* changed when they were exposed to ocimene or myrcene blends. Indeed, more research is needed to understand the function of chemical communication signals between *C. annuum* and *T. patula* cv. Nana plants.^{26,36}

From an ecologic point of view, this laboratory olfactory study has allowed us to select two companion plants that can be introduced into the culture system in order to reduce the

nefarious effects of *M. persicae*. Mixing crops with *O. basilicum* or *T. patula* would contribute to reduce *M. persicae* infestations. The choice of the cultivar together with the adequate species is a key condition. Likewise, we have identified an indirect effect of the *T. patula* cv. Nana odors *via* host plants, which can be an important mode of action. It can have a great potential to reduce the appeal of *C. annuum* and could be used to minimize aphid incidences. However, the sensitivity of aphids to small differences between VOC blends with the complexity of CP-hostplant-aphid interactions requires deeper investigations which take into consideration the major sources of variability (e.g. genetic variability, cultural practices, edaphoclimatic conditions, among others). Furthermore, a combination of repellent plants and diffusers containing repellent compounds, such as eugenol, EBF, α -terpineol or a blend of synthetic compounds could represent an interesting method in an Integrated Pest Management (IPM) program and those could be used as ‘push’ elements for applying the “Push-pull” strategy. Finally, before offering this pest management system to farmers, we need to determine their effectiveness in natural conditions.

Acknowledgements

The authors are grateful to Patrick Signoret for the assistance during the collection of volatiles and to Michel Pradier for the technical assistance. A financial support was provided by INRA to study the repulsive effect of companion plant volatiles. Tarek Dardouri was supported by a scholarship from the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research. This manuscript is part of the Ph.D. thesis of Tarek Dardouri.

5. References

1. Blackman RL and Eastop VF, *Aphids on the World's Crop: And Identification and Information Guide*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester (2000).
2. Bass C, Puinean AM, Zimmer CT, Denholm I, Field LM, Foster SP, Gutbrod O, Nauen R, Slater R and Williamson MS, The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochem Mol Biol* **51**:41-51 (2014).
3. Tang GB, Song BZ, Zhao LL, Sang XS, Wan HH, Zhang J and Yao YC, Repellent and attractive effects of herbs on insects in pear orchards intercropped with aromatic plants. *Agrofor Syst* **87**:273-285 (2012).
4. Ben Issa R, Gomez L and Gautier H, Companion Plants for Aphid Pest Management. *Insects* **8**:112-131 (2017).
5. Tiroesele B and Matshela O, The Effect of Companion Planting on the Abundance of Cabbage Aphid, *Brevicoryne brassicae* L., on Kale (*Brassica oleracea* var. acephala). *J Plant Pest Sci* **2**:57-65 (2015).
6. Moreno CR and Racelis AE, Attraction, Repellence, and Predation: Role of Companion Plants in Regulating *Myzus persicae*(Sulzer) (Hemiptera: Aphidae) in Organic Kale Systems of South Texas. *Southw Entomol* **40**:1-14 (2015).
7. Abteew A, Subramanian S, Cheseto X, Kreiter S, Garzia GT and Martin T, Repellency of Plant Extracts against the Legume Flower Thrips *Megalurothrips sjostedti* (Thysanoptera: Thripidae). *Insects* **6**:608-625 (2015).
8. Deletre E, Schatz B, Bourguet D, Chandre F, Williams L, Ratnadass A and Martin T, Prospects for repellent in pest control: current developments and future challenges. *Chemoecology* **26**:127-142 (2016).
9. Ben Issa R, Gautier H, Costagliola G and Gomez L, Which companion plants affect the performance of green peach aphid on host plants? Testing of 12 candidate plants under laboratory conditions. *Entomol Exp Appl* **160**:164-178 (2016).
10. Tomova BS, Waterhouse JS and Doberski J, The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. *Entomol Exp Appl* **115**:153-159 (2005).
11. Ben Issa R, Gautier H and Gomez L, Influence of neighbouring companion plants on the performance of aphid populations on sweet pepper plants under greenhouse conditions. *Agric Forest Entomol* **19**:181-191 (2017).
12. Digilio MC, Mancini E, Voto E and De Feo V, Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *J Plant Interact* **3**:17-23 (2008).
13. Hori M, Repellency of rosemary oil against *Myzus persicae* in a laboratory and in a screenhouse. *J Chem Ecol* **24**:1425-1432 (1998).

14. Wubie M, Negash A, Guadie F, Molla G, Kassaye K and Nagappan R, Repellent and insecticidal activity of *Mentha piperita* (L.) plant extracts against cabbage aphid [*Brevicoryne brassicae* Linn. (Homoptera: Aphididae)]. *Am-Eur J Sci Res* **9**:150-156 (2014).
15. Ikeura H, Kobayashi F and Hayata Y, Repellent Effect of Herb Extracts on the Population of Wingless Green Peach Aphid, *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae). *J Agric Sci* **4**:139-144 (2012).
16. Pascual-Villalobos MJ, Cantó-Tejero M, Vallejo R, Guirao P, Rodríguez-Rojo S and Cocero MJ, Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. *Ind Crop Prod* **110**:45-57 (2017).
17. Hori M and Komatsu H, Repellency of rosemary oil and its components against the onion aphid, *Neotoxoptera formosana* (Takahashi) (Homoptera, Aphididae). *Appl Entomol Zoolog* **32**:303-310 (1997).
18. Kasmi A, Hammami M, Raelison EG, Abderrabba M, Bouajila J and Ducamp C, Chemical composition and behavioral effects of five plant essential oils on the green pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae). *Chem Biodivers* **14**:e1600464 (2017).
19. Halbert SE, Corsini D, Wiebe M and Vaughn SF, Plant-derived compounds and extracts with potential as aphid repellents. *Ann Appl Biol* **154**:303-307 (2009).
20. Vucetic A, Dahlin I, Petrovic-Obradovic O, Glinwood R, Webster B and Ninkovic V, Volatile interaction between undamaged plants affects tritrophic interactions through changed plant volatile emission. *Plant Signal Behav* **9**:e29517 (2014).
21. Held DW, Gonsiska, P and Potter, DA, Evaluating companion planting and non-host masking odors for protecting roses from the Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae). *Hortic Entomol* **96**:81-87 (2003).
22. Dahlin I, Vucetic A and Ninkovic V, Changed host plant volatile emissions induced by chemical interaction between unattacked plants reduce aphid plant acceptance with intermorph variation. *J Pest Sci* **88**:249-257 (2014).
23. Ninkovic V, Dahlin I, Vucetic A, Petrovic-Obradovic O, Glinwood R and BW, Volatile Exchange between Undamaged Plants - a New Mechanism Affecting Insect Orientation in Intercropping. *PLoS ONE* **8**:e69431 (2013).
24. Heil M and Karban R, Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends Ecol Evol* **25**:137-144 (2010).
25. Himanen SJ, Blande JD, Klemola T, Pulkkinen J, Heijari J and Holopainen JK, Birch (*Betula* spp.) leaves adsorb and re-release volatiles specific to neighbouring plants - a mechanism for associational herbivore resistance? *New Phytol* **186**:722-732 (2010).
26. Godard KA, White R and Bohlmann J, Monoterpene-induced molecular responses in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **69**:1838-1849 (2008).

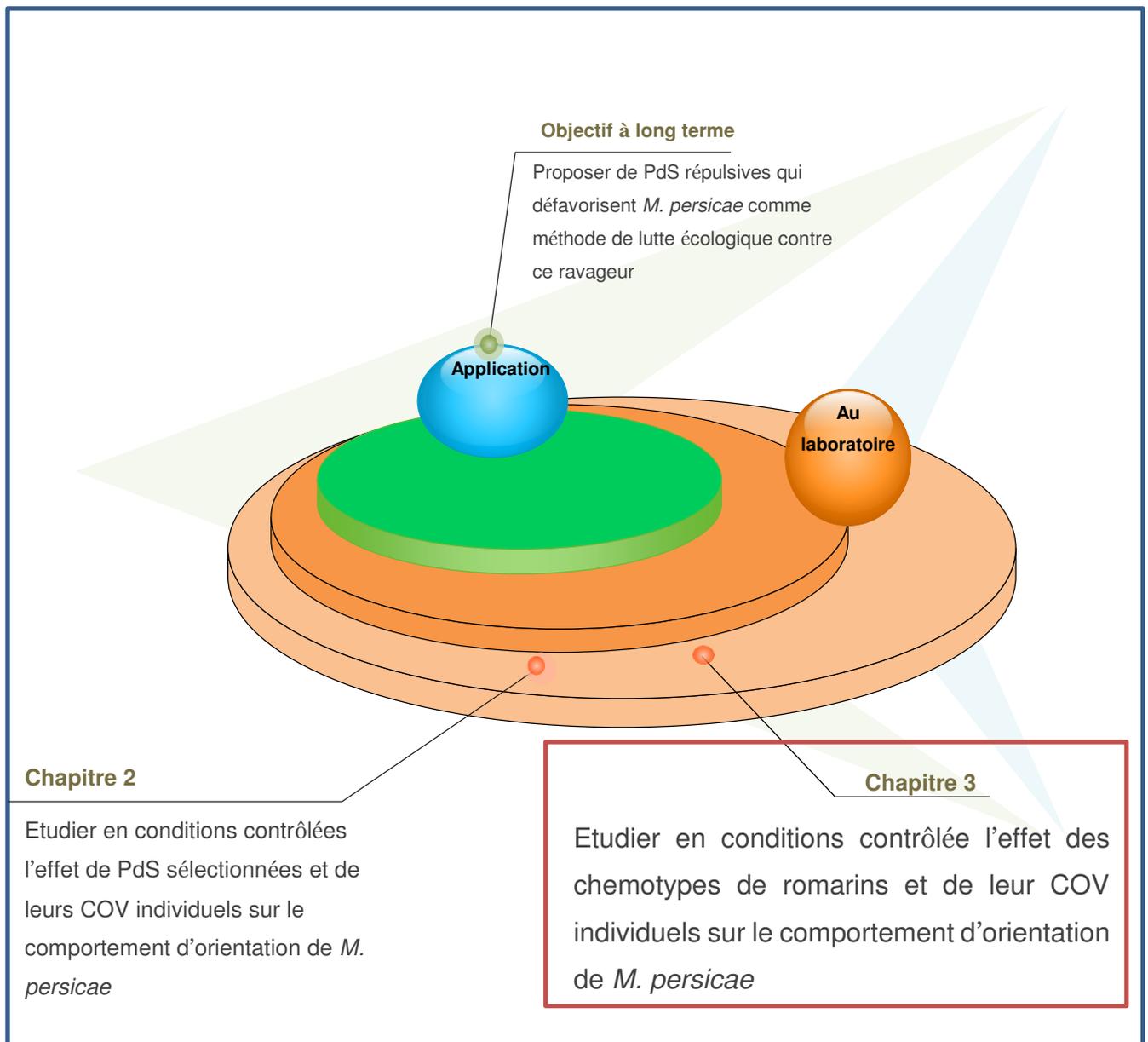
27. Deletre E, Chandre F, Barkman B, Menute C and Martin T, Naturally occurring bioactive compounds from four repellent essential oils against *Bemisia tabaci* whitefly. *Pest Manag Sci* **72**:179–189 (2015).
28. Bruce TJA, Birkett MA, Blande J, Hooper AM, Martin JL, Khambay B, Prosser I, Smart LE and Wadhams LJ, Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Manag Sci* **61**:1115-1121 (2005).
29. Isman MB, Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot* **19**:603-608 (2000).
30. Dardouri T, Gautier H, Costagliola G and Gomez L, How French marigold (*Tagetes patula* L.) volatiles can affect the performances of green peach aphid? *IOBC-WPRS Bull* **123**:71-78 (2017).
31. Hori M, Onion aphid (*Neotoxoptera formosana*) attractants, in the headspace of *Allium fistulosum* and *A. tuberosum* leaves. *J Appl Entomol* **131**:8-12 (2007).
32. Holopainen JK and Gershenzon J, Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci* **15**:176-184 (2010).
33. Schröder ML, Glinwood R, Webster B, Ignell R and Krüger K, Olfactory responses of *Rhopalosiphum padi* on three maize, potato, and wheat cultivars and the selection of prospective crop border plants. *Entomol Exp Appl* **157**:241-253 (2015).
34. Rowan DD, Volatile metabolites. *Metabolites* **1**:41-63 (2011).
35. Visser JH, Piron PGM and Hardie J, The aphids' peripheral perception of plant volatiles. *Entomol Exp Appl* **80**:35-38 (1996).
36. Glinwood R, Ahmed E, Qvarfordt E, Ninkovic V and Pettersson J, Airborne interactions between undamaged plants of different cultivars affect insect herbivores and natural enemies. *Arthropod-Plant Interact* **3**:215-224 (2009).
37. Webster BEN, The role of olfaction in aphid host location. *Physiol Entomol* **37**:10-18 (2012).
38. Pandey AK, Singh P and Tripathi NN, Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. *Asian Pacif J Trop Biomed* **4**:682-694 (2014).
39. Prajapati V, Tripathi AK, Aggarwal KK and Khanuja SP, Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresour Technol* **96**:1749-1757 (2005).
40. Obeng-Ofori D and Reichmuth C, Bioactivity of eugenol, a major component of essential oil of *Ocimum suave* (Wild.) against four species of stored-product Coleoptera. *Int J Pest Manage* **43**:89-94 (1997).
41. Sun H, Zhang F, Chen S, Guan Z, Jiang J, Fang W and Chen F, Effects of aphid herbivory on volatile organic compounds of *Artemisia annua* and *Chrysanthemum morifolium*. *Biochem Syst Ecol* **60**:225-233 (2015).

42. Kunert G, Reinhold C and Gershenson J, Constitutive emission of the aphid alarm pheromone, (*E*)-beta-farnesene, from plants does not serve as a direct defense against aphids. *BMC Ecol* **10**:23 (2010).
43. de Vos M, Cheng WY, Summers HE, Raguso RA and Jander G, Alarm pheromone habituation in *Myzus persicae* has fitness consequences and causes extensive gene expression changes. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **107**:14673-14678 (2010).
44. Zhang R, Wang B, Grossi G, Falabella P, Liu Y, Yan S, Lu J, Xi J and Wang G, Molecular basis of alarm pheromone detection in aphids. *Curr Biol* **27**:55-61 (2017).
45. Dawson GW, Griffiths DC, Pickett JA, Smith MC and And Woodcock CM, Natural inhibition of the aphid alarm pheromone. *Entomol Exp Appl* **36**:197-199 (1984).
46. Araujo MJ, Camara CA, Born FS, Moraes MM and Badji CA, Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. *Exp Appl Acarol* **57**:139-155 (2012).
47. Zhang Q-H, Schneidmiller RG and Hoover DR, Essential oils and their compositions as spatial repellents for pestiferous social wasps. *Pest Manag Sci* **69**:542-552 (2013).
48. Ngumbi E, Eigenbrode SD, Bosque-Pérez NA, Ding H and Rodriguez A, *Myzus persicae* is arrested more by blends than by individual compounds elevated in headspace of PLRV-Infected potato. *J Chem Ecol* **33**:1733-1747 (2007).
49. Webster B, Bruce T, Pickett J and Hardie J, Volatiles functioning as host cues in a blend become nonhost cues when presented alone to the black bean aphid. *Anim Behav* **79**:451-457 (2010).
50. Bruce TJ and Pickett JA, Perception of plant volatile blends by herbivorous insects-finding the right mix. *Phytochemistry* **72**:1605-1611 (2011).
51. Mostafavi R, Henning JA, Gardea-Torresday J and Ray IM, Variation in aphid alarm pheromone content among glandular and eglandular-haired *Medicago* accessions. *J Chem Ecol* **22**:1629-1638 (1996).
52. Glinwood R, Ninkovic V, Pettersson J and Ahmed E, Barley exposed to aerial allelopathy from thistles (*Cirsium* spp.) becomes less acceptable to aphids. *Ecol Entomol* **29**:188-195 (2004).
53. Amarawardana L, Bandara P, Kumar V, Pettersson J, Ninkovic V and Glinwood R, Olfactory response of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) to volatiles from leek and chive: Potential for intercropping with sweet pepper. *Acta Agric Scand Sect B - Soil Plant Sci* **57**:87-91 (2007).
54. Bandara K, Kumar V, Ninkovic V, Ahmed E, Pettersson J and Glinwood R, Can Leek Interfere With Bean Plant-Bean Fly Interaction? Test of Ecological Pest Management in Mixed Cropping. *J Econ Entomol* **102**:999-1008 (2009).

55. Prabakaran S, Ramu L, Veerappan S, Pemiah B and Kannappan N, Effect of different solvents on volatile and non-volatile constituents of red bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and their in vitro antioxidant activity. *J Food Meas Charact* **11**:1531-1541 (2017).
56. Birkett MA, Campbell CAM, Chamberlain K, Guerrieri E, Hick AJ, Martin JL, Matthes M, Napier JA, Pettersson J, Pickett JA, Poppy GM, Pow EM, Pye BJ, Smart LE, Wadhams GH, Wadhams LJ and Woodcock CM, New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **97**:9329-9334 (2000).
57. Kang Z-W, Liu F-H, Zhang Z-F, Tian H-G and Liu T-X, Volatile β -Ocimene Can Regulate Developmental Performance of Peach Aphid *Myzus persicae* Through Activation of Defense Responses in Chinese Cabbage *Brassica pekinensis*. *Front Plant Sci* **9**:708 (2018).
58. Ninkovic V, Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. *J Exp Bot* **54**:1931–1939 (2003).
59. Kegge W, Ninkovic V, Glinwood R, Welschen RA, Voeselek LA and Pierik R, Red: far-red light conditions affect the emission of volatile organic compounds from barley (*Hordeum vulgare*), leading to altered biomass allocation in neighbouring plants. *Ann Bot* **115**:961-970 (2015)

Chapitre 3

Effets de clones de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) sur le comportement olfactif du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer)



Chapitre 3

Effets de clones de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) sur le comportement olfactif du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer)

“ Behavioural response of green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) to volatiles from different rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones ”

Article soumis (accepté avec révisions mineures) à *Agricultural and Forest Entomology*

Running title: Influence of rosemary volatiles in the green peach aphid

Tarek Dardouri¹, Laurent Gomez¹, Alexandra Schoeny², Guy Costagliola¹, Hélène Gautier^{1*}

¹UR1115 PSH Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, INRA, F84914, Avignon, France;

²Pathologie Végétale, INRA, 84140, Montfavet, France.

Abstract

The association of companion plants (*Rosmarinus officinalis* L.), was studied as an alternative approach to control green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). Some volatile organic compounds (VOCs) exhaled from the rosemary plant have a repellent effect over aphids and are able to limit their fecundity. Therefore, the aim of this research is to target which of five clones of rosemary (Voltz Splindler, Nonza, Pigette, Sudbery Blue, and Esselte), may reveal repulsive properties over *M. persicae* and determine the possible VOCs responsible for such action. The analyses of the mixtures of volatile compounds released by the different clones revealed the presence of 15 main components. However, each clone was characterised by a specific volatile profile showing the existence of a marked chemical variability. By testing the identified VOCs individually, using a dual-choice olfactometer, we observed that five volatiles were capable of significantly disturbing the olfactory behaviour of *M. persicae*: bornyl acetate, camphor, α -terpineol, terpinene-4-ol, and geranyl acetone. In addition, the behaviour of *M. persicae* was disturbed according to the clone tested: Voltz Splindler retrieved a higher

repulsive action, while the remaining clones did not cause any effect. Nevertheless, all the clones released compounds that are repellent to the aphid when tested individually. Therefore, it can be concluded that the presence of the volatiles is not sufficient to induce a disruption in the choice of the aphid. The VOCs' concentration, proportion, and even their association/synergetic action in the olfactory bouquets released are at the origin of these contrasting results.

Keywords: Aphid; *Myzus persicae*; agroecology; companion plants; volatile organic compounds (VOCs); repulsion; rosemary

1. Introduction

Aphids (Hemiptera, Aphididae) are piercing-sucking insects feeding from phloem sap. They are among the most dangerous phytophages since they inflict severe damage on host plants. *Myzus persicae* (Sulzer), the so-called green peach aphid, causes considerable damage to several crops, not only by removing phloem sap from plants, but also because it transmits phytovirus (Blackman & Eastop, 2000). This highly phytophagous insect, whose primary host is the peach tree, causes significant damage to many secondary hosts, namely pepper species in greenhouses (Sanchez *et al.*, 2011).

In order to limit the severity of the damage caused by this pest, several control methods have been put in place, among which chemical control methods are the most widespread. Despite being rapid and effective, the chemical control methods present several disadvantages due to their harmful effects on the environment and the continuous development of resistant populations (Bass *et al.*, 2014).

To solve this problem and in order to ensure sustainable, economically competitive and ecologically intensive agriculture, the scientific community has adopted a strategy for the development of alternative control methods (Penvern *et al.*, 2010). One of these methods is based on the association of cultivated crops with companion plants so as to provide services to the agro-ecosystem (Ben Issa *et al.*, 2017a). This agro-ecological strategy presents a promising alternative control method to maintain phytophagous populations below their economic threshold, thus reducing the frequency of phytosanitary treatments without significantly reducing the level of production of the target crop (Uvah & Coaker, 1984; Malézieux *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2012). The different mechanisms explored with these companion plants are repulsion (plants with repellent properties) and attraction (trap plants). Furthermore, companion plants are able to mask the volatile emissions from host plants and can also attract natural enemies to control phytophagous populations (Ben Issa *et al.*, 2017a).

Regarding the repulsion mechanism (Deletre *et al.*, 2016), the choice of species associated with the crop to be protected remains paramount for the strategy to succeed (Shrivastava *et al.*, 2010) and depends on several factors. In addition to the ability to disturb the behaviour of aphids, criteria such as the phenology, hardiness and commercial exploitation of these plants need to be considered (Castro *et al.*, 2017).

Recent research has shown that the presence of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae) in the vicinity of sweet pepper plants hinders the development of *M. persicae* populations (Ben Issa *et al.*, 2016, 2017b). Rosemary is an aromatic plant that seems to meet the criteria required to be described as a companion plant for the control of green peach aphid in Mediterranean horticultural crops. According to several studies (Hori, 1998, 1999a; Ben Issa *et al.*, 2016, 2017b), the remote action mechanism of rosemary plants on the repulsion of *M. persicae* is related to the emission of volatile organic compounds (VOCs). These VOCs, which are not essential to cell growth and development, are accumulated in specialised anatomical

structures called trichomes (Marin *et al.*, 2006). The mixture of VOCs, which gives rosemary its characteristic odour, is mainly composed of monoterpenes (C₁₀H₁₆ compounds). Chromatographic analyses of rosemary essential oils and plants show that the main VOCs are bornyl acetate, borneol, camphene, camphor, eucalyptol (1,8-cineole), linalol, verbenone and α -pinene (Angioni *et al.*, 2004; Miresmailli *et al.*, 2006; Chopra & Descamps, 2012; Zhang *et al.*, 2014a; Sadeh *et al.*, 2017). It can be hypothesised that the efficacy of these plants is related to the emission level of one or more of these compounds, which would increase as their production increases. However, Ben Issa *et al.* (2017b) found that the range of action of the companion plants is quite limited and that effective protection requires such a density that it can be restrictive and cause a decline in the yield of the main crop. Therefore, it is imperative to optimise VOCs production. In this sense, genetic selection can be an essential lever to optimise the effectiveness of rosemary and promote its use by producers. Indeed, VOCs production varies quantitatively and qualitatively according to the cultivars (Satyal *et al.*, 2017), generating a variable olfactory response from aphids (da Costa *et al.*, 2010; Staudt *et al.*, 2010; Rajabaskar *et al.*, 2013; Schröder *et al.*, 2015). Still, within the same logic, understanding the action modes of companion plants and identifying the molecules involved should help us to select the most successful genotypes. However, there is little information available on this topic, including on the dualistic interaction between plants and insects via VOCs (Hori, 1999b).

This work aims to assess the effect of rosemary genetic variability on its ability to disrupt the behaviour of green peach aphids. The olfactory bouquets of five rosemary clones were analysed by GC-MS (gas-chromatography with mass spectrometry detector) and their VOCs profiles were established. The repellent properties of the studied clones as well as those of each of the VOCs identified in the olfactory bouquets were assessed in dual-choice bioassays using olfactometers (Ameline *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2007). In the end, our ultimate goal is to establish a link between the disturbance of aphid behaviour and the presence of certain VOCs from rosemary clones.

2. Material and methods

2.1. *Myzus persicae* insects

The insects from *M. persicae* were obtained by mass rearing (clone Mp05) from a fundatrix collected from a peach orchard of the French National Institute for Agricultural Research (INRA) of Avignon (France) (Sauge *et al.*, 2010). The insect culture was maintained in young pepper plants under controlled rearing conditions (temperature of 22 ± 1 °C; relative humidity of 60%-70%; photoperiod 16L:8D). For each experiment conducted, the aphids used were all of the same age. For breeding synchronisation, 20 apterae females were deposited per plant; 24 h later these females were removed while the larvae generated remained in the pepper plants. After 10 days, this cohort of 24 h gave the necessary individuals to be used in the experiments.

2.2. Plant material

Five clones of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) were propagated by cuttings from specimens collected from plots from CRIEPPAM (Centre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales, Manosque, France). The following clones were considered in the present study: Esselte (E), Nonza (N), Pigette (P), Sudbery Blue (SB), and Voltz Splindler (VS). The clones mentioned were selected based on preliminary results that reported the existence of variability in the chemical profile of their essential oils (unpublished data). The five clones were propagated in the same moment and cultivated in a glass greenhouse of the INRA Avignon under controlled conditions ($T = 20 \pm 5$ °C; relative humidity = 60%-70%). The cultivated clones did not receive any fertilisation or phytosanitary treatments. The irrigation was carried out in a drip system in order to homogenise the production conditions. For all the experiments carried out, the plants were used at the same vegetative stage (6 to 8 months old). The pepper plants (*Capsicum annuum* L., var. Yolo Wonder) used for the *M. persicae* mass rearing, were 6 weeks old (with 5-6 developed leaves) and were obtained by sowing in another glass greenhouse to avoid any interaction with the rosemary clones. All the plants were cultivated in 1 L pots filled with peat.

2.3. Volatile profile characterisation

The profile of the VOCs from each clone was analysed by HS-SPME (headspace solid phase micro-extraction) and GC-MS. For the analyses, 15 plants were used per clone, divided into three groups of five plants each. On the day before sampling, the plants were placed under the following experimental conditions: $T = 22$ °C \pm 1 °C and relative humidity of 60% \pm 5%. The plants were watered and the pots were wrapped in aluminium foil to prevent sample pollution by VOCs from the culture substrate and plastic pot. For each analysis, five plants were carefully introduced without touching the foliage inside a parallelepiped-shaped Plexiglas® chamber, with the following dimensions: 40 cm \times 40 cm \times 50 cm (W \times L \times h), as

shown in Figure 3.1. In order to homogenise the atmosphere inside the Plexiglas® chamber during sampling and to promote the adsorption of the VOCs on the SPME fibre, two ventilator fans were installed at the base.

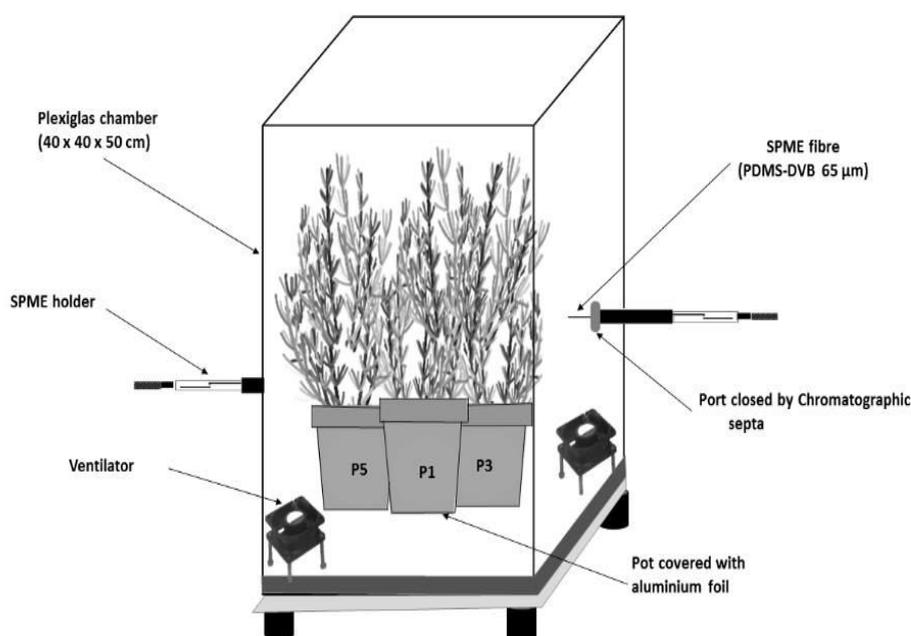


Figure 3.1. Device for static sampling of VOCs emitted from rosemary clones using the headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) technique.

After 10 min of stabilisation, two polydimethylsiloxane/divinylbenzene SPME fibres (PDMS-DVB, 65 µm; Supelco, Bellefonte, USA) were introduced simultaneously through two septa positioned on the walls. After an exposure time of 5 min, the SPME fibres were removed together with the sampled plants. This experiment was conducted at 10 am, and the other two groups of plants were analysed at 1 pm and 4 pm, totalising 6 samples per clone (2 fibres × 3 sampling moments), reporting an average profile throughout the day. Before each SPME analysis, the air inside the chamber was removed and the cage was cleaned with distilled water to avoid contamination. The SPME analyses were carried out in a reason of one clone per day.

The VOCs samples were rapidly analysed by GC-MS (Trace-ISQ, single quadrupole (Thermo Scientific, Austin, TX, USA)) equipped with an apolar capillary column TR-5MS (Thermo) 20 m; 0.1 mm ID; 0.1 µm film thickness. The carrier gas was helium at a constant flow of 0.4 mL min⁻¹. The desorption of the SPME fibre was done during two minutes in the injector at 250 °C in splitless mode. The oven temperature was set at 40 °C for 2 min after desorption, followed by an increase of 20 °C min⁻¹ up to 100 °C, then 5 °C min⁻¹ up to 160 °C, and finally 30 °C min⁻¹ up to 300 °C. The mass spectra were recorded in electron impact mode (EI) with an ionisation energy of 70 eV in the m/z 35-450 range.

The VOCs were identified by comparing their mass spectra with the spectra of the NIST11 library (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). The retention times of the compounds to be identified were compared with those obtained from commercial standards. The quantification was done by manual integration of the peaks obtained by the Thermo Xcalibur software.

2.4. Standards and reagents

The VOCs identified in the obtained olfactory mixtures produced by the rosemary clones were supplied by Sigma Aldrich® (France). The standards were purchased to individually test their effect on green peach aphids. The following standards were obtained (respective standard purity represented in brackets): bornyl acetate (95%), borneol (99%), camphene (95%), camphor (96%), eucalyptol (99%), geranyl acetone (97%), limonene (97%), linalol (97%), terpinene-4-ol (95%), terpinolene (90%), verbenone (93%), α -pinene (98%), α -terpineol (96%), and γ -terpinene (97%). (*E*)- β -farnesene (93%) was used as a positive control. Only β -terpineol was not available for purchase. Each compound was tested at a concentration of 1% diluted in ethanol (v/v – m/v in the case of camphor). The concentration used makes it possible to obtain a peak area similar to the sum of the peak areas emitted by a whole plant in order to avoid the saturation of the olfactometer.

2.5. Olfactometer bioassays with *Myzus persicae*

The dual-choice olfactometer used (Eigenbrode *et al.*, 2002; Ameline *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2007) is a device with static atmosphere, consisting of two overlapping containers of different sizes, with facing openings provided with a polyethylene grid (0.09 mm² mesh; Figure 3.2). The upper container is a cylindrical Plexiglas® arena (14 cm in diameter and 5 cm high) hermetically sub-divided into two equal chambers. This container is pierced in each side to allow the introduction of a leaf or plant part through a 5 mm opening. In order to prevent mechanical injuries, each opening is protected with foam. The lower container, where aphids are placed, is 9 cm in diameter and 2.5 cm high and is placed below the arena polyethylene grid.

All the bioassays were performed in a ventilated room, maintained at 22 ± 1 °C and relative humidity of $60 \pm 5\%$. The bioassays were conducted in darkness to avoid any visual cue that could influence the orientation of aphids. An hour before starting the bioassays, the plants were placed in the room. Thirty apterae females from a cohort of ten days were placed in the lower container with a brush soaked in demineralised water. A fasting of one hour in the dark allowed aphids to equalise their physiological state.

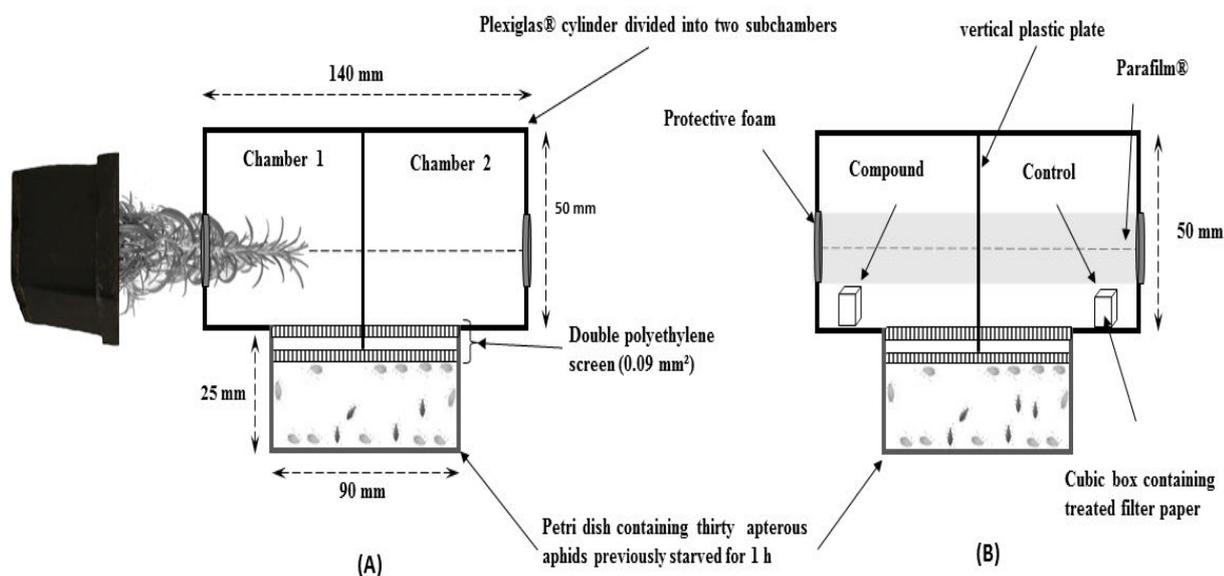


Figure 3.2. Dual-choice olfactometer used for the olfactometry bioassays conducted with *Myzus persicae*: (A) – rosemary *vs.* control (without plant); (B) – 10 μL of volatile compound (1%) *vs.* control (10 μL of ethanol). An aphid is considered as a responder if it is positioned on the grid under one of the two chambers.

A part of rosemary plant was introduced into one upper chamber *vs.* control (empty chamber). To test the VOCs, 10 μL of the VOC (1% solution in ethanol) were deposited on filter paper (2 cm \times 2 cm) in a cubic box (2.1 cm \times 2.1 cm) which was then fixed in a chamber from the upper arena. A second paper with 10 μL of ethanol was placed in the second chamber, serving as a control. The papers were left to dry for 5 min. The upper arena was then closed and sealed with Parafilm® to seal the olfactometer. The lower container, with the aphids homogeneously distributed, was immediately placed under the upper container. Aphids underwent negative geotaxis and climbed onto the upper grid (Eigenbrode *et al.*, 2002) where they positioned themselves according to their olfactory orientation under one of the two upper chambers. Each bioassay lasted for one hour. After this period, the upper container was removed and the lower container was photographed to record the distribution of the aphids. An aphid is considered as a ‘responder’ when it is placed on the grid and as a ‘non-responder’ when it is placed in the edges of the container or when it is not in the grid. In each bioassay, only the responders were counted considering the side of the upper chamber where they were positioned. Each choice hypothesis was tested eight times in eight olfactometers used in parallel. Per treatment and hypothesis to be tested, 240 aphids were studied (8 olfactometers

× 30 apterae females). In order to avoid the risk of contamination, a single clone or VOC was tested per day and the entire structure was cleaned with 70% ethanol and distilled water.

Finally, two complementary assays were carried out (blank *vs.* blank and solvent *vs.* solvent) to ensure a lack of experimental bias. An assay with pepper *vs.* blank allowed the characterisation of the behaviour of *M. persicae* insects in the presence of the host plant (pepper).

2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the XLSTAT software (version 2016.02, Addinsoft, Paris, France). The number of non-responders between the different treatments was compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test. In case of significant differences, the number of non-responders was compared by using Tukey's test ($\alpha = 0.05$). For each treatment conducted, the distribution of responders on each arm of the olfactometer was analyzed using a Wilcoxon test for paired samples. The significance level was $\alpha = 0.05$. In order to compare the differences in emissions of VOCs of different rosemary clones, a Tukey test with a 95% confidence interval was performed. A Principal Component Analysis (PCA) was also carried out to show the variability of the VOCs between the different clones.

3. Results

3.1. Analysis of the VOCs profiles from the rosemary clones

The VOCs profiles of the five different clones of rosemary, Esselte, Nonza, Pigette, Sudbery Blue, and Voltz Splindler, allowed the identification of 15 compounds. From these 15 compounds, 11 were present in the five clones, while linalol, α -terpineol, and verbenone were absent from the Voltz Splindler clone. Other VOCs, namely (*E*)- β -terpineol and terpinolene were also absent from the volatile profile of Esselte (Table 1). Statistical analyses revealed that the VOCs emission is highly dependent on the clone. There are five major components (represented in bold in Table 1) in the different clones: α -pinene, eucalyptol (except for Nonza), camphor, borneol and bornyl acetate. Bornyl acetate is the main VOC in Nonza, Sudbery Blue, and Voltz Spindler, and camphor in Pigette and Esselte (Table 1). The proportion of α -pinene was homogeneous between the clones analysed, varying on average between 16% and 26% (Pigette and Esselte, respectively). The same observation was verified for eucalyptol with a relative percentage below 10%, while borneol represented between 6% (Nonza) and 14% (Pigette) of the total VOCs emitted. Other two VOCs reported a higher variability among rosemary clones: camphor ranged from 5% (Nonza) to 25% (Pigette), while bornyl acetate varied from 13% (Esselte) to 40% (Nonza). It was also verified that verbenone is especially important in Sudbery Blue, with 18% (Table 3.1).

Table 3.1. Relative percentages (mean \pm standard deviation) of the components of the VOC mixtures released by the rosemary clones studied, sampled by SPME and identified by GC-MS (n = 6).

Code	VOCs	RT	RI	Clones				
				Esselte	Nonza	Pigette	S. Blue	V. Splindler
1	α -pinene	4.65	938	26.20 \pm 2.46 b	18.72 \pm 1.75 a	16.50 \pm 1.58 a	19.91 \pm 2.79 a	19.66 \pm 2.09 a
2	Camphene	4.88	957	0.96 \pm 0.5 a	2.01 \pm 1.35 b	0.90 \pm 0.50 a	1.26 \pm 0.37 ab	0.91 \pm 0.39 a
3	Limonene	5.9	1034	1.20 \pm 0.71 a	3.71 \pm 2.16 b	1.44 \pm 0.63 a	1.65 \pm 0.71 a	1.60 \pm 0.93 a
4	Eucalyptol	5.97	1039	9.33 \pm 0.80 c	0.64 \pm 0.12 a	8.09 \pm 1.05 bc	7.55 \pm 1.07 b	7.37 \pm 0.35 b
5	γ -terpinene	6.28	1064	0.93 \pm 0.41 a	5.07 \pm 1.70 c	0.85 \pm 0.45 a	3.30 \pm 0.56 b	4.57 \pm 1.26 c
6	(<i>E</i>)- β -Terpineol	6.53	1079	ND a	1.61 \pm 0.44 bc	1.38 \pm 0.55 b	2.04 \pm 0.35 c	3.18 \pm 0.37 d
7	Terpinolene	6.69	1092	ND a	1.00 \pm 0.45 c	0.39 \pm 0.14 b	0.59 \pm 0.22 b	1.14 \pm 0.34 c
8	Linalol	6.91	1107	4.98 \pm 0.61 d	1.42 \pm 0.58 b	4.67 \pm 1.50 d	2.25 \pm 0.28 c	ND a
9	Camphor	7.84	1167	26.26 \pm 1.45 d	5.01 \pm 1.90 a	25.15 \pm 5.11 d	6.89 \pm 2.31 b	12.81 \pm 1.90 c
10	Borneol	8.26	1191	10.92 \pm 0.72 b	6.26 \pm 1.58 a	14.02 \pm 2.03 d	10.84 \pm 0.51 b	12.23 \pm 2.13 c
11	Terpinen-4-ol	8.34	1196	1.05 \pm 0.08 a	2.20 \pm 0.79 b	1.80 \pm 0.39 b	2.37 \pm 0.45 b	0.94 \pm 0.54 a
12	α -terpineol	8.62	1211	0.34 \pm 0.34 ab	0.78 \pm 0.48 bc	1.13 \pm 0.49 c	1.10 \pm 0.51 c	ND a
13	Verbenone	8.94	1229	1.46 \pm 0.39 a	8.12 \pm 1.98 c	4.58 \pm 1.86 b	18.17 \pm 2.53 d	ND a
14	Bornyl acetate	10.22	1295	12.92 \pm 0.88 a	40.43 \pm 1.23 e	17.09 \pm 2.30 b	20.26 \pm 2.49 c	31.16 \pm 3.39 d
15	Geranyl acetone	13.66	1456	3.45 \pm 0.51 bc	3.05 \pm 2.15 abc	2.02 \pm 1.18 ab	1.82 \pm 0.59 a	4.44 \pm 1.54 c
Total peak area				5.06^{E+07} \pm 1.90^{E+07} ab	12.3^{E+07} \pm 4.27^{E+07} c	11.6^{E+07} \pm 2.67^{E+07} c	9.49^{E+07} \pm 3.08^{E+07} bc	3.79^{E+07} \pm 1.32^{E+07} a

*100% = Σ of the 15 volatiles identified;

VOCs are listed according to their retention time (RT) in minutes;

RI: Retention Index relative to (C8-C20) n-alkanes on the TR-5MS column.

