



**Appel à projets de recherche  
« Pour et Sur le Plan Ecophyto »**  
Edition 2014 : Contribuer à l'essor du biocontrôle  
**PSPE2**



---

## DicaBio

### «Valorisation des acides Dicaféoylquiniques et Dicaféoyltartriques comme substances naturelles de Biocontrôle»

---

N° SIREPA 2878

**Partenaires du projet :**

- **UR 1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles (PSH)**, INRAE Avignon  
*Equipe Ecologie de la Production Intégrée*
- **UR 1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL)**, INRAE Avignon  
*Equipe Résistance aux Bioagresseurs, Diversité et Durabilité*
- **UMR 408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale (SQPOV)**, INRAE/AU Avignon  
*Equipe Micronutriments: Réactivité et Digestion*
- **UR 406 Abeille et Environnement (AE)**, INRAE Avignon  
*Equipe Toxicologie environnementale*
- **SBM Développement**, Ecully.

**Coordination scientifique:** Jean-Luc Poëssel (INRAE GAFL)

**Novembre 2016 – Septembre 2020**

### Rapport d'activité

Page 2

### Rapport scientifique

Page 10

### Contribution au plan Ecophyto

Page 31

### Annexes

Page 32

---

# DicaBio

## «Valorisation des acides Dicaféoylquiniques et Dicaféoyltartriques comme substances naturelles de Biocontrôle»

---

N° SIREPA 2878

### Rapport d'activité

Le projet DicaBio s'est déroulé du 09 novembre 2016 au 08 septembre 2020 sur une durée de 46 mois, la période initiale de 36 mois ayant été prolongée par avenant à la convention pour une durée de 10 mois. Cette prolongation a été motivée par les difficultés d'approvisionnement en substances naturelles nécessaires à la réalisation du projet.

DicaBio a réuni un consortium de quatre laboratoires d'INRAE Avignon, pour la plupart déjà engagés précédemment dans des projets de valorisation des substances naturelles étudiées, et une entreprise privée du secteur phytopharmaceutique, SBM développement, spécialisée dans le domaine de la formulation des pesticides. SBM développement s'est substitué peu avant le démarrage du projet à l'entreprise Goëmar initialement pressentie, qui s'est retirée en raison du rachat de sa maison-mère et des changements d'orientations stratégiques inhérents. Une convention a été établie entre INRAE et SBM. Suite au décès en 2016 de Marie-Hélène Sauge (INRAE PSH), initiatrice du projet, la coordination scientifique du projet a été assurée par Jean-Luc Poëssel (INRAE GAFL).

La collaboration entre les équipes a été assurée tout au long du projet par les réunions du Comité de Pilotage, des réunions techniques réunissant l'ensemble des collaborateurs du projet, des réunions plus restreintes entre les participants INRAE Avignon pour les tâches indépendantes de la collaboration avec SBM qui leur incombait. Des visites des laboratoires et installations ont été organisées à la faveur de la réunion des Comités de Pilotage à Avignon et à Béziers (Usine de formulation SBM). Enfin de nombreux contacts individuels ont eu lieu entre SBM et les chercheurs d'INRAE pour échanger sur l'avancée des travaux de formulation des substances. Par ailleurs, un outil de partage de fichiers a été en place entre les partenaires pour faciliter l'accès aux documents produits dans le projet (organisation du planning de travail, fichiers bibliographiques...).

Le programme de travail de DicaBio est réparti en quatre tâches. La tâche 1 (efficacité aphicide des diCQ/diCT) a été exécutée en partenariat entre SBM et INRAE, La tâche 2 (efficacité fongicide des diCQ/diCT) entièrement par SBM et les tâches 3 et 4 ont été intégralement réalisées par INRAE. Ce programme de travail a été légèrement adapté en début de projet pour répondre aux demandes de SBM : d'une part les cibles pour les activités aphicides et fongicides ont été choisies en fonction de la stratégie commerciale de SBM et de son savoir-faire, d'autre part les travaux ont été orientés préférentiellement sur le diCT (acide dicaféoyltartrique ou acide chicorique) molécule plus stable que le diCQ et dont l'activité aphicide est mieux protégée par le Brevet INRAE FR3017510.

Les principales difficultés rencontrées lors de l'exécution de DicaBio ont concerné en premier lieu l'approvisionnement en matière active pour les formulations. En effet le savoir-faire de SBM dans le domaine de la formulation des pesticides est applicable à des quantités d'actif de quelques kg. Une fourniture à façon limitée de diCT a pu être obtenue avec délai à partir d'une source végétale grâce à un fournisseur chinois de substances naturelles. Les difficultés ont aussi résidé d'une part dans l'absence d'activité des formulations aphicides élaborées par SBM dans les tests de laboratoire ce qui a empêché la réalisation des essais *in planta* en serre et au champ et d'autre part dans les problèmes de formulation pour le traitement des semences rencontrés par SBM, dus aux caractéristiques physico-chimiques des substances. L'ensemble des travaux de laboratoires prévus ont cependant été réalisés conformément au programme. Certaines tâches ont été ajoutées en complément pour répondre aux besoins du projet (fourniture en diCT pour les travaux de laboratoire, tâche 1) et aux questions scientifiques qui ont émergé (recherche d'espèces de pucerons résistantes aux substances, tâche 3).