Mean values followed by different letters differ significantly (Tukey test at $\alpha = 0.05$);

Compounds with relative percentage higher than 5% are represented in bold.

ND: not detect

The PCA obtained using the VOCs of the five rosemary clones (Figure 3.3) showed that clones are able to form distinct groups on the first plane of the PCA. Each clone was characterised by a specific profile, which allowed observing the existence of marked chemical variability, thus allowing clone's separation on the PCA. The first two dimensions (F1 and F2) of the PCA explain 61.5% of the total variability of the data (41.84% for the F1 axis and 19.74% for the F2 axis). The first axis, F1, allows separating clones richer in camphor (9), eucalyptol (4), and linalol (8), such as Esselte and Pigette, located on the left side of the PCA, from clones richer in γ -terpinene (5), bornyl acetate (14), and terpinolene (7), namely Nonza, Sudbery Blue, and Voltz Spindler.

The second dimension of the PCA, F2, allowed distinguishing the clones richer in α -terpineol (12), terpinene-4-ol (11) and verbenone (13), namely Pigette, Sudbery Blue, and Nonza represented in the positive region of F2, from those clones represented in the negative region of F2, characterised for being richer in geranyl acetone (15), namely Esselte and Voltz Spindler clones (Figure 3.3).

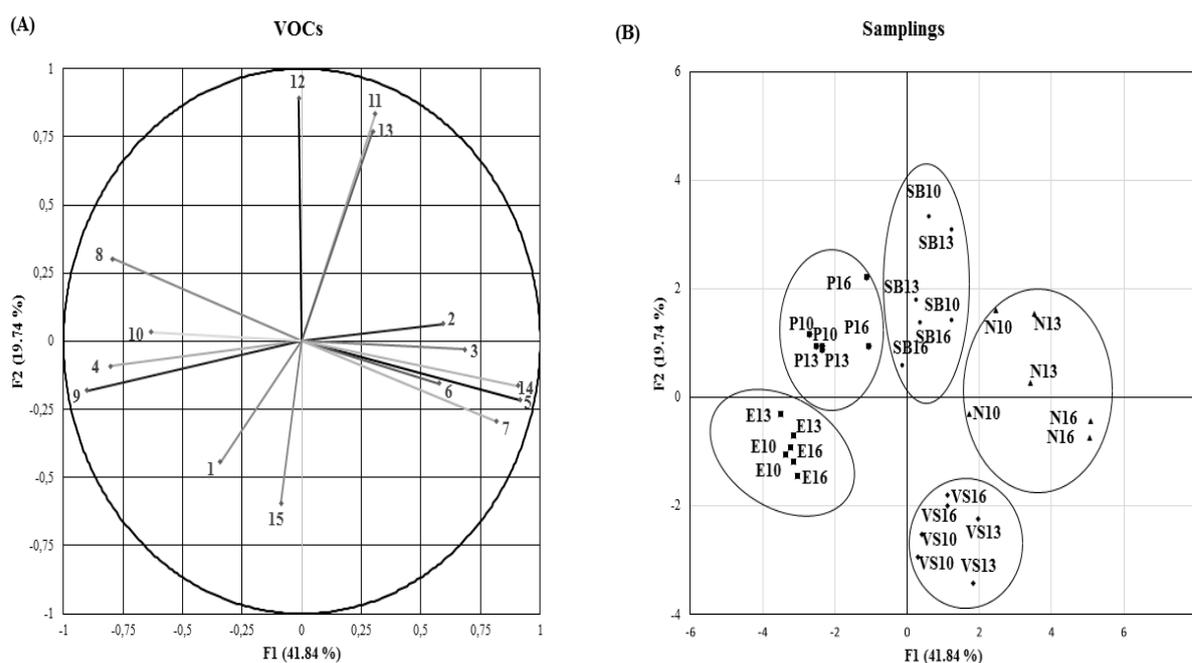


Figure 3.3. Principal component analysis obtained from the relative percentages of VOCs from rosemary clones: (A) – correlations circle of the VOCs variables on the two axes F1 and F2; (B) – projection of the 30 samplings of VOCs from the five rosemary clones during three periods (10 am, 1 pm, and 4 pm) with two SPME fibres on the two axes F1 and F2. The identity of the VOCs is listed in Table 1.

3.2. Orientation of *Myzus persicae* under the influence of olfactory bouquets from rosemary clones

The percentage of aphids classified as non-responders ranged from 27.5% to 44.5%. Nevertheless, these results were not statistically different among the several clones analysed (Kruskall–Wallis: $K = 8.43$; $P = 0.208$). Figure 3.4 represents the distribution of aphid responders in the presence of a rosemary clone in one chamber of the olfactometer against control in the other chamber (empty chamber). The results of the blank *vs.* blank (Wilcoxon: $P = 0.83$) and the pepper *vs.* blank (Wilcoxon: $P = 1$) assays showed no significant differences in the choice of aphids between the two olfactometer chambers. In the tests carried out with rosemary clones, aphids tend to choose blank in detriment of those with companion plants. However, only the Voltz Spindler clone reported a statistically significant effect on the orientation of aphids (VS: 37.34%; $P = 0.014$). The remaining clones did not cause a significant change in the aphids' orientation: Nonza (N: 45.98%, Wilcoxon: $P = 0.17$); Esselte (E: 45.39%, Wilcoxon: $P = 0.30$); Sudbery Blue (SB = 42.41%, Wilcoxon: $P = 0.29$); and Pigette (P: 42.86%, Wilcoxon: $P = 0.30$).

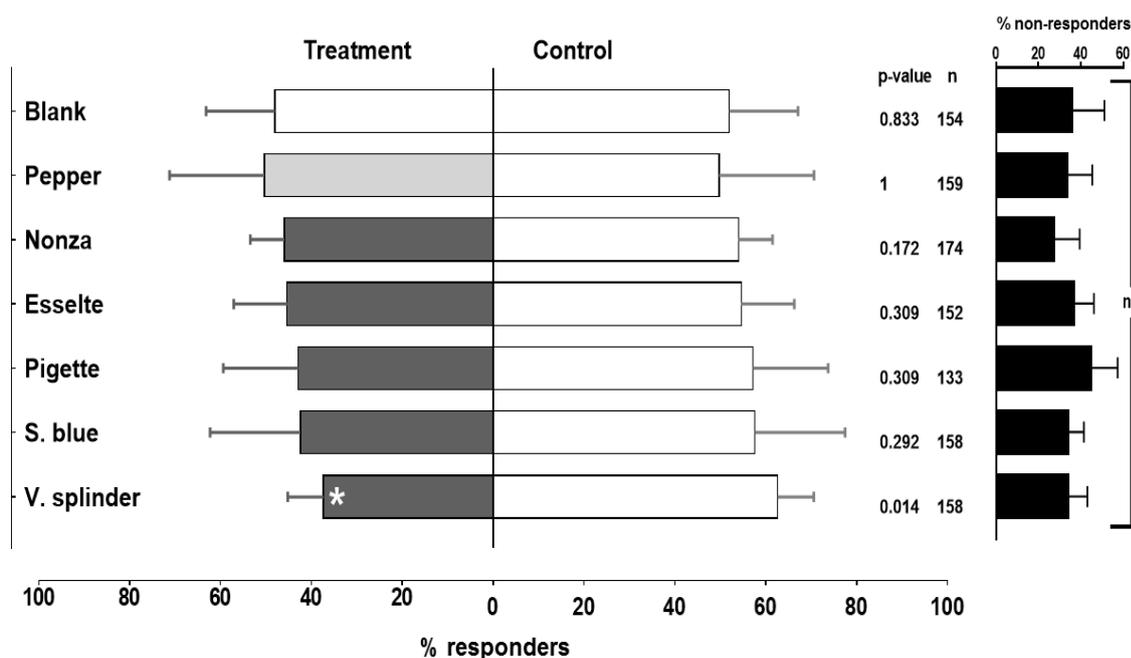


Figure 3.4. *Myzus persicae* responders' orientation in the presence of a rosemary clone in one chamber of the olfactometer (grey bars) and control in the other one (empty chamber; white bars). Light grey bars represent pepper. The asterisk (*) indicates a significant difference (Wilcoxon test) with p-value < 0.05; “n” represents the total number of responders and black bars in the histogram on the right represent the percentages of non-responders for 240 aphids tested for each treatment; “ns” = no significant differences (Kruskall-Wallis test at $\alpha = 0.05$); error bars represent standard deviation.

3.3. Effect of individual VOCs on the orientation of *Myzus persicae*

In the assays of individual VOCs, the percentage of non-responders ranged from 24.2% to 46.7%. Although there is a significant difference in the number of non-responders according to the VOC (Kruskall–Wallis: $K = 41.19$; $P = 0.0002$), none differed significantly from the negative and positive controls, blank and (*E*)- β -farnesene, respectively (Figure 3.5). Nevertheless, the olfactory behaviour of *M. persicae* differed according to the VOC assayed. The positive control, (*E*)- β -farnesene, clearly induced aphids' orientation towards blank ((*E*)- β -farnesene: 20.99%, $P = 0.014$). Only five VOCs elicited a significant repellent effect compared to blank: bornyl acetate (39.74%, Wilcoxon: $P = 0.035$); camphor (37.43%, Wilcoxon: $P = 0.041$); α -terpineol (36.71%, Wilcoxon: $P = 0.019$), terpinene-4-ol (36.25%, Wilcoxon: $P = 0.014$); and geranyl acetone (33.77%, Wilcoxon: $P = 0.022$).

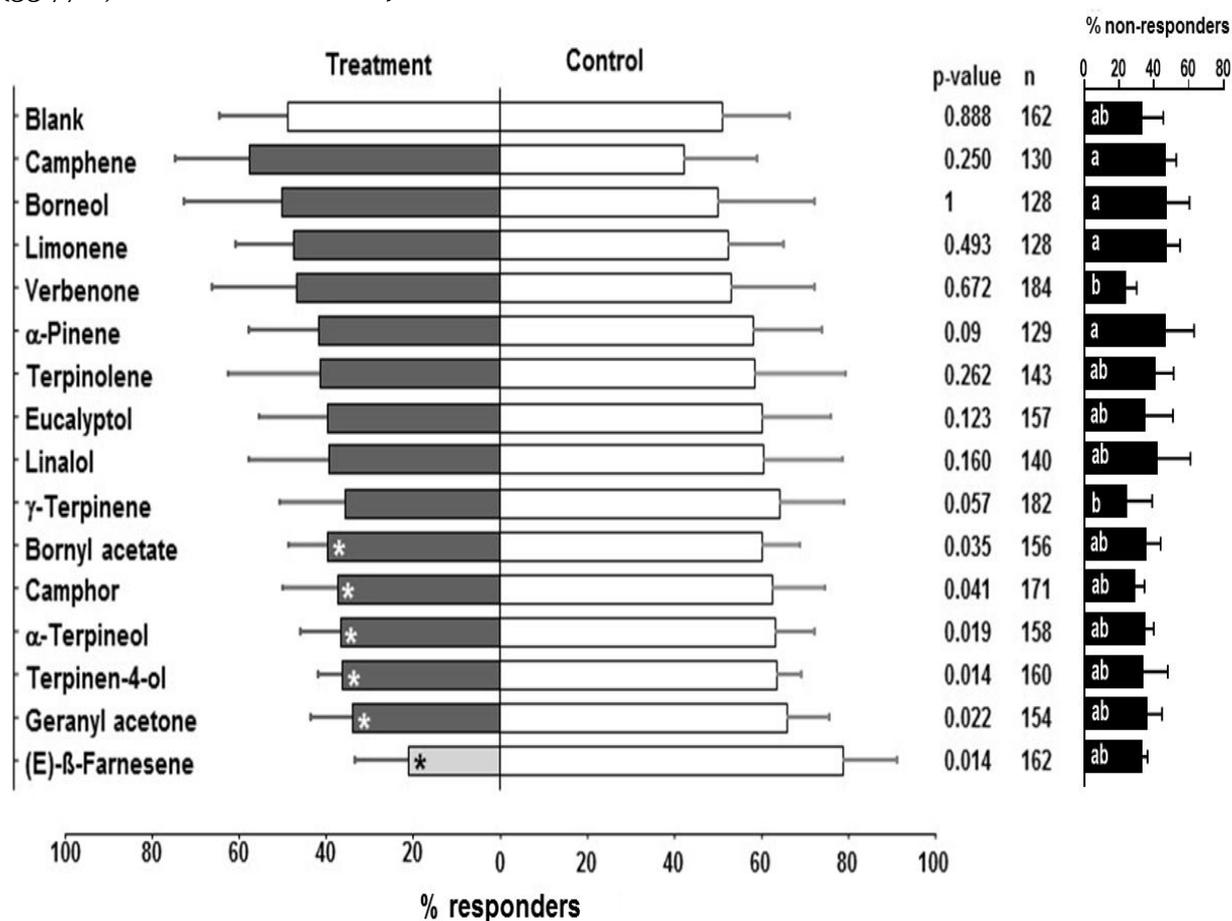


Figure 3.5. *Myzus persicae* responders' orientation in the presence of a volatile compound (10 μ L at 1%) in one chamber of the olfactometer (grey bars) and control in the other one (10 μ L of ethanol; white bars). Light grey bars represent positive control ((*E*)- β -farnesene). The asterisk (*) indicates a significant difference (Wilcoxon test) with p-value < 0.05; "n" represents the total number of responders and black bars in the histogram on the right represent the percentages of non-responders for 240 aphids tested for each treatment; values presented with the same letter are not significantly different (Tukey's test at $\alpha = 0.05$); error bars represent standard deviation.

4. Discussion

The VOCs identified in the rosemary clones were all previously identified in studies with whole plants (Zhang *et al.*, 2014a; Ben Issa *et al.*, 2016) or in rosemary essential oil (Hori & Komatsu, 1997; Hori, 1998; Isman *et al.*, 2008; Pausas *et al.*, 2015). This observation suggests the generic presence of most of the VOCs in rosemary plants. Thus, the volatile profile of our five rosemary clones has almost the same composition of VOCs, although in different concentrations and proportions. These results confirm that genetic variability influences VOCs production in a quantitative and qualitative way (Tholl & Lee, 2011; Schröder *et al.*, 2015). While VOCs production varies throughout the day, overall, their proportion in the olfactory bouquet is relatively stable. This gives the olfactory bouquet, considered as a whole, a chemical signature that separates genotypes (see PCA in Figure 3). Nevertheless, environmental factors, phenology, and plants cultivation also influence the characteristics of the VOC bouquet (Pichersky & Gershenzon, 2002). Also, it does not seem advisable to search only the relative proportions of one or two VOCs to identify a genotype, even though some VOCs such as α -pinene, camphor, bornyl acetate or verbenone are significantly different among clones.

One of the reasons of interest in rosemary is its presumed repellency potential for pests (Koschier & Sedy, 2003; Miresmailli *et al.*, 2006; Zhang & Chen, 2015; Zhang *et al.*, 2014a) and in particular towards the green aphid (Hori, 1998; Ben Issa *et al.*, 2016, 2017b). The arena olfactometer, like most of the olfactometers described in literature (Hori, 1998; Wang *et al.*, 2015), allows testing choice or preference bioassays, which are used to estimate the repellent power when it cannot be measured directly. The fact that aphids were distributed homogeneously during the blank tests showed an absence of preference for a chamber and thus of bias of the device in arena. Similarly, bioassays carried out with pepper showed that this host plant does not emit an attractive olfactory volatile mixture for *M. persicae*. Finally, the choice was clear when aphids were tested with a blank and when tested with (*E*)- β -farnesene (the aphids alarm pheromone; Francis *et al.*, 2004). (*E*)- β -farnesene used as a positive control confirmed the functionality of the olfactometer, being highly repulsive. Thus, when the aphids preferentially head for the blank side, a deduction can be made that the plant or VOC present in the other chamber of the device in the arena is repulsive. In this case, in the bioassays performed with five rosemary clones, all the clones reported repulsive capacities towards *M. persicae*, but only the effect of Voltz Spindler was statistically significant ($P < 0.05\%$). The same repellent effect has already been reported for the Pyramidal clone (Ben Issa *et al.*, 2016). Therefore, there is an effect related to the rosemary genetics that may explain the differences in the behaviour observed in the aphid. This is consistent with several studies that have shown that for the same plant species, the repulsion (or attractiveness) of the aphid differs according to the VOC profile produced by different cultivars (Storer & Emden, 1995; Wang *et al.*, 2009; da Costa *et al.*, 2010; Schröder *et al.*, 2015). This evidence is also valid for other pests sensitive to the olfactory environment such as thrips

(*Frankliniella occidentalis* (Pergande), (Thysanoptera: Thripidae)) in rosebushes (Gaum *et al.*, 1994) and the whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae)) in tomatoes or eggplants (Darshanee *et al.*, 2017). In this sense, genetic variability should be taken into consideration for choosing companion plants and can be a potential lever to improve companion plants effectiveness. We would like to emphasise that the absence of a significant repellent effect does not prevent a clone to impact negatively the fecundity of the aphid, as reported by Ben Issa *et al.* (2017b). In the present work, in the absence of physical and visual cues, VOCs from the companion plants are the exclusive cues present that can cause a deviation in the aphids' orientation. The results obtained with rosemary clones support the scientific outputs of other works that prove the ability of rosemary terpenes to adversely affect the performance of *M. persicae* (Hori, 1998, 1999a; Ben Issa *et al.*, 2016, 2017b). Therefore, these results show that this is an essential criterion for selecting a rosemary clone as a companion plant to control *M. persicae*.

The olfactometer bioassays conducted with individual VOCs emitted from rosemary were performed to identify their potential effect in the behavioural choice of the aphids in order to better understand the mode of action of the olfactory bouquet. The efficacy of the olfactory bouquet may result from the individual effect of certain VOCs on the behaviour of the aphid or from an effect resultant from the relative proportion in the blend of certain VOCs by an interactive and synergetic action (Zhang *et al.*, 2014a). Regarding the rosemary VOCs tested at the same concentration, not all elicited a significant effect on the behavioural response and choice of aphids. From the VOCs emitted from rosemary, only five reported a repulsive effect on aphids, namely bornyl acetate, camphor, α -terpineol, terpinene, and geranyl acetone. These terpenic compounds were already reported to be involved in the ability of rosemary plants to reduce the performance of *M. persicae* (Hori, 1998, 1999a). These results are in agreement with the available information in literature about these VOCs, already recognised to affect insects' behaviour. For example, camphor is a proven repellent not only for *M. persicae* (Hori, 1998) but also for the onion aphid *Neotoxoptera formosana* (Takahashi) (Homoptera: Aphididae) (Hori & Komatsu, 1997), and mosquitoes (Hwang *et al.*, 1985). Camphor also induces an anti-appetising effect on *M. persicae* (González-Coloma *et al.*, 2011) and a toxic effect on the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) (Rozman *et al.*, 2007) and on the rice weevil *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae) (Abdelgaleil *et al.*, 2009). Bornyl acetate reports a repellent effect on mosquitoes and Coleoptera species (Hwang *et al.*, 1985; Park *et al.*, 2003; Rozman *et al.*, 2007) and an anti-appetising effect against the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) (Hemiptera: Aphididae) (González-Coloma *et al.*, 2011). Terpinene-4-ol is a toxic VOC and has insecticidal activity against several insects (Isman, 2004; Abbassy *et al.*, 2009). The α -terpineol has a repellent activity towards *M. persicae* (Hori, 1998). Geranyl acetone revealed a highly repellent activity against the green pea aphid

Acyrtosiphon pisum (Harris) (Hemiptera: Aphididae) (Zhang *et al.*, 2017) and *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Deletre *et al.*, 2015).

According to our results, the remaining VOCs emitted from rosemary (α -pinene, camphene, limonene, eucalyptol, γ -terpinene, terpinolene, linalol, borneol, and verbenone) do not cause a significant repellent effect on *M. persicae*. The lack of a repellent effect on *M. persicae* was also observed by Bruce *et al.* (2005) for linalol and by Hori (1998) for α -pinene, camphene, eucalyptol, and borneol. Nevertheless, several authors report the effect of these VOCs on the behaviour of aphids and other insects (Chapman *et al.*, 1981; Hori & Komatsu, 1997; Rozman *et al.*, 2007; Abdelgaleil *et al.*, 2009; Halbert *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014b; Lamy *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2016; Hori, 1998; Tomova, 2005). Such contradictions are not necessarily surprising and testify the difficulty of making comparisons without considering the experimental conditions. The first cause of variability is undoubtedly the concentration of the VOCs tested (Foster *et al.*, 2007). It is also possible that these compounds are more repulsive in combination and in a synergetic action with other VOCs (Deletre *et al.*, 2016). Among the five repellent VOCs, bornyl acetate is the major component (35%) in the olfactory bouquet of the rosemary Voltz Spindler clone. Nevertheless, the same VOC was present in a relative proportion of 40% in the least repellent clone, Nonza. Therefore, this major VOC cannot alone explain the repellent action of Voltz Spindler over *M. persicae*. Consequently, we can hypothesise that the repellency level does not result from the accumulation of individual repulsive effects of the VOCs. For example, the Nonza clone accumulates 50% of repellent VOCs against 48% in Voltz Spindler. Thus, these results suggest that the repulsion of a companion plant is more related to a blend/mixture of VOCs (with a significant synergetic effect), as mentioned by (Bruce & Pickett, 2011), than the sole action of a certain repellent VOC. The results obtained in the PCA (Figure 3) point towards the same direction as it is difficult to establish a link between the repulsive efficacy of Voltz Spindler and the repellency of each VOC emitted. Repulsion may also be associated with the presence of minor components, sometimes difficult to detect (McCormick *et al.*, 2014). Bruce *et al.* (2005) reported that the sesquiterpene (+)-bicyclogermacrene inhibited the effect of (*E*)- β -farnesene on *M. persicae*, and that (-)-germacrene D caused the same effect over pea aphid *A. pisum*. Dawson *et al.* (1984) verified that depending on the concentration of VOCs in the olfactory bouquet, β -caryophyllene may inhibit the aphid response to the aphids' alarm pheromone (*E*)- β -farnesene. Also, the relative proportion of each VOC in the volatile profile perceived by the aphid plays an important role in its olfactory response. Some specific ratios may elicit a maximum repelling action (Zhang *et al.*, 2014a).

In this first comparative study, we noted the limitations of testing the VOCs individually at the same concentration (1%), which does not correspond to the relative proportion of each VOC in the olfactory bouquet of rosemary. A slight change in the concentration or absence of a designated VOC in the olfactory bouquet can disrupt the repellent action previously observed

(Rajabaskar *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014a). In order to go further into this research topic, it could be relevant to test a range of concentrations and to establish a response curve for each VOC. The relative proportion of VOCs perceived by the aphid also appears to affect its olfactory response (Zhang *et al.*, 2014a). A complementary approach might consist of verifying whether VOCs associations retrieve higher or lesser repellent properties, as reported by Webster *et al.* (2010). Finally, we could simulate at the best possible the volatile bouquet emitted from rosemary, then create variations by removing one or more VOCs from the bouquet so as to try to isolate the most effective olfactory combination (Bruce & Pickett, 2011).

Conclusion

In conclusion, our work showed the importance of genetic variability of rosemary clones regarding their level of repulsion for *M. persicae*. The five clones studied emit almost the same VOCs but in different concentrations and relative proportions. Most of the VOCs identified are terpenic compounds, and among them, five tend to repel aphids. The Voltz Spindler clone, the only one demonstrating real repellent properties, has four of the five VOCs that are themselves repellent in the individual assays. Nonza, the least repellent clone, emits these five VOCs in higher quantities and proportions than the Voltz Spindler. Such results prove that the effectiveness of an olfactory bouquet is more related to a blend and synergetic action between compounds than the sum of the effects from individual VOCs with repellent properties. Thus, the production of a specific repulsive VOC cannot be used as a reliable marker of the effectiveness of a companion plant and promoting its emission by genetic selection or culture is not sufficient. In our study model, we must therefore assess and integrate the beneficial or harmful interactions within the olfactory bouquet emitted from the rosemary clones. Such aspect should guide our approach in order to optimise the repulsive efficiency of companion plants of interest, namely Voltz Spindler, by testing, for example, artificial combinations of VOCs.

Acknowledgments

The authors would like to thank the CRIEPPAM (Centre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales), for supplying rosemary clones. The authors would also like to thank Michel Pradier for the maintenance of plants and Julie Courtois for the breeding of aphids. We are in debt to Refka Ben Issa and Marie-Hélène Sauge for their advice. Tarek Dardouri is funded by a scholarship from the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research. This manuscript is part of the Ph.D. thesis of Tarek Dardouri.

References

- Abbassy, M.A., Abdelgaleil, S.A.M. & Rabie, R.Y.A. (2009) Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **131**, 225-232.
- Abdelgaleil, S.A., Mohamed, M.I., Badawy, M.E. & El-arami, S.A. (2009) Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *Journal of Chemical Ecology*, **35**, 518-525.
- Alvarez, A.E., Garzo, E., Verbeek, M., Vosman, B., Dicke, M. & Tjallingii, W.F. (2007) Infection of potato plants with potato leafroll virus changes attraction and feeding behaviour of *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **125**, 135-144.
- Ameline, A., Couty, A., Dugravot, S., Campan, E., Dubois, F. & Giordanengo, P. (2007) Immediate alteration of *Macrosiphum euphorbiae* host plant-selection behaviour after biotic and abiotic damage inflicted to potato plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **123**, 129-137.
- Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Daniela B., Coisson, J.C., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V. & Cabras, P. (2004) Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J Agriculture and Food Chemistry*, **52**, 3530-3535.
- Bass, C., Puinean, A.M., Zimmer, C.T., Denholm, I., Field, L.M., Foster, S.P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R. & Williamson, M.S. (2014) The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **51**, 41-51.
- Ben Issa, R., Gautier, H., Costagliola, G. & Gomez, L. (2016) Which companion plants affect the performance of green peach aphid on host plants? Testing of 12 candidate plants under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **160**, 164-178.
- Ben Issa, R., Gomez, L. & Gautier, H. (2017a) Companion Plants for Aphid Pest Management. *Insects*, **8**, 112-131.
- Ben Issa, R., Gautier, H. & Gomez, L. (2017b) Influence of neighbouring companion plants on the performance of aphid populations on sweet pepper plants under greenhouse conditions. *Agricultural and Forest Entomology*, **19**, 181-191.
- Blackman, R.L. & Eastop, V.F. (2000) *Aphids on the World's Crop: And Identification and Information Guide*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Bruce, T.J. & Pickett, J.A. (2011) Perception of plant volatile blends by herbivorous insects-finding the right mix. *Phytochemistry*, **72**, 1605-1611.

- Bruce, T.J.A., Birkett, M.A., Blande, J., Hooper, A.M., Martin, J.L., Khambay, B., Prosser, I., Smart, L.E. & Wadhams, L.J. (2005) Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Management Science*, **61**, 1115-1121.
- Castro, A.M., Tapias, J., Ortiz, A., Benavides, P. & Góngora, C.E. (2017) Identification of attractant and repellent plants to coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **164**, 120-130.
- Chapman, R.F., Bernays, E.A. & Simpson, S.J. (1981) Attraction and repulsion of the aphid, *Cavariella aegopodii*, by plant odors *Journal of Chemical Ecology*, **7**, 881-888.
- Chopa, C.S. & Descamps, L.R. (2012) Composition and biological activity of essential oils against *Metopolophium dirhodum* (Hemiptera: Aphididae) cereal crop pest. *Pest Management Science*, **68**, 1492-1500.
- da Costa, J.G., Pires, E.V., Riffel, A., Birkett, M.A., Bleicher, E. & Sant'Ana, A.E.G. (2010) Differential preference of *Capsicum* spp. cultivars by *Aphis gossypii* is conferred by variation in volatile semiochemistry. *Euphytica*, **177**, 299-307.
- Darshanee, H.L.C., Ren, H., Ahmed, N., Zhang, Z.F., Liu, Y.H. & Liu, T.X. (2017) Volatile-Mediated Attraction of Greenhouse Whitefly *Trialeurodes vaporariorum* to Tomato and Eggplant. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 1285.
- Dawson, G.W., Griffiths, D.C., Pickett, J.A., Smith, M.C. & Woodcock, C.M. (1984) Natural inhibition of the aphid alarm pheromone. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **36**, 197-199.
- Deletre, E., Chandre, F., Barkman, B., Menuc, C. & Martin, T. (2015) Naturally occurring bioactive compounds from four repellent essential oils against *Bemisia tabaci* whitefly. *Pest Management Science*, **72**, 179-189.
- Deletre, E., Schatz, B., Bourguet, D., Chandre, F., Williams, L., Ratnadass, A. & Martin, T. (2016) Prospects for repellent in pest control: current developments and future challenges. *Chemoecology*, **26**, 127-142.
- Eigenbrode, S.D., Ding, H., Shiel, P. & Berger, P.H. (2002) Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **269**, 455-460.
- Foster, S.P., Tomiczek, M., Thompson, R., Denholm, I., Poppy, G., Kraaijeveld, A.R. & Powell, W. (2007) Behavioural side-effects of insecticide resistance in aphids increase their vulnerability to parasitoid attack. *Animal Behaviour*, **74**, 621-632.
- Francis, F., Lognay, G. & Haubruge, E. (2004) Olfactory responses to aphid and host plant volatile releases: (*E*)- β -Farnesene an effective kairomone for the predator *Adalia bipunctata*. *Journal of Chemical Ecology*, **30**, 741-755.

- Gaum, W.G., Giliomee, J.H. & Pringle, K.L. (1994) Resistance of some rose cultivars to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Bulletin of Entomological Research*, **84**, 487-492.
- González-Coloma, A., Delgado, F., Rodilla, J.M., Silva, L., Sanz, J. & Burillo, J. (2011) Chemical and biological profiles of *Lavandula luisieri* essential oils from western Iberia Peninsula populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, **39**, 1-8.
- Halbert, S.E., Corsini, D., Wiebe, M. & Vaughn, S.F. (2009) Plant-derived compounds and extracts with potential as aphid repellents. *Annals of Applied Biology*, **154**, 303-307.
- Hori, M. (1998) Repellency of rosemary oil against *Myzus persicae* in a laboratory and in a greenhouse. *Journal of Chemical Ecology*, **24**, 1425-1432.
- Hori, M. (1999a) The effects of rosemary and ginger oils on the alighting behavior of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) and on the incidence of yellow spotted streak. *Applied Entomology and Zoology*, **34**, 351-358.
- Hori, M. (1999b) Antifeeding, settling inhibitory and toxic activities of labiate essential oils against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology*, **34** 113-118
- Hori, M. & Komatsu, H. (1997) Repellency of rosemary oil and its components against the onion aphid, *Neotoxoptera formosana* (Takahashi) (Homoptera, Aphididae). *Applied Entomology and Zoology*, **32**, 303-310.
- Hwang, Y.-S., Wu, K.-H., Kumamoto, J., Axelrod, H. & Mulla, M.S. (1985) Isolation and identification of mosquito repellents in *Artemisia vulgaris*. *Journal of Chemical Ecology*, **11**, 1297-1306.
- Isman, M.B. (2004) *Plant Essential Oils as Green Pesticides for Pest and Disease Management*, In *Agricultural Applications in Green Chemistry*, (Ed, Series, A. S.), Vol. 887, pp. 41-51. American Chemical Society, Washington, DC.
- Isman, M.B., Wilson, J.A. & Bradbury, R. (2008) Insecticidal Activities of Commercial Rosemary Oils (*Rosmarinus officinalis*) Against Larvae of *Pseudaletia unipuncta*. and *Trichoplusia ni*. in Relation to Their Chemical Compositions. *Pharmaceutical Biology*, **46**, 82-87.
- Jiang, H., Wang, J., Song, L., Cao, X., Yao, X., Tang, F. & Yue, Y. (2016) GCxGC-TOFMS Analysis of Essential Oils Composition from Leaves, Twigs and Seeds of *Cinnamomum camphora* L. Presl and Their Insecticidal and Repellent Activities. *Molecules*, **21**, 423.
- Koschier, E.H. & Sedy, K.A. (2003) Labiate essential oils affecting host selection and acceptance of *Thrips tabaci* lindeman. *Crop Protection*, **22**, 929-934.
- Lamy, F.C., Poinot, D., Cortesero, A.-M. & Dugravot, S. (2016) Artificially applied plant volatile organic compounds modify the behavior of a pest with no adverse effect on its natural enemies in the field. *Journal of Pest Science*, **90**, 611-621.

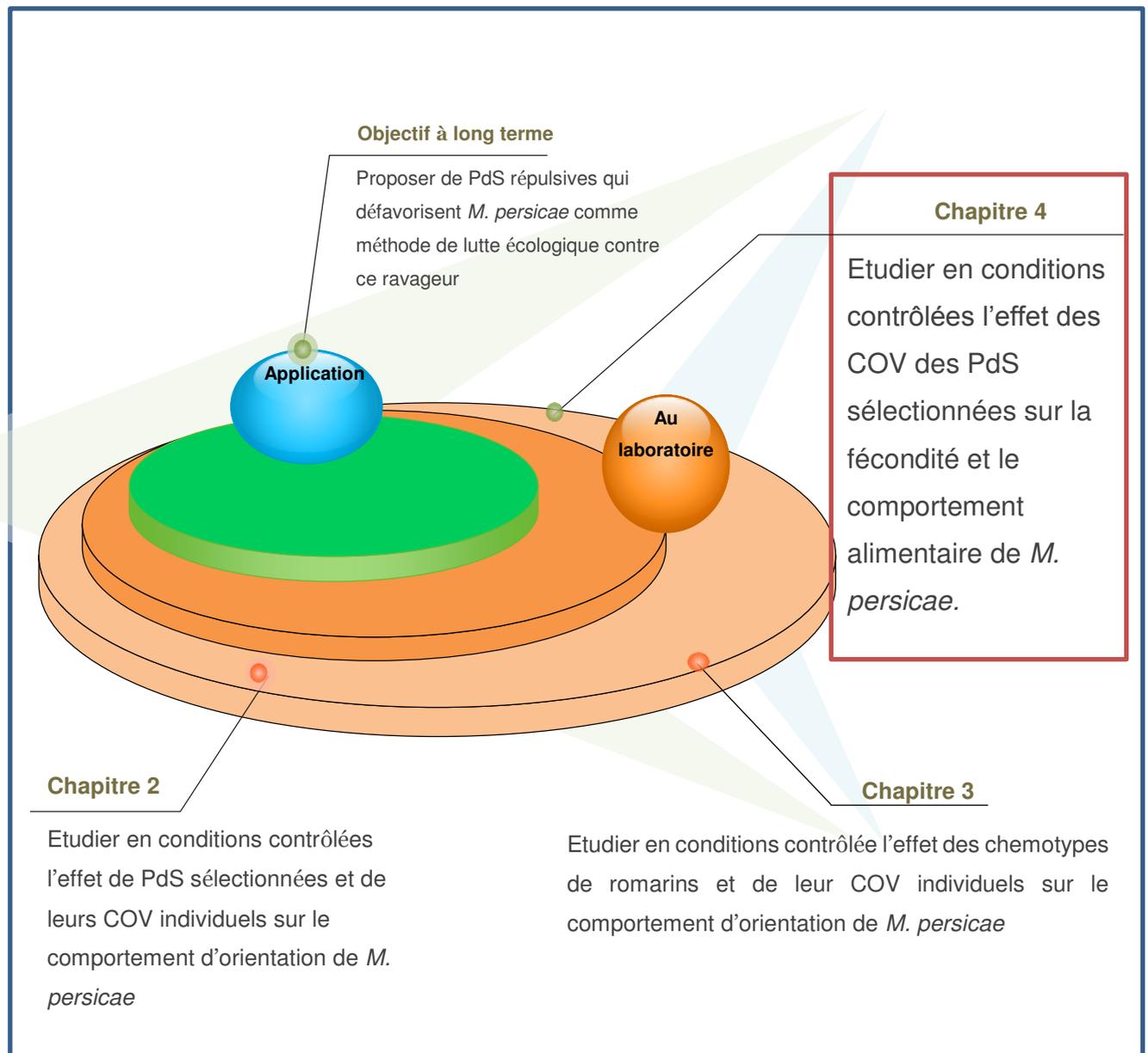
- Malézieux, E., Crozat, Y., Dupraz, C., Laurans, M., Makowski, D., Ozier-Lafontaine, H., Rapidel, B., Tourdonnet, S. & Valantin-Morison, M. (2009) Mixing plant species in cropping systems: concepts, tools and models. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **29**, 43-62.
- Marin, M., Koko, V., Duletić-Laušević, S., Marin, P.D., Rančić, D. & Dajic-Stevanovic, Z. (2006) Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. *South African Journal of Botany*, **72**, 378-382.
- McCormick, A.C., Gershenzon, J. & Unsicker, S.B. (2014) Little peaks with big effects: establishing the role of minor plant volatiles in plant-insect interactions. *Plant Cell Environ*, **37**, 1836-1844.
- Miresmailli, S., Bradbury, R. & Isman, M.B. (2006) Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. *Pest Management Science*, **62**, 366-371.
- Park, I.-K., Lee, S.-G., Choi, D.-H., Park, J.-D. & Ahn, Y.-J. (2003) Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Stored Products Research*, **39**, 375-384.
- Pausas, J.G., Alessio, G.A., Moreira, B. & Segarra-Moragues, J.G. (2015) Secondary compounds enhance flammability in a Mediterranean plant. *Oecologia*, **180**, 103-110.
- Penvern, S., Bellon, S., Fauriel, J. & Sauphanor, B. (2010) Peach orchard protection strategies and aphid communities: Towards an integrated agroecosystem approach. *Crop Protection*, **29**, 1148-1156.
- Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 237-243.
- Rajabaskar, D., Ding, H., Wu, Y. & Eigenbrode, S.D. (2013) Behavioral Responses of Green Peach Aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), to the Volatile Organic Compound Emissions from Four Potato Varieties. *American Journal of Potato Research*, **90**, 171-178.
- Rozman, V., Kalinovic, I. & Korunic, Z. (2007) Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, **43**, 349-355.
- Sadeh, D., Nitzan, N., Shachter, A., Chaimovitsh, D., Dudai, N. & Ghanim, M. (2017) Whitefly attraction to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is associated with volatile composition and quantity. *PLoS One*, **12**, e0177483.
- Sanchez, J.A., La-Spina, M., Michelena, J.M., Lacasa, A. & Hermoso de Mendoza, A. (2011) Ecology of the aphid pests of protected pepper crops and their parasitoids. *Biocontrol Science and Technology*, **21**, 171-188.

- Satyral, P., Jones, T.H., Lopez, E.M., McFeeters, R.L., Ali, N.A., Mansi, I., Al-Kaf, A.G. & Setzer, W.N. (2017) Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*. *Foods*, **6**, 20.
- Sauge, M.-H., Grechi, I. & Poëssel, J.-L. (2010) Nitrogen fertilization effects on *Myzus persicae* aphid dynamics on peach: vegetative growth allocation or chemical defence? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **136**, 123-133.
- Schröder, M.L., Glinwood, R., Webster, B., Ignell, R. & Krüger, K. (2015) Olfactory responses of *Rhopalosiphum padito* three maize, potato, and wheat cultivars and the selection of prospective crop border plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **157**, 241-253.
- Shrivastava, G., Rogers, M., Wszelaki, A., Panthee, D.R. & Chen, F. (2010) Plant Volatiles-based Insect Pest Management in Organic Farming. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **29**, 123-133.
- Staudt, M., Jackson, B., El-Aouni, H., Buatois, B., Lacroze, J.P., Poessel, J.L. & Sauge, M.H. (2010) Volatile organic compound emissions induced by the aphid *Myzus persicae* differ among resistant and susceptible peach cultivars and a wild relative. *Tree Physiology*, **30**, 1320-1334.
- Storer, J.R. & van Emden, H.F. (1995) Antibiosis and antixenosis of chrysanthemum cultivars to the aphid *Aphis gossypii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **77**, 307-314.
- Tang, G.B., Song, B.Z., Zhao, L.L., Sang, X.S., Wan, H.H., Zhang, J. & Yao, Y.C. (2012) Repellent and attractive effects of herbs on insects in pear orchards intercropped with aromatic plants. *Agroforestry Systems*, **87**, 273-285.
- Tholl, D. & Lee, S. (2011) Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book*, **9**, e0143.
- Tomova, B.S., Waterhouse, J.S., Doberski, J. (2005) The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **115**, 153-159.
- Uvah, I.I.I. & Coaker, T.H. (1984) Effect of mixed cropping on some insect pests of carrots and onions. *Entomologia Experimentalis Applicata*, **36**, 159-167.
- Wang, G.P., Yu, X.D., Fan, J., Wang, C.S. & Xia, L.Q. (2015) Expressing an (*E*)-beta-farnesene synthase in the chloroplast of tobacco affects the preference of green peach aphid and its parasitoid *Journal of Integrative Plant Biology*, **57**, 770-782.
- Wang, W., Liu, Y., Chen, J., Ji, X., Zhou, H. & Wang, G. (2009) Impact of intercropping aphid-resistant wheat cultivars with oilseed rape on wheat aphid (*Sitobion avenae*) and its natural enemies. *Acta Ecologica Sinica*, **29**, 186-191.
- Webster, B., Bruce, T., Pickett, J. & Hardie, J. (2010) Volatiles functioning as host cues in a blend become nonhost cues when presented alone to the black bean aphid. *Animal Behaviour*, **79**, 451-457.

- Zhang, R., Wang, B., Grossi, G., Falabella, P., Liu, Y., Yan, S., Lu, J., Xi, J. & Wang, G. (2017) Molecular Basis of Alarm Pheromone Detection in Aphids. *Current Biology*, **27**, 55-61.
- Zhang, Z., Bian, L., Sun, X., Luo, Z., Xin, Z., Luo, F. & Chen, Z. (2014a) Electrophysiological and behavioural responses of the tea geometrid *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae) to volatiles from a non-host plant, rosemary, *Rosmarinus officinalis*(Lamiaceae). *Pest Management Science*, **71**, 96-104.
- Zhang, Z. & Chen, Z. (2015) Non-host plant essential oil volatiles with potential for a ‘push-pull’ strategy to control the tea green leafhopper, *Empoasca vitis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **156**, 77-87.
- Zhang, Z., Luo, Z., Gao, Y., Bian, L., Sun, X. & Chen, Z. (2014b) Volatiles from non-host aromatic plants repel tea green leafhopper *Empoasca vitis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **153**, 156-169.

Chapitre 4

Effets des composés organiques volatils non-hôtes sur la fécondité et le comportement alimentaire du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer)



Chapitre 4

Effets des composés organiques volatils non-hôtes sur la fécondité et le comportement alimentaire du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer)

1. Introduction

Le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera : Aphididae) est fortement dommageable pour diverses cultures dans les régions tempérées. Des pièces buccales transformées en tube (4 stylets regroupés en un rostre), permettent à ce ravageur "piqueur-suceur" de prélever la sève élaborée à partir des tubes criblés du phloème pour répondre à ses besoins alimentaires (Hullé *et al.*, 1998). Ce mode d'alimentation provoque des dégâts directs qui se terminent par un dépérissement général de la plante. En plus de ces dégâts directs, il peut entraîner la transmission des particules virales responsables de maladies pour laquelle on ne dispose d'aucun moyen de lutte. Ainsi, la gravité des effets provoqués par *M. persicae* est accentuée par le fort potentiel reproductif de sa morphie aptère (reproduction par parthénogenèse), qui lui permet de coloniser rapidement les cultures (Blackman and Eastop, 2000). En effet, des pertes économiques considérablement importantes peuvent être engendrées par cet insecte. Ceci a imposé aux producteurs l'utilisation des pesticides pour limiter sa population dans les cultures. Cependant, cette méthode de lutte se confronte à diverses limites. Notamment, avec le phénomène de résistance, divers matière active ne semble plus efficace contre *M. persicae* (Bass *et al.*, 2014). Ainsi, de nombreux problèmes ont été aggravés par l'utilisation excessive des pesticides, comme la contamination de l'environnement par des résidus toxique et les effets néfastes sur la santé humaine (Hillocks, 2012).

Afin de réduire le recours aux intrants chimiques, la mise en place de programmes de lutte intégrée respectueux à l'environnement est devenu de plus en plus nécessaire, voir même obligatoire dans le futur (Dedryver *et al.*, 2010; Stenberg, 2017). Comme intéressante approche écologique, l'utilisation de la stratégie 'push-pull' peut réduire les dégâts néfastes des pucerons dans les agrosystèmes (Cook *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2013). Son principe consiste à défavoriser l'installation des ravageurs sur la plante à protéger et de les repousser loin de la culture vers des plantes pièges plus attractives. En particulier, l'application de la composante 'push' de cette stratégie peut être assurée par l'introduction des plantes de service (PdS), répulsives et/ou perturbatrices, avec la culture à protéger. Les mécanismes d'action sur les ravageurs de ces PdS,

sont principalement assurés par les composés organiques volatils (COV) qu'elles libèrent dans l'atmosphère (Ben Issa *et al.*, 2017b).

Les COV sont des signaux olfactifs qui jouent un rôle important dans l'écologie chimique des pucerons, notamment, dans la localisation de la plante-hôte et l'estimation de la qualité de son habitat. Or, dans la nature, en plus des COV attractifs ou neutres (Chapman *et al.*, 1981; Bruce *et al.*, 2005b), les pucerons perçoivent des COV répulsifs ou perturbateurs. Ces COV, émis généralement par des plantes non-hôtes, possèdent des effets opposés sur leur comportement et leurs performances. En effet, en plus du fait qu'ils repoussent le puceron ailé durant la phase de localisation de sa plante-hôte, ces allomones peuvent également provoquer un comportement de fuite du puceron aptère, même après son installation sur une plante-hôte adéquate. Ainsi, même en absence d'effet répulsif notable, certains COV peuvent engendrer des effets négatifs sur la fécondité de la morphé aptère du *M. persicae*, comme l'ont montré Ben Issa *et al.* (2016). Les performances des pucerons varient en fonction des particularités de la plante hôte, mais aussi en fonction de son environnement. Dans des conditions optimales pour la reproduction et le développement des population des pucerons, diverses études utilisant différentes source de diffusion des COV (*e.g.* plantes entières, huiles essentielles, composé individuels), ont bien démontré que l'exposition du puceron à certains COV ou certains mélanges des COV peuvent agir négativement sur sa reproduction (Hildebrand *et al.*, 1993; Tomova *et al.*, 2005; de Vos *et al.*, 2010; Ben Issa *et al.*, 2016; Ben Issa *et al.*, 2017a). Cependant, l'efficacité des PdS est principalement liée au mélange des COV qu'elles émettent. Des changements dans la composition et les quantités des COV dans ce mélange peuvent se traduire par la perte de ces impacts négatifs sur le puceron. Toutefois, les émissions d'une même espèce varient, qualitativement et/ou quantitativement, en fonction de plusieurs facteurs, tels que les conditions climatiques, les facteurs génétiques, les stades phénologiques, les organes émetteurs, les différents types de stress, la conduite culturale etc. (Pichersky and Gershenzon, 2002; Penuelas and Staudt, 2010; Bracho-Nunez *et al.*, 2011). En effet, en plus du choix de l'espèce végétale à introduire, divers paramètres doivent être prise en considérations. Pour optimiser l'efficacité des PdS, il faut comprendre comment ses COV agissent négativement sur la reproduction du puceron.

Les mécanismes qui peuvent expliquer comment les COV présents dans l'atmosphère du puceron affectent ses performances reproductives sont très rarement explorés. Cependant, en se référant à la littérature, quel que soit le mécanisme d'action des COV, l'hypothèse majeure consiste en une perturbation de son comportement alimentaire (Kunert *et al.*, 2010). Un effet d'antixénose (plante non acceptée) et/ou d'antibiose (plante acceptée, mais avec des problèmes de nutrition), peuvent être provoqués par les volatiles des plantes voisines (Pettersson *et al.*, 1996; Le Roux *et al.*, 2008). En effet, la perception des certains COV perturbateurs provoque des interruptions répétitives qui diminuent la durée de son alimentation. En conséquence, il augmente sa consommation d'énergie qui se traduit par des impacts négatifs sur son

développement, et ainsi sur sa reproduction. En effet, les COV peuvent agir sur différentes étapes de comportement alimentaire du puceron. Notamment, au moment de l'exploration de la surface de la feuille (marche et antennation), pendant les piqûres dans l'épiderme, durant les phases de gustation dans le mésophylle par des piqûres intracellulaires et enfin au moment de l'évaluation de la sève élaborée dans le phloème. Toutefois, comme nous l'avons montré dans le chapitre *cf.* chapitre 2, les PdS peuvent avoir différents modes d'action sur les pucerons (*i.e.* effet direct sur le puceron ou bien indirecte *via* sa plante hôte, *cf.* chapitre 2), (Dahlin *et al.*, 2014; Ninkovic *et al.*, 2013; Heil and Karban, 2010). En conséquence, les impacts des COV de la PdS sur les différentes étapes du son comportement alimentaire peuvent varier en fonction de leur mode d'action.

L'objectif de cette étude consiste à sélectionner des PdS qui émettent des COV ayant des effets négatifs sur les performances de *M. persicae*. Pour ceci, nous avons mesuré et comparé l'effet des COV émis par six plantes aromatiques sur sa fécondité par rapport à un témoin (poivron seul). Nous avons essayé aussi de cibler la partie de la plante et le stade phénologique durant lequel la plante émet des COV efficaces sur les performances de *M. persicae*. Pour ceci, l'effet des COV des PdS a été étudié en fonction de différents organes aériens de la plante. En parallèle, nous avons identifié les COV qui peuvent être impliqués en GC-MS. Nous avons aussi caractérisé qualitativement la composition du mélange émis par une plante entière pour essayer de distinguer les différences entre le mélange émis par une plante entière et le mélange libéré par la partie efficace de la plante. Par la suite, nous avons essayé de comprendre le processus par lequel agissent les composés des plantes candidates sur les performances reproductives du *M. persicae*. Par la technique d'électropénétrographie, nous avons étudié l'effet de la présence des COV de PdS candidates sur le comportement alimentaire du *M. persicae*.

2. Matériels et méthodes

2.1. Les insectes

L'élevage du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Mp05, Sulzer), est maintenu sur de jeunes plantes de poivrons en conditions contrôlées ($22\pm 1^\circ\text{C}$, HR=60%-70%, photopériode 16 : 8 h jour : nuit).

Dans le but d'obtenir des individus de même âge, l'élevage des pucerons est synchronisé. Pour les tests sur la fécondité, nous avons utilisé des larves âgées de 5 jours issues d'une cohorte standardisée de 8 h. Les expérimentations d'EPG ont été effectuées avec des femelles aptères âgées de 10 jours issues d'une cohorte standardisée de 24 h.

2.2. Les plantes

Nous avons testé cinq espèces aromatiques comme PdS : le basilic (*Ocimum basilicum* L.), la lavande (*Lavandula latifolia* L.), la menthe poivrée (*Mentha piperita* L.), le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Lamiaceae) et deux variétés d'œillets d'inde (*Tagetes patula* L., variétés Nana et Bonita Bolero) (Asteraceae). Comme plante-hôte de *M. persicae* nous avons

utilisé des plantes du poivron (*Capsicum annuum* L., cv. Yolo Wonder) âgées de 6 semaines (5-6 feuilles développées). Les PdS et les plantes de poivron ont été cultivées dans deux serres vitrées différentes (20 ± 5 °C et HR=60- 70%) pour éviter les interactions entre PdS et plantes hôtes liées aux COV. A l'exception de *L. latifolia* (pots de 3 litres), toutes les plantes ont été cultivées dans des pots de 1 litre. Aucun apport d'engrais et aucun traitement chimique n'ont été réalisés.

2.3. Effet des composés organiques volatils sur la fécondité de *Myzus persicae*

L'objectif de ce test est d'étudier l'influence des COV émis par différents organes aériens des PdS sur la reproduction de femelles de *M. persicae* élevées sur poivron. Dans des conditions contrôlées (température = 22 ± 1 °C et photopériode 16 jours : 8 nuits), le taux de fécondité de *M. persicae* en présence des COV des PdS a été comparé à celui observé en présence de feuilles de poivron uniquement (témoin).

Au fond d'une boîte de Pétri (155 mm de diamètre x 25 mm de hauteur), une feuille de poivron a été fixée (côté abaxial vers le haut) sur un milieu gélosé (2 % d'agar-agar) (Roy *et al.*, 1999; Tomova *et al.*, 2005). Pour le témoin, on place une feuille de poivron seule dans une boîte (figure 4.1). Pour les traitements avec PdS, on place, dans la deuxième moitié de la boîte, 3 g de feuilles ou 3 g de fleurs (\approx le poids d'une fleur de *T. patula*) de la PdS.



Figure 4.1 : Exemples de tests de fécondité. A : feuille de poivron seule (témoin); B : feuille de poivron avec : 1. feuilles d'*O. basilicum*; 2. feuilles de *Mentha piperita*; 3. Fleur de *T. patula*, variétés Bonita Bolero ; 5. Fleur de *T. patula*, variété Nana ; 5. feuilles de *T. patula*, variété Nana.

Après une heure de stabilisation, une seule larve âgée de 5 jours a été déposée sur chaque feuille de poivron à l'aide d'un fin pinceau. La boîte a été ensuite fermée et retournée.

Après 3 jours, les pucerons atteignent le stade adulte et commencent à pondre. A partir de cette date et durant cinq jours, les larves néonates ont été comptées et éliminées chaque jour à la même heure (entre 10 h et 11h). Chaque modalité a été testée 30 fois (3 × 10 répétitions) simultanément avec une modalité témoin (figure 4.2).

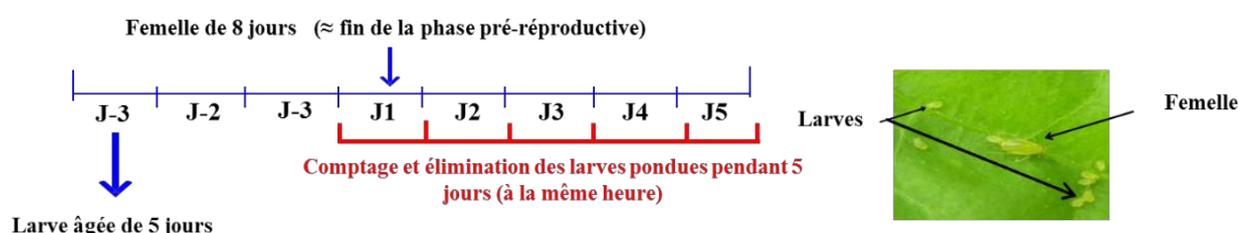


Figure 4.2 : Représentation synoptique du protocole de suivi de la fécondité de femelles de *M. persicae*.

2.4. Analyse qualitative des composés volatils en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Pour essayer d'établir un lien entre la PdS et la fécondité des pucerons, nous avons capté puis analysé la composition des mélanges de COV libérés par différentes parties aériennes (feuilles ou fleurs) (figure 4.3). Les prélèvements ont été réalisés dans les mêmes conditions avec le matériel décrit pour les tests de fécondité.

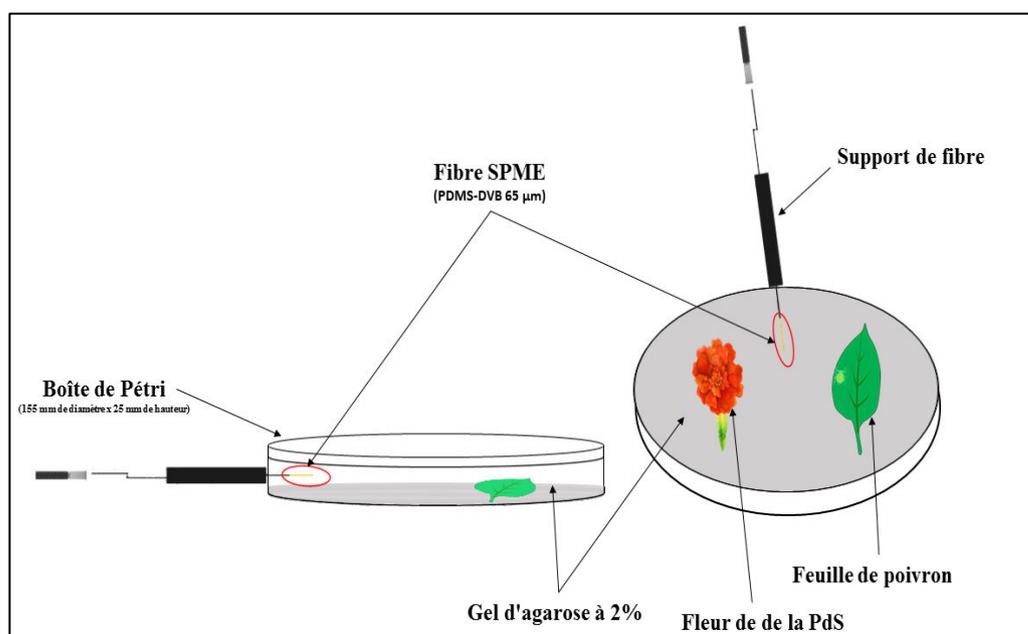


Figure 4.3 : Prélèvement des composés volatils par micro-extraction en phase solide en mode espace de tête statique « ou Static Headspace » (HS-SPME)

Une petite ouverture (<1mm) pratiquée sur la paroi de la boîte de petri nous a permis d'introduire une fibre SPME (PDMS-DVB, 65 μm ; Supelco, Bellefonte, USA) et de prélever durant 30 min un échantillon représentatif du mélange olfactif à l'intérieur. La fibre SPME est ensuite retirée et le prélèvement analysé postérieurement par GC-MS. Cinq prélèvements ont ainsi été effectués par modalité, à savoir 1 par jour (de J1 à J5), à 11h, durant la première manip.

Pour comparaison, les mélanges olfactifs produits par des plantes entières ont également été prélevés à l'aide d'un dispositif dynamique dans des contions contrôlées ($T^{\circ}=22\pm 1^{\circ}\text{C}$ et $\text{HR}=60\%\pm 5\%$) (figure 4.4). Pour chaque prélèvement, 6 plantes ont été soigneusement introduites, sans toucher le feuillage, à l'intérieur d'une enceinte en verre, de dimensions 60 cm \times 60 cm \times 60 cm (l \times L \times H), équipée d'un couvercle amovible. Les pots ont été enveloppés d'une feuille d'aluminium pour éviter la pollution de l'échantillon par les COV du substrat de culture et du plastique. Deux ventilateurs sont installés à la base de manière à homogénéiser l'atmosphère lors des prélèvements et favoriser l'adsorption des COV sur la fibre SPME. Un flux d'air permanent, distribué par un compresseur (8 L min^{-1}) et purifié par un filtre à charbon, a été pompé dans la cage contenant les PdS. Durant deux heures de stabilisation, ce flux d'air est expulsé à l'extérieur de la pièce.

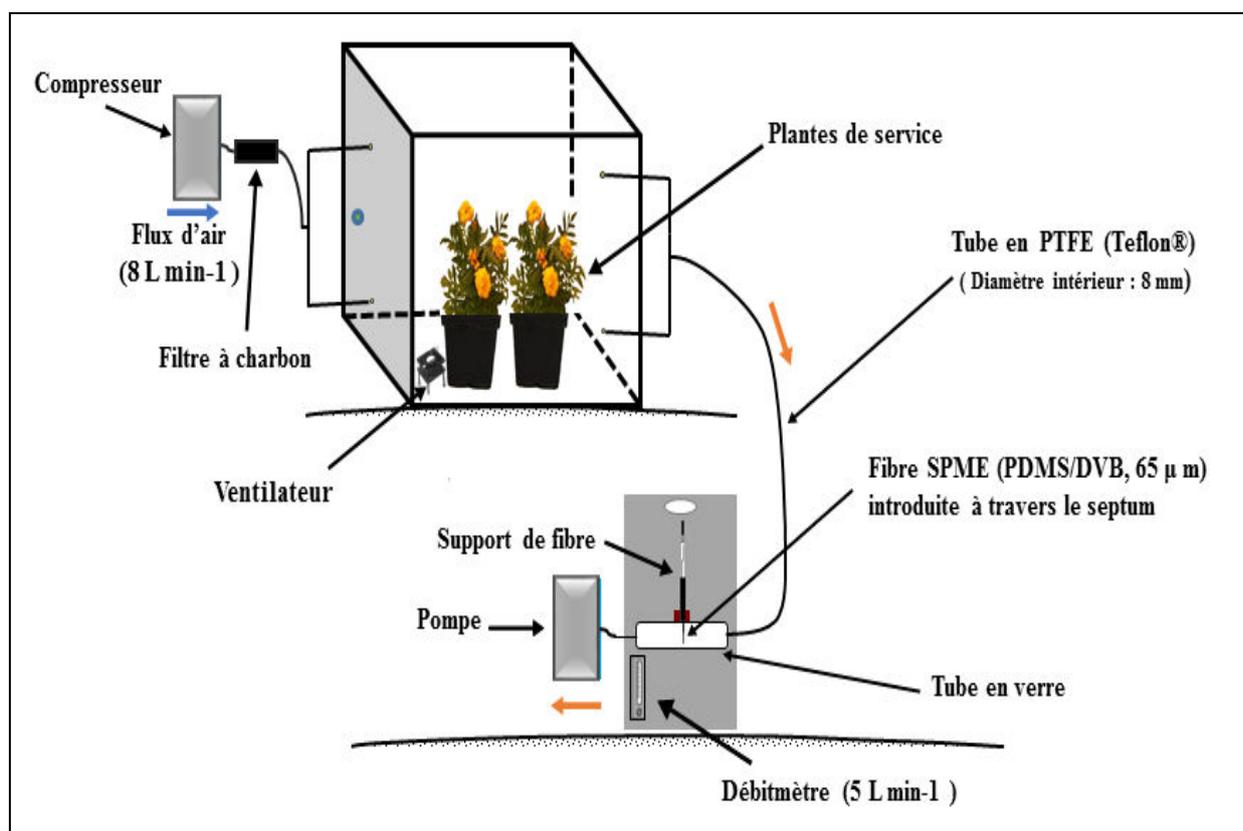


Figure 4.4 : Dispositif de prélèvement dynamique des composés organiques volatils émis par des plantes de service entières par SPME.

Au moment du prélèvement, un débit d'air régulé de 5 L min⁻¹ a été aspiré de la cage par une pompe et diffusé dans un tube en verre. Ensuite, une fibre SPME (PDMS-DVB, 65 µm) a été introduite dans ce tube à travers un septum positionné sur sa paroi. Après très exactement 30 min d'exposition, les fibres SPME ont été retirées ainsi que les plantes. Le premier prélèvement a été réalisé à 11 h, puis l'opération a été répétée à 2 reprises sur 2 autres lots de plantes, soit 3 échantillons par PdS. Avant chaque introduction de plantes, la cage a été nettoyée avec de l'éthanol (70%) puis de l'eau distillée, séchée et largement ventilée.

Les échantillons de COV ont été rapidement analysés par GC-MS (Trace-ISQ, single quadropole (Thermo Scientific, Austin, TX, USA) équipée d'une colonne apolaire TR-5MS (20 m, 0,1 mm ID, 0,1 µm film thickness). Le gaz vecteur est l'hélium à 0,4 ml.min⁻¹. Pendant 2 minutes, une désorption de la fibre est faite dans l'injecteur « splitless » à 250°C. La température initiale du four est à 40°C pendant 2 minutes après la désorption puis 20°C/minute jusqu'à 100°C, ensuite 5°C/minute jusqu'à 160°C et enfin 30°C/min jusqu'à 300°C. Les spectres de masse sont obtenus en mode d'impact électronique (énergie d'ionisation : 70eV) dans la gamme m/z 35-450.

Les composés sont identifiés par le logiciel Thermo Xcalibur en comparant leurs spectres de masse avec les spectres de la bibliothèque NIST 2011 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). Les temps de rétention de la majorité des composés à identifier sont vérifiés par des standards commerciaux purs (Sigma Aldrich®).

2.5. Etude du comportement alimentaire de *Myzus persicae* en électropénétrographie (EPG)

Pour savoir si la présence de COV libérés par les PdS modifie le comportement alimentaire du puceron, nous avons mis en œuvre la technique d'EPG (Tjallingii, 1978; Tjallingii, 1988). Cette technique permet d'évaluer *in situ* le comportement alimentaire des insectes "piqueurs-suceurs" (la grande majorité des Hémiptères), généralement phloémophages, tels que les pucerons. Elle consiste à intégrer un puceron et une plante dans un circuit électrique (figure). Une première électrode en cuivre implantée dans le substrat de chaque plante testée est reliée à un générateur de courant. Une seconde électrode, connectée à un puceron par un fil d'or fixé sur son dos à l'aide d'une colle d'argent conductrice, est branchée à un amplificateur connecté à un ordinateur. La pénétration de stylets dans les tissus végétaux génère des signaux électriques qui sont amplifiés et affichés sous formes d'ondes sur un graphe électrique « *electrical penetration graphe* » (cf. graphique de la figure 4.5). Ces ondes enregistrées varient selon la position des stylets au sein des tissus végétaux et selon les différentes activités alimentaires. Cinq différentes formes d'ondes caractéristiques sont analysées dans cette études : (1) les ondes C : phase de recherche des cellules phloémiennes et transit des stylets entre les tissus épidermiques, parenchymateux et mésophylliens, (2) les ondes E1 : la salivation dans un tube criblé, (3) les ondes E2 : l'ingestion

passive de sève élaborée (phloème) dont celles soutenues plus de 10 minutes ont été nommées ondes sE2, (4) les ondes G : ingestion active de sève brute (xylème) et (5) les ondes F : déraillement des stylets dans les tissus de la plante provoqué par un stress mécanique (Tjallingii, 1988). Une phase de non-pénétration des stylets (np) (stylets en dehors du végétal) est marquée par l'absence de signal (Tjallingii, 1988). L'interprétation des différentes phases permet d'analyser le comportement d'alimentation.

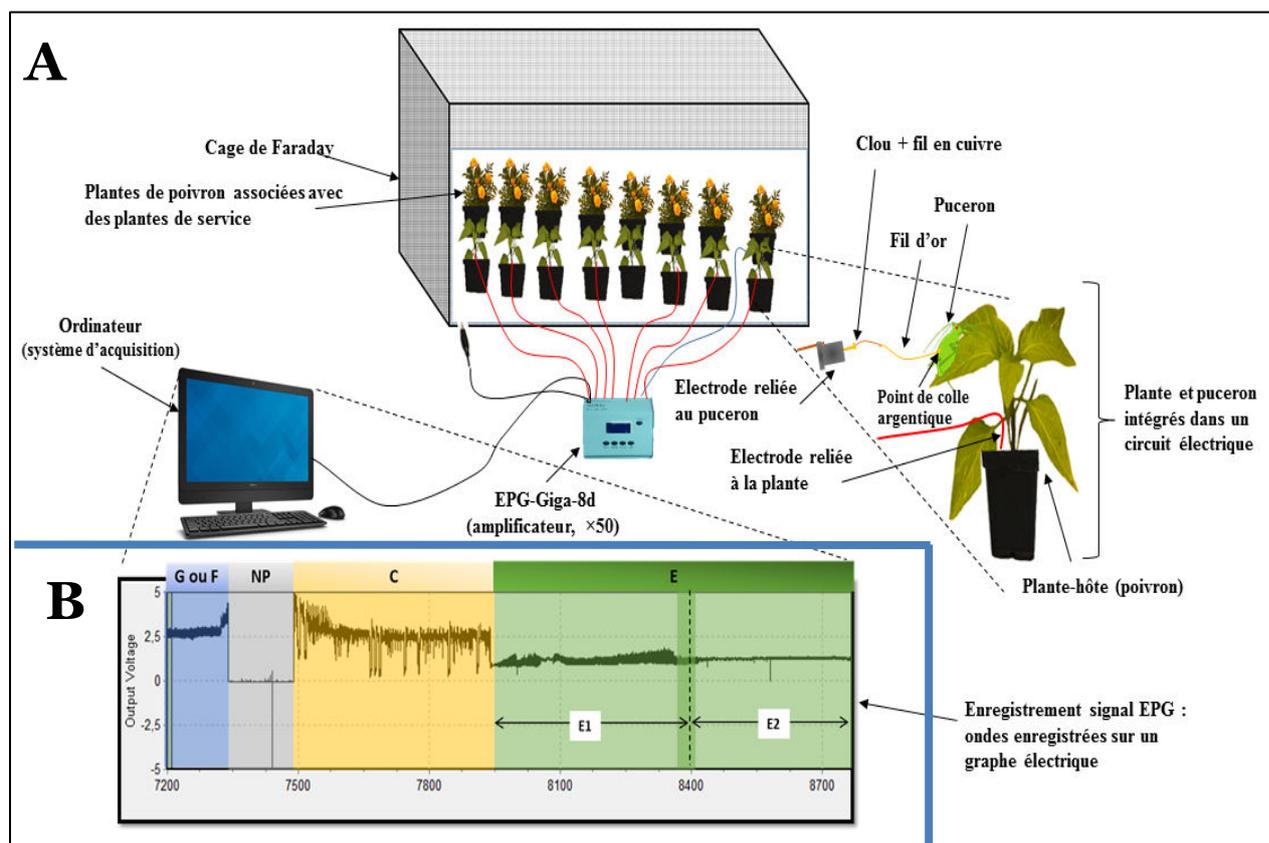


Figure 4.5 : Dispositif d'électropénétrographie (A). Les ondes enregistrées (B) sont : F ; stress mécaniques (déraillement des stylets) ; G ; stress trophiques (ingestion de sève) ; NP ; non pénétration des stylets ; C ; recherche (trajets extracellulaires) ; E ; alimentation phloémienne (E1 : salivation ; E2 : ingestion).

Le dispositif d'EPG utilisé pour cette étude est constitué de huit canaux (EPG-Giga-8d, Université de Wageningen, Pays-Bas) permettant d'enregistrer simultanément les activités alimentaires de huit pucerons sur huit plantes.

Le matin de l'expérimentation, les plantes de poivron et les PdS ont été placées selon la modalité à tester dans une salle climatisée ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, équipée d'un extracteur) à l'intérieur d'une cage Faraday. Cette dernière permet d'atténuer les interférences électromagnétiques. Puis, une électrode en cuivre, reliée à un générateur de courant continu, est implantée dans le substrat de chaque plante.

Minimum 4 heure après le placement de plantes dans la salle, des femelles affamées pendant une heure dans des boîtes de Pétri sur un papier filtre humide, ont été précautionneusement câblées par un fil d'or (diamètre = 20 μm , longueur = 2 cm) collé sur leurs dos (sur les tergites abdominaux) par une colle d'argent conductrice (EPG Systems, Wageningen, Pays-Bas). Les pucerons stressés (présence de phéromone d'alarmes à l'extrémité de leurs cornicules) et ceux ayant de la colle sur leurs antennes, leurs pattes ou leurs cornicules ont été supprimés. Huit pucerons correctement équipés ont été ensuite connectés à une seconde électrode insérée dans la sonde EPG. Dès que l'acquisition du signal à la fréquence 100 Hz a été déclenchée à l'aide du logiciel (Styler+ daq v01.27) (EPG Systems, www.epgsystems.eu), les pucerons ont été posés délicatement sur une feuille de la plante-hôte. Les enregistrements en continu de l'activité alimentaire ont été réalisés pendant 8 heures.

Une fois les enregistrements effectués, les EPG ont été analysés à l'aide du logiciel EPG Styler+ ana (v01.27) (EPG Systems, www.epgsystems.eu) et les différentes formes d'ondes caractéristiques ont été déterminées. En utilisant les analyses de formes d'ondes enregistrées, différents paramètres EPG ont été calculés à l'aide de logiciel EPG-Calc 6.1.6 (Giordanengo, 2014). Seulement, dix-huit paramètres ont été choisis pour cette étude (cf. tableau 4.3).

A l'aide de ce dispositif, nous avons suivi le comportement alimentaire de *M. persicae* en présence de *O. basilicum* au stade végétatif et *T. patula* cv. Nana au stade floraison. Un témoin a été réalisé en absence de PdS. Pour chacune des trois modalités testées, cinq à six répétitions ont été réalisées jusqu'à l'obtention de 35 enregistrements exploitables /par modalité. Une seule répétition d'une modalité a été testée par jour. Les dates d'expérimentation pour chaque modalité ont été alternées et randomisées pour limiter l'impact de toute source de variabilité (lot de plantes, puceron...). Pour éviter la contamination, la salle a été aérée et inutilisée un minimum de 3 jours à chaque changement de la modalité à tester.

2.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 3.1.0). Les conditions de normalité et d'homogénéité de variance n'étant pas respectées, le test U non paramétrique de Mann-Whitney ($\alpha = 0.05$) a été utilisé pour comparer le taux de fécondité journalier pour chaque traitement avec celui du témoin respectif (feuille de poivron seule). Le même test statistique a été utilisé pour comparer les données d'EPG de deux modalités (PdS vs témoin).

3. Résultats

3.1. Effet de composés organiques volatils sur la fécondité journalière de *Myzus persicae*

Les courbes témoin présentées dans la figure 2.1 montrent l'évolution de la fécondité des femelles de puceron vert du pêcher entre 8 et 12 jours d'âge. A J1, premier jour de ponte, ce taux est compris entre 1 à 3 larves pondues par jour selon les expérimentations. Il augmente rapidement le jour suivant et atteint une valeur qui se stabilise entre J2 et J3, et se maintient à J4 et J5 à une valeur comprise entre 6 et 8 larves pondues par jour et par femelle en conditions témoin. On retrouve ce même profil pour tous les témoins testés, ce qui valide le protocole utilisé pour tester l'effet des PdS sur la fécondité. On peut noter à certaines dates des taux initiaux de fécondité plus élevés qui reflètent sans doute des variations liées à la saison et à la composition des feuilles de poivrons utilisées pour nourrir les larves bien que l'élevage se fasse toujours dans les mêmes conditions de température. Par ailleurs, quelle que soit la plante de service testée il n'y a eu aucune différence significative du taux de fécondité à J1 entre témoin et PdS testées.

Lorsque les femelles sont placées à proximité de feuilles de Tagetes (Figure. 4.6 A et C), de *L. latifolia* (Figure. 4.6G), de *M. piperita* (Figure. 4.6 J) ou de *R. officinalis* (Figure 4.6I), le taux de fécondité de *M. persicae* n'est pas affecté. Par contre en présence de feuilles d'*O. basilicum* (Figure. 4.6E), le taux de fécondité diminue dès J2 et est significativement plus faible dès J3 ($P=0.001$ à J3, $P=0.03$ à J4, $P=0.009$ à J5). Le taux de fécondité diminue également en présence de fleur de *T. patula* cv. Nana ($P=0.01$, $P=0.0003$, $P<0.0001$, $P=0.0003$, entre J2 et J5 respectivement, Figure. 4.6B) et dans une moindre mesure en présence de fleur de *L. latifoliae* avec un effet significatif uniquement à J4 ($P=0.01$, Figure. 4.6H). Durant les cinq jours de suivi nous avons enregistré une baisse de 19.3 % du nombre de larves pondues en présence de feuilles d'*O. basilicum* et 23.6% en présence de fleurs de *T. patula* cv. Nana. On voit donc que tous les organes de la plante de service n'ont pas le même effet. Il est également intéressant de noter qu'aucun effet significatif n'a été observé ($P > 0.05$) en présence de fleur ou de feuilles d'une autre variété de *T. patula* (Bonita Boléro, Figure, 4.6 CD). L'hypothèse sous-jacente est que certains organes des plantes de service émettent des COV qui perturbent le comportement du puceron. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré les COV émis par les plantes de service efficaces à deux stades phénologiques (stade végétatif et stade en fleur) et en complément nous avons mesuré les COV présents dans les boîtes de Pétri lors des tests de fécondité.

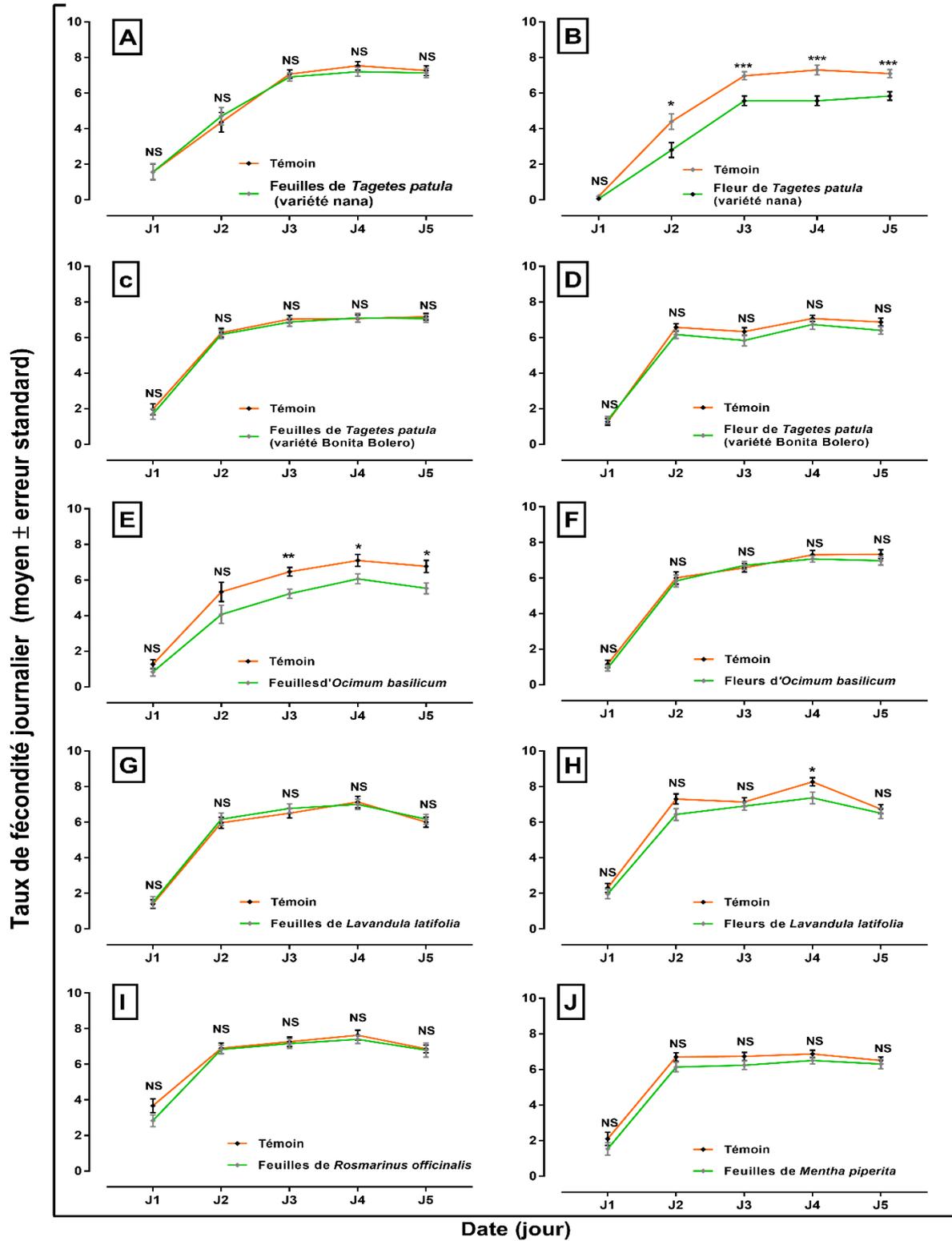


Figure 4.6 : Fécondité journalière de femelles de *Myzus persicae* d'âge compris entre 8 et 12 jours et placées sur une feuille de poivron à proximité ou non de feuilles (A, C, E, G, I, J) ou de fleurs (B, D, F, H) de plantes de service (moyenne ± erreur-standard). Le degré de significativité (P-value) selon le test U de Mann-Whitney (= 0.05) est : NS, différence non significative, $P > 0.05$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

3.2. Caractérisation de composés organiques volatils

Les prélèvements ont été réalisés pour la majorité des modalités, cependant, nous ne présentons dans ce manuscrit que les profils des modalités qui ont un effet négatif sur la fécondité du *M. persicae*.

Dans les deux conditions où une baisse de fécondité avait été observée (feuille d'*O. basilicum* et fleur de *T. patula*), des analyses qualitatives de profils de COV émis ont été réalisées de façon journalière dans les boîtes de Pétri et comparées aux profils émis par les plantes entières. Ces analyses, ont permis d'identifier 30 COV chez *T. patula* cv. Nana (stade floraison) et 25 chez *O. basilicum* (stade végétatif, Tableaux 4.1 et 4.2).

Les prélèvements réalisés dans les boîtes de Pétri en présence d'une fleur de tagete n'ont permis d'isoler que 11 composés sur les trente identifiés sur plante entière, dont deux ne se distinguent plus du bruit de fond après J1. Les 9 composés identifiables sur fleur de *T. patula* sont le (*E*)- β -ocimène, le limonène, le neo-allo-ocimène, l'*o*-cymène, le sabinène, l' α -guaïène, le β -myrcène, le β -ocimène et le β -ylangène.

Juste après son prélèvement, le profil de volatils libérés par la feuille d'*O. basilicum* a quasiment la même composition que celui d'une plante entière en stade végétatif (seulement deux COV sont absents à J0). Au cours du temps le nombre de composés détectés dans la boîte diminue pour n'atteindre plus que 8 COV identifiables à J5 (*i.e.* l'eucalyptol, le bornyle acétate, le copaène, le géranyle acétone, le méthyleugénol, l' α -bergamotène, γ -muurolène et δ -cadinène).

3.3. Effet des composés organiques volatils de plantes de service sur le comportement alimentaire du *M. persicae*

L'hypothèse que nous souhaitions tester dans ce chapitre était que des composés volatils émis par des plantes de service pouvaient altérer le comportement alimentaire du puceron et diminuer sa fécondité. Après avoir identifié des plantes de service efficaces pour diminuer la fécondité du puceron, nous les avons placées à proximité de plantes de poivron sur lesquelles un puceron était équipé d'un système d'électropénétrographie afin de suivre le comportement alimentaire du puceron pendant 8 heures. Le tableau 4.3 montrent les conséquences de la présence des COV émis par ces plantes de service sur différents paramètres descriptifs du comportement alimentaire du puceron. *M. persicae*. La plupart des paramètres mesurés (15 sur 18) sont significativement impactés par la présence des COV des plantes de service.

En présence de PdS, les pucerons ont inséré leur stylet pour la 1^{ère} fois dans les tissus végétaux plus rapidement (après 1.6 et 1.4 min en présence d'*O. basilicum* et de tagete) par rapport au témoin (après 2.8 min, paramètre 3). Pendant les 8 h d'enregistrement (480 min), le nombre d'insertion de stylets (Pr, paramètre 1) est plus important et est multiplié par deux en présence de PdS (20.3 et 22.3 en présence d'*O. basilicum* et de *T. patula*) par rapport au témoin (9.6). Aussi, la durée totale pendant laquelle les stylets sont restés hors des tissus végétaux

(paramètre 2) est significativement plus longue et double en présence de plantes de service (≈ 60 min) par rapport au control (≈ 30 min). En présence de PdS, les pucerons passent plus de temps en phase de recherche, du fait d'une augmentation du nombre de phases de recherche (C, paramètre 4, de +103 % avec *O. basilicum* et +118% avec *T. patula*) et de la durée des phases de recherche (paramètre 5, de +62 % avec *O. basilicum* et +69% avec *T. patula*).

Les phases de salivation (E1) sont aussi affectées par la présence de PdS : leur nombre augmente (paramètre 6, de +125% avec *O. basilicum* et de +92% avec tagete) ainsi que leur durée (paramètre 7, de +375% avec *O. basilicum* et de +83% avec tagete). En conséquence, la durée totale de salivation (paramètre 8) augmente significativement avec l'*O. basilicum* (+176%) mais pas significativement avec *T. patula* (+40%).

Le nombre de phases d'ingestion de sève élaborée (E2, paramètre 10) n'est pas modifié par la présence de plante de service mais le nombre d'insertions de stylets (paramètre 11, +92 et 83% avec *O. basilicum* et *T. patula*) et le temps écoulé avant la 1^{ère} phase d'ingestion de sève élaborée soutenue (>10 min, paramètre 16 +50 et 91% avec *O. basilicum* et *T. patula*) sont augmentés en présence des volatils des PdS. Par contre, les durées totales d'ingestion (paramètre 13) ou d'ingestion longue (> 10 min, paramètre 14) de sève élaborées étaient significativement plus courtes en présence de PdS (environ 46% avec *O. basilicum* et -36% avec tagete).

Ces expérimentations montrent également des différences selon les PdS testées. Le temps écoulé avant la première ingestion de sève élaborée (paramètre 15) augmente en présence des COV de *T. patula* (+48%) et d'*O. basilicum* (+100%), mais l'augmentation n'est significative qu'avec l'*O. basilicum*. Le comportement de test des pucerons avant ingestion soutenue de sève élaborée (nombre d'insertions de stylet avant la première E2 soutenue, V12) est également différent selon les PdS associées : il augmente en présence d'*O. basilicum* (50%) et de *T. patula* (91%) mais n'est significatif qu'en présence de *T. patula*. Enfin, les COV émis par les PdS n'ont pas eu d'effet sur le temps écoulé avant la 1^{ère} phase de salivation (E1, paramètre 9), le nombre des phases d'ingestion passive de phloème (E2, paramètre 10) ni la durée des phases de déraillement des stylets dans tissus de la plante (F, paramètre 17).