Deux communications sur les résultats obtenus (tâche 3, concernant les risques d'adaptation des pucerons aux molécules phénoliques étudiées) ont été faites lors de colloques en France et en Grande Bretagne. Les affiches présentées sont données en annexe. Des publications des résultats de recherche obtenus sont en cours et prévues.

Le programme d'action et l'état de sa réalisation sont détaillés ci-dessous, l'investissement des partenaires dans DicaBio est ensuite présenté. Les principaux résultats acquis dans DicaBio sont ensuite succinctement décrits. Ils sont détaillés dans le rapport scientifique.

## Les actions du programme DicaBio et leur réalisation

### TÂCHE 1. Déterminer l'efficacité aphicide des diCQ/diCT sur le terrain vis-à-vis des pucerons et d'autres insectes

Actions	Description	Partenaires impliqués	Réalisation
1.0 - Approvisionnement en substances actives et connaissances sur la stabilité des molécules	1.0.1 - Achat diCT	SBM	Réalisée
	1.0.2 - Etude de solubilité du diCT dans les solvants	INRAE SQPOV	Réalisée
	1.0.3 - Etude des propriétés chimiques du diCT et de sa stabilité dans les formulations	INRAE SQPOV	Réalisée
	1.0.4 - Approvisionnement en diCQ pour les travaux de laboratoire	INRAE GAFL	Réalisée
	1.0.5 - Action complémentaire: recherche de plantes sources riches en diCT pour approvisionnement INRAE et pour mise en place de parcelles pièges (tâche 3)	INRAE GAFL	Réalisée
	1.0.6 - Action complémentaire: Extraction et purification de diCT pour les travaux de laboratoire	INRAE GAFL	Réalisée
1.1 - Développement pré-formulations du diCT	Définition du besoin en formulation Développement	SBM	Réalisée
1.2 - Tests d'efficacité des formulations sur insectes en laboratoire ( <i>in vitro</i> ou <i>in planta</i> ) 1.2.1 - Tests des diCT et diCQ avec pré-formulation sur organes détachés 1.2.2 - Tests sur plantes entières	Définition des protocoles de tests Tests sur puceron vert du pêcher ( <i>Myzus persicae</i> ), pucerons du blé, puceron du rosier autres ravageurs (Mélégèthes,...)	INRAE PSH SBM	Réalisé sauf autres ravageurs (SBM) et tests sur plantes entières
1.3 - Optimisation des formulations	Optimisation des formulations pour une application en serre et en plein champ en fonction du couple ravageur/culture Vérification de la stabilité de la formulation	SBM	Non réalisée
1.4 - Tests sous serre sur plante entière	Tests sur pucerons du blé, puceron vert du pêcher, puceron du rosier et autres ravageurs	SBM	Non réalisée
1.5 - Expérimentations en plein champ	Expérimentations sur : pucerons du blé, puceron vert du pêcher, puceron du rosier et autres ravageurs	SBM	Non réalisée
1.6 - Vérification de la rémanence et de la pénétration des formulations	Tests sur organes détachés	INRAE SQPOV PSH	Réalisée
1.7 - Efficacité du diCT infiltré, formulé ou non	Tests sur organes détachés	INRAE PSH	Réalisée
1.8 - Efficacité du diCT en application topique	Tests directs sur pucerons	INRAE PSH	Réalisé

### TÂCHE 2. Déterminer l'efficacité fongicide du diCT vis-à-vis d'une gamme de micro-organismes phytopathogènes

Actions	Description des tâches	Partenaires impliqués	Réalisation
2.1 - Tests d'efficacité <i>in vitro</i> du diCT	Tests en boîte de pétri sur : - <i>Septoria tritici</i> - <i>Fusarium graminearum</i> et <i>culmorum</i> - <i>Microdochium nivale</i> et <i>Septoria nodorum</i> - <i>Phytophthora infestans</i>	SBM (GERME)	Réalisation complète
2.2 - Développement de formulations	Définition du besoin en formulation. Développement Vérification de la stabilité de la formulation	SBM	Réalisation mais pas de formulations efficaces développées
2.3 - Tests d'efficacité <i>in planta</i>	Tests sur plantes en pots en conditions contrôlées - Blé/ <i>Septoria tritici</i> , <i>F. graminearum</i> et <i>culmorum</i> , <i>M. nivale</i> et <i>Septoria nodorum</i> . - Vigne/ <i>P. viticola</i> ou P de terre/ <i>P infestans</i>	SBM	Réalisation partielle ( <i>Septoria tritici</i> )
2.4 - Optimisation des formulations	Optimisation des formulations pour une application en plein champ en fonction du couple ravageur/culture	SBM	Non réalisé (pas de formulations efficaces développées)
2.5 - Tests d'efficacité en plein champ	Tests d'efficacité plein champ sur les cibles sensibles au diCT <i>in vitro</i> et sur plantes entières	SBM/prestation d'expérimentation	Non réalisé (pas de formulations efficaces développées)