Comparé au témoin, les pucerons présentent une activité plus longue en phase G : phase d'ingestion de sève xylémienne avec une durée (paramètre 18) qui augmente de façon modérée en présence de *T. patula* (+50%) et de façon beaucoup plus importante en présence d'*O. basilicum* (+387%).

Tableau 4.1: Composition des mélanges de COV libérés par *Tagetes patula* variété Nana

N°	COV	RT	RI	Plantes de <i>Tagetes patula</i> variété Nana en stade floraison	Fleur de <i>Tagetes patula</i> , variété Nana					
					Jour -3	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
1	Sabinene	5.01	968	X	X	X	X	X	X	X
2	β -Myrcene	5.2	984	X	X	X	X	X	X	X
3	(Z)-3-hexenyl acetate	5.43	100	X	-	-	-	-	-	-
4	o-Cymene	5.64	1017	X	X	X	X	X	X	X
5	Limonene	5.69	1022	X	X	X	X	X	X	X
6	(E)- β -Ocimene	5.78	1028	X	X	X	X	X	X	X
7	β -Ocimene	5.95	1042	X	X	X	X	X	X	X
8	Terpinolene	6.49	1083	X	X	-	-	X	-	-
9	Linalol	6.62	1094	X	-	-	-	-	-	-
10	Neo-allo-ocimene	7.06	1122	X	X	X	X	X	X	X
11	(Z)-Tagetone	7.31	1138	X	-	-	-	-	-	-
12	p-Cymen-8-ol	7.97	1182	X	-	-	-	-	-	-
14	α -Terpineol	8.08	1188	X	-	-	-	-	-	-
15	Verbenone	8.41	1207	X	-	-	-	-	-	-
16	Piperitone	9.23	1251	X	-	-	-	-	-	-
17	(+)-p-Mentha-1.8-dien-3-	9.54	1268	X	-	-	-	-	-	-
18	γ -Elemene	10.8	1333	X	-	-	-	-	-	-
19	Eucarvone	10.91	1338	X	-	-	-	-	-	-
20	β -elemene	11.94	1387	X	-	-	-	-	-	-
21	α -Guaiene	12.16	1398	X	X	X	X	X	X	X
22	β -Caryophyllene	12.55	1417	X	X	X	-	-	-	-
23	β -ylangene	12.75	1426	X	X	X	X	X	X	X
24	Geranyl acetone	13.14	1445	X	-	-	-	-	-	-
25	Humulene	13.25	1450	X	-	-	-	-	-	-
26	β -Cuvebene	13.47	1459	X	-	-	-	-	-	-
27	Germacrene D	13.87	1478	X	-	-	-	-	-	-
28	α -Farnesene	14.35	1500	X	-	-	-	-	-	-
29	β -Bisabolene	14.4	1503	X	-	-	-	-	-	-
30	γ -Muurolene	14.54	1509	X	-	-	-	-	-	-
31	δ -Cadinene	14.72	1517	X	-	-	-	-	-	-
Total				30	11	10	9	10	9	9

Tableau 4.2 : Composition des mélanges de COV libérés par *Ocimum basilicum*

N°	COV	TR	RI	Plantes d' <i>Ocimum basilicum</i> en stade végétative	Feuilles d' <i>Ocimum basilicum</i>					
					Jour -3	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
1	α -Pinène	4.51	929	X	X	-	-	-	-	-
2	Sabinène	5.01	968	X	X	-	-	-	-	-
3	β -pinène	5.05	971	X	X	X	X	-	-	-
4	β -Myrcène	5.2	984	X	X	-	-	-	-	-
5	Eucalyptol	5.73	1025	X	X	X	X	X	X	X
6	Terpinolène	6.49	1083	X	X	X	-	-	-	-
7	Linalol	6.62	1094	X	X	X	X	X	-	-
8	Camphre	7.34	1141	X	X	X	X	X	-	-
9	α -Terpinéol	8.08	1188	X	X	X	X	-	-	-
10	Bornyle acétate	9.78	1281	X	X	X	X	X	X	X
11	Eugénol	11.24	1353	X	X	X	X	X	-	-
12	Copaène	11.62	1372	X	X	X	X	X	X	X
13	β -elemène	11.94	1387	X	X	X	X	X	X	-
14	Méthyleugénol	12.23	1402	X	X	X	X	X	X	X
15	Aromandendrène	12.55	1417	X	-	-	-	-	-	-
16	α -Bergamotène	12.85	1431	X	X	X	X	X	X	X
17	Geranyle acétone	13.14	1445	X	X	X	X	X	X	X
18	(E)- β -Farnesène	13.25	1449	X	X	X	-	-	-	-
19	Germacrène D	13.87	1478	X	X	X	-	-	-	-
20	(Z)- β -Farnesène	13.9	1480	X	-	-	-	-	-	-
21	Isométhyleugenol	14.12	1489	X	X	-	-	-	-	-
22	α -Bulnesene	14.37	1501	X	X	-	-	-	-	-
23	γ -Muuroène	14.54	1509	X	X	X	X	X	X	X
24	δ -Cadinène	14.72	1517	X	X	X	X	X	X	X
25	α -epi-Cadinol	17.24	1638	X	X	X	-	-	-	-
Total				25	23	18	14	12	9	8

Tableau 4.3 : Paramètres caractérisant le comportement alimentaire de *Myzus persicae* placé sur des plantes de poivron en présence ou non (témoin) de plantes de service *O. basilicum* et *T. patula*. Les paramètres (moyennes ± erreur type) sont calculés à l'aide du logiciel « EPG-Calc » sur 8h d'enregistrement en électropénétrographie réalisés sur 35 pucerons par modalité.

EPG paramètres	Poivron (control)	Plantes de poivron associées à des plantes d' <i>Ocimum basilicum</i>		Plantes de poivron associées à des plantes de <i>Tagetes patula</i> , variété Nana	
	n=35	n=35	U-test (P-value)	n=35	U-test (P-value)
Phase de pénétration des stylets (Pr)					
1. Nombre de Pr	9.6 ± 1.2	20.3 ± 2.4	305.5 (***)	22.3 ± 2.1	195 (***)
2. Durée totale des Pr (min)	452.2 ± 3.9	424.2 ± 9	838 (**)	420.2 ± 9	865 (**)
3. Temps écoulé avant le 1 ^{er} Pr (min)	2.8 ± 0.6	1.6 ± 0.3	800 (*)	1.4 ± 0.1	802 (*)
Phase de recherche (C) (trajets extracellulaires)					
4. Nombre de C	12.1 ± 1.4	24.6 ± 2.5	295 (***)	26.4 ± 2.2	205 (***)
5. Durée totale des C (min)	105.8 ± 11	171.5 ± 15.5	356 (**)	178.3 ± 13.4	300 (***)
Phase de salivation (E1)					
6. Nombre de E1 non suivi de E2 (sgE1)	1.2 ± 0.3	2.7 ± 0.4	383.5 (**)	2.3 ± 0.4	428 (*)
7. Durée totale des sgE1 (min)	5.3 ± 1.4	25.2 ± 8.1	376 (**)	9.7 ± 1.9	439 (*)
8. Durée totale des E1 (min)	13.8 ± 1.9	38.1 ± 9.4	418 (*)	19.3 ± 2.8	503 (NS)
9. Temps écoulé avant le 1 ^{er} E1 (min)	71.2 ± 8.9	123.5 ± 18.9	449 (NS)	100.3 ± 16	506 (NS)
Phase d'ingestion de sève élaborée (E2)					
10. Nombre de E2	2.9 ± 0.3	2.6 ± 0.3	678 (NS)	2.9 ± 0.3	592.5 (NS)
11. Nombre de Pr avant le 1 ^{er} E2	5.3 ± 1	10.2 ± 1.8	423.5 (*)	9.7 ± 1.2	350 (**)
12. Nombre de probes avant le 1 ^{er} sE2	5.8 ± 1	8.7 ± 1.7	552 (NS)	11.1 ± 1.2	318 (***)
13. Durée totale des E2 (min)	307 ± 16.4	165 ± 21.6	982 (***)	195.4 ± 20.8	934 (***)
14. Durée totale des E2 soutenu > 10min (sE2) (min)	303.9 ± 16.8	160.5 ± 21.7	980 (***)	191.2 ± 21	931 (***)
15. Temps écoulé avant le 1 ^{er} E2 depuis le 1 ^{er} Pr (min)	94.7 ± 10.9	189.8 ± 24	362 (**)	140.5 ± 19.1	467 (NS)
16. Temps écoulé avant le 1 ^{er} sE2 depuis le 1 ^{er} Pr (min)	107.8 ± 13.3	241.6 ± 26.7	300 (***)	170 ± 20.9	417 (*)
Autres paramètres					
17. Durée totale des phases de déraillement des stylets (F) (min)	20.5 ± 6.6	30.7 ± 7.1	471 (NS)	20.3 ± 6.6	625 (NS)
18. Durée totale des phases d'ingestion de sève xylémienne (G) (hydratation) (min)	5.2 ± 2.9	25.3 ± 8	371.5 (***)	7.8 ± 2.6	469 (*)

Le degré de significativité (*P-value*) selon le test U de Mann-Whitney (= 0.05) est : NS, différence non significative, $P > 0.05$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

4. Discussion

La présente étude avait pour objectif de mieux comprendre les interactions entre plantes de service et puceron et de tester l'hypothèse que les COV émis par les plantes de service pouvaient affecter le comportement alimentaire du puceron vert du pêcher et en conséquence affecter sa fécondité. Pour mener à bien ce travail, nous avons mis au point et validé un test qui s'avère répétable et efficace pour suivre l'effet des COV émis par un organe de plante sur la fécondité du puceron. Dans un premier temps nous avons testé 5 plantes de service qui avaient montré un effet sur la dynamique de développement du puceron vert (Ben Issa *et al.*, 2016). La présente étude nous a permis de confirmer que les COV de deux des plantes aromatiques testées, *O. basilicum* et *T. patula* réduisaient la fécondité de *M. persicae*. L'effet négatif des COV émis par ces plantes sur la fécondité de *M. persicae* observé avec ce test *in vitro* est en accord avec les résultats des études précédentes utilisant des plantes entières comme sources de volatils (Ben Issa *et al.*, 2016; Ben Issa *et al.*, 2017a). Il est également cohérent avec leur effet inhibiteur sur la reproduction d'autres pucerons (Tomova *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2013; Traka *et al.*, 2018) et d'autres ravageurs appartenant à divers ordres d'insectes (*e.g.* Lipidoptera et Coleoptera) (Kéita *et al.*, 2000; Tomova *et al.*, 2005; Basedow *et al.*, 2006; Digilio *et al.*, 2008; Yarou *et al.*, 2017).

Dans cette expérimentation, la fécondité de *M. persicae* n'a pas été réduite en présence des COV de *L. latifolia*, *R. officinalis* et *M. piperita* ce qui contraste avec des études antérieures sur plantes entières (Ben Issa *et al.*, 2016; Ben Issa *et al.*, 2017a). L'analyse comparative des profils de COV recueillis, lorsqu'elle est possible, montrent des différences sensibles entre ces 2 études qui peuvent trouver leur explication dans plusieurs variables génétiques, biotiques et abiotiques qui peuvent moduler la production et l'émission des COV (Pichersky and Gershenzon, 2002). Ainsi, l'importance du génotype a été mise en évidence dans la présente étude, avec les résultats sur *T. patula* et souligne qu'il existe des chémotypes différents de *T. patula* n'ayant pas le même effet sur la fécondité du puceron. Cette conclusion rejoint celles énoncées par (Storer and Emden, 1995; Wang *et al.*, 2009; Rajabaskar *et al.*, 2013), pour d'autres PdS et d'autres patho-systèmes.

Nous avons également constaté que les organes aériens d'une plante, en l'occurrence la feuille et la fleur, étaient capables d'émettre des COV, que ceux-ci pouvaient constituer des mélanges olfactifs différents, et ne pas avoir le même effet sur les performances de *M. Persicae*. Ces observations qui s'accordent à celles de (Pichersky and Gershenzon, 2002; Jiang *et al.*, 2016b), montrent surtout l'importance de considérer le stade phénologique pour apprécier le potentiel d'une PdS et envisager son introduction dans un système de culture. Au vu de nos résultats, nous préconiserions l'usage d'*O. basilicum* au stade végétatif et de *T. patula* au stade floral.

Les résultats de nos tests n'ont pas toujours été conformes à nos attentes si l'on considère par exemple l'absence d'effet du *R. officinalis* alors que (Ben Issa *et al.*, 2016) en faisait la PdS la plus efficace pour diminuer la fécondité de *M. Persicae*, devant l'*O. basilicum*, *L. latifoliae* et *T. patula*. On ne peut pas exclure le fait que le détachement d'organes de la plante ait provoqué des changements importants dans la composition et la quantité de COV émis par ceux-ci. En plus du stress subit, certains COV disparaissent progressivement du mélange des COV suite à la diminution de leur biosynthèse (Jiang *et al.*, 2016b). Nous avons également pu constater le résultat de telles manipulations à travers l'analyse des mélanges olfactifs recueillis, souvent très différents de ceux obtenus avec une plante entière au même stade phénologique. Ces modifications peuvent expliquer la perte de propriétés du *R. officinalis*, ce qui peut d'ailleurs nous fournir des informations utiles pour identifier des molécules actives qui auraient disparues et comprendre le mode d'action de cette plante sur la fécondité de *M. persicae*. Pour l'heure nous sommes intéressés aux profils olfactifs produits par la fleur de *T. patula* et la feuille d'*O. basilicum* et avons pu constater la présence de plusieurs composés capables d'affecter la reproduction de divers insectes (Yarou *et al.*, 2017; Koorki *et al.*, 2018), dont les pucerons (Gutierrez *et al.*, 1997; Tomova *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2018). Parmi ces COV majoritairement reconnus pour leurs activités insecticides (Regnault-Roger, 2013), on trouve l'allo-ocimène, le p-cymène, le bisabolène, le β -caryophyllène, l'eucalyptol (1,8-cinéole), l'eugénol, la limonène, l' α -terpinéol, le linalol, le β -ocimène et l' α -pinène.

La baisse de la fécondité du puceron par les COV, serait principalement liée à une perturbation de son comportement alimentaire (Ameline *et al.*, 2010). Nos résultats obtenus à l'aide de la technique EPG tendent à vérifier cette hypothèse, dans la mesure où le comportement alimentaire sur poivron de *M. persicae* est nettement perturbé par la présence de *O. basilicum* (stade végétatif) et *T. patula* cv. Nana (stade floraison). Comme récemment (Kang *et al.*, 2018), nous constatons que des signaux olfactifs peuvent modifier le comportement alimentaire du puceron. Celui-ci, quoique complexe, est bien connu et la technique d'EPG nous permet de décrypter ses différentes étapes et d'apprécier les modifications occasionnées par la proximité des PdS. Ces modifications sont conséquentes puisque qu'elles concernent 15 paramètres sur 18.

D'autres auteurs ont révélé aussi que les COV agissent sur le comportement alimentaire du puceron, mais les effets sont observés sur une courte durée (Storer *et al.*, 1996; Schwarzkopf *et al.*, 2013). Cette durée correspond à la phase d'exploration de la surface de la plante durant laquelle le puceron bouge ses deux antennes pour détecter les molécules volatiles et décide d'accepter ou de refuser la plante (antixénose). *A contrario*, (Olivares-Donoso and Niemeyer, 2005) ont montré en EPG que la prise alimentaire de morphes ailés de *Rhopalosiphum padi* L. (Hemiptera: Aphididae) sur leur plante hôte *Triticum aestivum* L. n'était pas affectée par la

présence des COV des plantes non-hôtes (*Medicago sativa* L.). Il est possible que les volatils de *M. sativa* n'aient pas d'effets directs ou indirects sur *R. padi*, alors que les COV des PdS que nous avons testés ont des actions négatives sur *M. persicae*, particulièrement sur son comportement olfactif (répulsion) (cf. chapitre 2).

Le premier constat majeur est que durant les 8 heures d'enregistrement, en présence des PdS, le puceron a consacré globalement moins de temps à la recherche et au prélèvement de nourriture, ses stylets restant plus longtemps hors tissus végétaux par rapport au témoin. Ceci est en accord avec les travaux de [Dancewicz et al. \(2016\)](#). On peut donc envisager un effet direct des COV sur le puceron qui le freinent dans son activité d'alimentation. Ainsi [Mondédji et al. \(2014\)](#), considèrent que la perception de COV répulsifs par les antennes du puceron peut avoir des impacts négatifs sur différentes phases de sa prise alimentaire, et particulièrement, entraîner une diminution de la durée de pénétration des stylets dans les tissus de sa plante hôte. Plus que la recherche de nourriture, c'est le temps consacré à l'ingestion de nutriments qui a été considérablement réduit.

Il faut d'abord noter qu'après le premier contact avec le poivron, le puceron pique plus rapidement l'épiderme en présence des COV de PdS. Ce constat paraît contraire à ceux de la littérature. En effet, selon [Powell et al., 1999](#)) et [\(Alvarez et al., 2006\)](#), la présence des COV répulsifs n'empêche pas le puceron de piquer dans l'épiderme pour tester la qualité de la plante, par contre elle peut augmenter le temps qu'il met avant la 1^{ère} insertion de son stylet dans les tissus végétaux. Il paraît également en désaccord avec [\(Schwarzkopf et al., 2013\)](#) qui observent que plus les conditions sont favorables pour le puceron plus le temps écoulé avant la 1^{ère} insertion des stylets est court. Considérant que la présence de COV répulsifs ne constitue pas un environnement olfactif optimal pour les performances du puceron, nous avançons une hypothèse différente à savoir que la détection de ces COV incommode le puceron et l'incite à évaluer plus rapidement la qualité de sa plante hôte. En outre, l'évolution à la hausse d'autres variables comme le nombre d'insertion des stylets, la durée des phases de recherche et de salivation, voire le nombre de piqûres dans le xylème, laissent penser que le puceron est perturbé et rencontre des difficultés pour trouver sa nourriture. Ces résultats s'accordent avec plusieurs études antérieures. On observe que la prise alimentaire de *M. persicae* est fréquemment interrompue [\(Dancewicz et al., 2016\)](#), qu'il est gêné avant d'atteindre le phloème [\(Ameline et al., 2009\)](#) et que le nombre et la durée des phases de salivation sont significativement plus importantes en présence de PdS [\(Hu et al., 2018\)](#). Si l'évolution de ces variables apparaît comme le symptôme d'une perturbation du comportement alimentaire [\(Sauge et al., 2002\)](#), il n'est pas évident d'établir un lien avec une baisse de la fécondité du puceron. Celle-ci peut s'expliquer plus aisément par la diminution de la durée des phases d'ingestion (E2) de nutriments provenant de la sève phloémienne, selon le

principe qui veut que la physiologie d'un être vivant soit tributaire des apports nutritionnels. En prélevant moins de sucres et d'acides aminés, le puceron disposerait de moins de matière première pour la parthénogénèse. Ce n'est pas le nombre de prélèvements mais bien leur durée qui est responsable de cette baisse de l'alimentation du puceron. Selon [Kang et al. \(2018\)](#), une molécule répulsive, le β -ocimène, serait responsable de cette diminution de la phase d'ingestion. Nous retrouvons cette molécule dans le mélange olfactif de *T. patula* en fleur mais pas dans celui d'*O. basilicum*. Si ce mode d'action se confirme, nous pouvons donc supposer que plusieurs COV possèdent cette propriété. Il ne faut pas exclure la possibilité de modes d'action différents de ces plantes sur la fécondité du puceron, à l'image de leur effet répulsif. Nous avons en effet montré que l'*O. basilicum* avait un effet répulsif direct sur le puceron, alors que *T. patula* avait un effet répulsif indirect, nécessitant la présence de poivron (Chapitre 2). A ce stade, nous ne pouvons pas dire si l'effet de ces plantes sur le comportement alimentaire résulte d'une action directe sur le puceron et/ou d'un échange d'informations entre la PdS et le poivron (phénomène d'allélopathie). En 2001 ([Slesak et al., 2001](#)) avaient montré que l'exposition des plants de blé au méthyl jasmonate (volatil) réduit significativement la durée totale d'ingestion de *R. padi* sur ces plantes. Selon ([Alvarez et al., 2006](#)), certaines modifications du comportement alimentaire du puceron (un temps relativement plus long avant le premier sE2 avec un temps court avant le premier E1) indiqueraient des facteurs de résistance chimiques au niveau du phloème. Ceci impliquerait un changement conséquent du métabolisme de la plante hôte qui renforcerait sa résistance à l'installation du puceron en lui opposant une barrière physique et/ou chimique renforcée. Dans notre étude, l'absence des différences significatives sur les durées des phases (F) (phases de déraillement des stylets) laisse penser que les effets observés entre les différents traitements ne sont pas liés à une évolution de la résistance mécanique des tissus. Une analyse métabolomique de la composition du phloème permettrait de valider une évolution dans le métabolisme cellulaire du poivron en réaction à l'émission de COV par les PdS.

Nous pouvons également envisager que l'adsorption de COV de la PdS sur la surface de la feuille de poivron pourrait perturber le comportement de *M. persicae*. ([Dancewicz et al., 2016](#)) ont démontré que certaines molécules volatiles, telles que le camphène, peuvent être adsorbées par la feuille de la plante-hôte et s'accumuler dans les tissus mésophylliens. Ainsi, durant les phases de gustation par des brèves piquées intracellulaires dans ces tissus, la détection de ces molécules pousse le puceron à retirer ses stylets hors tissus végétaux et piquer dans un autre endroit de la feuille. Ceci augmente le nombre de pénétrations de stylets. En conséquence, les durées de ses phases d'ingestion diminuent ([Hu et al., 2018](#)). Nous retrouvons ici une évolution du comportement alimentaire en présence de COV conforme à nos observations.

5. Conclusion

Les tests de fécondité réalisés *in vitro* se sont avérés être un moyen fiable et rapide pour mettre en évidence l'effet des PdS sur la reproduction de *M. persicae*. Nous avons ainsi confirmé la capacité d'*O. basilicum* au stade végétatif et de *T. patula* en fleur à ralentir significativement la ponte des femelles, mettant en évidence l'importance du stade phénologique de la PdS et de la composition du mélange olfactif libéré. L'évaluation de cette capacité à diminuer la reproduction du puceron s'avère être un second moyen de typage pertinent des PdS agissant sur les caractères de vie de ce ravageur, le premier étant la mesure de leur propriété répulsive. Les tests EPG réalisés ont montré que les COV produits par l'*O. basilicum* comme par *T. patula* en fleur perturbent fortement le comportement alimentaire du puceron. En particulier, la baisse significative du temps d'alimentation dans le phloème devrait logiquement se traduire par une baisse des ressources nutritionnelles et aboutir à une diminution de la fécondité du puceron. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette perturbation du comportement alimentaire par les COV mais nos résultats ne permettent pas de trancher entre une action directe sur le puceron qui perturberait son système nerveux, une adsorption des COV par la feuille de poivron qui perturbe ses phases de prospection pour se nourrir, ou encore une action induite sur le poivron qui modifie son métabolisme pour freiner l'accès aux ressources alimentaires du ravageur.

6. Références

- Alvarez, A. E., Tjallingii, W. F., Garzo, E., Vleeshouwers, V. & Vosman, M. D. B. (2006). Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 121: 145–157.
- Ameline, A., Couty, A., Martoub M & Giordanengo, P. (2009). Effects of mineral oil application on the orientation and feeding behaviour of *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphidae). *Acta Entomologica Sinica* 52(6): 617–623.
- Ameline, A., Couty, A., Martoub, M., Sourice, S. & Giordanengo, P. (2010). Modification of *Macrosiphum euphorbiae* colonisation behaviour and reproduction on potato plants treated by mineral oil. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 135(1): 77-84.
- Arimura, G. I., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W. & Takabayashi, J. (2000). Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* 406: 512–515.
- Basedow, T., Hua, L. & Aggarwal, N. (2006). The infestation of *Vicia faba* L. (Fabaceae) by *Aphis fabae* (Scop.) (Homoptera: Aphididae) under the influence of Lamiaceae (*Ocimum basilicum* L. and *Satureja hortensis* L.). *Journal of Pest Science* 79(3): 149-154.
- Bass, C., Puinean, A. M., Zimmer, C. T., Denholm, I., Field, L. M., Foster, S. P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R. & Williamson, M. S. (2014). The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 51: 41-51.
- Ben Issa, R., Gautier, H., Costagliola, G. & Gomez, L. (2016). Which companion plants affect the performance of green peach aphid on host plants? Testing of 12 candidate plants under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 160(2): 164-178.
- Ben Issa, R., Gautier, H. & Gomez, L. (2017a). Influence of neighbouring companion plants on the performance of aphid populations on sweet pepper plants under greenhouse conditions. *Agricultural and Forest Entomology* 19(2): 181-191.
- Ben Issa, R., Gomez, L. & Gautier, H. (2017b). Companion Plants for Aphid Pest Management. *Insects* 8(4): 112-131.
- Blackman, R. L. & Eastop, V. F. (2000). *Aphids on the World's Crop: And Identification and Information Guide*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Bracho-Nunez, A., Welter, S., Staudt, M. & Kesselmeier, J. (2011). Plant-specific volatile organic compound emission rates from young and mature leaves of Mediterranean vegetation. *Journal of Geophysical Research* 116(D16).
- Bruce, T. J. A., Wadhams, L. J. & Woodcock, C. M. (2005). Insect host location: a volatile situation. *Trends in Plant Science* 10(6): 269-274.
- Cao, H. H., Zhang, M., Zhao, H., Zhang, Y., Wang, X. X., Guo, S. S., Zhang, Z. F. & Liu, T. X. (2014). Deciphering the mechanism of beta-aminobutyric acid-induced resistance in wheat to the grain aphid, *Sitobion avenae*. *PLoS One* 9(3): e91768.

- Cascone, P., Iodice, L., Maffei, M. E., Bossi, S., Arimura, G.-i. & Guerrieri, E. (2015). Tobacco overexpressing β -ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants. *Journal of Plant Physiology* 173: 28-32.
- Chapman, R. F., E.A. Bernays & Simpson, a. S. J. (1981). Attraction and repulsion of the aphid, *Cavariella aegopodii*, by plant odors *Journal of Chemical Ecology* 7(5): 881-888.
- Cook, S. M., Khan, Z. R. & Pickett, J. A. (2007). The Use of Push-Pull Strategies in Integrated Pest Management. *Annual Review of Entomology* 52(1): 375-400.
- Dahlin, I., Vucetic, A. & Ninkovic, V. (2014). Changed host plant volatile emissions induced by chemical interaction between unattacked plants reduce aphid plant acceptance with intermorph variation. *Journal of Pest Science* 88(2): 249-257.
- Dancewicz, K., Sznajder, K., Załuski, D., Kordan, B. & Gabryś, B. (2016). Behavioral sensitivity of *Myzus persicae* to volatile isoprenoids in plant tissues. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 160(3): 229-240.
- de Vos, M., Cheng, W. Y., Summers, H. E., Raguso, R. A. & Jander, G. (2010). Alarm pheromone habituation in *Myzus persicae* has fitness consequences and causes extensive gene expression changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(33): 14673-14678.
- Dedryver, C. A., Le Ralec, A. & Fabre, F. (2010). The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. *C R Biol* 333(6-7): 539-553.
- Digilio, M. C., Mancini, E., Voto, E. & De Feo, V. (2008). Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *Journal of Plant Interactions* 3(1): 17-23.
- Giordanengo, P. (2014). EPG-Calc: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod-Plant Interactions* 8(2): 163-169.
- Gutierrez, C., Fereres, A., Reina, M., Cabrera, R. & And Azucena, G.-C. (1997). Behavioral and sublethal effects of structurally related lower terpenes on *Myzus persicae*. *Journal of Chemical Ecology* 23(6).
- Heil, M. & Karban, R. (2010). Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends in Ecology and Evolution* 25(3): 137-144.
- Hildebrand, D., Brown, G., Jackson, D. & Hamilton-Kemp, T. (1993). Effects of some leaf-emitted volatile compounds on aphid population increase. *Journal of Chemical Ecology* 1875-1887(9): 19.
- Hillocks, R. J. (2012). Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. *Crop Protection* 31(1): 85-93.
- Hu, H., Li, J., Delatte, T., Vervoort, J., Gao, L., Verstappen, F., Xiong, W., Gan, J., Jongsma, M. A. & Wang, C. (2018). Modification of chrysanthemum odour and taste with chrysanthemol synthase induces strong dual resistance against cotton aphids. *Plant Biotechnol J*.
- Hullé, M., Turpeau, E., Leclant, F. & Rahn, M.-J. (1998). *Les pucerons des arbres fruitiers : Cycles biologiques et activités de vol*. Paris

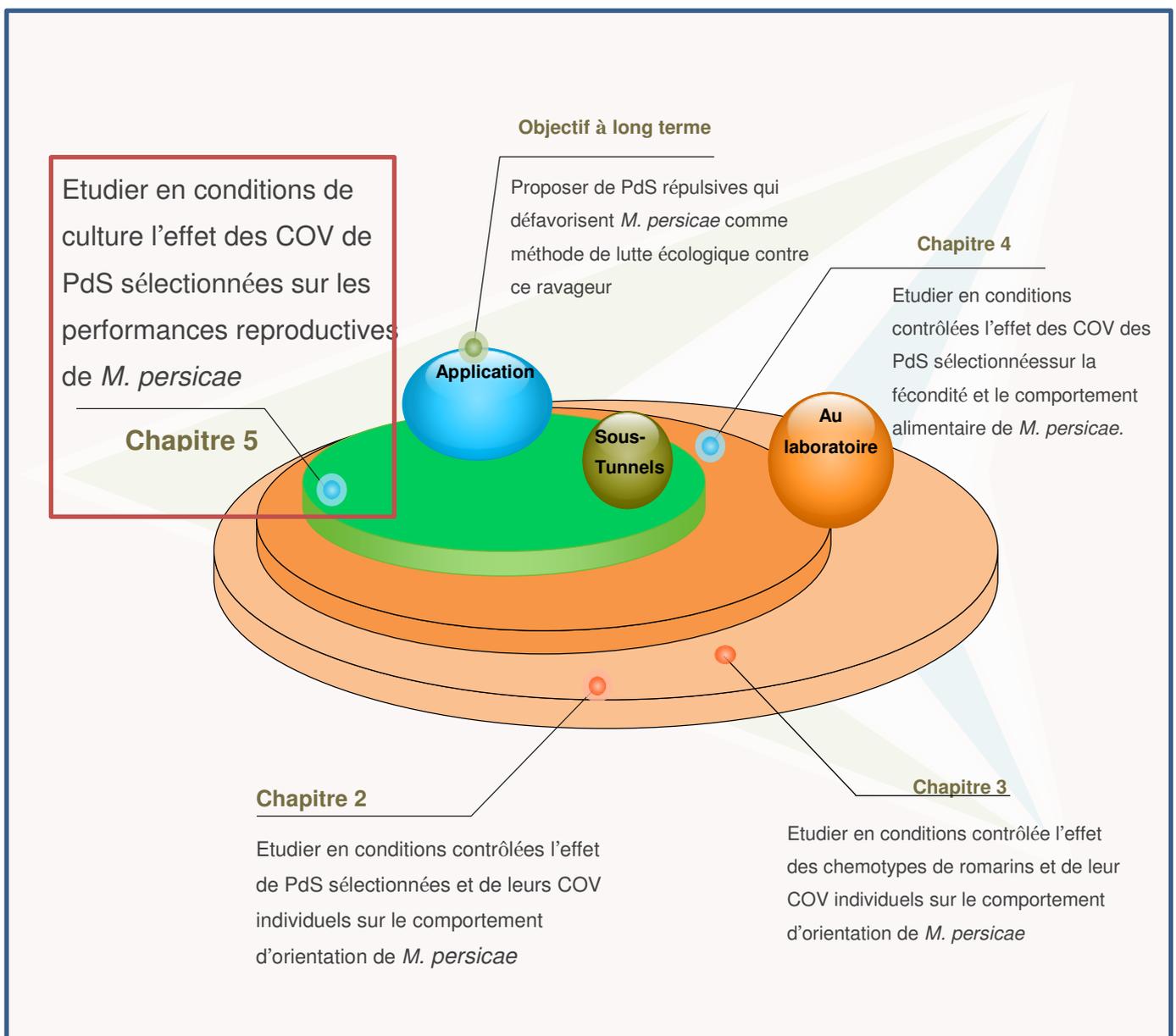
- Jiang, Y., Ye, J., Li, S. & Niinemets, Ü. (2016). Regulation of Floral Terpenoid Emission and Biosynthesis in Sweet Basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Plant Growth Regulation* 35(4): 921-935.
- Kang, Z.-W., Liu, F.-H., Zhang, Z.-F., Tian, H.-G. & Liu, T.-X. (2018). Volatile β -Ocimene Can Regulate Developmental Performance of Peach Aphid *Myzus persicae* Through Activation of Defense Responses in Chinese Cabbage *Brassica pekinensis*. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Kéita, S. M., Vincent, C., Schmita, J.-P., Jarnason, o. T. & Bélanger, A. (2000). Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae].
- Koorki, Z., Shahidi-Noghabi, S., Mahdian, K. & Pirmaoradi, M. (2018). Chemical Composition and Insecticidal Properties of Several Plant Essential Oils on the Melon Aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 21(2): 420-429.
- Kunert, G., Reinhold, C. & Gershenzon, J. (2010). Constitutive emission of the aphid alarm pheromone, (E)-beta-farnesene, from plants does not serve as a direct defense against aphids. *BMC Ecology* 10: 23.
- Le Roux, V., Dugravot, S., Campan, E., Dubois, F., Vincent, C. & Giordanengo, P. (2008). Wild *Solanum* Resistance to Aphids: Antixenosis or Antibiosis? *Journal of Economic Entomology* 101(2): 584-591.
- Mondédji, A. D., Ketoh, G. K., Amévoïn, K., Ameline, A., Giordanengo, P. & Glitho, I. A. (2014). Evaluation of neem leaves-based preparations as insecticidal agents against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sternorrhyncha: Aphididae). *African Journal of Agricultural Research* 9(17): 1344-1352.
- Ninkovic, V., Dahlin, I., Vucetic, A., Petrovic-Obradovic, O., Glinwood, R. & B., W. (2013). Volatile Exchange between Undamaged Plants - a New Mechanism Affecting Insect Orientation in Intercropping. *PLoS One* 8(7): e69431.
- Olivares-Donoso, R. & Niemeyer, H. M. (2005). Non-host volatiles do not affect host acceptance by alate virginoparae of *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) settled on the host plant surface. *European Journal of Entomology* 102(2): 303-304.
- Penuelas, J. & Staudt, M. (2010). BVOCs and global change. *Trends Plant Sci* 15(3): 133-144.
- Pettersson, J., Quiroz, A. & Fahad Ahmed, E. (1996). Aphid Antixenosis Mediated by Volatiles in Cereals. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* 46(2): 135-140.
- Pichersky, E. & Gershenzon, a. J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 237-243.
- Powell, G., P. Maniar, S., Pickett, J. A. & Hardie, J. (1999). Aphid responses to non-host epicuticular lipids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91: 115-123.
- Prado, E. & Tjallingii, W. F. (2007). Behavioral evidence for local reduction of aphid-induced resistance *Journal of Insect Science* 7(1): 48.

- Rajabaskar, D., Ding, H., Wu, Y. & Eigenbrode, S. D. (2013). Behavioral Responses of Green Peach Aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), to the Volatile Organic Compound Emissions from Four Potato Varieties. *American Journal of Potato Research* 90(2): 171-178.
- Regnault-Roger, C. (2013). Essential Oils in Insect Control. In *Natural Products*, Vol. 1, 4087-4107: Springer, Berlin, Heidelberg.
- Roy, H. E., Pell, J. K. & Alderson, P. G. (1999). Effects of Fungal Infection on the Alarm Response of Pea Aphids *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 69–75.
- Sauge, M.-H., Lacroze, J.-P., Poëssel, J.-L., Pascal, T. & Jocelyne, K. (2002). Induced resistance by *Myzus persicae* in the peach cultivar ‘Rubira’. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 102: 29–37.
- Schwarzkopf, A., Rosenberger, D., Niebergall, M., Gershenzon, J. & Kunert, G. (2013). To feed or not to feed: plant factors located in the epidermis, mesophyll, and sieve elements influence pea aphid's ability to feed on legume species. *PLoS One* 8(9): e75298.
- Slesak, E., Slesak, M. & Gabrys, B. (2001). Effect of methyl jasmonate on hydroxamic acid content, protease activity, and bird cherry–oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) probing behavior. *Journal of Chemical Ecology* 27(12).
- Song, B., Tang, G., Sang, X., Zhang, J., Yao, Y. & Wiggins, N. (2013). Intercropping with aromatic plants hindered the occurrence of *Aphis citricolain* in an apple orchard system by shifting predator–prey abundances. *Biocontrol Science and Technology* 23(4): 381-395.
- Stenberg, J. A. (2017). A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. *Trends Plant Sci* 22(9): 759-769.
- Storer, J. R. & Emden, a. H. E. v. (1995). Antibiosis and antixenosis of chrysanthemum cultivars to the aphid *Aphis gossypii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 77: 307-314.
- Storer, J. R., Powell, G. & Hardie, J. (1996). Settling responses of aphids in air permeated with non-host plant volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 76-78.
- Tjallingii, W. F. (1978). Electronic recording of penetration behaviour by aphids. *Ent. exp. & appl.* 24: 521-530.
- Tjallingii, W. F. (1988). Electrical recording of stylet penetration activities. In *Aphids, their biology, natural enemies and control*, 95-108 (Eds A. K. Minks and P. Harrewijn). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Tomova, B. S., Waterhouse, J. S. & Doberski, J. (2005). The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115: 153–159.
- Traka, C. K., Petrakis, E. A., Kimbaris, A. C., Polissiou, M. G. & Perdakis, D. C. (2018). Effects of *Ocimum basilicum* and *Ruta chalepensis* hydrosols on *Aphis gossypii* and *Tetranychus urticae*. *Journal of Applied Entomology*.
- Wang, W., Liu, Y., Chen, J., Ji, X., Zhou, H. & Wang, G. (2009). Impact of intercropping aphid-resistant wheat cultivars with oilseed rape on wheat aphid (*Sitobion avenae*) and its natural enemies. *Acta Ecologica Sinica* 29(3): 186-191.
- Yarou, B. B., Bawin, T., Boullis, A., Heukin, S., Lognay, G., Verheggen, F. J. & Francis, F. (2017). Oviposition deterrent activity of basil plants and their essential oils against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environ Sci Pollut Res Int*.

- Zhou, H.-b., Chen, J.-l., Liu, Y., Francis, F., Haubruge, E., Bragard, C., Sun, J.-r. & Cheng, D.-f. (2013). Influence of Garlic Intercropping or Active Emitted Volatiles in Releasers on Aphid and Related Beneficial in Wheat Fields in China *Journal of Integrative Agriculture* 12(3): 467-473.
- Züst, T. & Agrawal, A. A. (2016). Mechanisms and evolution of plant resistance to aphids. *Nature Plants* 2: 1-9.

Chapitre 5

Effets des bouquets volatils émis par des plantes de basilic (*Ocimum basilicum*) et d'œillet d'Inde (*Tagetes patula*) sur les performances reproductives de *Myzus persicae* (Sulzer) sur poivron sous tunnels



Chapitre 5

Effets des bouquets volatils émis par des plantes de basilic (*Ocimum basilicum*) et d'œillet d'Inde (*Tagetes patula*) sur les performances reproductives de *Myzus persicae* (Sulzer) sur poivron sous- tunnels

1. Introduction

De nos jours, les pratiques agricoles conventionnelles qui reposent principalement sur l'utilisation d'intrants chimiques, comme les pesticides, ont provoqué divers impacts négatifs sur la santé humaine et sur l'environnement. Afin de résoudre ces problèmes, diverses approches écologiques ont été explorées, telles que l'utilisation de bio-pesticides, l'amélioration de l'immunité des plantes par des pratiques culturales, l'utilisation d'auxiliaires, (Gurr and Kvedaras, 2010; Stenberg, 2017), l'association de cultures, etc. (Malézieux *et al.*, 2009; Mutiga *et al.*, 2010).

En particulier, l'introduction de plantes de service (PdS) en association avec les cultures à protéger permet de maintenir les populations de ravageurs en dessous d'un seuil de nuisibilité (Malézieux *et al.*, 2009; Finch and Collier, 2012; Parker *et al.*, 2013; Kahn *et al.*, 2017). Toutefois, malgré divers avantages, cette approche est peu utilisée et souffre d'un manque de validations expérimentales, notamment du fait de la difficulté de réaliser des essais systèmes (Matson *et al.*, 1997). Mais ces dernières années, les études sur ce volet ont connu une évolution dans un contexte de développement des stratégies *Push-Pull* (Mutiga *et al.*, 2010; Parolin *et al.*, 2012b). Cette approche a été étudiée pour contrôler écologiquement divers bio-agresseurs dont les pucerons (Ben Issa *et al.*, 2017b). Ceux-ci, à l'image du puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*), causent des dégâts considérables aux cultures sous-tunnels et en plein champs, non seulement par le prélèvement de sève élaborée, mais aussi par la transmission de phytovirus. De plus, son morphe aptère, caractérisé par une capacité reproductive très importante, développe des colonies denses à la face inférieure des feuilles, difficiles à atteindre par les traitements (Blackman and Eastop, 2000).

En diffusant des composés répulsifs à proximité, certaines PdS peuvent rendre l'environnement du puceron défavorable à son installation et sa multiplication. Ainsi, la perception de ces molécules peuvent perturber son développement, sa croissance, sa fécondité et

sa longévité, et même le pousser à quitter la plante (effet répulsif) (Tomova *et al.*, 2005; Ben Issa *et al.*, 2016; Ben Issa *et al.*, 2017a). Toutefois, les mécanismes par lesquels les COV agissent sont mal connus. La baisse de la fécondité du puceron pourrait être causée par une activité répulsive de certains COV (Gutierrez *et al.*, 1997), dont certains agissent directement sur son système nerveux. Alors que des COV comme l'eugénol et l' α -terpinéol peuvent être neurotoxiques (Regnault-Roger, 2013), d'autres, lipophiles peuvent être adsorbés par le corps de l'insecte et affecter diverses fonctions physiologiques (*e.g.* respiration cellulaire, croissance, etc.) (Koorki *et al.*, 2018). Les interactions entre les plantes voisines peuvent également avoir un effet indirect négatif sur les performances reproductives du puceron, notamment en perturbant son comportement alimentaire (Pettersson *et al.*, 1996; Arimura *et al.*, 2000; Prado and Tjallingii, 2007; Züst and Agrawal, 2016). Ainsi, l'exposition des plantes de tomate au β -ocimène induit une réponse défensive qui diminue les performances de *Macrosiphum euphorbiae* sur ces plantes (Cascone *et al.*, 2015).