### TÂCHE 3. Évaluer *ex ante* la durabilité des diCQ/diCT en tant que toxines aphicides

Actions	Description	Partenaires impliqués	Réalisation
3.1 - Courbe dose-mortalité avec diCT sur milieu pour des clones de <i>M. persicae</i> différant dans leur niveau d'expression d'estérases	Tests de clones de <i>Myzus persicae</i> surexprimant ou non des carboxylestérases impliquées dans la détoxification de pesticides.	INRAE PSH + GAFL	Réalisation complète
3.2 - Courbe dose-mortalité avec diCT pour des clones de <i>M. persicae</i> traités avec des inhibiteurs d'estérases.	Inhibition des carboxylestérases des clones surexprimant cette enzyme de détoxification par traitement chimique.	INRAE PSH + GAFL	Non réalisée car aucune résistance n'a été observée dans les clones surexprimant les estérases, remplacée par une étude d'enzymes de détoxification : GST et EST (tâche 3.3)
3.3 - Courbes dose-mortalité avec diCT pour une gamme de clones de <i>M. persicae</i> échantillonnés dans les populations naturelles.	Tests de clones de <i>Myzus persicae</i> échantillonnés en vergers de pêcher traités par différents pesticides. Mesures des activités de détoxification (estérases, glutathion-S-transférases)	INRAE PSH + GAFL	Réalisation complète
3.4 - Tâche additionnelle: Courbes dose-mortalité avec diCT pour une gamme de pucerons échantillonnés en parcelle piège sur des plantes naturellement riches en diCT.	Prospection et tests de clones de pucerons colonisant d'espèces riches en diCQ ou diCT cultivées en parcelles pièges	INRAE PSH + GAFL	Réalisation complète

### TÂCHE 4. Évaluer les effets non intentionnels des diCQ et diCT sur l'abeille domestique

Actions	Description	Partenaires impliqués	Réalisation
4.1 - Courbe dose-mortalité des diCQ et diCT chez l'abeille domestique.	à 48 heures	INRAE A&E (avec l'appui des équipes INRAE)	Réalisation complète
4.2 - Survie des abeilles après exposition aiguë aux diCT et diCQ.	à 60 jours	INRAE A&E (avec l'appui des équipes INRAE)	Réalisation complète
4.3 - Effets sublétaux des diCT et diCQ.	Modifications comportementales observées après exposition de l'abeille à des doses sublétales de diCQ ou de diCT	INRAE A&E (avec l'appui des équipes INRAE)	Réalisation complète

## Implication des partenaires dans le projet

### UMR INRAE/AU, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale (SQPOV), Avignon.

Claire Dufour (CR) a apporté son expertise en chimie dans les études de caractérisation des diCT et diCQ avec le concours de Marie-José Vallier, technicienne INRAE, qui a réalisé de nombreuses expérimentations sur la solubilité, la stabilité, la dégradation des diCQ et diCT. Claire Dufour a répondu aux demandes des partenaires sur la stabilité des molécules d'intérêt lors de leur formulation par SBM pour les tests aphicides (tâche 1) et dans les solutions nutritives utilisées pour les tests de toxicité chez l'abeille (tâche 4). Elle a encadré deux stages portant sur l'évaluation de la stabilité des diCQ et diCT :

- Yanis Leroy, «Etude de la stabilité et de la capacité antioxydante des acides dicaféoylquiniques et caféoyltartriques», stage M1 Avignon Université, avril-juin 2017.

- Déjanire Barnier, «Réactivité des acides dicaféoylquiniques et caféoyltartriques (effet de la lumière et d'ions métalliques)», 1ère année ENSCM, juin-août 2018.

Claire Dufour a mis à disposition l'ensemble des moyens disponibles de son laboratoire nécessaires pour l'exécution de DicaBio dont les équipements analytiques HPLC et spectrométrie de masse.

Outre les discussions dans les Comités de pilotage et réunions techniques du projet, des échanges directs entre SQPOV et SBM ont eu lieu (i) pour évaluer la pertinence d'une hémisynthèse du diCT (fourniture d'une publication décrivant une hémisynthèse multi-étapes à l'échelle du laboratoire «Lamidey *et al.*, 2002, A Convenient Synthesis of the Echinacea-Derived Immunostimulator and HIV-1 Integrase Inhibitor (-)-(2R,3R)-Chicoric Acid»), (ii) lors du développement des formulations pour les étapes de broyage, homogénéisation, solubilisation et stabilité du diCT. SQPOV a réalisé pour SBM le contrôle par HPLC de la pureté du diCT acheté en Chine et le suivi de stabilité du diCT dans une formulation concentrée lors d'un vieillissement accéléré et normal.

SQPOV et PSH ont mené conjointement les expérimentations sur la rémanence et la pénétration de la formulation liquide concentrée dans la feuille.

SQPOV a réalisé l'intégralité des tâches prévues dans DicaBio.

## INRAE Plantes et Systèmes de cultures Horticoles (PSH), Avignon

Les travaux de Dicabio ont été menés à PSH par Myriam Siegart ; Ingénieure, assistée par deux techniciennes de la recherche, Odile Masclé et Élodie Lecerf, recrutée pour le projet en provenance de l'équipe de Jean-Luc Poëssel au GAFL. Le projet DicaBio a bénéficié des laboratoires et installations expérimentales de PSH, dont l'insectarium où se sont déroulées la plupart des expérimentations. Les travaux menés par l'équipe de M. Siegart pour DicaBio sont détaillés ci-dessous tâche par tâche.

### TÂCHE 1 : efficacité aphicide des diCQ/diCT vis-à-vis d'une gamme de pucerons et vis-à-vis d'autres insectes

#### 1.2 Tests d'efficacité des formulations sur insectes en laboratoire

Durant 2 ans, Myriam Siegart et son équipe ont réalisé de très nombreux biotests sur *Myzus persicae* avec les différentes formulations fournies par SBM. Tous ces tests ont été réalisés au laboratoire en conditions contrôlées. Chaque résultat a été communiqué immédiatement à SBM pour qu'ils puissent améliorer les formulations produites. Des biotests ont été réalisés dans les mêmes conditions sur trois autres espèces de pucerons: *Dysaphis plantaginea*, *Sitobion avenae* et *Acyrtosiphon pisum*. Comme décrit dans le rapport scientifique, l'ensemble de ces biotests a été réalisé sur un total de 15 732 pucerons du même âge (cohortes de 24 h) et a mobilisé le travail de 2 techniciennes à hauteur de 70% de leur temps de travail pendant 2 ans tant pour la production en serre des plantes supports, l'élevage des pucerons en insectarium, la réalisation des cohortes que pour la réalisation des biotests eux-mêmes. L'amélioration des formulations ou la révélation de leur potentiel aphicide ont été recherchées en ajoutant extemporanément divers produits pouvant aider la pénétration du produit dans la plante ou en testant de nouveaux protocoles de biotests mettant en contact direct les formulations sur les pucerons. En réponse à l'inefficacité des formulations l'équipe a cherché à confirmer les causes de cette impasse. Elle a prouvé par les tests d'infiltration que le point de blocage est bien la pénétration du produit dans la plante et confirmé par les tests d'application topique que la molécule n'est pas efficace par contact.

L'inefficacité des formulations dans les tests sur organes détachés n'a pas permis d'entreprendre les tests sur plante entière.

### TÂCHE 3 : Évaluer ex ante la durabilité des diCQ/diCT en tant que toxines aphicides

Cette tâche a été réalisée sur la durée du contrat. Elle a fait l'objet de 2 stages: Mathilde Salette (2017, Capacité adaptative de *Myzus persicae* aux acides caféiques, rapport de stage de DUT génie biologique, Angers) et Antoine Blot (2018, Etude de la durabilité de molécules issues d'un extrait de plante utilisé comme nouveau bio-aphicide, rapport de stage de M1, Avignon Université) encadrés par Myriam SIEGWART. Ils ont été complétés par des travaux d'Élodie Lecerf et Odile Masclé. Les résultats très encourageants obtenus ont fait l'objet de communications dans deux colloques: «Natural Products and Biocontrol 2018» à Perpignan et «Resistance 19» à Rothamsted (UK).

#### 3.1 - Courbe dose-mortalité sur milieu pour des clones de *M. persicae* différant dans leur niveau d'expression d'estérases

Divers clones de *M. persicae* résistants à des insecticides chimiques ont été récupérés par Myriam Siegart auprès de l'unité CASPER de l'Anses de Lyon. Un autre, recueilli auprès de Thierry Fricaux à l'ISA Sophia-Antipolis, provient de Grande-Bretagne et surexprime une carboxylestérase qui lui confère des résistances à plusieurs substances actives. Des biotests ont été réalisés sur ces clones et les courbes doses-réponses ont été comparées à celles obtenues sur notre clone sensible de référence Mp06. Même si une légère différence de sensibilité significative a été observée, le rapport de résistance ne dépasse pas le seuil de 10, qui correspond au seuil de définition de la résistance. On peut donc affirmer que les différents clones testés ne sont pas résistants au diCT. L'éventuelle corrélation entre niveau d'activité estérase (EST) et baisse de sensibilité au diCT a également été investiguée dans la tâche 3.3.

#### 3.3 - Courbes dose-mortalité du diCQ pour une gamme de clones de *M. persicae* échantillonnés dans des populations naturelles

Ce travail a été réalisé en 2017 sur différents clones de *M. persicae* prélevés sur des pêchers en vergers commerciaux de la vallée du Rhône pour lesquels les insecticides utilisés étaient connus, ceci dans l'objectif de prélever des clones ayant des niveaux de résistances variés à des insecticides chimiques. Nous avons ensuite élevé ces clones et séquencé des marqueurs microsatellites dans un souci d'identification. Les biotests ont pu être effectués après installation des clones dans les conditions de laboratoire. Des mesures d'activité des EST ont mis en évidence une diversité de niveau d'activité de cette famille d'enzyme sans qu'une corrélation n'apparaisse avec les courbes dose diCT-mortalité. Ce résultat inattendu a motivé le test de clones de *M. persicae* provenant d'autres plantes hôtes que le pêcher et riches en métabolites secondaires. Ces clones pourraient avoir en effet des capacités de détoxication accrues. Les résultats ont montré une bonne efficacité du diCQ et diCT vis-à-vis de ces clones qui ne montre pas de capacités particulières de détoxication vis-à-vis de ces molécules. Une expérimentation additionnelle pour répondre à la question de la durabilité a été menée sur un clone de *M. persicae* nourri exclusivement sur une plante riche en diCQ pour détecter une évolution vers une forme plus adaptée à cette substance naturelle, ce qui n'a pas été le cas.