Les COV susceptibles d'affecter les performances des pucerons peuvent être produits par diverses espèces végétales. Parmi ces espèces, on compte des plantes qui appartiennent à la famille des Lamiacées et à la famille des Astéracées tels que le basilic (*O. basilicum* L.) et l'œillet d'Inde (*T. patula*, nana). Les impacts négatifs de composés organiques volatils produits par ces deux espèces sur les pucerons ont été démontrés dans diverses études (Tomova *et al.*, 2005; Digilio *et al.*, 2008; Ghanim, 2014; Ben Issa *et al.*, 2016; Ben Issa *et al.*, 2017a), et nos travaux précédents, réalisés en conditions contrôlées, ont confirmé l'efficacité du basilic, (*O. basilicum* L, variété Pistou à petites feuilles) au stade végétatif et l'œillet d'Inde en fleur (*T. patula*, variété nana) (*cf.* chapitre 2 et 4). Ceci montre l'intérêt d'associer *O. basilicum* ou *T. patula* à une culture de poivron pour lutter contre *M. persicae*, cependant le passage de conditions contrôlées à des conditions naturelles, nécessite une validation expérimentale. En effet, divers facteurs à la fois biotiques et abiotiques peuvent moduler la nature et la quantité des COV émis par une plante vivante. Ces facteurs sont principalement la variabilité génétique, le stade phénologique, des interactions allélopathiques plantes-plantes (Llandres *et al.*, 2018), le stress subit par la plante, les conditions de cultures et/ou le climat (Pichersky and Gershenson, 2002; Penuelas and Staudt, 2010; Bracho-Nunez *et al.*, 2011). Autant des facteurs qui interagissent en conditions naturelles et peuvent modifier qualitativement et quantitativement la production olfactive d'une PdS candidate, et par conséquent changer son efficacité.

Cette étude a donc pour objectif de vérifier si l'association d'*O. basilicum* (effet direct sur puceron) ou de *T. patula* (effet indirect *via* la plante-hôte, *Cf.* chapitre 2) à une culture de poivrons sous tunnels, affectent les performances reproductives de *M. persicae*. Des suivis

démographiques ont été réalisés sur une génération de pucerons élevés sur *C. annuum* associé ou non à ces PdS. En parallèle, nous avons réalisé des prélèvements atmosphériques pour identifier les COV émis par ces PdS, et suivre leur production dans le temps et en lien avec l'évolution des conditions climatiques.

2. Matériels et méthodes

2.1. Les pucerons

L'élevage de masse de *M. persicae* (clone Mp05) aptères a été maintenu sur de jeunes plantes de poivrons, en conditions contrôlées (température de 22 ± 1 °C, humidité relative de 60-70 %, photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit). Pour chaque expérience, les pucerons utilisés avaient le même âge. Pour la synchronisation de l'élevage, 20 femelles aptères ont été déposées par plante. Après 24 heures, nous avons éliminé les femelles et laissé les larves néonates qui se sont développées jusqu'au stade adulte. Pour toutes les expérimentations, les femelles utilisées étaient âgées de 10 jours. Le nombre de femelles nécessaires à chacune des 3 expérimentations a été de 288 (144 *clips-cages* posées par expérimentation).

2.2. Les plantes

Le poivron (*Capsicum annuum* L., variété Yolo Wonder) au stade 10-15 feuilles a été utilisé comme plante-hôte (Figure 5.1.A). Les plants de poivrons ont été cultivés pendant 10 semaines avant le début de chaque expérience. Des semis décalés ont été réalisés afin d'avoir toujours des plantes au même stade de développement pour les différentes expériences.

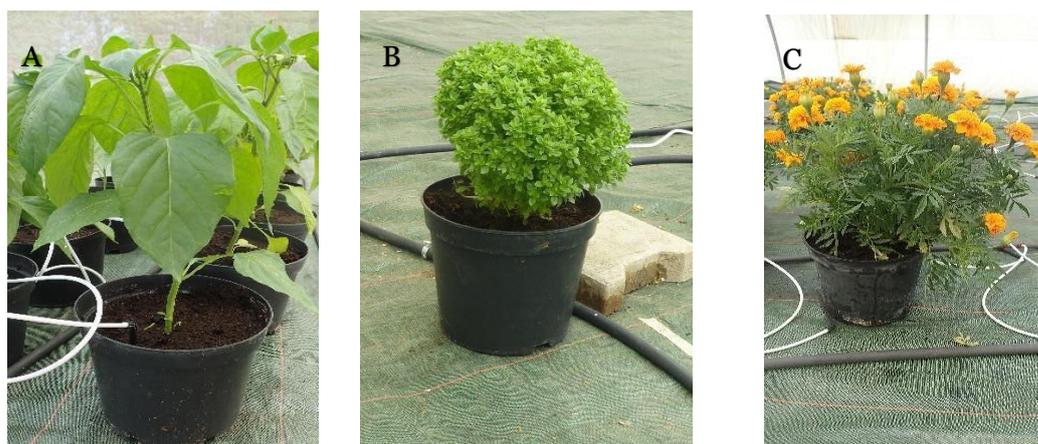


Figure 5.1 : Photographies représentant les 3 plantes présentes dans le cadre de nos expérimentations (de gauche à droite) : A : Poivron (*Capsicum annuum*), B : Basilic (*Ocimum basilicum*), C : Œillet d'inde ou Tagète (*Tagetes patula*).

Les plantes utilisées comme PdS dans cette étude sont : (1) le basilic (*Ocimum basilicum* L.) variété pistou à petites feuilles au stade végétatif (Figure 5.1.B) et (2) l'œillet d'inde (*Tagetes patula*) variété *nana* au stade floral (Figure 5.1.C). Elles ont été semées en pépinière, puis repiquées dans des pots de 1 litre remplis de terreau contenant de la tourbe, puis rempotées dans des pots de 4 litres en plastique, avant d'être utilisées dans les différentes expériences. Pour éviter les interactions entre les plantes de poivron et les PdS, ces dernières ont été élevées dans deux serres vitrées séparées (20 ± 5 °C et HR=60-70%) de l'INRA d'Avignon. Durant les expérimentations, l'ensemble des plantes a reçu quotidiennement la même quantité d'eau par un système de goutte à goutte automatique (≈ 180 ml/plante/jour). Cette distribution a été modulée en considérant les conditions climatiques environnantes. Les plantes n'ont subi aucun traitement phytosanitaire tant en production qu'en expérimentation.

2.3. Suivi de paramètres démographiques de *M. persicae*

Trois expériences ont été réalisées consécutivement de mars à juin 2017, sous trois tunnels plastiques, permettant de tester conjointement 3 modalités expérimentales : un traitement témoin (poivrons sans PdS), un traitement « basilic » (poivrons avec basilics) et un traitement « tagète » (poivrons avec tagètes). Même si la similitude et la proximité de ces tunnels minimisent les risques de variabilité environnementale, une rotation des cultures, a permis de réaliser successivement les 3 traitements dans chaque tunnel et de considérer un éventuel effet tunnel.

2.3.1. Les tunnels

Trois tunnels plastiques identiques, orientés Nord-Sud, de 10 m de long, 8 m de large et 3 m de haut, ont été utilisés. Ils étaient munis de portes *insect-proofs* pour favoriser la ventilation tout en empêchant l'entrée de ravageurs ou de prédateurs. Le sol était recouvert de toiles de paillage vertes pour lutter contre le développement des adventices et réduire le rayonnement réfléchi. Ces tunnels ont été blanchis au préalable avec de la chaux afin de réduire le niveau de rayonnement et de limiter les températures trop élevées.

2.3.1. Aménagement expérimental

À chaque expérimentation et dans chaque tunnel, 60 poivrons et 30 PdS (ou 30 poivrons dans le cas d'un tunnel témoin) ont été disposés au sol, sur trois rangs doubles espacés de 1 m, selon le plan de la figure 5.2. Les pots sur coupelles sont distants de 25 cm. Les 24 plantes expérimentées (cercles en bleu sur la figure) se situent au centre du dispositif, intercalées avec 30 PdS (cercles en orangé sur la figure 5.2). Pour s'affranchir d'un effet de bordure, 18 plantes de poivron ont été installées au nord et au sud (cercles jaunes sur la figure 5.2).

2.3.2. Protocole expérimental de suivi physiologique des pucerons en « *clip-cages* »

Les études physiologiques ont été effectuées à l'aide de *clip-cages* qui ont permis un suivi individuel des pucerons. Ces cages constituaient également une protection contre les attaques d'éventuels prédateurs qui auraient pu pénétrer dans les tunnels. Celles que nous avons utilisées sont constituées d'un cylindre transparent dont les dimensions (25 mm de diamètre et d'une hauteur de 7 mm) ont été adaptées pour favoriser au maximum les échanges gazeux avec l'extérieur et permettre au puceron de percevoir les COV présents dans son atmosphère (figure 5.3). Le dessus de ce cylindre est couvert par une grille de polyéthylène d'un maillage de 0.09 mm², tandis que son dessous est fermé par un disque en plastique (diamètre = 30 mm). Un joint en tissu lisse (feutrine) est fixé sur les bords inférieurs pour éviter les interstices et les blessures mécaniques de la feuille. Le cylindre et le disque sont collés à une pince métallique (longueur = 45 mm et largeur = 5 mm) permettant une ouverture et une fermeture sous pression aisées.

Pratiquement, chaque *clip-cage* installée sur une plante, emprisonne un disque de feuille. La cage est reliée à une tige métallique plantée dans le pot, qui supporte son poids (environ 6 g) et évite une torsion excessive de la feuille.

Un jour avant le lancement d'une expérimentation, l'ensemble des plantes a été mis en place dans chaque tunnel selon le plan décrit précédemment (figure 5.2). À J12, les *clip-cages* ont été fixées sur deux feuilles différentes de chaque poivron en test (ronds bleus). Puis, 2 femelles adultes ont été placées dans chaque *clip-cage*, sur la partie inférieure de la feuille. Après 24h, seules 2 larves néonates sont conservées dans la cage, les 2 femelles et les autres larves étant retirées. Ces deux larves sont gardées jusqu'à la fin de la phase pré-reproductive, marquée par une première ponte (début de la phase reproductive). Dès lors, une seule femelle a été conservée dans la cage. Puis, durant une période de durée équivalente à la phase pré-reproductive, les larves pondues sont comptées et éliminées tous les 2 jours.

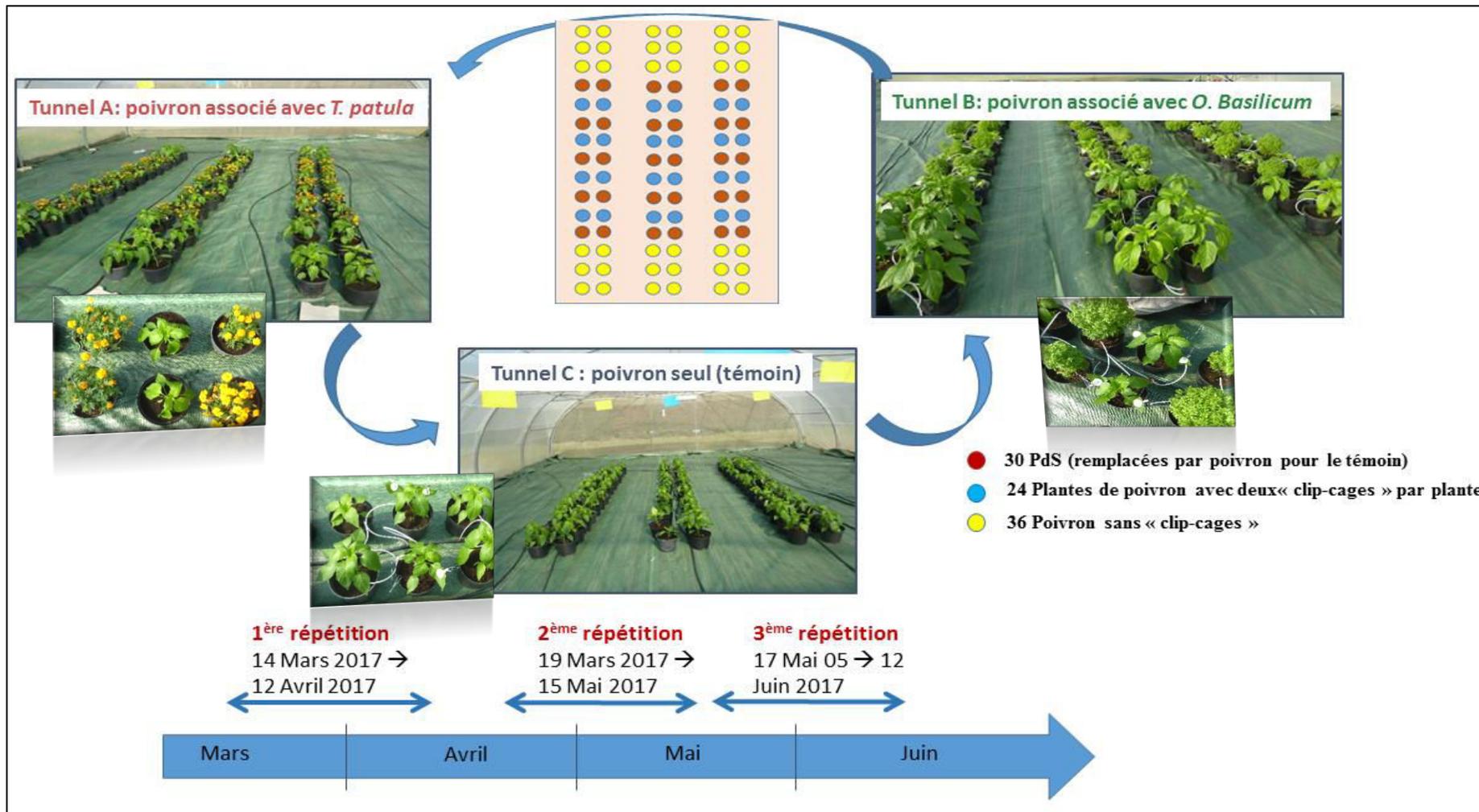


Figure 5.2 : Plan et périodes expérimentaux



Figure 5.3 : *clip-cages* positionnées sur des feuilles d'une plante de poivron. Le puceron est placé sur la face inférieure de la feuille.

Le comptage est réalisé le matin entre 9h et 11h concomitamment par 3 opérateurs qui ont effectué des rotations sur les 3 dispositifs pour éviter des biais. Tous les 4 jours, les *clip-cages* ont été déplacées sur la même plante pour minimiser une perturbation du métabolisme de la feuille, notamment de la photosynthèse liée à l'ombrage par la clip-cage. Le suivi de fécondité a été effectué dans 48 *clip-cages* par modalité et par expérimentation. Les relevés concernant le nombre de larves pondues et le nombre de femelles vivantes ont ensuite été analysés par le logiciel DEMP 1.5.4 (<http://www2.sophia.inra.fr/ID/SOFTS/demp/demp.php>) (Giordanengo, 2012). Ce programme permet le calcul des variables démographiques des pucerons : (1) la durée de la période pré-reproductive (*PRP*) dont la fin est marquée par la ponte de la 1^{ère} larve néonate, (2) la fécondité journalière (*DF*) qui correspond au nombre de larves pondues par femelle et par jour, (3) la survie adulte (*ADS*), (4) le taux intrinsèque d'accroissement (R_m : femelles/femelle/jour) obtenu avec l'équation de Lotka ($R_m, \sum e^{-r_m x} l_x m_x = 1$, avec x = l'âge, l_x = la survie âge spécifique et m_x = le nombre moyen de femelles juvéniles produites en une unité de temps par une femelle âgée de x (Birch, 1948), et (5) le temps de doublement de la population ($DT = \ln 2/R_m$) (DeLoach, 1974).

2.4. Caractérisation des composés volatils émis par les plantes de service (sous tunnels)

Des prélèvements de COV émis par des plantes d'*O. basilicum* d'une part, et par des plantes de *T. patula*, d'autre part ont été réalisés simultanément. Pour chaque PdS, les COV ont été prélevés sur trois plantes installées dans les tunnels en marge du dispositif expérimental décrit précédemment, mais dans les mêmes conditions climatiques. Les prélèvements ont été réalisés pendant 30 minutes sur une plante après l'autre, le matin (de 10h à 11h30) puis de nouveau l'après-midi (15h à 16h30), soit 6 prélèvements par date. Pour chaque expérimentation, nous avons répété ces schémas de prélèvements à 3 reprises (début, milieu et fin d'expérimentation). Au milieu de chaque essai, nous avons également suivi la production de COV au cours d'un nyctémère, en réalisant des prélèvements toutes les trois heures, à compter de 8h.

Compte tenu de la forte pollution olfactive environnante (notamment par des hydrocarbures), nous avons dû isoler les PdS sous une cloche pour pratiquer ces prélèvements de COV. Pour ce faire nous avons conçu un dispositif dynamique (figure 5.4) qui permet d'isoler momentanément la partie aérienne de la plante de son environnement olfactif et de réaliser un prélèvement sans la déplacer.

Au-dessus du pot de la PdS, deux plaques de plexiglass coulissent comme une guillotine entre deux glissières métalliques et permettent d'entourer la tige de la plante de service sans la blesser. Cette guillotine constitue le fond du dispositif et isole de fait la partie aérienne du terreau. Une cage très légère, constituée d'une structure métallique recouverte d'un sac transparent en NalophanTM est ensuite déposée sur cette plaque. Une fois la partie aérienne de la PdS enfermée dans cette cage, un flux d'air purifié par un filtre à charbon a été propulsé par un orifice à l'intérieur à l'aide d'un compresseur (5 L/min) relié à la cage par un tube en téflon. Durant les dix minutes suivantes, une partie de l'air pulsé ressort de la cage par un second orifice équipé d'un tube en téflon, se situant à l'opposé, mais décalé vers le bas de 20 centimètres. Cette étape permet la stabilisation de la plante et l'homogénéité du mélange olfactif au sein de ce dispositif. Une cartouche de Tenax[®] TA (PerkimElmer) en acier inoxydable a ensuite été installée dans le dispositif, reliée d'un côté au tuyau de sortie de la cage et de l'autre à une micro-pompe (PAS-500 Micro Air Sampler). Durant 20 minutes, un flux d'air aspiré de la cage, à un débit de 0,2 L/min, a traversé la cartouche où les COV ont été piégés par le Tenax[®]. La cartouche a ensuite été récupérée et stockée à +4°C, pour être analysée postérieurement, et le dispositif démonté. Les différentes connexions ont été faites par des tubes en téflon (de diamètre 8 mm et 10 mm).



Figure 5.4 : Prélèvement de COV sur une plante de service

Les tubes ont été analysés au moyen d'un CPG-SM Trace-ISQ (Thermo) équipé d'un désorbeur thermique Turbomatrix ATD 650 et d'une colonne capillaire en silice fondue Elite 5-MS 0.25mm x 30m x 0.5 μ m (PerkinElmer). Le gaz vecteur est l'hélium (0.8mL/min) et la programmation de température : 40°C durant 2 minutes puis 20°C/min jusqu'à 100°C puis 5°C/min jusqu'à 190°C puis 30°C/min jusqu'à 300°C puis 3 minutes à 300°C.

L'interprétation des chromatogrammes a été effectuée avec le logiciel Thermo Xcalibur et la plateforme Workflow4Metabolomics 3.0 (<https://galaxy.workflow4metabolomics.org/>). Les quantités de COV y sont représentées en aires de pic. Les aires des composés données sur les figures sont celles obtenues par la plateforme Galaxy. Les composés sont identifiés en comparant leurs spectres de masse avec les spectres de la bibliothèque NIST 2011 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). Les temps de rétention de la majorité des composés à identifier sont vérifiés par des standards commerciaux purs (Sigma Aldrich®).

2.5. Suivi météorologique

Le suivi de la température (°C), du rayonnement solaire global (W/m²) et de l'humidité relative (%) a été réalisé dans un tunnel afin de déterminer les conditions climatiques au cours des expérimentations. Nous avons utilisé un capteur Delta Ohm HD 9817T.1 pour mesurer la température et l'humidité relative de l'air (degré hygrométrique) et un pyranomètre Kipp and Zonen modèle CM5 pour mesurer le rayonnement solaire global. Les données ont été enregistrées automatiquement toutes les 15 minutes sur une centrale d'acquisition Campbell Scientific modèle CR23X.

2.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 3.1.0). Les comparaisons entre les différentes expérimentations sur les cinq paramètres physiologiques et sur la production de COV en fonction de l'heure, de la date et de l'expérimentation ont été effectuées grâce à des analyses de variance (*via* le test statistique d'ANOVA, 0.05 %). Pour comparer les paramètres démographiques des pucerons en présence de PdS par rapport au témoin (poivron seul), nous avons utilisé le test de Student (test t, $\alpha = 0.05$) dans le cas où les conditions de la normalité et de l'homogénéité de variance étaient respectées et le test U non-paramétrique de Mann-Whitney ($\alpha = 0.05$) dans le cas contraire. Les deux tests de Shapiro-Wilk et de Levene ont été utilisés pour vérifier les conditions de normalité et d'homogénéité de variance, respectivement.

3. Résultats et discussion

3.1. Effets des composés volatils de plantes de service sur des paramètres physiologiques de *M. persicae*

Cette étude avait pour objectif de confirmer l'effet inhibiteur de la présence d'*O. basilicum* sur les performances reproductives de *M. persicae* et de rechercher si la présence de *T. patula* sous tunnel, une PdS qui n'avait pas encore été testée dans ces conditions, perturbait également sa fécondité (Ben Issa *et al.*, 2017a). Au cours de ces essais, les suivis physiologiques ont été réalisés sur une seule génération de *M. persicae* à partir d'une larve néonate encagée sur une feuille de plante saine de poivron (nous n'avons enregistré aucune attaque d'autre ravageurs ou maladies) afin de caractériser l'effet de l'environnement olfactif sur ses paramètres physiologiques (Amiri-Jami *et al.*, 2012).

Les analyses de variance réalisées (*via* le test statistique d'ANOVA, 0.05 %) sur l'ensemble des données expérimentales, indiquent que les cinq paramètres démographiques mesurés semblent varier ($p < 0,0001$) en fonction des expérimentations. Ceci peut s'expliquer par des conditions environnementales différentes, notamment la température dans les tunnels (van Baaren *et al.*, 2010).

Les analyses statistiques ont montré une diminution significative de la fécondité journalière (*DF*, larves/femelle/jour) de *M. persicae* en présence de PdS, qui se confirme dans les 3 expérimentations (baisse de 19 %, 18 % et 23 % pour l'*O. basilicum* et de 10 %, 17% et 10 % pour *T. patula*). L'*O. basilicum* semble avoir eu un effet plus important que *T. patula*.

Table 5.1 : Paramètres caractérisant la démographie de *Myzus persicae* placé sur des plantes de poivron en présence ou non (témoin) de plantes de service *O. basilicum* et *T. patula*. Les paramètres (moyennes ± erreur type) sont calculés à l'aide du logiciel « DEMP 1.5.4 ».

Paramètres	Poivron seul (témoin)	Poivron avec <i>O. basilicum</i>	(a) Test de Student (b) Test Mann-whitney	Poivron avec <i>T. patula</i>	(a) Test de Student (b) Test Mann-whitney
<i>Expérience 1</i>					
	n=48	n=48	<i>P-value</i>	n=48	<i>P-value</i>
1. PRP (jours)	11,25 ± 0,14	11,46 ± 0,13	0,38 ns (b)	11,08 ± 0,15	0,5348 ns (b)
2. DF (larves/femelle/jour)	3,11 ± 0,07	2,50 ± 0,11	<0,0001, **** (a)	2,80 ± 0,08	0,0074 ** (a)
3. ADS (jours)	12 ± 0,36	11,75 ± 0,37	0,39 ns (b)	12,54 ± 0,24	0,4005 ns (b)
4. Rm (femelles/femelle/jour)	0,21 ± 0,002	0,195 ± 0,003	0,0005 *** (a)	0,21 ± 0,002	0,6483 ns (a)
5. DT (jours)	3,32 ± 0,035	3,59 ± 0,06	0,0001 ***(b)	3,35 ± 0,06	0,5953 ns (a)
<i>Expérience 2</i>					
	n=48	n=48	<i>P-value</i>	n=48	<i>P-value</i>
1. PRP (jours)	12,46 ± 0,17	12,92 ± 0,19	0,06 ns (b)	12,42 ± 0,17	0,90 ns (b)
2. DF (larves/femelle/jour)	2,376 ± 0,09	1,95 ± 0,08	0,0004 *** (a)	1,97 ± 0,08	0,001 ** (a)
3. ADS (jours)	10,67 ± 0,38	10,17 ± 0,29	0,06 ns (b)	10,46 ± 0,31	0,40 ns (b)
4. Rm (femelles/femelle/jour)	0,19 ± 0,004	0,17 ± 0,003	<0,0001 **** (a)	0,17 ± 0,004	0,005 ** (b)
5. DT (jours)	3,80 ± 0,08	4,23 ± 0,07	<0,0001 ****(a)	4,11 ± 0,08	0,006 ** (a)
<i>Expérience 3</i>					
	n=48	n=48	<i>P-value</i>	n=48	<i>P-value</i>
1. PRP (jours)	8 ± 0	8 ± 0	>0,9999 ns (b)	8 ± 0	>0,9999 ns (b)
2. DF (larves/femelle/jour)	4,49 ± 0,09	3,47 ± 0,13	<0,0001 ****(b)	4,02 ± 0,13	<0,0001 ****(b)
3. ADS (jours)	7,75 ± 0,13	7,29 ± 0,23	0,09 ns (b)	7,92 ± 0,06	0,39 ns (b)
4. Rm (femelles/femelle/jour)	0,30 ± 0,002	0,28 ± 0,004	<0,0001 ****(b)	0,29 ± 0,003	0,03 * (b)
5. DT (jours)	2,29 ± 0,02	2,55 ± 0,04	<0,0001 **** (b)	2,37 ± 0,03	0,03 * (b)

-Le niveau de significativité ($p > 0,05$ (différence non significative), $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) est signalé par respectivement (ns, * ; ** ; ***).

-Test t de Student utilisé lorsque les conditions de la normalité et de l'homogénéité de variance étaient respectées

-Test U non-paramétrique de Mann-Whitney utilisé lorsque les conditions de la normalité et de l'homogénéité de variance n'étaient pas respectées

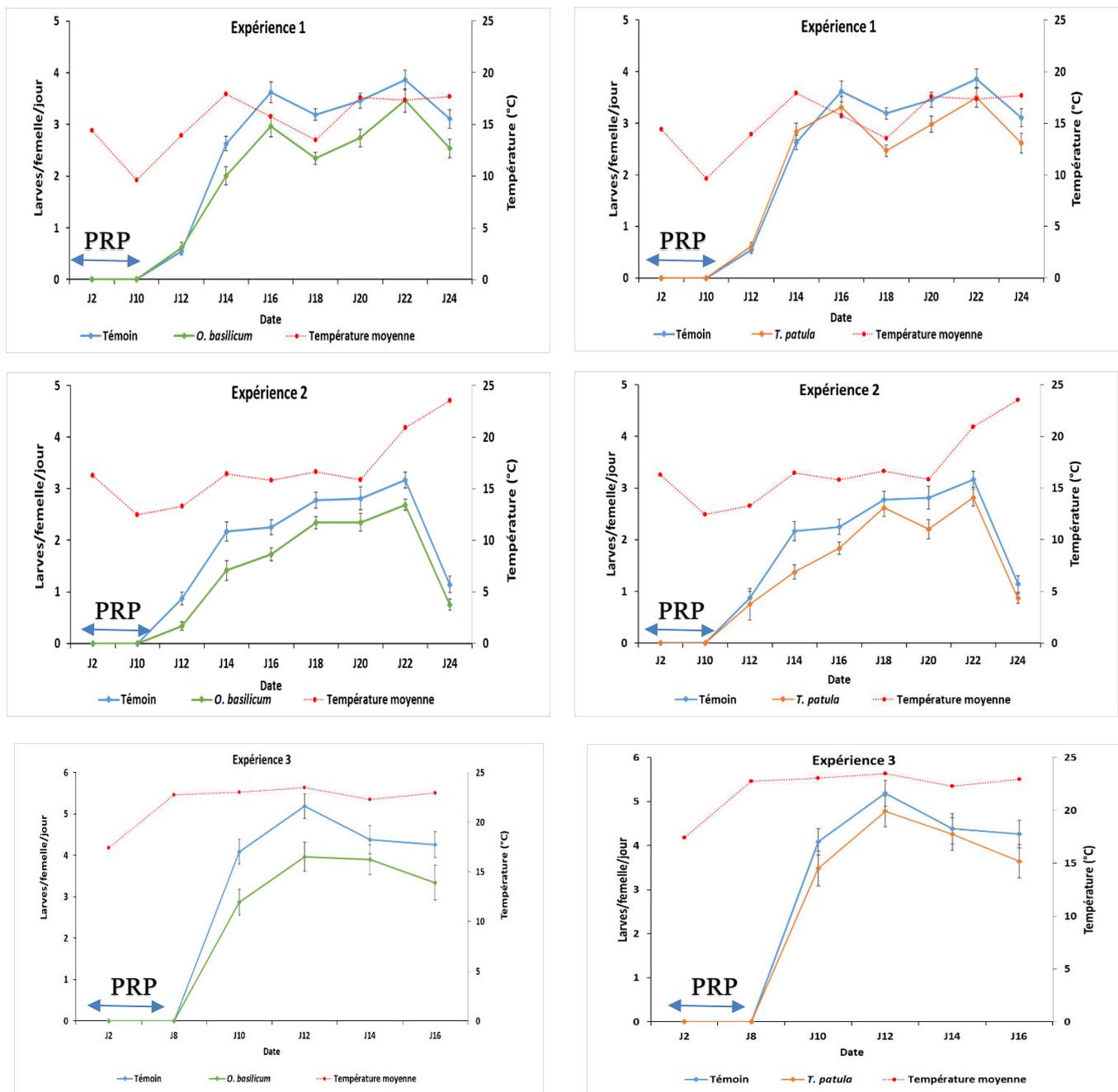


Figure 5.5: Fécondité journalière de femelles de *Myzus persicae* (moyenne \pm erreur-standard) sur des plantes de poivron (en bleu) à proximité ou non de plantes de service *O. basilicum* (en vert) ou *T. patula* (en orangé). La température moyenne est présentée en rouge (3 expériences).

Cet effet est conforme aux observations antérieures obtenues en atmosphère contrôlée dans des enceintes climatiques (Ben Issa *et al.*, 2016) et au laboratoire dans des boîtes de Pétri (*cf.* chapitre 4). En cela, ce résultat valide la pertinence des essais réalisés au laboratoire pour typer des plantes candidates pour lutter contre les pucerons.

La figure 5.5 montre l'évolution de ce paramètre (nombre de larves pondues par jour et par femelle) durant les 3 expérimentations successives. Même si ces dernières ont été réalisées au cours d'une même saison, elles se sont succédées et les conditions environnementales étaient différentes, notamment les températures (Figure 5.5). Cette variabilité du climat est sans doute à l'origine des différences de développement du puceron dans les conditions témoin entre les trois répétitions (Satar *et al.*, 2008). Lors de la 1^{ière} expérimentation, les femelles ont commencé à pondre à J12, et le nombre de larves pondues a rapidement augmenté pour dépasser 2 larves par jour et par femelle à J14 et atteindre une valeur entre 3 et 4 larves par jour et par femelle entre J16 et J24. Le même profil a été observé lors de la deuxième expérimentation avec une augmentation du nombre de larves pondues plus progressive, qui est resté tout au long de l'expérimentation entre 2 et 3 larves pondues par femelle et qui a brusquement chuté à J24. Lors de la 3^{ième} répétition, les femelles ont commencé à pondre à J10, et dès J12, le nombre de larves pondues était le plus élevé, entre 4 et 5 larves par jour et par femelle. Ces différences de développement phénologique et de fécondité journalière du témoin sont à relier avec les conditions climatiques sous tunnel qui ont beaucoup évolué entre les expérimentations (figure 5.6).

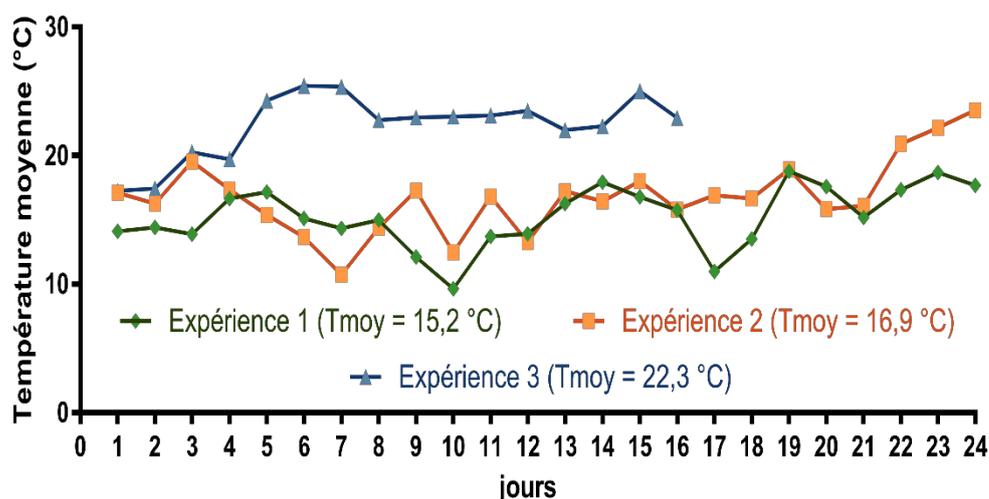


Figure 5.6 : Évolution des températures moyennes journalières sous tunnel durant les 3 expériences

Les températures étaient beaucoup plus élevées lors de la 3^{ième} expérimentation, ce qui peut expliquer la diminution du nombre de jours pour passer du stade larvaire L1 au stade adulte observée lors de la 3^{ième} expérimentation, la phénologie de *M. persicae* étant fortement liée à la température. La chute de fécondité observée à J24 pourrait être liée à une brusque augmentation de la température sous tunnel mais également à la fin de la période reproductive du puceron (dont la période de vie est d'environ 24J).

L'évolution du taux intrinsèque d'accroissement par individu (R_m , femelles/femelle/jour) au fil des expérimentations est un autre témoignage de l'influence majeure de la température sur la démographie du puceron. Ce taux a augmenté de 30% lors de la dernière expérimentation, pour laquelle la température moyenne journalière dépassait 20°C. Ceci confirme que l'on est proche de la température d'accroissement optimal naturel de la population de *M. persicae*, à savoir aux alentours de 22°C au niveau du feuillage (van Baaren *et al.*, 2010). Ces différences de température entre expérimentations ne semblent pas avoir eu d'incidence sur l'effet de *O. basilicum* dont la présence a très significativement diminué R_m ($p < 0.0005$) à chaque expérimentation, dans des proportions sensiblement comparables (baisse de 7 %, 10 % et 8 % pour les expériences 1, 2 et 3). *T. patula* a eu un effet négatif moins prononcé, uniquement significatif ($p < 0.05$) lors des expérimentations 2 et 3 (baisse respective de 7% et 3%).

En corolaire de l'évolution du taux intrinsèque d'accroissement par individu, les temps de doublement des populations (DT , jours) ont clairement diminué dans l'expérimentation 3, avec l'élévation de la température dans les tunnels et indépendamment de la présence de PdS (tableau 5.1). Celles-ci ont également eu un effet sur le DT avec une augmentation très nette ($p < 0.0001$) en présence d'*O. basilicum* (augmentation de 8 %, 11 % et 11 % pour les expérimentations 1, 2 et 3), et un effet plus nuancé de *T. patula*, uniquement significatif à $p < 0,05$ pour les expérimentation 2 et 3 (augmentations respectives de 8 et 4%). L'absence d'effet des COV de *T. patula* sur les deux paramètres R_m et DT dans la première expérience est probablement lié à une variabilité de la production de COV par des variations dans le bouquet des COV émis. Ces variations sont éventuellement modulées par des facteurs climatiques comme nous le discuterons plus loin (Penuelas and Staudt, 2010).

Les 2 derniers paramètres démographiques calculés (PRP et ADS) ont également été sensibles à l'évolution des températures (Vandermeer *et al.*, 1998), mais n'ont pas été significativement affectés par la présence de PdS (tableau 5.1). Nos résultats ont démontré qu'au sein d'une même expérience, les durées pré-reproductives (PRP , jours) ont été similaires entre les différents traitements. Cependant, ces durées ont avancé de 3 jours et 4 jours par rapport à la 1^{ère} et à la 2^{ème} expérimentation, respectivement. Aussi, les pucerons ont survécu (ADS , jours) pendant toute la période d'expérimentation que ce soit en présence ou en absence des COV des PdS. Par ailleurs, les suivis ont été réalisés entre 16 et 24j. Ceci ne permet pas de conclure à l'effet

des PdS sur la durée de vie de *M. persicae*. Il aurait été intéressant de poursuivre les mesures jusqu' à la mort de toutes les femelles, pour estimer ce paramètre (Amiri-Jami *et al.*, 2012), mais les contraintes expérimentales (notamment pour réaliser 3 expérimentations sur la même saison) ne l'ont pas permis.

Globalement, les trois expérimentations réalisées ont permis de montrer que la présence de COV des PdS, *O. basilicum* comme *T. patula*, a des effets négatifs sur les paramètres biologiques et démographiques (*DF*, *Rm* et *DT*) qui déterminent le développement de la population de *M. persicae*. En effet, l'implication des COV émis par *O. basilicum* et par *T. patula* comme médiateurs chimiques pouvant agir sur la dynamique des populations de pucerons a été évoquée à l'occasion de plusieurs études réalisées sous tunnels ou en plein champs (Tang *et al.*, 2012). Basedow *et al.* (2006). Elles ont montré que l'introduction d'*O. basilicum* dans une culture de *Vicia faba* (culture à protéger) sous tunnel a permis de réduire significativement les populations d'*Aphis fabae*. D'autres études ont également révélé des effets négatifs de COV émis par *O. basilicum* sur *M. persicae* et sur d'autres pucerons (Digilio *et al.*, 2008; Ghanim, 2014; Tiroesele and Matshela, 2015). De même, l'introduction de *T. patula* dans des systèmes des cultures peut réduire les densités de pucerons (Tomova *et al.*, 2005; Jankowska, 2007; Jankowska *et al.*, 2009; Parker *et al.*, 2013). *O. basilicum* et *T. patula* ont été sélectionnés comme PdS pouvant être utilisées pour lutter contre *Aphis citricola* dans les vergers de pommiers (Song *et al.*, 2013). Néanmoins, dans tous ces travaux, les diminutions des populations des pucerons occasionnées par la présence de PdS sont généralement associées à deux mécanismes : soit un effet direct de COV répulsifs sur les pucerons, soit un effet indirect, impliquant ou non les COV, consistant à favoriser la présence et le développement d'ennemis naturels. En fait, seuls les travaux de Ben Issa *et al.* (2017a) ont clairement prouvé l'effet de COV libérés par les PdS sur la démographie des populations de *M. persicae*.

3.2. Caractérisation des composés volatils émis par les plantes de service au cours des expérimentations

Dans notre étude, nous avons fait le choix de prélever les COV sur des PdS placées dans les mêmes conditions (dans le tunnel) mais mises sous cloche pour les isoler de leur environnement. En effet, les premières captures de COV directement au-dessus des PdS ou des poivrons, se sont révélées inexploitable du fait de la forte pollution olfactive environnante. Ce constat nous offre cependant une information intéressante dans la mesure où les pucerons, ou les poivrons, malgré cette pollution, ont capté et répondu à ce message olfactif des PdS. Ceci montre la sensibilité olfactive élevée de puceron en cas d'action directe, ainsi qu'une sensibilité de la plante-hôte à des COV particuliers de la PdS en cas d'action indirecte *via* la plante hôte (Zhang *et al.*, 2017; Clavijo McCormick *et al.*, 2014)

Étant donné que dans les chapitres précédents nous avons utilisé la technique SPME (qui permet des mesures qualitatives et semi-quantitatives), les résultats sont exprimés en proportion calculées à partir des surfaces des aires des pics des chromatogrammes. Ici, nous avons utilisé des cartouches adsorbantes (Tenax[®]) pour réaliser le prélèvement de COV, ce qui nous permet de quantifier les COV (Materic *et al.*, 2015). Nous avons mesuré des quantités produites dans un temps donné et dans des conditions de prélèvements standardisées, qui permettent de comparer les effets du nyctémère, de la date et des PdS.

Par ailleurs, les COV émis par les PdS ont été analysés sur un nyctémère afin de déterminer s'il existait un cycle journalier. On voit sur la figure 5.7A. que l'émission des COV de basilic est très faible de nuit et qu'elle augmente d'un facteur 2 à 4 et est maximale entre 11h et 17h, ce qui correspond également aux pics de rayonnement et de température mesurés sur la même journée (figure 5.8). On retrouve la même évolution d'émission des COV sur *T. patula* au cours d'un nyctémère figure 5.7B. Certains composés sont également détectés de nuit et d'autres uniquement de jour. Les changements des émissions des plantes au cours de la journée (Hendel-Rahmanim *et al.*, 2007), peuvent s'expliquer par une influence considérable des facteurs climatiques sur les émissions des plantes, principalement la température qui agit sur la pression de vapeur des molécules, et aussi la lumière qui est impliquée dans la biosynthèse de composés (Holopainen and Gershenzon, 2010). Dans certains cas, l'humidité relative peut également agir sur les émissions de la plante (Loreto *et al.*, 1996).