#### Tâche additionnelle 3.4 - Courbes dose-mortalité pour une gamme de pucerons échantillonnés sur des plantes naturellement riches en diCT/diCQ

Pour poursuivre les études sur la durabilité de ces actifs, PSH et GAFL ont installé cinq espèces de plantes naturellement riches en diCT et diCQ sur une parcelle en plein champ en 2019 et 2020 en prospectant les pucerons qui viennent naturellement les coloniser et échantillonnant 2 fois par semaine les colonies de toutes espèces qui pouvaient avoir une bonne tolérance naturelle à ces actifs. 10 clones de pucerons ont été récoltés et certains d'entre eux ont pu être installés au laboratoire. L'un d'entre eux, de l'espèce *Aphis craccivora*, s'est montré insensible au diCT et au diCQ

pour la première fois depuis le début des études sur les propriétés aphicides des diCT/diCQ. Cette découverte est primordiale car elle pourrait d'une part aider à mieux identifier le mode d'action de ces actifs et donc mieux les comprendre et les utiliser et d'autre part permettre de caractériser les processus d'adaptation aux diCT et diCQ.

L'équipe de PSH a mobilisé d'importants moyens humains pour réaliser le programme de travail et a pu réaliser l'ensemble des actions prévues dans les tâches 1 et 3 du projet à l'exception des tests aphicides sur plante en raison de l'absence d'efficacité des formulations délivrées par SBM dans les tests sur organes détachés. Les expérimentations complémentaires menées par PSH avec l'appui de SQPOV ont permis d'identifier l'étape de pénétration dans les tissus foliaires comme le verrou essentiel de l'efficacité des actifs.

#### **INRAE, Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL), Avignon**

Jean-Luc Poëssel (CR) a apporté son expertise en physiologie et génétique du végétal pour l'étude de la biochimie, de la production dans la plante et de l'activité biologique des acides caféoylquiniques et dicaféoyltartriques. Titulaire de deux brevets détenus par INRAE, il a apporté son expérience sur la valorisation des diCQ et diCT à l'ensemble du projet. Il a été épaulé pour la réalisation de DicaBio par Marie-Noëlle Corre (Assistante-Ingénieure) pour l'ensemble des travaux d'analyse biochimique de la tâche 1 (tâche 1.0.4 à 1.0.6: caractérisation des sources végétales riches en diCQ et diCT ; mise au point de la méthode d'extraction et de purification du diCT à partir du pissenlit ; production du diCQ et du diCT à partir respectivement de la patate douce et des feuilles de pissenlit pour les travaux de laboratoire). Il a été assisté par l'équipe des installations expérimentales du GAFL d'une part pour la culture en serre des plantes riches en diCQ et diCT en vue de leur étude et de la production des molécules (tâche 1) et d'autre part pour l'élevage du clone Mp06 de référence de *Myzus persicae* dans l'insectarium de l'Unité GAFL, pour la mise en place des parcelles expérimentales pièges en 2018 et 2019, pour la production en serre des 5 espèces cultivées et pour l'entretien et le suivi phytosanitaire des parcelles en culture (tâche 3.4). Une technicienne de l'équipe de Jean-Luc Poëssel au GAFL, Elodie Lecerf, a été recrutée par l'Unité PSH pour renforcer le personnel dédié au projet DicaBio. Jean-Luc Poëssel a participé à l'élaboration des expérimentations et à l'analyse et à la rédaction des résultats sur les risques d'adaptation des pucerons aux diCT et diCQ obtenus dans la tâche 3. Il a conçu avec Myriam Siegwart les parcelles pièges qui ont permis de détecter un clone d'une espèce de puceron insensible aux diCQ et diCT.

L'Unité GAFL a mis à disposition du projet le matériel de laboratoire (dont matériel analytique HPLC) et les installations expérimentales (serres, chambres de culture, insectarium, parcelles plein champ) nécessaires à la réalisation de DicaBio.

Jean-Luc Poëssel a assuré une veille bibliographique hebdomadaire sur les parutions concernant les diCQ et diCT et les a analysées et communiquées régulièrement aux partenaires. Plus de 200 publications citant l'acide dicaféoyltartrique (ou acide chicorique) et près de 400 publications citant les acides dicaféoylquiniques (ou acides isochlorogéniques) ont été relevées. Une base bibliographique a été constituée concernant les biopesticides, leur formulation et le développement des nanoformulations pour résoudre les difficultés rencontrées dans ce domaine lors du projet DicaBio, ce qui permet aujourd'hui de dessiner de nouvelles perspectives pour la valorisation des diCT et diCQ.

Jean-Luc Poëssel a assuré l'animation scientifique du projet, le suivi de son exécution, l'organisation des réunions, le lien avec les organismes financeurs, les services de partenariat, de valorisation et administratifs, le suivi de l'établissement des conventions et leurs avenants et la coordination de la rédaction des comptes-rendus.

La totalité des moyens humains et matériels prévus a été investie, à l'exception de l'appui d'une technicienne de la recherche qui est venue conforter l'équipe DicaBio de PSH. L'intégralité des actions prévues par le GAFL dans DicaBio ont été réalisées.

#### **INRAE, Abeilles et Environnement (A&E), Avignon**

Claude Collet (CR) a apporté au projet son expertise en toxicologie des abeilles et a réalisé l'ensemble de la tâche 4 avec le concours de Mercedes Charreton, technicienne INRAE, qui a participé aux nombreuses expérimentations sur les effets potentiellement toxiques des diCT et diCQ, et avec l'appui des autres partenaires INRAE. L'Unité Abeilles & Environnement a mis à disposition du projet DicaBio ses équipements de laboratoire, notamment en terme de suivi des effets sublétaux des diCQ et diCT, et le rucher expérimental qui a fourni les abeilles pour les tests toxicologiques.

La totalité des moyens humains et matériels prévus a été investie. L'intégralité des actions prévues dans DicaBio ont été réalisées.

#### **SBM Développement**

Le projet DicaBio a été mené à SBM Développement par Mélanie Poncet puis Charlotte Arbona à son départ, Chargées de Projet Innovation, par Christophe Vastel Chargé de Projet Innovation (développement fongicides) et avec les compétences de Sarah Fouilloux (SBM Formulation) pour le développement des formulations. Martine Gautier, Directrice Innovation, a participé aux Comités de Pilotage.

Le diCT a été seul travaillé durant ce projet par SBM. Il a été privilégié car il est breveté pour ses propriétés aphicides. Sont détaillés ci-dessous les travaux effectués par SBM.

**TÂCHE 1 : efficacité aphicide des diCQ/diCT vis-à-vis d'une gamme de pucerons et vis-à-vis d'autres insectes**

**Tâche 1.0. Approvisionnement des substances actives et connaissances des actifs**

**Achat du diCT**

La principale difficulté de ce projet a résidé dans la complexité pour s'approvisionner sur le marché en diCT en quantité suffisante à un prix raisonnable. Les quantités obtenues sont largement en dessous des prérequis de SBM pour des développements de formulations qui consomment des quantités entre 3 à 10 kg. Aucune source de diCT capable de soutenir le développement de formulations optimisées n'a donc été trouvée pendant la durée du projet.

## Etude de la stabilité du diCT dans la formulation

Cette tâche a été réalisée par INRAE SQPOV avec la fourniture par SBM Formulation d'échantillons ayant subi des vieillissements accélérés.

### Tâche 1.1. Développement des pré-formulations

Le laboratoire de SBM Formulation a réalisé cette étape en étroite collaboration avec SBM Développement. Compte tenu des faibles quantités de matière active disponibles, SBM a par ailleurs dû acquérir des équipements complémentaires (notamment un broyeur adapté au broyage de très faibles quantités) et adapter ses méthodes pour développer des formulations (premières études réalisées avec des systèmes d'agitations adaptés à de très petits volumes).

Plusieurs études de pré-formulations ont donné lieu à la production des pré-formulations suivantes, identifiées comme les livrables attendus dans le projet :

- 8 pré-formulations à base de diCT de type SL (SL3, SL1-F, SL1P-ATP, SL3+C, SL1-F+C, SL1P-ATP+C, SL1-P-F+C et 19L10SL02)

- 1 pré-formulation à base de diCT de type WP (DT-300-WP-A)

En raison du manque d'actif en quantité suffisante et de sa stabilité complexe à maîtriser, tous les choix de développement de formulation ont été faits de façon à minimiser la consommation d'actif ce qui ne permet pas d'obtenir des formulations optimisées pour l'efficacité de la matière active. Ainsi, il n'a pas été possible d'obtenir des pré-formulations qualitatives et efficaces. La formulation étant un aspect clé du projet, cela a freiné l'avancée globale du programme et l'obtention des livrables.

### 1.2 Tests d'efficacité des pré-formulations sur insectes en laboratoire (*in vitro* ou *in planta*)

SBM, en collaboration avec son laboratoire commun, devait tester sur des insectes autres que les pucerons comme les méligèthes (coléoptères) l'efficacité des formulations à base de diCT lorsque la preuve de l'efficacité sur pucerons serait faite. Cette démonstration de l'efficacité sur pucerons n'ayant pu être faite, cette étape n'a pas été réalisée.

### 1.3 Optimisation des formulations

En partenariat avec SBM, SBM Formulation a essayé d'optimiser les pré-formulations pour passer de formulations SL (Solution Liquide) à WP (Poudre Mouillable) puis SC (Suspension Concentrée) et pour concentrer le plus possible les formulations pour passer de 3 g/L au maximum dans les premières formulations SL à une concentration de 135 g/L. La stabilité des formulations a été étudiée sur les bases de formulations à 135 g/L de diCT avec une étude de vieillissement accélérée pendant 14 jours à 54°C. SBM a constaté un aspect physique normal et stable. La teneur en diCT a été analysée par INRAE SQPOV.

Cependant, compte tenu de la faible quantité d'actif disponible et les propriétés du diCT, les pré-formulations développées n'ont pas pu être entièrement optimisées comme prévu au début du projet.

### 1.4 Tests sous serre sur plantes entières

Cette action n'a pas été réalisée du fait des niveaux d'efficacité trop faibles en conditions de laboratoire.

### 1.5 Expérimentations plein champ

Cette action n'a pas été réalisée du fait des niveaux d'efficacité trop faibles en conditions de laboratoire.

## Tâche 2 : Déterminer l'efficacité fongicide du diCT vis-à-vis d'une gamme de micro-organismes phytopathogènes

### 2.1 Tests d'efficacité *in vitro* du diCT et diCQ

Les pré-formulations développées par SBM Formulation pour la tâche 1 ont été utilisées pour l'évaluation de l'efficacité fongicide du diCT. Tous les pathogènes des semences et foliaires prévus en début de projet ont été testés en conditions *in vitro*, en test de surface de gélose en partenariat avec le prestataire de service GERME.

Au cours de ces essais, le diCT a démontré son efficacité contre les pathogènes des semences et contre la septoriose foliaire du blé. SBM Développement a donc fourni comme livrable un rapport d'efficacité du diCT et certaines formulations à base de diCT issues de la tâche 1 sur l'ensemble des pathogènes fongiques prévus initialement dans le projet.