Pour vérifier si les différences de développement démographique du puceron en présence de PdS étaient liées à des différences d'émission des COV, nous avons estimé un profil moyen de COV émis par les PdS (moyenne de 18 prélèvements réalisés pendant une expérimentation). Concernant l'aspect qualitatif, l'identité des COV composant les mélanges olfactifs émis par les PdS au cours de cette étude est conforme à nos attentes (*cf. chapitre 4*). Les COV que nous avons identifiés ont déjà tous été répertoriés dans des études réalisées sur plantes entières ou sur huile essentielle d'*O. basilicum* (Klimánková *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2016b; Yarou *et al.*, 2017; Ben Issa *et al.*, 2017a) et de *T. patula* (Czerniewicz *et al.*, 2018; Prakash *et al.*, 2012), ce qui laisse présager de la présence générique de la plupart d'entre eux chez ces espèces. Or, si les profils de volatils produits par les deux PdS ont quasiment la même composition de COV au fil du temps, leurs quantités ont été significativement différentes en fonction de l'expérience. L'importance des écart-type (18 mesures) témoigne aussi d'une grande variabilité de la production en fonction du climat (3 journées de mesures) et de l'heure de la journée (2 captures à 10h et 15h). La figure 5.9 montre globalement que la quantité de composés captés sur *O. basilicum* a été plus faible dans l'expérimentation 1 (3,8 E¹⁰) comparée

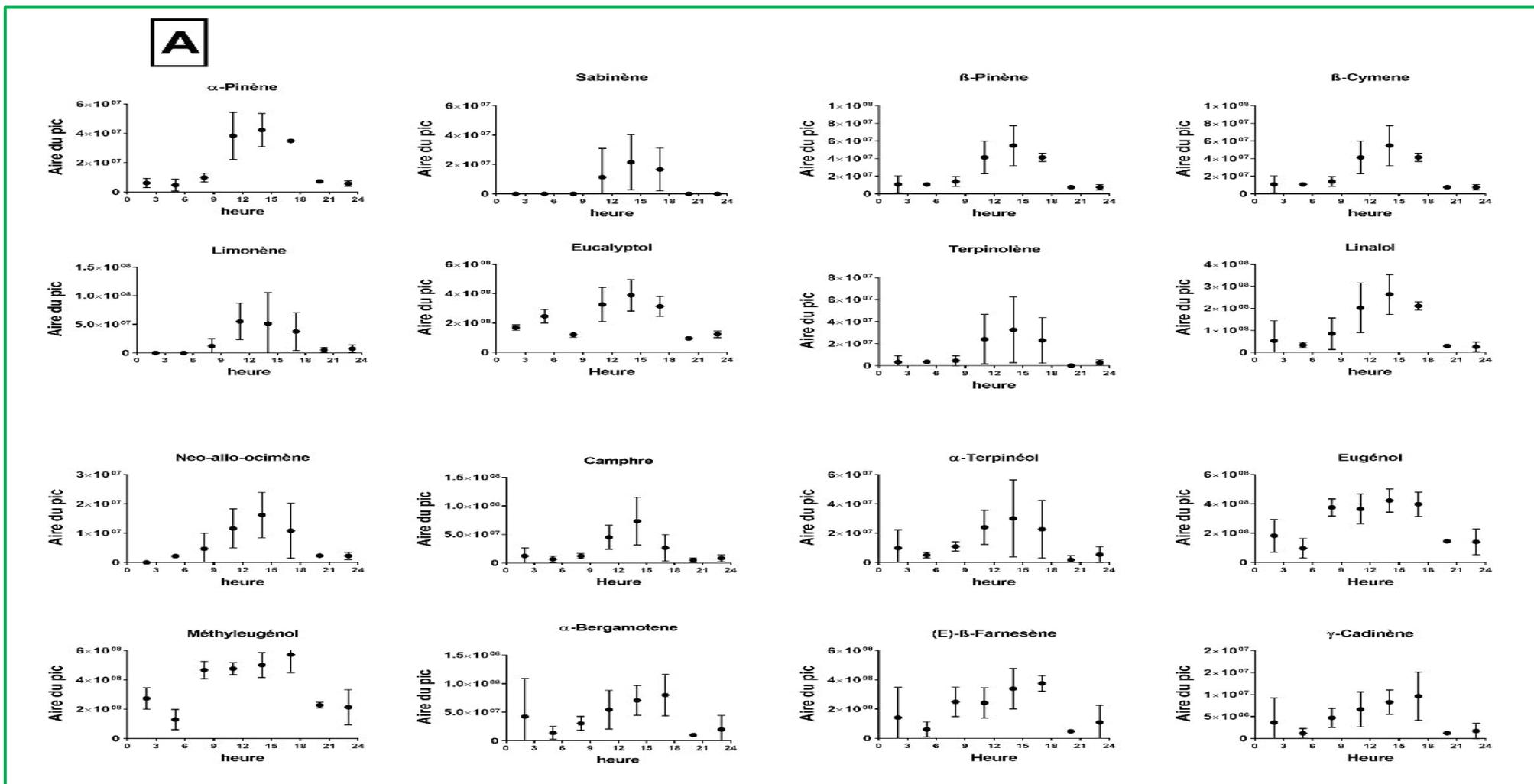


Figure 5.7 A : Suivi sur 24 h (nycthémer) des composés volatils (moyenne ± écart type) émis par *O. basilicum* réalisé au cours de l'expérience 1 (n=3)

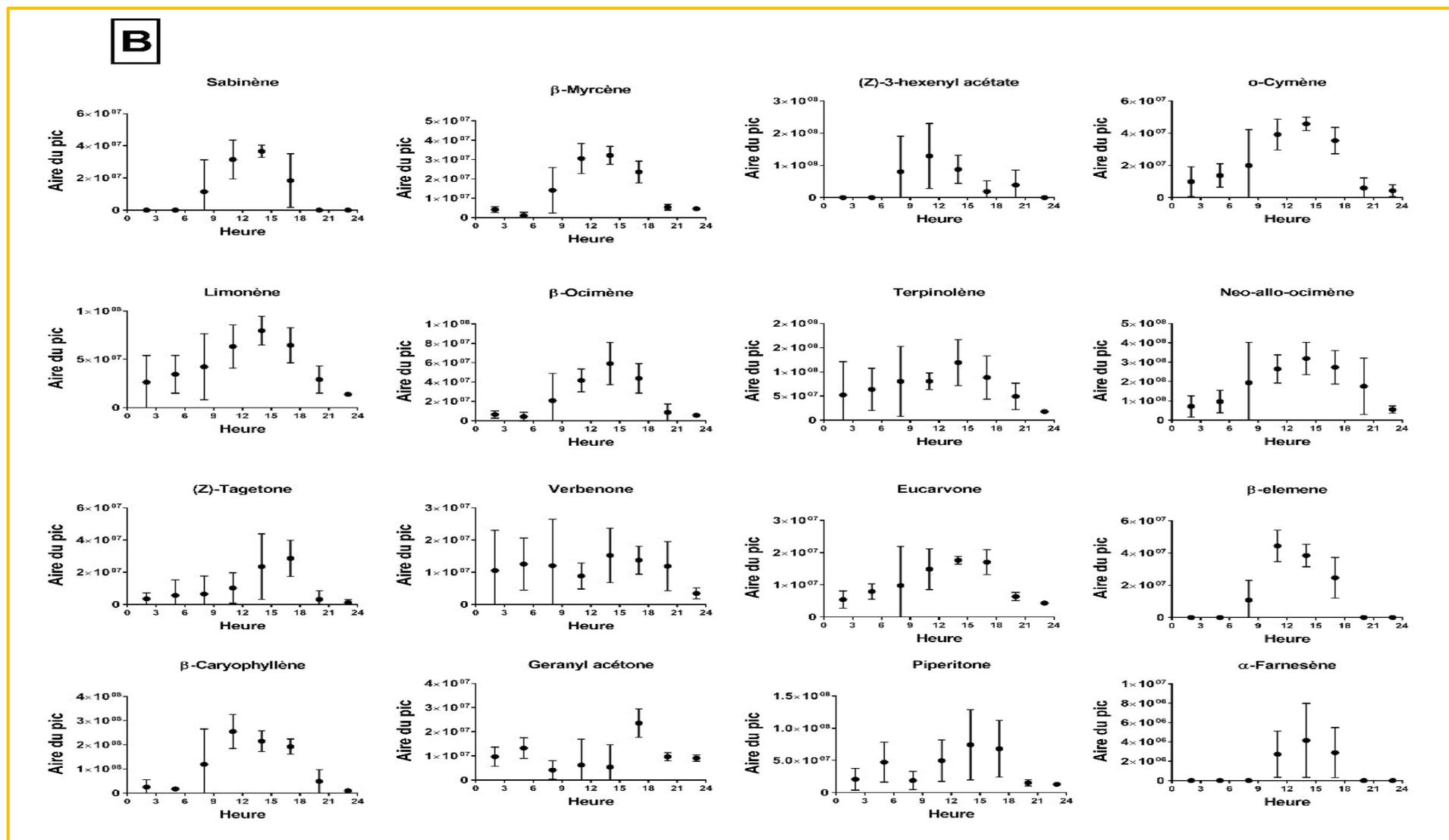


Figure 5.7 B : Suivi sur 24 h (nycthémère) des composés volatils (moyenne ± écart type) émis par *T. patula* réalisé au cours de l'expérience 1 (n=3)

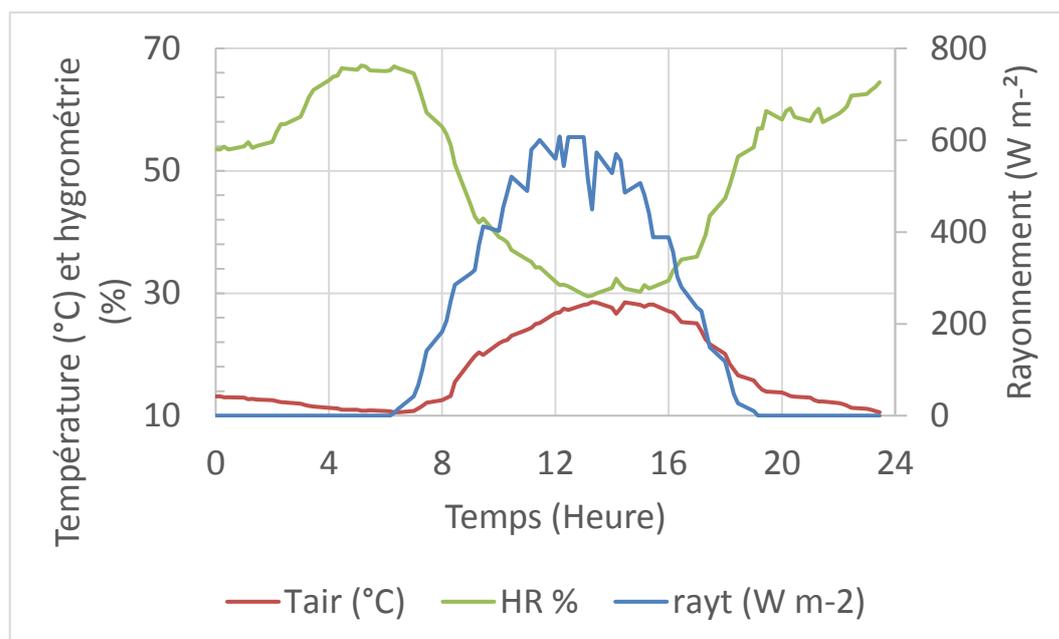


Figure 5.8 : Évolution du climat sous tunnel pendant le nyctémère lors du prélèvement de COV du 6 avril

aux valeurs obtenues lors de la 2^{ième} (1,2 E¹¹) et de la 3^{ième} expérimentation (8,8 E¹⁰). Aussi, des différences moins nettes ont été observées sur les profils de COV captés sur *T. patula*. La quantité totale de composés captés sur *T. patula* dans l'expérimentation 1 (1,9 E¹⁰) a été plus faible par rapport aux expériences 2 et 3 (4,8 E¹⁰ et 4,1 E¹⁰, respectivement). Ceci pourrait être lié à des différences d'émission des plantes au cours de la saison ou en réponse au climat. Par ailleurs, la quantité de chaque COV dans le profil capté varie également selon les expérimentations. La majorité des composés sont émis en plus faible quantité lors de l'expérimentation 1.

En effet, la plus grande efficacité des PdS pourrait ainsi être liée à des émissions plus fortes de certains composés ou à des composés spécifiques. À titre d'exemple, nous observons, en fonction des expériences, des différences de quantités de composés connus pour leurs effets négatifs sur *M. persicae*. Parmi les COV d'*O. basilicum*, on retrouve des composés répulsifs comme l'eugénol et l'(*E*)- β -farnésène (EBF) (*cf.* chapitre 2). Quant au β -ocimène (émis par *T. patula*), il peut induire un changement dans les mécanismes de défense de la plante-hôte et générer indirectement des effets négatifs sur *M. persicae* (Kang *et al.*, 2018). Nos résultats montrent que les quantités d'eugénol et d'EBF émis par *O. basilicum* durant l'expérimentation 2 (6,6 E⁸ et 5,3 E⁸, respectivement) sont beaucoup plus importantes que celles de l'expérimentation 1 (3,4 E⁸ et 2,7 E⁸, respectivement) ou 3 (4,9 E⁸ et 3,8 E⁸, respectivement).

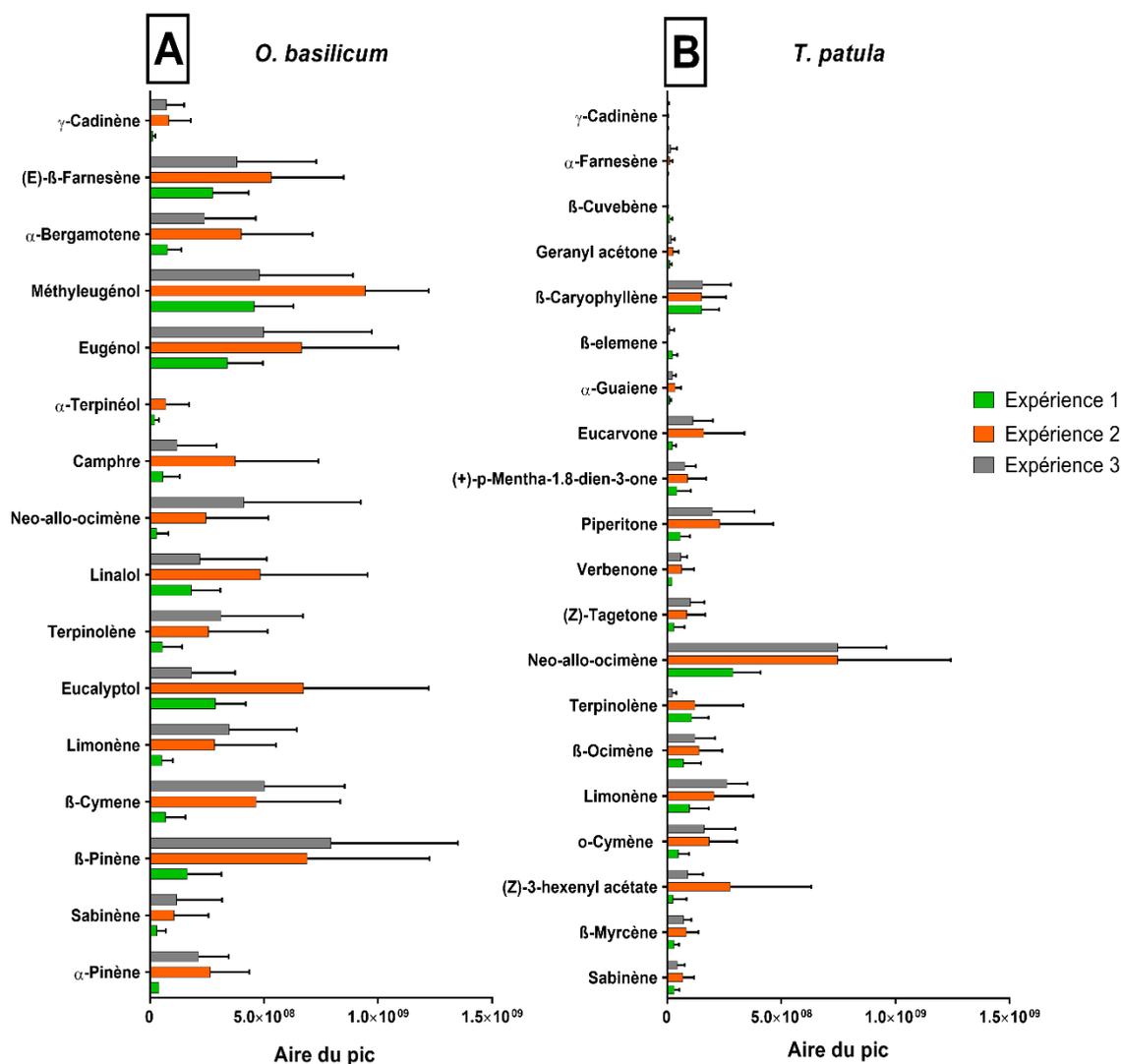


Figure 5.9 : Différences des émissions (moyenne \pm écart type) entre les 3 expériences (n=18).

Nous avons également noté que les plantes de *T. patula* ont émis des quantités de β -Ocimène plus faibles durant l'expérimentation 1 ($7,1 E^7$) par rapport aux expérimentations 2 ($1,4 E^8$) et aux expérimentations 3 ($1,2 E^8$). Ceci peut expliquer en partie les résultats observés sur les paramètres démographiques en fonction des traitements et en fonctions des expériences.

Conclusion

Nous avons bien vu l'impact de la température sur la reproduction du puceron, mais aussi sur la production de COV par les PdS. Il paraissait donc judicieux, malgré la difficulté opérationnelle, d'enchaîner 3 expérimentations sur toute la période durant laquelle la pression de

M. persicae sur les cultures sous abri est forte. Ces travaux montrent ainsi l'intérêt d'associer l'*O. basilicum* à une culture de poivron, au vu de sa capacité à ralentir la démographie du puceron vert, indépendamment des conditions climatiques. *T. patula* semble peu efficace en début de saison et de floraison lorsque les températures sont plus fraîches et les jours plus courts, mais devient plus intéressante lorsque la production de COV de ses fleurs augmente. L'effet des PdS a été significatif sur 3 des 5 paramètres démographiques mesurés (*DF*, *Rm* et *DT*), ce qui témoigne d'un effet sur la capacité reproductive du puceron. Ceci renforce l'idée d'un lien causal avec une perturbation de l'alimentation des femelles comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 4. L'implication d'un COV ou d'un mélange de COV particulier est difficile à établir, même si la présence de COV comme l'eugénol, l'*(E)*- β -farnésène ou encore le β -ocimène qui ont une action avérée sur le comportement du puceron peut être soulignée. Par contre la quantification des COV nous permet de penser qu'il existe un lien direct entre le niveau de production de certains COV et l'efficacité des PdS à perturber les paramètres démographiques du puceron. Pour l'heure cette production est appréciée à partir de l'aire des pics du chromatogramme mais une quantification précise est en cours à partir d'un étalonnage de chaque composé, ce qui nous procurera une information rare dans la littérature. Il serait intéressant également de réaliser des suivis plus précis du développement des larves ou de la longévité des femelles pour estimer l'impact des PdS sur la phénologie de *M. persicae*. Ces résultats révèlent également une efficacité différente d'*O. basilicum* et de *T. patula* dans des conditions expérimentales analogues. Ceci peut être en lien avec un mode d'action différent comme nous l'évoquions dans le chapitre 2, tel une interaction possible avec la plante hôte. À ce propos, des analyses biochimiques des feuilles de poivrons actuellement en cours, pourraient nous renseigner sur une modification du métabolisme du poivron en présence de PdS, qui pourrait par exemple se traduire par des compositions en acides aminés et en sucres différentes.

Références

- Amiri-Jami, A. R., Sadeghi, H. & Shoor, M. (2012). The performance of *Brevicoryne brassicae* on ornamental cabbages grown in CO₂-enriched atmospheres. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15(2): 249-253.
- Arimura, G. I., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W. & Takabayashi, J. (2000). Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* 406: 512–515.
- Basedow, T., Hua, L. & Aggarwal, N. (2006). The infestation of *Vicia faba* L. (Fabaceae) by *Aphis fabae* (Scop.) (Homoptera: Aphididae) under the influence of Lamiaceae (*Ocimum basilicum* L. and *Satureja hortensis* L.). *Journal of Pest Science* 79(3): 149-154.
- Ben Issa, R., Gautier, H., Costagliola, G. & Gomez, L. (2016). Which companion plants affect the performance of green peach aphid on host plants? Testing of 12 candidate plants under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 160(2): 164-178.
- Ben Issa, R., Gautier, H. & Gomez, L. (2017a). Influence of neighbouring companion plants on the performance of aphid populations on sweet pepper plants under greenhouse conditions. *Agricultural and Forest Entomology* 19(2): 181-191.
- Ben Issa, R., Gomez, L. & Gautier, H. (2017b). Companion Plants for Aphid Pest Management. *Insects* 8(4): 112-131.
- Blackman, R. L. & Eastop, V. F. (2000). *Aphids on the World's Crop: And Identification and Information Guide*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Bracho-Nunez, A., Welter, S., Staudt, M. & Kesselmeier, J. (2011). Plant-specific volatile organic compound emission rates from young and mature leaves of Mediterranean vegetation. *Journal of Geophysical Research* 116(D16).
- Cascone, P., Iodice, L., Maffei, M. E., Bossi, S., Arimura, G.-i. & Guerrieri, E. (2015). Tobacco overexpressing β -ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants. *Journal of Plant Physiology* 173: 28-32.
- Clavijo McCormick, A., Gershenzon, J. & Unsicker, S. B. (2014). Little peaks with big effects: establishing the role of minor plant volatiles in plant-insect interactions. *Plant Cell Environ* 37(8): 1836-1844.
- Czerniewicz, P., Chrzanowski, G., Sprawka, I. & Sytykiewicz, H. (2018). Aphicidal activity of selected Asteraceae essential oils and their effect on enzyme activities of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pestic Biochem Physiol* 145: 84-92.
- Digilio, M. C., Mancini, E., Voto, E. & De Feo, V. (2008). Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *Journal of Plant Interactions* 3(1): 17-23.
- Finch, S. & Collier, R. H. (2012). The influence of host and non-host companion plants on the behaviour of pest insects in field crops. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142(2): 87-96.
- Ghanim, N. M. a. S. B. A. G. (2014). Control of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) by some aqueous plant extracts.

- Gurr, G. M. & Kvedaras, O. L. (2010). Synergizing biological control: Scope for sterile insect technique, induced plant defences and cultural techniques to enhance natural enemy impact. *Biological Control* 52(3): 198-207.
- Gutierrez, C., Fereres, A., Reina, M., Cabrera, R. & And Azucena, G.-C. (1997). Behavioral and sublethal effects of structurally related lower terpenes on *Myzus persicae*. *Journal of Chemical Ecology* 23(6).
- Hendel-Rahmanim, K., Masci, T., Vainstein, A. & Weiss, D. (2007). Diurnal regulation of scent emission in rose flowers. *Planta* 226: 1491–1499.
- Holopainen, J. K. & Gershenzon, J. (2010). Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in Plant Science* 15(3): 176-184.
- Jankowska, B. (2007). Impact of intercropping white cabbage with Pot Marigold (*Calendula officinalis* L.) and French Marigold (*Tagetes patula nana*) on the occurrence of cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.), its parasitoid *Diaeretiella rapae* M'Intosh and predatory *Syrphidae*. *Aphids and Other Hemipterous Insects* 13(1): 199-209.
- Jankowska, B., Poniedziałek, M. & Jędrszczyk, E. (2009). Effect of intercropping white cabbage with French Marigold (*Tagetes patula nana* L.) and Pot Marigold (*Calendula officinalis* L.) on the colonization of plants by pest insects. *Folia Horticulturae* 21(1).
- Jiang, Y., Ye, J., Li, S. & Niinemets, Ü. (2016). Regulation of Floral Terpenoid Emission and Biosynthesis in Sweet Basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Plant Growth Regulation* 35(4): 921-935.
- Kahn, B. A., Rebek, E. J., Brandenberger, L. P., Reed, K. & Payton, M. E. (2017). Companion planting with white yarrow or with feverfew for squash bug, *Anasa tristis* (Hemiptera: Coreidae), management on summer squash. *Pest Manag Sci* 73(6): 1127-1133.
- Kang, Z.-W., Liu, F.-H., Zhang, Z.-F., Tian, H.-G. & Liu, T.-X. (2018). Volatile β -Ocimene Can Regulate Developmental Performance of Peach Aphid *Myzus persicae* Through Activation of Defense Responses in Chinese Cabbage *Brassica pekinensis*. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Klimánková, E., Holadová, K., Hajšlová, J., Čajka, T., Poustka, J. & Koudela, M. (2008). Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions. *Food chemistry* 107(1): 464-472.
- Koorki, Z., Shahidi-Noghabi, S., Mahdian, K. & Pirmaoradi, M. (2018). Chemical Composition and Insecticidal Properties of Several Plant Essential Oils on the Melon Aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 21(2): 420-429.
- Llandres, A. L., Almohamad, R., Brevault, T., Renou, A., Tereta, I., Jean, J. & Goebel, F. R. (2018). Plant training for induced defense against insect pests: a promising tool for integrated pest management in cotton. *Pest Manag Sci*.
- Loreto, F., Ciccioli, P., Cecinato, A., Brancaleoni, E., Frattoni, M. & D., T. (1996). Influence of Environmental Factors and Air Composition on the Emission of [alpha]-Pinene from *Quercus ilex* Leaves. *Plant Physiology* 110(1): 1317–1322.
- Malézieux, E., Crozat, Y., Dupraz, C., Laurans, M., Makowski, D., Ozier-Lafontaine, H., Rapidel, B., Tourdonnet, S. & Valantin-Morison, M. (2009). Mixing plant species in cropping

- systems: concepts, tools and models. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 29(1): 43-62.
- Materic, D., Bruhn, D., Turner, C., Morgan, G., Mason, N. & Gauci, V. (2015). Methods in plant foliar volatile organic compounds research. *Appl Plant Sci* 3(12).
- Matson, P. A., W. J. Parton, A. G. Power & Swift, M. J. (1997). Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *SCIENCE*. www.sciencemag.org 277: 504-509.
- Mutiga, S. K., Gohole, L. S. & Auma, E. O. (2010). Effects of integrating companion cropping and nitrogen application on the performance and infestation of collards by *Brevicoryne brassicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 134(3): 234-244.
- Parker, J. E., Snyder, W. E., Hamilton, G. C. & Rodriguez- Saona, C. (2013). Companion Planting and Insect Pest Control.
- Parolin, P., Bresch, C., Poncet, C. & Desneux, N. (2012). Functional characteristics of secondary plants for increased pest management. *International Journal of Pest Management* 58(4): 369-377.
- Penuelas, J. & Staudt, M. (2010). BVOCs and global change. *Trends Plant Sci* 15(3): 133-144.
- Pettersson, J., Quiroz, A. & Fahad Ahmed, E. (1996). Aphid Antixenosis Mediated by Volatiles in Cereals. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* 46(2): 135-140.
- Pichersky, E. & Gershenzon, a. J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 237–243.
- Prado, E. & Tjallingii, W. F. (2007). Behavioral evidence for local reduction of aphid-induced resistance *Journal of Insect Science* 7(1): 48.
- Prakash, O., Rout, P. K., Chanotiya, C. S. & Misra, L. N. (2012). Composition of essential oil, concrete, absolute and SPME analysis of *Tagetes patula capitula*. *Industrial Crops and Products* 37(1): 195-199.
- Regnault-Roger, C. (2013). Essential Oils in Insect Control. In *Natural Products*, Vol. 1, 4087-4107: Springer, Berlin, Heidelberg.
- Satar, S., Kersting, U. & Uygun, N. (2008). Effect of temperature on population parameters of *Aphis gossypii* Glover and *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) on pepper.
- Song, B., Tang, G., Sang, X., Zhang, J., Yao, Y. & Wiggins, N. (2013). Intercropping with aromatic plants hindered the occurrence of *Aphis citricolain* an apple orchard system by shifting predator–prey abundances. *Biocontrol Science and Technology* 23(4): 381-395.
- Stenberg, J. A. (2017). A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. *Trends Plant Sci* 22(9): 759-769.
- Tang, G. B., Song, B. Z., Zhao, L. L., Sang, X. S., Wan, H. H., Zhang, J. & Yao, Y. C. (2012). Repellent and attractive effects of herbs on insects in pear orchards intercropped with aromatic plants. *Agroforestry Systems* 87(2): 273-285.
- Tiroesele, B. & Matshela, O. (2015). The Effect of Companion Planting on the Abundance of Cabbage Aphid, *Brevicoryne brassicae* L., on Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Journal of Plant and Pest Science* 2(3): 57-65.

- Tomova, B. S., Waterhouse, J. S. & Doberski, J. (2005). The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115: 153–159.
- Yarou, B. B., Bawin, T., Boullis, A., Heukin, S., Lognay, G., Verheggen, F. J. & Francis, F. (2017). Oviposition deterrent activity of basil plants and their essential oils against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environ Sci Pollut Res Int*.
- Zhang, R., Wang, B., Grossi, G., Falabella, P., Liu, Y., Yan, S., Lu, J., Xi, J. & Wang, G. (2017). Molecular basis of alarm pheromone detection in aphids. *Curr Biol* 27(1): 55-61.
- Züst, T. & Agrawal, A. A. (2016). Mechanisms and evolution of plant resistance to aphids. *Nature Plants* 2: 1-9.

Discussion générale

Chapitre 6

Discussion générale

Dans un contexte de réduction d'intrants chimique et de recherche de solutions alternatives à l'usage de pesticides, ma thèse avait pour objectif d'identifier des plantes de services qui pourraient être utilisées pour limiter l'installation du puceron vert sur les plantes horticoles. Des travaux précédents montraient l'intérêt de développer des méthodes écologiques pour protéger les cultures comme par exemple des stratégies de type *push-pull* associant des plantes aromatiques répulsives aux cultures pour perturber l'installation des pucerons (Tang *et al.*, 2012). Des travaux prometteurs avaient montré l'effet répulsif des COV d'huiles essentielles sur le comportement de *M. persicae*. Cependant, on manquait d'information sur les effets et les modes d'action de COV individuels ou en mélange émis par des plantes entières sur le comportement de *M. persicae*.

La perturbation du comportement d'orientation et des performances démographiques du puceron constitue une explication de la capacité des PdS à ralentir le développement des pucerons sur une culture horticole. Cependant, il apparaît que l'efficacité de leur introduction dans un système de culture est aléatoire car très liée à leur densité et aux conditions environnementales, ce qui constitue une contrainte majeure à leur usage. Identifier les plantes les plus efficaces, comprendre leur mode d'action et chercher à optimiser leur efficacité est donc une démarche propre à favoriser leur emploi en horticulture. C'est celle que nous avons adoptée dans cette étude, dans la continuité de la thèse de R. Ben Issa (2014). L'émission de COV par les PdS est à l'origine de ces interactions plantes-insectes et les caractéristiques du mélange olfactif environnant la culture (composition, proportion et quantité des différents COV présents) peuvent expliquer le niveau d'efficacité de ces PdS. Dans tous nos essais, nous avons analysé le message olfactif délivré par les PdS expérimentées, et cherché un lien entre celui-ci et un changement de comportement de *M. persicae*. Ceci nous a conduit à améliorer les techniques de captation et d'analyses de COV afin d'identifier les COV libérés par les PdS efficaces et de pouvoir les tester individuellement.

La répulsion et la capacité à ralentir les performances démographiques de *M. persicae* sont donc les 2 propriétés que nous avons évaluées pour typer quelques PdS sélectionnées à partir des travaux de Ben Issa *et al.* (2016), et sur la valeur desquelles nous avons construit notre réflexion. Les PdS que nous avons testées sont donc des plantes aromatiques, endémiques possédant un potentiel de valorisation commercial. Il s'agit du basilic (*Ocimum basilicum* L.), de la lavande (*Lavandula latifolia* L.), de la menthe poivrée (*Mentha piperita* L.), du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Lamiaceae) et de deux variétés d'œillets d'inde (*Tagetes patula* L., variétés Nana et Bonita Bolero).

Notre première tâche aura été de mettre au point et développer des techniques de typage rapides et pertinentes pour évaluer et comparer l'effet des PdS sur le comportement de *M. persicae* (fuite, alimentation, démographie) puis de les utiliser pour caractériser les réponses des pucerons aux PdS et à leur COV. Les tests de typage et les tests EPG nous ont renseignés sur les modes d'actions putatifs des PdS, en particulier s'il s'agit d'une perception directe du message olfactif par le puceron, et/ou indirecte via une modification du métabolisme de la plante hôte (Ninkovic *et al.*, 2013; Dahlin *et al.*, 2014). A ce stade de notre étude, il nous a semblé nécessaire de valider la pertinence de notre processus de screening des PdS en évaluant leur effet sur la démographie de *M. persicae* dans une expérimentation sous tunnel, en environnement semi-contrôlé. Les résultats obtenus lors de ces différentes étapes ont permis de mieux comprendre l'effet des COV sur *M. persicae*.

Comment caractériser la réponse olfactive des pucerons ?

Dans les expériences qui concernent particulièrement les pucerons, la plupart des études menées sur l'effet des COV a été effectuée en utilisant un olfactomètre en Y (Zhang *et al.*, 2017), un olfactomètre en arène à double choix (Eigenbrode *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2007; Ameline *et al.*, 2007), un olfactomètre à voies linéaires (Nottingham *et al.*, 1991; Webster *et al.*, 2010), un olfactomètre à quatre à 4 voies (Hegde *et al.*, 2012; Babikova *et al.*, 2013), des tunnels du vol, ou des tests simples dans des boîtes de pétri (Halbert *et al.*, 2009; Ikeura *et al.*, 2012). Au cours de cette thèse, pour évaluer la capacité répulsive des PdS, nous avons utilisé 3 types d'olfactomètres (l'olfactomètre en Y, l'olfactomètre tubulaire statique et l'olfactomètre en arène) qui ont globalement conduit à des conclusions similaires. Les tests sont cependant de nature très différentes.

Pour tester l'effet répulsif individuel de COV, nous avons utilisé un olfactomètre statique en tube conçu en nous inspirant des travaux de Abtew *et al.* (2015) (*cf.* Chapitre 4). Pour tester l'effet répulsif d'organes ou de plantes entières, nous avons utilisé un olfactomètre en arène et un olfactomètre en Y, qui comme d'ailleurs la plupart des olfactomètres décrits dans la littérature permettent de réaliser des tests de choix ou de préférence, et sont utilisés pour estimer le pouvoir répulsif à défaut de pouvoir le mesurer directement. Ces dispositifs ne sont pas vraiment appropriés pour mesurer la fuite de pucerons, et nous avons travaillé au cours de cette thèse sur la conception d'un olfactomètre pour apprécier directement la capacité répulsive de plantes entières ou de composés placés dans nos enceintes (*Cf.* Conclusions et Perspectives).

Lors de nos tests avec l'olfactomètre en arène le choix d'une trentaine de pucerons peut s'opérer entre 2 sources de COV qui diffusent passivement en provenance de 2 parties (feuilles ou fleurs) de plantes différentes (*Cf.* Chapitre 3). La répartition homogène des pucerons lors des tests à blanc montrent une absence de préférence pour un compartiment et donc de biais du dispositif en arène. De même les tests réalisés avec le poivron montrent que cette plante hôte n'émet pas de

mélange olfactif attractif pour *M. persicae*. Ainsi lorsque les pucerons se positionnent préférentiellement du côté du blanc, on peut en déduire que la plante ou le COV présent(e) dans le second côté est répulsif. Nous avons confirmé la fonctionnalité de notre dispositif, par des tests réalisés avec l'(*E*)- β -farnésène (phéromone d'alarme des pucerons), utilisé comme témoin positif.

Dans le cadre de l'olfactomètre en Y, quelques 120 pucerons sont testés individuellement et le choix s'opère entre 2 sources de COV portés par un flux d'air en provenance de 2 types de plantes entières (Cf. Chapitre 2). Notre préférence va vers l'olfactomètre en Y qui nous renseigne sur le message olfactif global d'une plante entière, beaucoup moins stressée par les manipulations qu'avec l'olfactomètre en arène (la plante est couchée et seule une partie est introduite dans l'olfactomètre). La capacité des enceintes en verre connectées à l'olfactomètre en Y, nous permet également de moduler le nombre de plantes à l'intérieur et d'apprécier éventuellement un effet « densité » ou « interaction entre plusieurs variétés » sur le message olfactif délivré. Celui-ci peut être aisément analysé par des prélèvements effectués directement dans l'enceinte à l'aide de fibre SPME, ou sur le circuit à l'aide de cartouche, ce qui n'est pas permis par l'olfactomètre en arène. On peut ajouter que le mode opératoire, avec un test individuel et un nettoyage régulier du dispositif, limitent le phénomène de suivisme fréquent chez les pucerons, auquel n'échappe pas le test en arène. Ce dernier conserve néanmoins l'avantage d'être plus rapide et de permettre de tester individuellement la production olfactive d'un seul organe de la plante. Nous l'avons choisi dans un premier temps (chapitre 3) car il permettait une comparaison plus aisée avec les tests réalisés dans le même dispositif par Ben Issa et al (2014) et parce que le dispositif en Y n'était pas encore opérationnel. Cependant, les tests réalisés avec ces deux olfactomètres ne sont pas exactement des tests de répulsion mais des tests de choix, la capacité répulsive étant obtenue par déduction de la réponse du puceron à plusieurs choix.

Comment caractériser l'environnement olfactif du puceron ?

La caractérisation des composés volatils émis par les plantes étudiées est essentielle dans notre démarche. Ainsi, la quantification des COV est nécessaire pour mesurer l'impact de facteurs abiotique sur la production des COV par les PdS. Au cours de cette étude nous avons utilisé des dispositifs qui nous ont permis d'échantillonner le mélange de volatils produits par les PdS. Nos échantillons ont été prélevés par deux techniques différentes : (1) la Micro extraction en phase solide "SPME " (Cf. matériel et méthode des chapitre 2, 3 et 4), qui est une technique simple et rapide pour caractériser qualitativement et semi-quantitativement les profils des COV, (2) les cartouches adsorbants (Tenax[®]), qui ont permis la quantification des COV (exprimée en aire du pic). (Cf. matériel et méthode de chapitre 5). Après l'identification des COV présents dans les profils de COV des PdS, nous avons testé individuellement des COV émis par des PdS candidates pour déterminer leur effet répulsif sur *M. persicae*. Ceci nous a offert la possibilité de mieux comprendre le mode d'action du bouquet olfactif des plantes efficaces.

Le potentiel répulsif des composés volatils émis par des plantes de service dépend des espèces et du chémotype.

L'efficacité de PdS dans un système de culture est aléatoire car très liée à leur densité et aux conditions environnementales, ce qui constitue une contrainte majeure à leur usage. Identifier les plantes les plus efficaces, comprendre leur mode d'action et chercher à optimiser leur efficacité est donc une démarche propre à favoriser leur emploi en horticulture. C'est celle que nous avons adoptée dans cette étude, Un des leviers pour avoir une association de culture efficace, et une production de COV satisfaisante (y compris dans la durée), est d'utiliser la variabilité génétique.

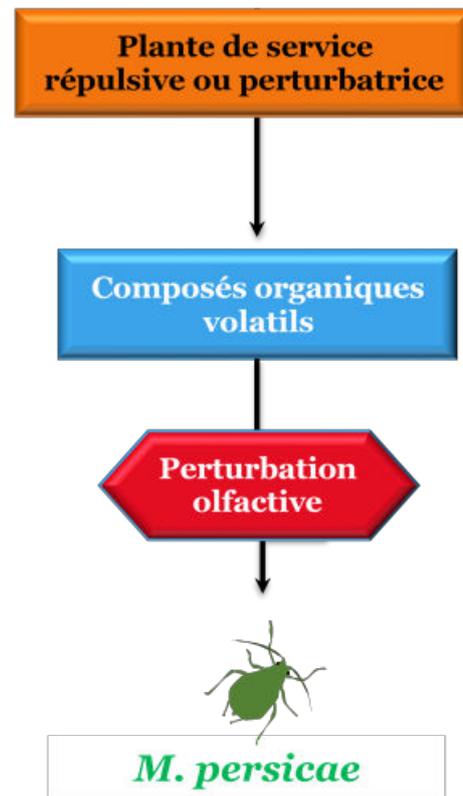
C'est pourquoi, nous avons consacré les deux chapitres de la thèse, à étudier la réponse olfactive de *M. persicae* à la perception de mélange de COV émis par des plantes aromatiques vivantes. Nous avons testé des plantes aromatiques qui avaient été antérieurement sélectionnées pour leurs effets négatifs sur *M. persicae* et comparé différents chémotypes de Romarin et leurs COV individuels sur le comportement olfactif de *M. persicae*.

Les tests d'olfaction réalisés avec différents génotypes de romarin offrent des résultats contrastés qui confirment l'effet de la variabilité génétique sur l'efficacité de cette plante. Ainsi, seul un génotype (Voltz Spindler) a eu un effet significatif sur le comportement de *M. persicae*. Ceci ne s'explique pas par la présence de COV supplémentaires comparés aux autres chémotypes de romarins inefficaces, mais semble lié à des différences dans les proportions de COV. On peut également envisager une différence dans la quantité de COV produits, mais les prélèvements avec les fibres SPME ne permettent pas une évaluation quantitative de leur production. Les tests individuels ont montré que 5 COV émis par les romarins avaient des propriétés répulsives sur *M. persicae* : l'acétate de bornyle, le camphre, l' α -terpinéol, le terpinène-4-ol et le géranyle acétone. Ces résultats sont cohérents avec ce que nous apprend la littérature sur ces composés, déjà connus pour agir sur le comportement des pucerons. Cependant, nos résultats ont montré que certains COV rapportés comme répulsifs contre des pucerons et d'autres insectes (Chapman *et al.*, 1981; Hori and Komatsu, 1997; Hori, 1998; Tomova *et al.*, 2005; Rozman *et al.*, 2007; Abdelgaleil *et al.*, 2009; Halbert *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014b; Lamy *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2016a), n'ont pas d'effet répulsif significatif sur *M. persicae*. En effet, le génotype des pucerons pourrait également expliquer la variabilité entre études, car les réponses comportementales diffèrent selon les pucerons (Visser *et al.*, 1996; Abteu *et al.*, 2015). *M. persicae*, puceron

généraliste, peut utiliser des stimuli peu spécifiques et répondre à diverses familles de COV (Bernays, 2001).

Par ailleurs, l'émission par une variété de romarin (Esselte) des 5 COV répulsifs ne suffit pas pour induire un effet répulsif du mélange olfactif. Nos résultats confortent l'hypothèse que l'effet répulsif ou non d'une plante résulte de la synergie ou de l'antagonisme entre plusieurs COV (Dawson *et al.*, 1984; Bruce *et al.*, 2005a; Bruce and Pickett, 2011) ; ils soulignent l'importance d'un effet lié à la proportion relative dans le mélange de certains COV et confirment les travaux réalisés avec les COV de romarin sur un autre ravageur (Zhang *et al.*, 2014a). Toutefois, on ne peut pas exclure, un effet répulsif d'autres composés qui n'auraient pas été détectés par notre méthode de prélèvement et d'analyse. Nos résultats sur deux variétés de *T. patula* confirment également l'importance du choix variétal et des proportions de COV dans le mélange émis par une PdS sur le comportement de *M. persicae*.

In vivo, nous avons étudié à l'aide d'un olfactomètre en Y l'effet de six PdS sur le comportement d'orientation de *M. persicae*. Ces plantes aromatiques sont le basilic (*Ocimum basilicum* L.), la lavande (*Lavandula latifolia* L.), la menthe poivrée (*Mentha piperita* L.), le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Lamiaceae) et deux variétés d'œillets d'inde (*Tagetes patula* L., variétés Nana et Bonita Bolero). Une des raisons de l'intérêt porté à ces plantes réside dans leur pouvoir répulsif présumé pour les ravageurs dont les pucerons (Koschier and Sedy, 2003; Miresmailli *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014a; Zhang and Chen, 2015) et le puceron vert en particulier (Hori, 1998; Tomova *et al.*, 2005; Ikeura *et al.*, 2012; Ben Issa *et al.*, 2016; Ben Issa *et al.*, 2017a). Nos résultats ont montré que les COV émis par *O. basilicum* et par *T. patula* perturbent le comportement olfactif de *M. persicae*, ce qui confirme les résultats de Ben Issa *et al.* (2016). Ces tests réalisés avec un autre dispositif, n'ont pas confirmé l'effet répulsif du romarin observé avec l'olfactomètre en arène, ce qui souligne la complexité de quantifier les effets des COV et le manque de connaissances des facteurs affectant leur émission (Pichersky and Gershenzon, 2002). La comparaison des signatures olfactives de ces plantes aurait pu nous éclairer sur ces différences dans la mesure où les COV sont les responsables de cet effet répulsif, mais les techniques et les conditions de prélèvements ont changé entre ces deux expérimentations et ne permettent pas de comparer les COV. L'implication des COV dans l'effet des PdS est cependant bien établie en l'absence de tout autre mode de communication entre PdS et puceron. Les variations des profils de volatils d'une

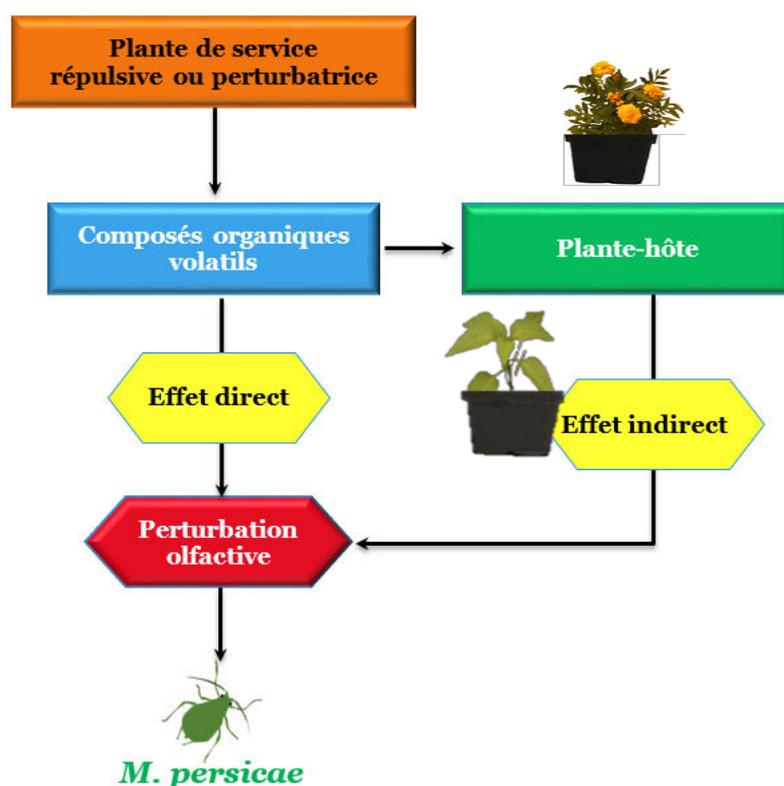


même espèce végétale peuvent être liées à des différences génétiques et à divers facteurs biotiques et abiotiques liés à l'état nutritionnel, aux conditions de stress et aux stades phénologiques des plantes (Schröder *et al.*, 2015; Dardouri *et al.*, 2017). De plus, nos résultats ont montré que la nature et la quantité des émissions des COV varient en fonction des stades phénologiques (*i.e.* stade végétatif, stade floraison). Des résultats similaires avaient été observés en fonction de l'organe émetteurs de COV (feuille ou fleur) (Pichersky and Gershenzon, 2002).

Les deux plantes de service candidates agissent sur le comportement olfactif de *Myzus persicae* selon deux modes d'action différents.

Les résultats obtenus ont montré que les mélanges des COV des deux PdS prometteuses agissent par deux modes d'action différents. Premièrement, la réponse olfactive de *M. persicae* a été directement altérée par les COV émis par *O. basilicum*. Ce résultat confirme des observations antérieures (Digilio *et al.*, 2008; Ben Issa *et al.*, 2016) qui ont révélé que cette espèce émet des COV ayant des effets négatifs directs sur le comportement.

Les COV de *T. patula* cv. Nana ont été impliqués indirectement dans la répulsion de *M. persicae* par l'intermédiaire de la plante hôte (le poivron). Les plantes pré-conditionnées deviennent moins attractives par rapport au témoin (plantes non pré-conditionnées). Des études précédentes ont montré que les modifications, quantitatives et/ou qualitatives, des profils des COV émis par plantes-hôtes peuvent les rendre répulsives (Hegde *et al.*, 2012; Ninkovic *et al.*, 2013; Dahlin *et al.*, 2014). Nous pouvons proposer deux hypothèses plausibles pour expliquer nos résultats : (1) les COV de *T. patula* peuvent adhérer par adsorption à la surface des plantes de poivron et être relâchés (mécanisme passif) (Himanen *et al.*, 2010), (2) les COV de *T. patula* peuvent également induire une modification de la composition biochimique des plantes de poivron *via* des changements dans leur physiologie (mécanisme actif) (Choh *et al.*, 2004; Bandara *et al.*, 2009; Glinwood *et al.*, 2009).



Effet des composés volatils émis par des plantes de service sur le comportement alimentaire et la fécondité des pucerons

Postérieurement, notre attention s'est portée sur l'effet des COV émis par les PdS sur la reproduction des pucerons. Nous avons réalisé un deuxième screening sur les plantes sélectionnées pour leurs effets répulsifs (*O. basilicum* et *T. patula*), afin de sélectionner celles ayant un impact sur la reproduction de *M. persicae*. Pour évaluer l'effet des PdS sur la démographie du puceron vert, nous avons cherché une alternative plus simple et moins chronophage que les tests en enceintes réalisés par [Ben Issa et al. \(2016\)](#). Après une phase de mise au point, nous avons constaté que les pucerons pouvaient se reproduire avec des taux de fécondité comparables à ceux obtenus sur plante entière lorsqu'ils étaient placés sur des feuilles de poivrons isolées et conservées sur du gel d'agar en boîte de Pétri. Ce dispositif permet de réaliser des séries importantes en individualisant le suivi de la ponte des femelle (1 par boîte). C'est une différence notable avec les essais en enceinte climatique de [Ben Issa et al. \(2016\)](#) où il est impossible d'individualiser les pontes, sauf à isoler dans des cages chacune des 10 femelles déposées sur une même plante. Par contre nous ne pouvons pas contrôler en boîte de pétri l'effet d'une PdS entière, et le détachement d'un organe peut générer des modifications du métabolisme et donc du message olfactif.

Le premier screening bien que réalisé à partir d'organes détachés de la plante a permis de mettre en évidence l'effet des COV émis par *O. basilicum* et par *T. patula* sur la reproduction de *M. persicae*. Il a été ensuite complété par un suivi de la fécondité sur des larves élevées sur des plantes entières de poivron cultivées en association ou non avec des PdS sous tunnel.

Le suivi de taux de fécondité journalier sur le milieu gélosé en laboratoire et sur des plantes entières sous tunnel conduit aux mêmes conclusions et montre un effet négatif sur la reproduction des femelles en présence des PdS candidates. Ces observations sont en accord avec des études antérieures réalisées sur plante entière en laboratoire ([Ben Issa et al., 2016](#)).

Nos observations ont montré que les pucerons n'ont pas refusé totalement de s'installer sur la feuille de poivron (en clip-cages ou en boîte de Pétri) et continuent à se nourrir (en EPG) en présence de COV des PdS. Par contre, leur comportement alimentaire est affecté comme en attestent des modifications significatives des paramètres caractérisant leur comportement alimentaire et avec notamment une diminution de la durée de prélèvement de sève élaborée, qui pourrait perturber la démographie du puceron (retard de développement de la larve et diminution de la fécondité). Dans nos conditions, nous avons contraint les pucerons à rester sur les feuilles de poivrons même en présence de COV répulsifs ; c'est le cas pour les pucerons placés dans les clip-cages, dans les boîtes de Pétri ou pour les pucerons câblés en EPG qui ne peuvent pas quitter la feuille même si les conditions sont défavorables à leur installation ([Alvarez et al., 2006](#)). Par

conséquent, nous ne pouvions pas étudier un effet répulsif (fuite de puceron), mais les analyses des paramètres d'EPG ont montré que les pucerons étaient gênés par des COV répulsifs.

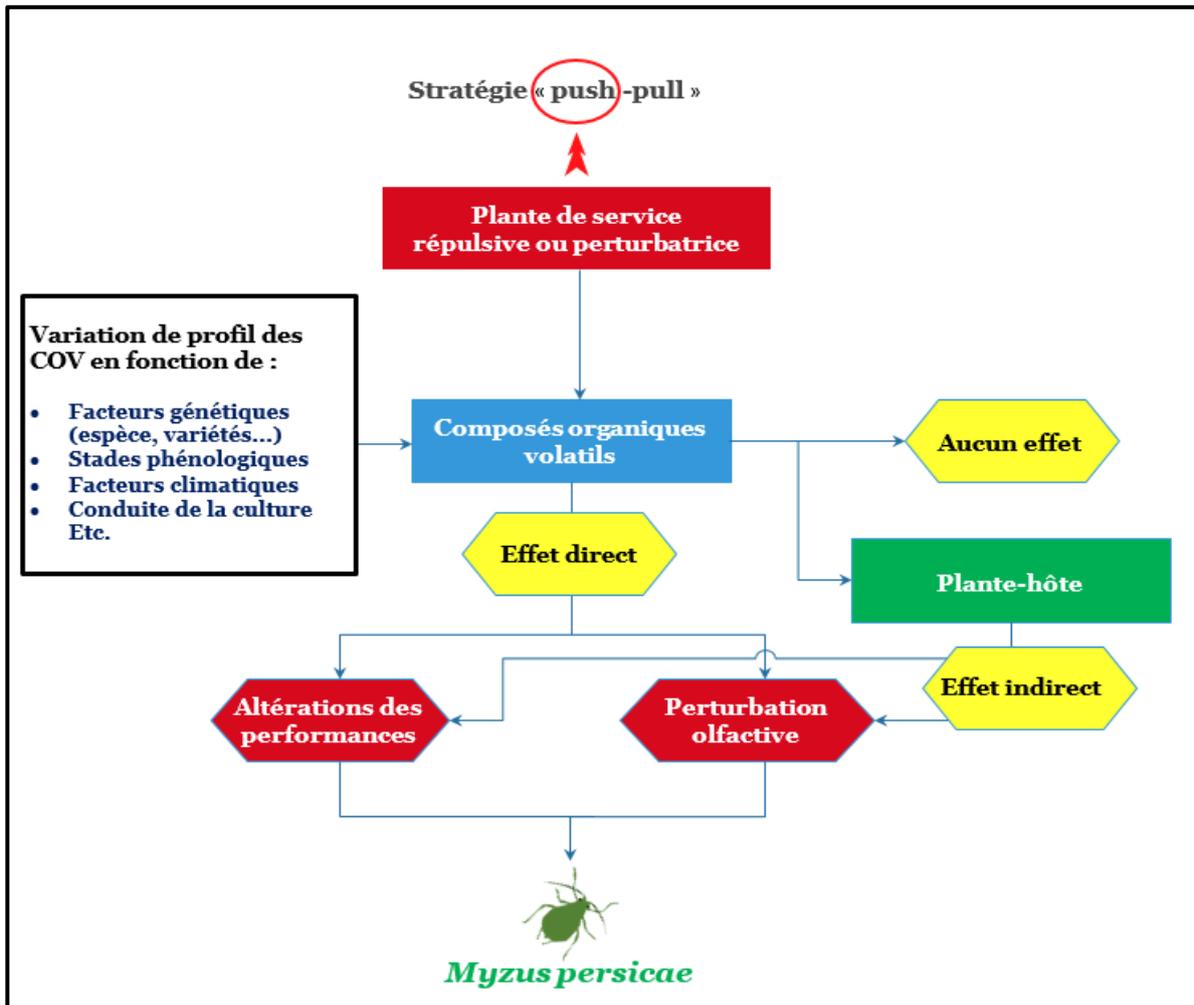
Or, dans des conditions naturelles, à la perception des COV répulsifs tels que l'EBF, les pucerons ne pondent plus de larves et quittent la plante (Powell et al., 2006). Les résultats différents observés dans nos expérimentations pourraient être dus à un phénomène d'habituation lié à une perception en continue des COV répulsifs. Dans nos expérimentations la perception de certains COV répulsifs peut ne pas se traduire par un phénomène de fuite, mais par une consommation plus importante d'énergie à la recherche de nourriture qui reste moins fructueuse comme le montre la diminution du temps d'alimentation. Ceci se traduit par des impacts négatifs sur le potentiel reproductif (de Vos et al., 2010) et sur le développement de sa population (Webster, 2012).

Nous avons observé une prise alimentaire perturbée par la présence de ces médiateurs chimiques dans son atmosphère. Eventuellement, nous pouvons donc supposer que l'impact des molécules répulsives sur la reproduction de puceron est la conséquence d'un comportement alimentaire perturbé.

Conclusions & perspectives

Conclusions & perspectives

Dans un contexte de réduction de l'usage des pesticides, mon sujet de thèse avait pour but de contribuer au développement de méthodes alternatives aux pesticides pour aider au contrôle du puceron vert du pêcher (*M. persicae*). Ainsi, le premier objectif consistait à identifier des plantes de service (PdS) à associer aux cultures à protéger afin de perturber le comportement olfactif et les performances de *M. persicae* et ainsi limiter ses effets néfastes (Ben Issa *et al.*, 2017b).



Notre première tâche fut de mettre au point et de développer des techniques de typage rapides et pertinentes. Cette étape de typage a permis d'évaluer et de comparer les effets de plusieurs plantes de service sur le comportement de *M. persicae*. Elle nous a montré que la variabilité génétique pouvait affecter la production des COV de la PdS et ses propriétés anti-aphides. En cela, le choix du génotype constitue un des leviers que l'on peut utiliser pour améliorer l'efficacité d'une PdS.

Conclusions & perspectives

D'autre part, le stade phénologique peut expliquer des niveaux d'efficacité différents des PdS, ce qui peut être lié à la présence ou à l'absence de certains organes. Les tests de typage, mais également les tests EPG ont permis de mettre en évidence les modes d'actions putatifs des PdS : par perception directe du message olfactif par le puceron, et/ou indirecte *via* la plante hôte. Nous avons ensuite validé la pertinence de notre processus de screening des PdS en évaluant leur effet sur la démographie de *M. persicae* dans une expérimentation sous tunnel, en environnement semi-contrôlé. Ces essais sous tunnel ont permis de confirmer que la présence des COV émis par les PdS sélectionnées peut perturber le développement et la reproduction des pucerons. Les tests de fécondité ont également montré que les mélanges de COV libérés par différentes parties de la PdS pouvaient avoir des effets différents sur les performances de *M. persicae*. Ce sont les fleurs qui confèrent à *T. patula* sa capacité à freiner la reproduction de *M. persicae*. *A contrario*, *O. basilicum* perd au stade floral, l'efficacité manifestée au stade végétatif, ce qui concorde avec les observations faites par Ben Issa lors d'essais sous tunnels (communication personnelle). Ainsi, le stade phénologique, et sans doute l'âge de la plante, ont un impact sur les caractéristiques du mélange olfactif libéré et par conséquent sur les propriétés des PdS. Ceci est une information importante qui doit nous guider pour réaliser des associations de culture pertinentes. Par exemple, on peut en déduire que l'introduction de *T. patula* au stade végétatif dans un système de culture ne sera pas efficace.

Comme nous l'avons mentionné, la production de COV est déterminante pour l'efficacité de PdS contre les ravageurs. Les effets observés restent cependant relativement limités pour freiner de façon significative la dynamique de développement des pucerons. Une perspective consiste à évaluer la production de COV selon l'environnement abiotique et à favoriser l'émission des profils de COV d'intérêt en agissant sur la conduite culturale (densité des cultures, aménagement de la parcelle, fertilisation, irrigation...) qui est en effet un levier potentiel pour améliorer l'efficacité d'une PdS. Par manque de temps, nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse lors d'une expérimentation sous tunnel. Cependant, nous avons pu tester les conséquences d'une privation d'eau sur la production de COV par *T. patula* en fleur (données non présentées). Les résultats de ce test montrent qu'un stress hydrique provoque une baisse de la capacité répulsive de *T. patula*. C'est un exemple qui témoigne de l'intérêt de considérer ce type de paramètre abiotique pour optimiser l'introduction d'une PdS dans un système de culture.

Un autre levier pour améliorer le potentiel d'une PdS passe par la connaissance des modes et sites d'action mis en jeu. En effet, en plus des effets directs des COV sur *M. persicae*, les effets de PdS sur la plante-hôte peuvent être un mode d'action important à développer pour affecter les performances du puceron. Il serait intéressant d'étudier s'il existe un effet synergique de ces deux modes d'action ; ainsi, une combinaison des modes d'actions directs et indirects pourrait-elle

Conclusions & perspectives

offrir une protection plus importante et plus durable ? Or, si l'implication des COV, par des effets directs et indirects, ne fait plus aucun doute, nous ne savons pas encore comment ils agissent pour repousser les pucerons ou diminuer leurs performances. Si des tests olfactométriques ont mis en évidence un effet indirect de la tagète, la méthode d'échantillonnage par SPME utilisée ne nous a malheureusement pas permis d'identifier des différences qualitatives entre les profils de COV émis par une plante de poivron pré-conditionnée et celui d'une plante qui ne l'est pas. La difficulté est probablement liée aussi aux faibles quantités de COV émis par les jeunes plantes de poivron. Il faudrait développer d'autres techniques d'extraction (Prabakaran *et al.*, 2017) ou augmenter la densité de plantes-hôtes. Des tests EPG ont été réalisés pour expliquer l'effet des COV de la PdS. Bien que les deux PdS agissent par deux modes d'action différents (direct pour le basilic et indirect pour la tagète), nous avons observé des effets assez similaires sur le comportement alimentaire de *M. persicae*. Ces effets sont apparus en présence de PdS et peuvent être liés à des changements dans le métabolisme de plante, qui modifient la composition chimique interne de la plante (composés volatils et non-volatils) ou la composition de surface des feuilles (résistance chimique induit par la PdS). Pour éclairer les incertitudes sur le mode d'action indirect de la PdS *via* la plante hôte, il aurait été intéressant de réaliser des tests de fécondité et des suivis du comportement alimentaire en EPG sur des plantes juste pré-conditionnées puis de voir si la perturbation du comportement de ponte ou alimentaire perdurait au cours du temps.

Des analyses biochimiques des feuilles de poivrons prélevés au cours de ces différentes expérimentations sont actuellement en cours, et pourraient nous renseigner sur une modification du métabolisme du poivron en présence de PdS, qui pourrait par exemple se traduire par des compositions différentes en acides aminés, en sucres ou en composés de défense (voie active). Ces données nous apporteront des indications précieuses sur les modifications éventuelles induites lors du pré-conditionnement des plantes par les COV de tagète ; on ne sait pas, en particulier, s'il s'agit d'un effet qui perdure ou non. Ce pré-conditionnement pourrait également ne pas modifier la composition interne tissulaire des feuilles de poivron mais être lié à une adsorption des COV sur la surface de la feuille (voie passive). Il faudrait donc caractériser la composition de la surface des feuilles et voir si les COV de la PdS se retrouvent piégés dans la cuticule de plante hôte. Pour aller plus loin dans la caractérisation des COV impliqués dans la réponse de *M. persicae*, l'Electro-Antenno-Graphie (EAG), qui mesure la sensibilité olfactive des antennes en réponse à des stimulations odorantes, serait un outil à utiliser pour identifier les volatils mineurs de poivron induits par la présence de *T. patula*. Ceci pourrait également permettre repérer des COV d'intérêt qui sont actifs sur *M. persicae* mais non-détectables en GC-MS (Visser and Piron, 1995b; Birkett *et al.*, 2000).

Conclusions & perspectives

Outre la finalité annoncée d'optimiser l'efficacité de l'introduction d'une PdS dans un système de culture, nos travaux peuvent être aussi utiles à la conception et l'utilisation de diffuseur de COV répulsifs (*i.e.* l'EBF, l'eugénol à effet direct) ou de COV agissant sur le métabolisme de la plante (*i.e.* β -ocimène) (Kang *et al.*, 2018). Ces diffuseurs pourraient d'ailleurs être associé à l'emploi d'une PdS pour renforcer ou relayer son effet dans le temps et dans l'espace. Ceci peut faire l'objet de futures recherches en conditions contrôlées pour à terme être intégré aux pratiques culturales. Dans ce contexte, il serait pertinent de prolonger l'analyse individuelle des différents COV, en réalisant une gamme de concentrations et en établissant une courbe de réponse des pucerons pour chacun d'eux.

Nous avons aussi montré que l'efficacité d'un bouquet olfactif est plus le fruit d'un mélange et d'interactions entre composés qu'une somme d'effets individuels des COV répulsifs présents. En effet, le niveau de production d'un COV même très répulsif ne peut constituer un marqueur fiable de l'efficacité d'une PdS. Ainsi donc, l'identification du cocktail olfactif responsable de l'efficacité d'une PdS serait une première étape. Cependant, les diverses comparaisons de profils de COV de PdS répulsives ou non que nous avons réalisées ne nous ont pas permis de conclure quant à leur effet. Pour l'heure, nous avons seulement pu identifier la présence dans les mélanges olfactifs de composés répulsifs. L'analyse des COV de toutes les modalités testées sera effectuée par la suite. Une des clés pour aller plus loin dans l'identification des mélanges efficaces pour perturber l'installation du puceron sera de rassembler l'ensemble des données des COV émis par les différentes espèces et chémotypes à différents stades phénologiques, et de rechercher des corrélations entre ces profils et les réponses des pucerons en termes de fécondité ou de répulsion. On pourrait aussi reconstituer au mieux le bouquet de substances volatiles émises par les PdS candidates, puis réaliser des variantes en amputant ce mélange d'un ou plusieurs COV, pour essayer d'isoler la combinaison olfactive la plus efficace (Bruce and Pickett, 2011).

Au cours de cette thèse, nous avons été amenés à effectuer des expérimentations supplémentaires non décrites dans ce rapport, dont la plus intéressante est la mise au point d'un olfactomètre tubulaire dynamique permettant d'apprécier le phénomène de fuite liée aux COV. Il servira à tester directement l'effet répulsif de différentes plantes, ou de mélanges de plantes ou de COV, ce qui sera utile pour préciser quelles combinaisons entre génotype, pratiques et environnement sont les plus efficaces contre les pucerons.

Par ailleurs, en lien avec le contexte de notre étude, nous nous sommes focalisés sur les effets négatifs des COV de PdS sur *M. persicae*. Or, dans la nature ces PdS peuvent rendre d'autres services écologiques et améliorer la protection de la culture, notamment en attirant et favorisant des ennemis naturels. Il reste à présent à le vérifier en milieu ouvert, dans des vergers. Il s'agit donc de mettre en application ces résultats de recherche et de travailler sur l'opérationnalité de la

Conclusions & perspectives

technique et la faisabilité de sa mise en œuvre en termes d'agencement de la parcelle, de densité de PdS et de distance PdS-arbres. Pour rendre applicable l'association de plantes pérennes et de PdS, il est important de mesurer l'effet de l'introduction de PdS sur les communautés biologiques du verger impliquées dans le service écosystémique de régulation (ravageurs, auxiliaires) et la production (production fruitière et valorisation de la PdS). Comme les COV répulsifs peuvent favoriser les déplacements de pucerons d'une plante à l'autre, l'ajout de PdS pourrait également favoriser l'inoculation des phytovirus aux plantes voisines et à toute la parcelle (Powell *et al.*, 1996). Il serait donc intéressant d'étudier l'incidence des COV répulsifs sur la transmission des phytovirus.

Ces premières données seront à confronter dans le cadre de recherches participatives à des essais mis en place par des partenaires de la profession et des agriculteurs. La capitalisation de ces différentes expériences sera nécessaire pour développer un travail de re-conception des systèmes de culture et/ou des espaces de production avec les utilisateurs finaux (les agriculteurs) pour une opérationnalité de l'approche dans différentes situations. Des travaux sont en cours de développement pour coupler ces deux volets d'étude complémentaires (travaux de recherche-expérimentation avec les connaissances des agriculteurs) afin d'identifier des pistes pour une gestion des ravageurs *via* des systèmes de culture innovants, adaptés au contexte socio-économique des exploitations et techniquement réalistes, et aller vers la conception de paysages olfactifs plus favorables au contrôle des ravageurs.

Références

Références

- Abdelgaleil, S. A., Mohamed, M. I., Badawy, M. E. & El-arami, S. A. (2009). Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *J Chem Ecol* 35(5): 518-525.
- Abtew, A., Subramanian, S., Cheseto, X., Kreiter, S., Garzia, G. T. & Martin, T. (2015). Repellency of Plant Extracts against the Legume Flower Thrips *Megalurothrips sjostedti* (Thysanoptera: Thripidae). *Insects* 6(3): 608-625.
- Aharoni, A., Giri, A. P., Deurlein, S., Griepink, F., de Kogel, W. J., Verstappen, F. W., Verhoeven, H. A., Jongsma, M. A., Schwab, W. & Bouwmeester, H. J. (2003). Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell* 15(12): 2866-2884.
- Altieri, M. A. & Letourneau, D. K. (1982). Vegetation management and biological control in agroecosystems. *Crop Protection* 1: 405-430.
- Alvarez, A. E., Garzo, E., Verbeek, M., Vosman, B., Dicke, M. & Tjallingii, W. F. (2007). Infection of potato plants with potato leafroll virus changes attraction and feeding behaviour of *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 125(2): 135-144.
- Alvarez, A. E., Tjallingii, W. F., Garzo, E., Vleeshouwers, V. & Vosman, M. D. B. (2006). Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing Solanum species to the aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 121: 145–157.
- Amarawardana, L., Bandara, P., Kumar, V., Pettersson, J., Ninkovic, V. & Glinwood, R. (2007). Olfactory response of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) to volatiles from leek and chive: Potential for intercropping with sweet pepper. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science* 57(1): 87-91.
- Ameline, A., Couty, A., Dugravot, S., Campan, E., Dubois, F. & Giordanengo, P. (2007). Immediate alteration of *Macrosiphum euphorbiae* host plant-selection behaviour after biotic and abiotic damage inflicted to potato plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 123(2): 129-137.
- Ameline, A., Couty, A., Martoub M & Giordanengo, P. (2009). Effects of mineral oil application on the orientation and feeding behaviour of *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphidae). *Acta Entomologica Sinica* 52(6): 617–623.
- Ameline, A., Couty, A., Martoub, M., Sourice, S. & Giordanengo, P. (2010). Modification of *Macrosiphum euphorbiae* colonisation behaviour and reproduction on potato plants treated by mineral oil. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 135(1): 77-84.
- Amiri-Jami, A. R., Sadeghi, H. & Shoor, M. (2012). The performance of *Brevicoryne brassicae* on ornamental cabbages grown in CO₂-enriched atmospheres. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15(2): 249-253.
- Andow, D. A. (1991). Vegetational diversity and arthropod population response. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 561-586.

- Arimura, G. I., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W. & Takabayashi, J. (2000). Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* 406: 512–515.
- Babikova, Z., Gilbert, L., Bruce, T. J. A., Birkett, M., Caulfield, J. C., Woodcock, C., Pickett, J. A., Johnson, D. & van Dam, N. (2013). Underground signals carried through common mycelial networks warn neighbouring plants of aphid attack. *Ecology Letters* 16(7): 835–843.
- Baldwin, I. T. (2010). Plant volatiles. *Curr Biol* 20(9): R392-397.
- Baldwin, I. T. & Schultz, J. C. (1983). Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. *Science* 221(4607): 277-279.
- Bandara, K., Kumar, V., Ninkovic, V., Ahmed, E., Pettersson, J. & Glinwood, R. (2009). Can Leek Interfere With Bean Plant-Bean Fly Interaction? Test of Ecological Pest Management in Mixed Cropping. *Journal of Economic Entomology* 102(3): 999-1008.
- Basedow, T., Hua, L. & Aggarwal, N. (2006). The infestation of *Vicia faba* L. (Fabaceae) by *Aphis fabae* (Scop.) (Homoptera: Aphididae) under the influence of Lamiaceae (*Ocimum basilicum* L. and *Satureja hortensis* L.). *Journal of Pest Science* 79(3): 149-154.
- Bass, C., Puinean, A. M., Zimmer, C. T., Denholm, I., Field, L. M., Foster, S. P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R. & Williamson, M. S. (2014). The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 51: 41-51.
- Ben Issa, R., Gautier, H., Costagliola, G. & Gomez, L. (2016). Which companion plants affect the performance of green peach aphid on host plants? Testing of 12 candidate plants under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 160(2): 164-178.
- Ben Issa, R., Gautier, H. & Gomez, L. (2017a). Influence of neighbouring companion plants on the performance of aphid populations on sweet pepper plants under greenhouse conditions. *Agricultural and Forest Entomology* 19(2): 181-191.
- Ben Issa, R., Gomez, L. & Gautier, H. (2017b). Companion Plants for Aphid Pest Management. *Insects* 8(4): 112-131.
- Bermingham, J. & Wilkinson, T. L. (2009). Embryo nutrition in parthenogenetic viviparous aphids. *Physiological Entomology* 34(2): 103-109.
- Bernays, E. A. (2001). Neural limitations in phytophagous insects: implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annual Review of Entomology* 46(1): 703-727.
- Birkett, M. A., Campbell, C. A. M., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Hick, A. J., Martin, J. L., Matthes, M., Napier, J. A., Pettersson, J., Pickett, J. A., Poppy, G. M., Pow, E. M., Pye, B. J., Smart, L. E., Wadhams, G. H., Wadhams, L. J. & Woodcock, C. M. (2000). New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(16): 9329-9334.
- Birkett, M. A. & Pickett, J. A. (2003). Aphid sex pheromones: from discovery to commercial production.
- Blackman, R. L. & Eastop, V. F. (2000). *Aphids on the World's Crop: And Identification and Information Guide*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.

- Boevé, J.-L., Honraet, K. & Rossel, B. (2014). Screening of Repellents against Vespid Wasps. *Insects* 5(1): 272-286.
- Boullis, A., Fassotte, B., Sarles, L., Lognay, G., Heuskin, S., Vanderplanck, M., Bartram, S., Haubruge, E., Francis, F. & Verheggen, F. J. (2017). Elevated Carbon Dioxide Concentration Reduces Alarm Signaling in Aphids. *J Chem Ecol* 43(2): 164-171.
- Boullis, A., Francis, F. & Verheggen, F. J. (2015). Climate Change and Tritrophic Interactions: Will Modifications to Greenhouse Gas Emissions Increase the Vulnerability of Herbivorous Insects to Natural Enemies? *Environmental Entomology* 44(2): 277-286.
- Bracho-Nunez, A., Welter, S., Staudt, M. & Kesselmeier, J. (2011). Plant-specific volatile organic compound emission rates from young and mature leaves of Mediterranean vegetation. *Journal of Geophysical Research* 116(D16).
- Branco, M., Pereira, J. S., Mateus, E., Tavares, C. & Paiva, M. R. (2010). Water stress affects *Tomicus destruens* host pine preference and performance during the shoot feeding phase. *Annals of Forest Science* 67(6): 608-608.
- Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E. & Blanc, S. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *C R Biol* 333(6-7): 524-538.
- Brennan, E. B. (2013). Agronomic aspects of strip intercropping lettuce with alyssum for biological control of aphids. *Biological Control* 65(3): 302-311.
- Broad, S. T., Schellhorn, N. A., Lisson, S. N., Mendham, N. J. & Corkrey, R. (2008). Host location and parasitism of *Brevicoryne brassicae* in diversified broccoli cropping systems. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 129(2): 166-171.
- Bromley, A. K. & Anderson, M. (1982). An electrophysiological study of olfaction in the aphid *Nasonovia ribis-nigri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 32: 101-110.
- Bruce, T. J. & Pickett, J. A. (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects-finding the right mix. *Phytochemistry* 72(13): 1605-1611.
- Bruce, T. J. A. (2014). Glucosinolates in oilseed rape: secondary metabolites that influence interactions with herbivores and their natural enemies. *Annals of Applied Biology* 164(3): 348-353.
- Bruce, T. J. A., Birkett, M. A., Blande, J., Hooper, A. M., Martin, J. L., Khambay, B., Prosser, I., Smart, L. E. & Wadhams, L. J. (2005a). Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Management Science* 61(11): 1115-1121.
- Bruce, T. J. A., Wadhams, L. J. & Woodcock, C. M. (2005b). Insect host location: a volatile situation. *Trends in Plant Science* 10(6): 269-274.
- Bruno, D., Grossi, G., Salvia, R., Scala, A., Farina, D., Grimaldi, A., Zhou, J. J., Bufo, S. A., Vogel, H., Grosse-Wilde, E., Hansson, B. S. & Falabella, P. (2018). Sensilla Morphology and Complex Expression Pattern of Odorant Binding Proteins in the Vetch Aphid *Megoura viciae* (Hemiptera: Aphididae). *Front Physiol* 9: 777.
- Cao, H. H., Wang, S. H. & Liu, T. X. (2014). Jasmonate- and salicylate-induced defenses in wheat affect host preference and probing behavior but not performance of the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Insect Sci* 21(1): 47-55.

- Cascone, P., Iodice, L., Maffei, M. E., Bossi, S., Arimura, G.-i. & Guerrieri, E. (2015). Tobacco overexpressing β -ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants. *Journal of Plant Physiology* 173: 28-32.
- Castro, A. M., Tapias, J., Ortiz, A., Benavides, P. & Góngora, C. E. (2017). Identification of attractant and repellent plants to coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 164(2): 120-130.
- Chapman, R. F., E.A. Bernays & Simpson, a. S. J. (1981). Attraction and repulsion of the aphid, *Cavariella aegopodii*, by plant odors *Journal of Chemical Ecology* 7(5): 881-888.
- Choh, Y., Shimoda, T., Ozawa, R., Dicke, M. & Takabayashi, a. J. (2004). Exposure of lima bean leaves to volatiles from herbivore-induced conspecific plants results in emission of carnivore attractants: active or passive process? *Journal of Chemical Ecology* 30(7).
- Clavijo McCormick, A., Gershenzon, J. & Unsicker, S. B. (2014). Little peaks with big effects: establishing the role of minor plant volatiles in plant-insect interactions. *Plant Cell Environ* 37(8): 1836-1844.
- Cook, S. M., Khan, Z. R. & Pickett, J. A. (2007). The Use of Push-Pull Strategies in Integrated Pest Management. *Annual Review of Entomology* 52(1): 375-400.
- Czerniewicz, P., Chrzanowski, G., Sprawka, I. & Sytykiewicz, H. (2018). Aphicidal activity of selected Asteraceae essential oils and their effect on enzyme activities of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pestic Biochem Physiol* 145: 84-92.
- Dahlin, I., Ninkovic, V. & Sheppard, A. (2013). Aphid performance and population development on their host plants is affected by weed-crop interactions. *Journal of Applied Ecology*: n/a-n/a.
- Dahlin, I., Vucetic, A. & Ninkovic, V. (2014). Changed host plant volatile emissions induced by chemical interaction between unattacked plants reduce aphid plant acceptance with intermorph variation. *Journal of Pest Science* 88(2): 249-257.
- Dancewicz, K. & Gabryś, B. (2008). Effect of extracts of garlic (*Allium sativum* L.), wormwood (*Artemisia absinthium* L.) and tansy (*Tanaceum vulgare* L.) on the behaviour of the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.) during the settling on plants. *Pestycydy/Pesticides*: 93-99.
- Dancewicz, K., Sznajder, K., Załuski, D., Kordan, B. & Gabryś, B. (2016). Behavioral sensitivity of *Myzus persicae* to volatile isoprenoids in plant tissues. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 160(3): 229-240.
- Dardouri, T., Gautier, H., Costagliola, G. & Gomez, L. (2017). How French marigold (*Tagetes patula* L.) volatiles can affect the performances of green peach aphid? In *Integrated Protection of Fruit Crops*, 71-78 (Ed IOBC). Thessaloniki, Greece: WPRS Bulletin.
- Dardouri, T., Gomez, L., Schoeny, A., Costagliola, G. & Gautier, H. (annexe 1). Behavioural response of green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) to volatiles from different rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones.
- Darshanee, H. L. C., Ren, H., Ahmed, N., Zhang, Z. F., Liu, Y. H. & Liu, T. X. (2017). Volatile-Mediated Attraction of Greenhouse Whitefly *Trialeurodes vaporariorum* to Tomato and Eggplant. *Front Plant Sci* 8: 1285.

- Das, B. C., Sarker, P. K. & Rahman, M. M. (2008). Aphidicidal activity of some indigenous plant extracts against bean aphid *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae). *Journal of Pest Science* 81(3): 153-159.
- Dawson, G. W., Griffiths, D. C., Pickett, J. A., Smith, M. C. & And Woodcock, C. M. (1984). Natural inhibition of the aphid alarm pheromone. *Entomologia Experimentalis Applicata* 36: 197–199.
- de Vos, M., Cheng, W. Y., Summers, H. E., Raguso, R. A. & Jander, G. (2010). Alarm pheromone habituation in *Myzus persicae* has fitness consequences and causes extensive gene expression changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(33): 14673-14678.
- Dedryver, C. A., Le Ralec, A. & Fabre, F. (2010). The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. *C R Biol* 333(6-7): 539-553.
- Deletre, E., Schatz, B., Bourguet, D., Chandre, F., Williams, L., Ratnadass, A. & Martin, T. (2016). Prospects for repellent in pest control: current developments and future challenges. *Chemoecology* 26(4): 127-142.
- Digilio, M. C., Mancini, E., Voto, E. & De Feo, V. (2008). Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *Journal of Plant Interactions* 3(1): 17-23.
- Dolan, M. C. & Panella, N. A. (2011). A Review of Arthropod Repellents. In *Recent Developments in Invertebrate Repellents*, Vol. 1090, 1-19 (Eds G. E. Paluch and J. R. Coats). Washington,: American Chemical Society.
- Dong, F., Fu, X., Watanabe, N., Su, X. & Yang, Z. (2016). Recent Advances in the Emission and Functions of Plant Vegetative Volatiles. *Molecules* 21(2): 124.
- Döring, T. F. (2014). How aphids find their host plants, and how they don't. *Annals of Applied Biology* 165(1): 3-26.
- Döring, T. F. & Röhrig, K. (2016). Behavioural response of winged aphids to visual contrasts in the field. *Annals of Applied Biology* 168(3): 421-434.
- dos Santos, R. C., Peñafior, M. F. G. V., Sanches, P. A., Nardi, C. & Bento, J. M. S. (2015). The effects of *Gibberella zeae*, Barley Yellow Dwarf Virus, and co-infection on *Rhopalosiphum padi* olfactory preference and performance. *Phytoparasitica* 44(1): 47-54.
- Dover, J. W. (1986). The effect of labiate herbs and white clover on *Plutella xylostella* oviposition
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K. & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist* 198(1): 16-32.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A. & Orlova, I. (2006). Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25(5): 417-440.
- Eigenbrode, S. D., Birch, A. N. E., Lindzey, S., Meadow, R., Snyder, W. E. & Pockock, M. (2016). REVIEW: A mechanistic framework to improve understanding and applications of push-pull systems in pest management. *Journal of Applied Ecology* 53(1): 202-212.
- Eigenbrode, S. D., Ding, H., Shiel, P. & Berger, P. H. (2002). Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269(1490): 455-460.

- Eilenberg, J., Hajek, A. & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46(4): 387–400.
- Fan, Z., Liou, P., Weschler, C., Fiedler, N., Kipen, H. & Zhang, J. (2003). Ozone-initiated reactions with mixtures of volatile organic compounds under simulated indoor conditions. *Environ Sci Technol* 37: 1811-1821.
- Fernandez-Grandon, G. M., Woodcock, C. M. & Poppy, G. M. (2013). Do asexual morphs of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*, utilise the aphid sex pheromone? Behavioural and electrophysiological responses of *M. persicae* virginoparae to (4aS,7S,7aR)-nepetalactone and its effect on aphid performance. *Bulletin of Entomological Research* 103(4): 466-472.
- Finch, S. & Collier, R. H. (2012). The influence of host and non-host companion plants on the behaviour of pest insects in field crops. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142(2): 87-96.
- Fountain, M. T., Baroffio, C., Borg-Karlson, A.-K., Brain, P., Cross, J. V., Farman, D. I., Hall, D. R., Ralle, B., Rendina, P., Richoz, P., Sigsgaard, L., Storberget, S., Trandem, N. & Wibe, A. (2017). Design and deployment of semiochemical traps for capturing *Anthonomus rubi* Herbst (Coleoptera: Curculionidae) and *Lygus rugulipennis* Poppius (Heteroptera: Miridae) in soft fruit crops. *Crop Protection* 99: 1-9.
- Gadenne, C., Barrozo, R. B. & Anton, S. (2016). Plasticity in Insect Olfaction: To Smell or Not to Smell? *Annu Rev Entomol* 61: 317-333.
- Ghanim, N. M. a. S. B. A. G. (2014). Control of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) by some aqueous plant extracts.
- Giordanengo, P. (2014). EPG-Calc: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod-Plant Interactions* 8(2): 163-169.
- Giordanengo, P., Brunissen, L., Rusterucci, C., Vincent, C., van Bel, A., Dinant, S., Girousse, C., Faucher, M. & Bonnemain, J. L. (2010). Compatible plant-aphid interactions: how aphids manipulate plant responses. *C R Biol* 333(6-7): 516-523.
- Gliessman, e. R. (1984). Multiple cropping systems: a basis for developing an alternative agriculture. In *Innovative biological technologies for lesser developed countries*, 69-86 (Ed O. o. T. Assessment). Washington D.C: U.S. Congress,.
- Glinwood, R., Ahmed, E., Qvarfordt, E., Ninkovic, V. & Pettersson, J. (2009). Airborne interactions between undamaged plants of different cultivars affect insect herbivores and natural enemies. *Arthropod-Plant Interactions* 3(4): 215-224.
- Glinwood, R., Ninkovic, V., Pettersson, J. & Ahmed, E. (2004). Barley exposed to aerial allelopathy from thistles (*Cirsium* spp.) becomes less acceptable to aphids. *Ecological Entomology* 29: 188–195.
- Goggin, F. L. (2007). Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives. *Curr Opin Plant Biol* 10(4): 399-408.
- Gross-Isseroff, R. & Lancet, D. (1988). Concentration-dependent changes of perceived odor quality. *Chemical Senses* 13(2): 191-204.
- Guerrieri, E. & Digilio, M. C. (2008). Aphid-plant interactions: a review. *Journal of Plant Interactions* 3(4): 223-232.