### 2.2. Développement de pré-formulations

Deux contraintes ont rendu ces travaux de formulation complexes: la faible disponibilité en diCT et les propriétés physico-chimiques de la matière active. Dans le cadre des travaux sur l'activité fongicide du diCT, il a été nécessaire de développer deux formulations adaptées à deux modes d'application bien différents. Le laboratoire SBM Formulation a réalisé ces deux développements de pré-formulation.

#### Développement d'une formulation pour le traitement de semences (TS)

Le but de ces travaux était de développer une formulation à base de diCT adaptée à une application en TS contre les pathogènes des semences *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Microdochium nivale* et *Septoria nodorum*. Les formulations foliaires développées pour les insecticides et décrits en tâche 1 n'étaient pas adaptées à ce mode d'application, notamment du fait d'une trop faible concentration en actif.

Bien que les premiers essais d'application en TS des bases de formulations en partenariat avec un prestataire de service AEGILOPS étaient encourageants, les propriétés du diCT n'ont pas permis d'aller au bout du développement de la formulation DP (poudre pour poudrage) destinée à une application en TS.

La formulation foliaire de type SC développée pour les insecticides (voir tâche 1) aurait été une solution qui aurait pu être adaptée à l'application en TS mais son développement n'a pas abouti. Quant à la dernière formulation SL foliaire disponible (19L10SL02), elle n'est pas adaptée car pas assez concentrée en actif pour un TS (135 g/L de diCT pour la formulation SL alors que la concentration visée pour le TS était de 500 g/kg).

La formulation du diCT pour des applications TS présente donc à la fin de ce projet un verrou technique qui nécessiterait des études supplémentaires et une disponibilité en actif plus importante pour être levé.

#### Développement d'une formulation pour l'application foliaire

Les formulations foliaires développées pour les insecticides et décrites en tâche 1 ont été utilisées pour le traitement de la septoriose du blé car elles étaient adaptées à ce type d'application.

#### 2.3. Tests efficacité en conditions contrôlées sur plante

Bien qu'une efficacité *in vitro* ait été observée, il n'a pas été possible de réaliser les tests *in planta* pour les pathogènes des semences faute d'avoir pu développer une formulation adaptée pour leur traitement.

Cette tâche a été réalisée en collaboration avec un prestataire de service, VEGENOV qui a réalisé les essais d'évaluation de l'efficacité de la formulation DT-300-WP-A contre *Zymoseptoria tritici*. Cet essai donne peu d'information sur la dose efficace de la formulation car les données sont très dispersées.

L'efficacité observée *in vitro* sur *S. tritici* n'a pu être confirmée *in planta*. La formulation WP n'est peut-être pas optimisée pour maximiser l'efficacité du diCT sur ce pathogène. Dans le temps imparti au projet, il n'a pas été possible de tester la dernière formulation SL 19L10SL02 *in planta* pour voir si le changement de type de formulation améliorerait les résultats.

#### 2.4. Optimisation des formulations pour une application au champ

Cette action n'a pas été réalisée étant donné qu'il n'a pas été possible de développer une pré-formulation de qualité.

#### 2.5. Essais efficacité champs

Cette action n'a pas été réalisée du fait de l'absence d'une formulation qualitative et adaptée.

En conclusion des deux tâches, plusieurs livrables ont été produits par SBM:

- 9 pré-formulations pour des applications insecticides et fongicides foliaires
- 1 rapport d'efficacité du diCT et des formulations à base de diCT en conditions *in vitro* contre *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Microdochium nivale*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici* et *Phytophthora infestans*.
- 1 rapport d'efficacité d'une formulation à base de diCT sur plante, en conditions contrôlées, contre *Septoria tritici*.

Les livrables attendus concernant les efficacités *in planta* pour les applications insecticides et au champ pour les applications fongicides n'ont pu être obtenus à cause des problèmes liés à l'approvisionnement du diCT et des difficultés lors du développement des formulations.

## Principaux résultats obtenus dans DicaBio

### Tâche 1. Déterminer l'efficacité aphicide des diCQ/diCT sur le terrain vis-à-vis des pucerons et d'autres insectes

- Nous avons caractérisé des sources végétales riches en diCT (pissenlit, arachide, chicorée) et démontré la faisabilité de la production en masse de la molécule à partir du pissenlit.
- Nous avons étudié les caractéristiques chimiques du diCT et les avons comparées à celles du diCQ: il s'agit d'une molécule très antioxydante, stable à pH acide qui interagit avec le fer et se dégrade par un phénomène d'oxydation. Des stéréoisomères peuvent se former sous l'effet de la lumière, essentiellement en milieu organique.
- De nombreuses formulations du diCT ont été élaborées par le partenaire privé sous forme de solutions liquides, de suspensions concentrées, de poudres mouillables et de solution liquide à forte concentration de diCT dans laquelle la substance est stable. Ces formulations additionnées ou non d'adjuvant ne montrent pas d'efficacité vis-à-vis de *Myzus persicae* et plusieurs autres espèces de pucerons.
- Nous avons identifié le principal verrou pour obtenir une formulation efficace. Il réside dans l'absence presque totale de pénétration des préparations dans les tissus foliaires. Nous confirmons par ailleurs que le diCT agit par ingestion et non par application topique. Cette pénétration de l'actif est donc essentielle pour qu'il puisse se mélanger à la prise alimentaire des pucerons. De plus sa rémanence en surface de la feuille ou dans les tissus foliaires semble limitée.