- Gurr, G. M. & Kvedaras, O. L. (2010). Synergizing biological control: Scope for sterile insect technique, induced plant defences and cultural techniques to enhance natural enemy impact. *Biological Control* 52(3): 198-207.
- Gutierrez, C., Fereres, A., Reina, M., Cabrera, R. & And Azucena, G.-C. (1997). Behavioral and sublethal effects of structurally related lower terpenes on *Myzus persicae*. *Journal of Chemical Ecology* 23(6).
- Haaland, C., Naisbit, R. E. & Bersier, L.-F. (2011). Sown wildflower strips for insect conservation: a review. *Insect Conservation and Diversity* 4(1): 60-80.
- Haddad, R., Khan, R., Takahashi, Y. K., Mori, K., Harel, D. & Sobel, N. (2008). A metric for odorant comparison. *Nat Methods* 5(5): 425-429.
- Halbert, S. E., Corsini, D., Wiebe, M. & Vaughn, S. F. (2009). Plant-derived compounds and extracts with potential as aphid repellents. *Annals of Applied Biology* 154(2): 303-307.
- Hallem, E. A. & Carlson, J. R. (2006). Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell* 125(1): 143-160.
- Hambäck, P. A., Ågren, J. & Ericson, L. (2000). Associational resistance: insect damage to purple loosestrife reduced in thickets of sweet gale. *Ecological Society of America* 84(7): 1784-1794.
- Han, B., Zhang, Q.-H. & Byers, J. A. (2012). Attraction of the tea aphid, *Toxoptera aurantii*, to combinations of volatiles and colors related to tea plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 144(3): 258-269.
- Hardie, J. (2017). Life Cycles and Polyphenism. In *Aphids as crop pests*, Vol. 2, 132 (Ed H. F. v. Emden, Harrington, R.). Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI.
- Harrison, K. V. & Preisser, E. L. (2016). Dropping Behavior in the Pea Aphid (Hemiptera: Aphididae): How Does Environmental Context Affect Antipredator Responses? *J Insect Sci* 16(1).
- Hassanali, A., Herren, H., Khan, Z. R., Pickett, J. A. & Woodcock, C. M. (2008). Integrated pest management: the push-pull approach for controlling insect pests and weeds of cereals, and its potential for other agricultural systems including animal husbandry. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363(1491): 611-621.
- Hatano, E., Kunert, G. & Weisser, W. W. (2010). Aphid wing induction and ecological costs of alarm pheromone emission under field conditions. *PLoS One* 5(6): e11188.
- Hegde, M., Oliveira, J. N., da Costa, J. G., Bleicher, E., Santana, A. E. G., Bruce, T. J. A., Caulfield, J., Dewhurst, S. Y., Woodcock, C. M., Pickett, J. A. & Birkett, M. A. (2011). Identification of Semiochemicals Released by Cotton, *Gossypium hirsutum*, Upon Infestation by the Cotton Aphid, *Aphis gossypii*. *Journal of Chemical Ecology* 37(7): 741-750.
- Hegde, M., Oliveira, J. N., da Costa, J. G., Loza-Reyes, E., Bleicher, E., Santana, A. E. G., Caulfield, J. C., Mayon, P., Dewhurst, S. Y., Bruce, T. J. A., Pickett, J. A. & Birkett, M. A. (2012). Aphid antixenosis in cotton is activated by the natural plant defence elicitor cis-jasmone. *Phytochemistry* 78: 81-88.
- Heil, M. & Karban, R. (2010). Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends in Ecology and Evolution* 25(3): 137-144.

- Heil, M. & Silva Bueno, J. C. (2007). Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(13): 5467-5472.
- Held, D. W., Gonsiska, P. and Potter, D. A. (2003). Evaluating companion planting and non-host masking odors for protecting roses from the Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae). *Horticultural Entomology* 96(1): 81-87
- Hendel-Rahmanim, K., Masci, T., Vainstein, A. & Weiss, D. (2007). Diurnal regulation of scent emission in rose flowers. *Planta* 226: 1491–1499.
- Herrbach, E. (1985a). Rôle des sémiochimiques dans les relations pucerons-plantes. I- Généralités et phéromones d'alarme. *Agronomie* 5(3): 283-286.
- Herrbach, E. (1985b). Rôle des sémiochimiques dans les relations pucerons-plantes. II- Les substances allélochimiques. *Agronomie* 5(4): 375-384.
- Hildebrand, D., Brown, G., Jackson, D. & Hamilton-Kemp, T. (1993). Effects of some leaf-emitted volatile compounds on aphid population increase. *Journal of Chemical Ecology* 1875–1887(9): 19.
- Hillocks, R. J. (2012). Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. *Crop Protection* 31(1): 85-93.
- Himanen, S. J., Blande, J. D., Klemola, T., Pulkkinen, J., Heijari, J. & Holopainen, J. K. (2010). Birch (*Betula* spp.) leaves adsorb and re-release volatiles specific to neighbouring plants - a mechanism for associational herbivore resistance? *New Phytologist* 186(3): 722-732.
- Holopainen, J. K. (2008). Importance of olfactory and visual signals of autumn leaves in the coevolution of aphids and trees. *Bioessays* 30(9): 889-896.
- Holopainen, J. K. & Gershenzon, J. (2010). Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in Plant Science* 15(3): 176-184.
- Holopainen, J. K., Semiz, G. & Blande, J. D. (2009). Life-history strategies affect aphid preference for yellowing leaves. *Biol Lett* 5(5): 603-605.
- Hori, M. (1998). Repellency of rosemary oil against *Myzus persicae* in a laboratory and in a greenhouse. *Journal of Chemical Ecology* 24(9): 1425-1432.
- Hori, M. (1999). Role of host plant odors in the host finding behaviors of aphids. *Applied Entomology and Zoology* 34(3): 293-298.
- Hori, M. & Komatsu, H. (1997). Repellency of rosemary oil and its components against the onion aphid, *Neotoxoptera formosana* (Takahashi) (Homoptera, Aphididae). *Applied Entomology and Zoology* 32(2): 303-310.
- Hu, H., Li, J., Delatte, T., Vervoort, J., Gao, L., Verstappen, F., Xiong, W., Gan, J., Jongsma, M. A. & Wang, C. (2018). Modification of chrysanthemum odour and taste with chrysanthemol synthase induces strong dual resistance against cotton aphids. *Plant Biotechnol J.*
- Hullé, M., Turpeau, E., Leclant, F. & Rahn, M.-J. (1998). *Les pucerons des arbres fruitiers : Cycles biologiques et activités de vol.* Paris

- Ikeura, H., Kobayashi, F. & Hayata, Y. (2012). Repellent Effect of Herb Extracts on the Population of Wingless Green Peach Aphid, *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Agricultural Science* 4(5).
- Iverson, A. L., Marín, L. E., Ennis, K. K., Gonthier, D. J., Connor-Barrie, B. T., Remfert, J. L., Cardinale, B. J., Perfecto, I. & Wilson, J. (2014). REVIEW: Do polycultures promote win-wins or trade-offs in agricultural ecosystem services? A meta-analysis. *Journal of Applied Ecology* 51(6): 1593-1602.
- Jakobs, R. & Muller, C. (2018). Effects of intraspecific and intra-individual differences in plant quality on preference and performance of monophagous aphid species. *Oecologia* 186(1): 173-184.
- Jankowska, B. (2007). Impact of intercropping white cabbage with Pot Marigold (*Calendula officinalis* L.) and French Marigold (*Tagetes patula* nana) on the occurrence of cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.), its parasitoid *Diaeretiella rapae* M'Intosh and predatory *Syrphidae*. *Aphids and Other Hemipterous Insects* 13(1): 199-209.
- Jankowska, B., Poniedziałek, M. & Jędrszczyk, E. (2009). Effect of intercropping white cabbage with French Marigold (*Tagetes patula* nana L.) and Pot Marigold (*Calendula officinalis* L.) on the colonization of plants by pest insects. *Folia Horticulturae* 21(1).
- Jiang, H., Wang, J., Song, L., Cao, X., Yao, X., Tang, F. & Yue, Y. (2016a). GCxGC-TOFMS Analysis of Essential Oils Composition from Leaves, Twigs and Seeds of *Cinnamomum camphora* L. Presl and Their Insecticidal and Repellent Activities. *Molecules* 21(4): 423.
- Jiang, Y., Ye, J., Li, S. & Niinemets, Ü. (2016b). Regulation of Floral Terpenoid Emission and Biosynthesis in Sweet Basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Plant Growth Regulation* 35(4): 921-935.
- Kahn, B. A., Rebek, E. J., Brandenberger, L. P., Reed, K. & Payton, M. E. (2017). Companion planting with white yarrow or with feverfew for squash bug, *Anasa tristis* (Hemiptera: Coreidae), management on summer squash. *Pest Manag Sci* 73(6): 1127-1133.
- Kang, Z.-W., Liu, F.-H., Zhang, Z.-F., Tian, H.-G. & Liu, T.-X. (2018). Volatile β -Ocimene Can Regulate Developmental Performance of Peach Aphid *Myzus persicae* Through Activation of Defense Responses in Chinese Cabbage *Brassica pekinensis*. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Kaplan, I. (2012). Trophic Complexity and the Adaptive Value of Damage-Induced Plant Volatiles. In *PLoS Biology*, Vol. 10.
- Kéita, S. M., Vincent, C., Schmita, J.-P., Jarnason, o. T. & Bélanger, A. (2000). Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae].
- Kennedy, J. S., C.O. B. & W.J.S., K. (1959). Host finding by aphids in the field : *Aphids fabae* scop. (gynoparae) and *Brevicoryne brassicae* (L.), with a re-appraisal of the role host finding behaviour in virus spread. *Annual Applied Biology* 47: 424-444.
- Kindlmann, P., Dixon, A. F. G. & Michaud, J. P. (2010). *Aphid Biodiversity under Environmental Change*. Springer, Dordrecht: Patterns and Processes.

- Klimánková, E., Holadová, K., Hajšlová, J., Čajka, T., Poustka, J. & Koudela, M. (2008). Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions. *Food chemistry* 107(1): 464-472.
- Kogel, w. J. D., VISSER, J. H. & TOI, R. w. H. M. V. (2000). Repellent odours to protect crops from aphids.
- Kollmann, M., Minoli, S., Joël, B., Uwe, H., Schachtner, J., Tagu, D. & Anton, S. (2011). Revisiting the anatomy of the central nervous system of a hemimetabolous model insect species: the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Cell and Tissue Research* 343(2): 343–355.
- Koorki, Z., Shahidi-Noghabi, S., Mahdian, K. & Pirmaoradi, M. (2018). Chemical Composition and Insecticidal Properties of Several Plant Essential Oils on the Melon Aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 21(2): 420-429.
- Koschier, E. H. & Sedy, K. A. (2003). Labiate essential oils affecting host selection and acceptance of *Thrips tabaci* lindeman. *Crop Protection* 22(7): 929-934.
- Koul, O. (2008). Phytochemicals and Insect Control: An Antifeedant Approach. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27(1): 1-24.
- Kunert, G., Reinhold, C. & Gershenzon, J. (2010). Constitutive emission of the aphid alarm pheromone, (E)-beta-farnesene, from plants does not serve as a direct defense against aphids. *BMC Ecology* 10: 23.
- Lamy, F., Dugravot, S., Cortesero, A. M., Chaminade, V., Faloya, V. & Poinso, D. (2017). One more step toward a push-pull strategy combining both a trap crop and plant volatile organic compounds against the cabbage root fly *Delia radicum*. *Environ Sci Pollut Res Int*.
- Lamy, F. C., Poinso, D., Cortesero, A.-M. & Dugravot, S. (2016). Artificially applied plant volatile organic compounds modify the behavior of a pest with no adverse effect on its natural enemies in the field. *Journal of Pest Science* 90(2): 611-621.
- Le Roux, V., Dugravot, S., Campan, E., Dubois, F., Vincent, C. & Giordanengo, P. (2008). Wild *Solanum* Resistance to Aphids: Antixenosis or Antibiosis? *Journal of Economic Entomology* 101(2): 584-591.
- Legeay, S., Clere, N., Apaire-Marchais, V., Faure, S. & Lapied, B. (2018). Unusual modes of action of the repellent DEET in insects highlight some human side effects. *Eur J Pharmacol* 825: 92-98.
- Llandres, A. L., Almohamad, R., Brevault, T., Renou, A., Tereta, I., Jean, J. & Goebel, F. R. (2018). Plant training for induced defense against insect pests: a promising tool for integrated pest management in cotton. *Pest Manag Sci*.
- Loreto, F., Ciccio, P., Cecinato, A., Brancaloni, E., Frattoni, M. & D., T. (1996). Influence of Environmental Factors and Air Composition on the Emission of [alpha]-Pinene from *Quercus ilex* Leaves. *Plant Physiology* 110(1): 1317–1322.
- Maffei, M. E. (2010). Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany* 76(4): 612-631.
- Maffei, M. E., Mithofer, A. & Boland, W. (2007). Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry* 68(22-24): 2946-2959.

- Maia, M. & Moore, S. J. (2011). Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal* 10(Suppl 1): S11.
- Malézieux, E., Crozat, Y., Dupraz, C., Laurans, M., Makowski, D., Ozier-Lafontaine, H., Rapidel, B., Tourdonnet, S. & Valantin-Morison, M. (2009). Mixing plant species in cropping systems: concepts, tools and models. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 29(1): 43-62.
- Mamoci, E., Cavoski, I., Andres, M. F., Díaz, C. E. & Gonzalez-Coloma, A. (2012). Chemical characterization of the aphid antifeedant extracts from *Dittrichia viscosa* and *Ferula communis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 43: 101-107.
- Marangoni, B., Rombolà, A. D. & Sorrenti, G. (2004). Use of natural compounds for plant nutrition and protection in organic farmed orchards In *Integrated plant protection in stone fruit*, Vol. 27, 129-136 (Ed I. w. Bulletin).
- Marin, M., Koko, V., Duletić-Laušević, S., Marin, P. D., Rančić, D. & Dajic-Stevanovic, Z. (2006). Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. *South African Journal of Botany* 72(3): 378-382.
- Materic, D., Bruhn, D., Turner, C., Morgan, G., Mason, N. & Gauci, V. (2015). Methods in plant foliar volatile organic compounds research. *Appl Plant Sci* 3(12).
- Matson, P. A., W. J. Parton, A. G. Power & Swift, M. J. (1997). Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *SCIENCE*. www.sciencemag.org 277: 504-509.
- Mauck, K. E., De Moraes, C. M. & Mescher, M. C. (2010). Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8): 3600-3605.
- Miresmailli, S., Bradbury, R. & Isman, M. B. (2006). Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. *Pest Manag Sci* 62(4): 366-371.
- Moayeri, H. R. S., Ashouri, A., Poll, L. & Enkegaard, A. (2007). Olfactory response of a predatory mirid to herbivore induced plant volatiles: multiple herbivory vs. single herbivory. *Journal of Applied Entomology* 131(5): 326-332.
- Mondédji, A. D., Ketoh, G. K., Amévoin, K., Ameline, A., Giordanengo, P. & Glitho, I. A. (2014). Evaluation of neem leaves-based preparations as insecticidal agents against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sternorrhyncha: Aphididae). *African Journal of Agricultural Research* 9(17): 1344-1352.
- Moreno, C. R. & Racelis, A. E. (2015). Attraction, Repellence, and Predation: Role of Companion Plants in Regulating *Myzus persicae*(Sulzer) (Hemiptera: Aphidae) in Organic Kale Systems of South Texas. *Southwestern Entomologist* 40(1): 1-14.
- Mutiga, S. K., Gohole, L. S. & Auma, E. O. (2010). Effects of integrating companion cropping and nitrogen application on the performance and infestation of collards by *Brevicoryne brassicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 134(3): 234-244.
- Mutyambai, D. M., Bruce, T. J., van den Berg, J., Midega, C. A., Pickett, J. A. & Khan, Z. R. (2016). An indirect defence trait mediated through igg-induced maize volatiles from neighbouring plants. *PLoS One* 11(7): e0158744.

- Najar-Rodriguez, A. J., Galizia, C. G., Stierle, J. & Dorn, S. (2010). Behavioral and neurophysiological responses of an insect to changing ratios of constituents in host plant-derived volatile mixtures. *J Exp Biol* 213(Pt 19): 3388-3397.
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J. & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* 96 101(1): 372-378.
- Ninkovic, V. (2003). Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. *Journal of Experimental Botany* 54(389): 1931-1939.
- Ninkovic, V., Dahlin, I., Vucetic, A., Petrovic-Obradovic, O., Glinwood, R. & B., W. (2013). Volatile Exchange between Undamaged Plants - a New Mechanism Affecting Insect Orientation in Intercropping. *PLoS One* 8(7): e69431.
- Norris, D. M. (1990). Repellents. In *Handbook of Natural Pesticides*, Vol. Insect Attractants and Repellents, 135-149 (Ed E. D. Morgan). Boca Raton: CRC Press.
- Nottingham, S. F. & Hardie, J. (1993). FLIGHT BEHAVIOR OF THE BLACK BEAN APHID, APHIS-FABAE, AND THE CABBAGE APHID, BREVICORYNE-BRASSICAE, IN HOST AND NONHOST PLANT ODOR. *Physiological Entomology* 18(4): 389-394.
- Nottingham, S. F., Hardie, J., Dawson, G., AJ, H., JA, P., LJ, W. & CM, W. (1991). BEHAVIORAL AND ELECTROPHYSIOLOGICAL RESPONSES OF APHIDS TO HOST AND NONHOST PLANT VOLATILES. *Journal of Chemical Ecology* 17(6): 1231-1242.
- Olivares-Donoso, R. & Niemeyer, H. M. (2005). Non-host volatiles do not affect host acceptance by alate virginoparae of *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) settled on the host plant surface. *European Journal of Entomology* 102(2): 303-304.
- Oluwafemi, S., Bruce, T. J. A., Pickett, J. A., Ton, J. & Birkett, M. A. (2010). Behavioral Responses of the Leafhopper, *Cicadulina storeyi* China, a Major Vector of Maize Streak Virus, to Volatile Cues from Intact and Leafhopper-Damaged Maize. *Journal of Chemical Ecology* 37(1): 40-48.
- Paré, P., W.. & Tumlinson, J. H. (1999). Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores. *Plant Physiology* 121: 325-331.
- Parker, J. E., Snyder, W. E., Hamilton, G. C. & Rodriguez-Saona, C. (2013). Companion Planting and Insect Pest Control.
- Parolin, P., Bresch, C., Desneux, N., Brun, R., Bout, A., Boll, R. & Poncet, C. (2012a). Secondary plants used in biological control: A review. *International Journal of Pest Management* 58(2): 91-100.
- Parolin, P., Bresch, C., Poncet, C. & Desneux, N. (2012b). Functional characteristics of secondary plants for increased pest management. *International Journal of Pest Management* 58(4): 369-377.
- Pascual-Villalobos, M. J., Cantó-Tejero, M., Vallejo, R., Guirao, P., Rodríguez-Rojo, S. & Cocero, M. J. (2017). Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. *Industrial Crops and Products*.
- Penuelas, J. & Staudt, M. (2010). BVOCs and global change. *Trends Plant Sci* 15(3): 133-144.

- Penvern, S., Bellon, S., Fauriel, J. & Sauphanor, B. (2010). Peach orchard protection strategies and aphid communities: Towards an integrated agroecosystem approach. *Crop Protection* 29(10): 1148-1156.
- Peterson, C. & Coats, J. (2001). Insect repellents - past, present and future. *Pesticide Outlook* 12(4): 154-158.
- Pettersson, J., Quiroz, A. & Fahad Ahmed, E. (1996). Aphid Antixenosis Mediated by Volatiles in Cereals. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* 46(2): 135-140.
- Pettersson, J., Tjallingii, W. F. & Hardie, J. (2007). Host-plant Selection and Feeding In *Aphids-As-Crop-Pests*, 87-113 (Ed H. H. VanEmden, R). CABI PUBLISHING-C A B INT, CABI PUBLISHING, WALLINGFORD OX10 8DE, OXON, ENGLAND.
- Pichersky, E. & Gershenzon, a. J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 237–243.
- Picimbon, J.-F. (2002). Les péri-récepteurs chimiosensoriels des insectes. *médecine/sciences* 18(11): 1089-1094.
- Pickett, J. A., Bruce, T. J. A. & Glinwood, R. T. (2017). Chemical Ecology. In *Aphids as crop pests*, Vol. 2, 177 (Ed H. F. v. Emden, Harrington, R.). Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI.
- Pickett, J. A., Wadhams, L. J. & Woodcock, C. M. (1992). The chemical ecology of aphids *Annual Review of Entomology* 37: 67-90.
- Pickett, J. A., Woodcock, C. M., Midega, C. A. O. & Khan, Z. R. (2014). Push–pull farming systems. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 125-132.
- Powell, G., Hardie, J. & Pickett, J. A. (1996). Effects of the repellent polygodial on stylet penetration behaviour and non-persistent transmission of plant viruses by aphids. *Journal of Applied Entomology* 120(1-5): 241–243.
- Powell, G., P. Maniar, S., Pickett, J. A. & Hardie, J. (1999). Aphid responses to non-host epicuticular lipids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91: 115–123.
- Powell, G., Tosh, C. R. & Hardie, J. (2006). Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary, and applied perspectives. *Annu Rev Entomol* 51: 309-330.
- Prabakaran, S., Ramu, L., Veerappan, S., Pemiah, B. & Kannappan, N. (2017). Effect of different solvents on volatile and non-volatile constituents of red bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and their in vitro antioxidant activity. *Journal of Food Measurement and Characterization* 11(4): 1531-1541.
- Prado, E. & Tjallingii, W. F. (2007). Behavioral evidence for local reduction of aphid-induced resistance *Journal of Insect Science* 7(1): 48.
- Prakash, O., Rout, P. K., Chanotiya, C. S. & Misra, L. N. (2012). Composition of essential oil, concrete, absolute and SPME analysis of *Tagetes patula* capitula. *Industrial Crops and Products* 37(1): 195-199.
- Pritchard, J. & Vickers, L. H. (2017). Aphids and Stress. In *Aphids as crop pests*, Vol. 2, 132 (Ed H. F. v. Emden, Harrington, R.). Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI.

- Prota, N., Bouwmeester, H. J. & Jongsma, M. A. (2014). Comparative antifeedant activities of polygodial and pyrethrins against whiteflies (*Bemisia tabaci*) and aphids (*Myzus persicae*). *Pest Manag Sci* 70(4): 682-688.
- Quiroz A, P. J., Pickett JA, Wadhams LJ & Niemeyer H M (1997). Semiochemicals mediating spacing behavior of bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* feeding on cereals. *Journal of Chemical Ecology* 23: 2599–2607.
- Rabatel, A., Febvay, G., Gaget, K., Duport, G., Baa-Puyoulet, P., Sapountzis, P., Bendridi, N., Rey, M., Rahbé, Y., Charles, H., Calevro, F. & Colella, S. (2013). Tyrosine pathway regulation is host-mediated in the pea aphid symbiosis during late embryonic and early larval development. *BMC Genomics* 14(1): 235.
- Rajabaskar, D., Ding, H., Wu, Y. & Eigenbrode, S. D. (2013). Behavioral Responses of Green Peach Aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), to the Volatile Organic Compound Emissions from Four Potato Varieties. *American Journal of Potato Research* 90(2): 171-178.
- Ratnadass, A., Fernandes, P., Avelino, J. & Habib, R. (2011). Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 32(1): 273-303.
- Regnault-Roger, C. (2013). Essential Oils in Insect Control. In *Natural Products*, Vol. 1, 4087-4107: Springer, Berlin, Heidelberg.
- Reisenman, C. E., Lei, H. & Guerenstein, P. G. (2016). Neuroethology of Olfactory-Guided Behavior and Its Potential Application in the Control of Harmful Insects. *Front Physiol* 7: 271.
- Robert, P.-C. (1986). Les relations plantes-insectes phytophages chez les femelles pondeuses : le rôle des stimulus chimiques et physiques. Une mise au point bibliographique. *Agronomie* 6(2): 127-142.
- Rosenblatt, A. E. & Schmitz, O. J. (2016). Climate Change, Nutrition, and Bottom-Up and Top-Down Food Web Processes. *Trends Ecol Evol* 31(12): 965-975.
- Roy, H. E., Pell, J. K. & Alderson, P. G. (1999). Effects of Fungal Infection on the Alarm Response of Pea Aphids *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 69–75.
- Rozman, V., Kalinovic, I. & Korunic, Z. (2007). Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 43(4): 349-355.
- Satar, S., Kersting, U. & Uygun, N. (2008). Effect of temperature on population parameters of *Aphis gossypii* Glover and *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) on pepper.
- Sauge, M.-H., Grechi, I. & Poëssel, J.-L. (2010). Nitrogen fertilization effects on *Myzus persicae* aphid dynamics on peach: vegetative growth allocation or chemical defence? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 136(2): 123-133.
- Sauge, M.-H., Kervella, J. & Pascal, T. (1998). Settling behaviour and reproductive potential of the green peach aphid *Myzus persicae* on peach varieties and a related wild Prunus. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 89(1): 233–242.
- Sauge, M.-H., Lacroze, J.-P., Poëssel, J.-L., Pascal, T. & Jocelyne, K. (2002). Induced resistance by *Myzus persicae* in the peach cultivar ‘Rubira’. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 102: 29–37.

- Schmucker, M., de Bruyne, M., Hahnel, M. & Schneider, G. (2007). Predicting olfactory receptor neuron responses from odorant structure. *Chem Cent J* 1: 11.
- Schröder, M. L., Glinwood, R., Webster, B., Ignell, R. & Krüger, K. (2015). Olfactory responses of *Rhopalosiphum padi* on three maize, potato, and wheat cultivars and the selection of prospective crop border plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 157(2): 241-253.
- Schröder, R., and Hilker, M. (2008). The Relevance of Background Odor in Resource Location by Insects: A Behavioral Approach. *BioScience* 58(4): 308-316.
- Schwarzkopf, A., Rosenberger, D., Niebergall, M., Gershenson, J. & Kunert, G. (2013). To feed or not to feed: plant factors located in the epidermis, mesophyll, and sieve elements influence pea aphid's ability to feed on legume species. *PLoS One* 8(9): e75298.
- Shrivastava, G., Rogers, M., Wszelaki, A., Panthee, D. R. & Chen, F. (2010). Plant Volatiles-based Insect Pest Management in Organic Farming. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29(2): 123-133.
- Slesak, E., Slesak, M. & Gabrys, B. (2001). Effect of methyl jasmonate on hydroxamic acid content, protease activity, and bird cherry–oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) probing behavior. *Journal of Chemical Ecology* 27(12).
- Smart, L. E., Aradottir, G. I. & Bruce, T. J. A. (2014). Role of Semiochemicals in Integrated Pest Management. 93-109.
- Song, B., Jiao, H., Tang, G. & Yao, Y. (2014). Combining Repellent and Attractive Aromatic Plants to Enhance Biological Control of Three Tortricid Species (Lepidoptera: Tortricidae) in an Apple Orchard. *Florida Entomologist* 97(4): 1679-1689.
- Song, B., Tang, G., Sang, X., Zhang, J., Yao, Y. & Wiggins, N. (2013). Intercropping with aromatic plants hindered the occurrence of *Aphis citricolain* in an apple orchard system by shifting predator–prey abundances. *Biocontrol Science and Technology* 23(4): 381-395.
- Stam, J. M., Kroes, A., Li, Y., Gols, R., van Loon, J. J., Poelman, E. H. & Dicke, M. (2014). Plant interactions with multiple insect herbivores: from community to genes. *Annu Rev Plant Biol* 65: 689-713.
- Stenberg, J. A. (2017). A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. *Trends Plant Sci* 22(9): 759-769.
- Stenberg, J. A., Heil, M., Ahman, I. & Bjorkman, C. (2015). Optimizing Crops for Biocontrol of Pests and Disease. *Trends Plant Sci* 20(11): 698-712.
- Storer, J. R. & Emden, a. H. E. v. (1995). Antibiosis and antixenosis of chrysanthemum cultivars to the aphid *Aphis gossypii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 77: 307-314.
- Storer, J. R., Powell, G. & Hardie, J. (1996). Settling responses of aphids in air permeated with non-host plant volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 76-78.
- Storer, J. R., Young, S. and Hardie, J. (1999). Three-dimensional analysis of aphid landing behaviour in the laboratory and field. *Physiological Entomology* 24: 271–277.
- Sun, H., Zhang, F., Chen, S., Guan, Z., Jiang, J., Fang, W. & Chen, F. (2015). Effects of aphid herbivory on volatile organic compounds of *Artemisia annua* and *Chrysanthemum morifolium*. *Biochemical Systematics and Ecology* 60: 225-233.

- Sunita Facknath, B. L. (2008). Study of Various Extracts of *Ayapana triplinervis* for their Potential in Controlling Three Insect Pests of Horticultural Crops.
- Swain, T. (1977). Secondary compounds as protective agents. *Plant Physiology* 28: 479-501.
- Tang, G. B., Song, B. Z., Zhao, L. L., Sang, X. S., Wan, H. H., Zhang, J. & Yao, Y. C. (2012). Repellent and attractive effects of herbs on insects in pear orchards intercropped with aromatic plants. *Agroforestry Systems* 87(2): 273-285.
- Tariq, M., Wright, D. J., Rossiter, J. T. & Staley, J. T. (2012). Aphids in a changing world: testing the plant stress, plant vigour and pulsed stress hypotheses. *Agricultural and Forest Entomology* 14(2): 177-185.
- Thibout, E. & Auger, J. (1997). Composés soufrés des *Allium* et lutte contre les insectes. *Acta Botanica Gallica* 144(4): 419-426.
- Thies, C. & Tschardt, T. (1999). Landscape Structure and Biological Control in Agroecosystems. *Science* 285(5429): 893-895.
- Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U. S. R. & Schnitzler, J.-P. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal* 45(4): 540-560.
- Tholl, D. & Lee, S. (2011). Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book* 9: e0143.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R. & Polasky, S. P. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671–677.
- Tiroesele, B. & Matshela, O. (2015). The Effect of Companion Planting on the Abundance of Cabbage Aphid, *Brevicoryne brassicae* L., on Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Journal of Plant and Pest Science* 2(3): 57-65.
- Tjallingii, W. F. (1978). Electronic recording of penetration behaviour by aphids. *Ent. exp. & appl.* 24: 521-530.
- Tjallingii, W. F. (1988). Electrical recording of stylet penetration activities. In *Aphids, their biology, natural enemies and control*, 95-108 (Eds A. K. Minks and P. Harrewijn). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Togni, P. H. B., Venzon, M., Muniz, C. A., Martins, E. F., Pallini, A. & Sujii, E. R. (2016). Mechanisms underlying the innate attraction of an aphidophagous coccinellid to coriander plants: Implications for conservation biological control. *Biological Control* 92: 77-84.
- Tomova, B. S., Waterhouse, J. S. & Doberski, J. (2005). The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115: 153–159.
- Traka, C. K., Petrakis, E. A., Kimbaris, A. C., Polissiou, M. G. & Perdakis, D. C. (2018). Effects of *Ocimum basilicum* and *Ruta chalepensis* hydrosols on *Aphis gossypii* and *Tetranychus urticae*. *Journal of Applied Entomology*.
- Ueda, H., Kikuta, Y. & Matsuda, K. (2012). Plant communication: mediated by individual or blended VOCs? *Plant signaling & behavior* 7(2): 222-226.
- Uvah, I. I. I. & Coaker, T. H. (1984). Effect of mixed cropping on some insect pests of carrots and onions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 36: 159-167.
- van Baaren, J., Le Lann, C. & van Alphen, J. J. (2010). Consequences of Climate Change for Aphid-Based Multi-trophic Systems. In *Aphid Biodiversity under Environmental Change*,

- 55-68 (Eds P. Kindlmann, A. F. G. Dixon and J. P. Michaud). Springer, Dordrecht: Patterns and Processes.
- van Emden, H., Eastop, V., Hughes, R. & Way, M. (1969). The ecology of *Myzus persicae*. *Annual Review of Entomology* 14: 197-270.
- Vandermeer, J. a., Meine, v. N. b., Jo Anderson c & Perfecto, C. O. I. (1998). Global change and multi-species agroecosystems: Concepts and issues *Agriculture. Ecosystems and Environment* 67: 1-22.
- Visser, J. H. & Piron, P. G. M. (1995a). OLFATORY ANTENNAL RESPONSES TO PLANT VOLATILES IN APTEROUS VIRGINOPARAE OF THE VETCH APHID MEGOURA-VICIAE. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 77(1): 37-46.
- Visser, J. H., Piron, P. G. M. & Hardie, J. (1996). The aphids' peripheral perception of plant volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 35-38.
- Visser, J. H. & Piron, R. G. M. (1995b). Olfactory antennal responses to plant volatiles in apterous virginoparae of the vetch aphid *Megoura viciae* *Entomologia Experimentalis et Applicata* 77: 37-46.
- Vucetic, A., Dahlin, I., Petrovic-Obradovic, O., Glinwood, R., Webster, B. & Ninkovic, V. (2014). Volatile interaction between undamaged plants affects tritrophic interactions through changed plant volatile emission. *Plant signaling & behavior* 9(8): e29517.
- Wang, W., Liu, Y., Chen, J., Ji, X., Zhou, H. & Wang, G. (2009). Impact of intercropping aphid-resistant wheat cultivars with oilseed rape on wheat aphid (*Sitobion avenae*) and its natural enemies. *Acta Ecologica Sinica* 29(3): 186-191.
- Webster, B., Bruce, T., Pickett, J. & Hardie, J. (2010). Volatiles functioning as host cues in a blend become nonhost cues when presented alone to the black bean aphid. *Animal Behaviour* 79(2): 451-457.
- Webster, B. E. N. (2012). The role of olfaction in aphid host location. *Physiological Entomology* 37(1): 10-18.
- Witzgall, P., Stelinski, L., Gut, L. & Thomson, D. (2008). Codling moth management and chemical ecology. *Annu Rev Entomol* 53: 503-522.
- Wubie, M., Negash, A., Guadie, F., Molla, G., Kassaye, K. & Nagappan, R. (2014). Repellent and insecticidal activity of *Mentha piperita* (L.) plant extracts against cabbage aphid [*Brevicoryne brassicae* Linn. (Homoptera: Aphididae)]. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 9(6): 150-156.
- Wyatt, T. D. (2018). Queen pheromones, colony odors, and better science: a comment on Holman. *Behavioral Ecology*.
- Xue, K., Deng, S., Wang, R., Yan, F. & Xu, C. (2008). Leaf surface factors of transgenic Bt cotton associated with the feeding behaviors of cotton aphids: a case study on non-target effects. *Sci China C Life Sci* 51(2): 145-156.
- Yarou, B. B., Bawin, T., Boullis, A., Heukin, S., Lognay, G., Verheggen, F. J. & Francis, F. (2017). Oviposition deterrent activity of basil plants and their essential oils against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environ Sci Pollut Res Int*.

- Zhang, R., Wang, B., Grossi, G., Falabella, P., Liu, Y., Yan, S., Lu, J., Xi, J. & Wang, G. (2017). Molecular basis of alarm pheromone detection in aphids. *Curr Biol* 27(1): 55-61.
- Zhang, Z., Bian, L., Sun, X., Luo, Z., Xin, Z., Luo, F. & Chen, Z. (2014a). Electrophysiological and behavioural responses of the tea geometrid *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae) to volatiles from a non-host plant, rosemary, *Rosmarinus officinalis*(Lamiaceae). *Pest Management Science* 71(1): 96-104.
- Zhang, Z. & Chen, Z. (2015). Non-host plant essential oil volatiles with potential for a 'push-pull' strategy to control the tea green leafhopper, *Empoasca vitis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 156(1): 77-87.
- Zhang, Z., Luo, Z., Gao, Y., Bian, L., Sun, X. & Chen, Z. (2014b). Volatiles from non-host aromatic plants repel tea green leafhopper *Empoasca vitis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 153(2): 156-169.
- Zhou, H.-b., Chen, J.-l., Liu, Y., Francis, F., Haubruge, E., Bragard, C., Sun, J.-r. & Cheng, D.-f. (2013). Influence of Garlic Intercropping or Active Emitted Volatiles in Releasers on Aphid and Related Beneficial in Wheat Fields in China *Journal of Integrative Agriculture* 12(3): 467-473.
- Zhu, J. & Park, K.-C. (2005). Methyl Salicylate, a Soybean Aphid-Induced Plant Volatile Attractive to the Predator *Coccinella septempunctata*. *Journal of Chemical Ecology* 31(8): 1733-1746.
- Züst, T. & Agrawal, A. A. (2016). Mechanisms and evolution of plant resistance to aphids. *Nature Plants* 2: 1-9.

Résumé

La recherche de solutions alternatives à l'usage de pesticides en production horticole est devenue une exigence de santé publique. Ainsi, l'introduction de plantes de service (PdS) est une méthode écologique qui peut contribuer à diminuer le recours à la lutte chimique contre *Myzus persicae*, le puceron vert du pêcher. L'intérêt de certaines de ces PdS réside dans leur capacité à perturber l'installation du puceron sur son hôte et/ou à diminuer ses performances grâce à l'émission des composés organiques volatils (COV). Cependant, un obstacle majeur à leur utilisation est que leur efficacité se limite à un périmètre restreint et que leur production olfactive est sensible à de nombreuses variables biotiques et abiotiques. Identifier les plantes les plus performantes, comprendre leur mode d'action et chercher à optimiser leur efficacité est donc une démarche propre à favoriser leur emploi en horticulture. L'analyse de l'environnement olfactif est une clé pour évaluer et comprendre les interactions PdS-plante hôte-puceron.

Au laboratoire, un typage avec un olfactomètre en Y a permis de sélectionner deux PdS émettrices de mélanges de COV ayant un effet répulsif marqué sur *M. persicae* : le basilic (*Ocimum basilicum*) qui agit directement sur l'insecte, et l'œillet d'Inde (*Tagetes patula*) qui agit indirectement *via* la plante hôte. Ainsi, les COV émis par *T. patula* rendent la plante-hôte (le poivron, *Capsicum annuum*) répulsive. En effet, lors des tests de choix, les pucerons s'orientent vers les poivrons seuls mais évitent les COV émis par des poivrons précédemment mis en culture associée pendant 5 jours avec l'œillet d'Inde. Deux composés, le (*E*)- β -farnésène (EBF) et l'eugénol ont de fortes propriétés répulsives envers *M. persicae*.

Différents facteurs peuvent affecter l'efficacité répulsive de ces plantes (climat, conduite, génétique). Nous avons comparé les COV émis selon les espèces et les chémotypes et testé l'effet répulsif individuel des COV. Cet effet « génotype » a été examiné en étudiant le comportement olfactif de *M. persicae* en présence des COV individuels émis par différents clones de Romarin (*Rosmarinus officinalis*). Cinq composés sont répulsifs, l'acétate de bornyle, le camphre, l' α -terpinéol, le terpinène-4-ol et le géranyle acétone. Seul le clone de romarin Voltz Splindler s'est avéré répulsif, alors que les autres clones contiennent également ces 5 composés répulsifs mais dans des proportions différentes. On peut donc conclure que la présence de ces composés ne suffit pas à induire une perturbation du comportement olfactif du puceron et que la concentration, la proportion, voire l'association des COV présents dans les bouquets olfactifs libérés, sont à l'origine de ces résultats contrastés.

Par la technique d'électropénétophographie (EPG), nous avons mis en évidence un deuxième effet des COV émis par *O. basilicum* au stade végétatif et par *T. patula* au stade floraison sur le puceron. Ils perturbent fortement son comportement alimentaire, en réduisant notamment la durée d'ingestion du phloème qui se traduit par une baisse des ressources nutritionnelles et aboutit à une diminution de sa fécondité. Un suivi de la fécondité sur organe détaché nous a permis de mettre en évidence l'importance du stade phénologique de la PdS sur la composition et l'efficacité du mélange olfactif libéré.

Une dernière étape de mon travail a permis de confirmer dans des conditions de cultures sous tunnels, l'effet de COV émis par ces deux PdS sur la démographie de *M. persicae* liée à une baisse de sa fécondité.

En conclusion, cette thèse a mis en évidence que les COV émis dans l'environnement d'une plante hôte par des plantes voisines peuvent fournir un service aux cultures en réduisant les performances de ravageurs tels que *M. persicae*. Nous avons montré que des variables comme le chémotype ou le stade phénologique de la PdS peuvent modifier son message olfactif et constituer un moyen d'optimiser ce service. Nous avons ainsi identifié des PdS perturbatrices et des COV répulsifs envers *M. persicae*, première étape vers le développement de la composante 'push' d'une stratégie de détournement stimulo-dissuasif visant à réduire le recours aux pesticides de synthèse contre *M. persicae*. Il reste maintenant à étudier comment la conduite de culture peut modifier l'efficacité de ces PdS et à valider ces résultats par des essais systèmes.

Mots clés : agroécologie, composés organiques volatils (COV), comportement, plantes de service (PdS), puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*), performances, répulsion

Tarek DARDOURI. (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 pêcher. Avignon, France. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.