### Tâche2. Déterminer l'efficacité fongicide du diCT vis-à-vis d'une gamme de microorganismes phytopathogènes

- Nous montrons que le diCT a, comme le diCQ, des propriétés fongicides *in vitro*. Il est actif contre les pathogènes des semences et contre la septoriose foliaire du blé.
- Du fait de la spécificité des formulations pour le traitement des semences, nous n'avons pas pu obtenir une préparation efficace en raison du manque de matière active et des propriétés physico-chimiques de la molécule.
- Nos premiers résultats obtenus sur plante pour traiter la septoriose foliaire du blé avec les formulations développées pour la lutte contre les pucerons ne sont pas concluants et les essais mériteraient d'être poursuivis.

### TÂCHE 3. Évaluer *ex ante* la durabilité des diCQ/diCT en tant que toxines aphicides

- Nous montrons que chez *Myzus persicae*, il n'existe pas de lien entre les systèmes de détoxification des pesticides de synthèse et une éventuelle résistance au diCT. Une résistance croisée à ces pesticides et au diCT semble donc exclue. Nous n'avons pas détecté de clone résistant au diCT dans la variabilité naturelle de cette espèce.
- Parmi les autres espèces de pucerons que nous avons récoltées en parcelle piège et testées avec les diCT et diCQ, un clone d'*Aphis craccivora* s'est avéré insensible aux deux molécules. C'est la première fois que nous détectons des pucerons capables de survivre à l'ingestion de diCT et 3,5-diCQ à 2 mM. Mieux connaître l'origine de ce phénomène d'insensibilité pourrait nous aider d'une part à comprendre le mode d'action de ces substances actives et donc les



utiliser à meilleur escient et d'autre part à mieux évaluer les risques d'adaptation des pucerons au traitement par le diCT ou le diCQ.

- Nous avons observé que les endosymbiotes secondaires jouent un rôle dans la sensibilité de *Myzus persicae* au diCT. En absence de ces bactéries, les pucerons sont significativement moins sensibles au diCT que s'ils en sont porteurs.

#### TÂCHE 4. Évaluer les effets non intentionnels des diCQ et diCT sur l'abeille domestique

- Nous montrons que l'exposition aiguë au diCQ et au diCT ne provoque pas de mortalité par contact. De plus, dans la gamme de concentrations utilisée, ces deux produits peuvent être consommés par les abeilles pendant plusieurs jours sans induire d'effets sur la survie. Cependant une tendance de mortalité légèrement plus précoce se dessine après 5 jours d'exposition qui devra être vérifiée dans des essais ultérieurs.

- Notre exploration des effets sublétaux a mis en évidence une diminution importante de la prise alimentaire après 5 jours d'exposition au diCT par voie orale, ce que nous n'avons pas observé pour le diCQ. Les approches de trajectométrie n'ont révélé aucun effet locomoteur sur 24 h pour les deux molécules. Ces résultats devront faire l'objet de la plus grande attention dans des expériences à réaliser dans le futur. Néanmoins la toxicité de ces substances pour les abeilles apparait bien plus légère que celle de la plupart des insecticides de synthèse utilisés couramment en agriculture.

#### Publications

Siegwart M., Lecerf E., Mascle O., Salette M. and Poëssel J.L. (2018). Risks of aphid adaptation to caffeic acid derivatives used as bioinsecticides. Natural Products and Biocontrol Conference. 25-28 September 2018, Perpignan, France.

Siegwart M., Lecerf E., Mascle O., Salette M., Blot A. and Poëssel J.L. (2019). Risks of aphid adaptation to caffeic acid derivatives used as bioinsecticides. Resistance'19, 8th International Meeting on Pesticide Resistance. 16-18 September 2019. Rothamsted, UK.

#### En préparation

Siegwart M., Sauge MH, Lecerf E, Mascle O, and Poëssel JL. Mode of action and sustainability of the use of caffeoyl acid derivatives in the control of aphids in agriculture. In prep.

### Rapport scientifique

#### 1 – Introduction – problématique, enjeux, état de l'art

Le projet DicaBio a pour ambition de répondre aux enjeux du volet 4 de l'appel d'offre Ecophyto PSPE2, et notamment d'enrichir la gamme des produits disponibles comme solutions de biocontrôle. Il a pour objectif de valoriser des substances naturelles botaniques comme biopesticides. Il s'agit d'une démarche innovante. En effet, malgré l'abondance des publications montrant les effets répulsifs ou biocides des substances naturelles, très peu de produits dérivés de plante sont actuellement exploités commercialement et ils ne représentent qu'une faible part du marché (pyréthrine et azadirachtine). Certains composés utilisés jadis sont désormais interdits en raison de leur toxicité vis-à-vis de l'homme et des mammifères (roténone, nicotine).

INRAE détient deux brevets sur la production et l'utilisation de molécules naturelles issues de plantes, les acides dicaféoylquiniques (diCQ) et dicaféoyltartriques (acide chicorique, diCT), pour la lutte contre les pucerons, insectes ravageurs majeurs de nombreuses cultures. Nous avons montré que les diCQ présentent également des activités antifongiques. Ces propriétés aphicides et fongicides de cette famille de composés permettent d'envisager leur utilisation comme biopesticides.

diCQ et diCT appartiennent à un groupe de composés phénoliques dérivés de l'acide caféique, présentant la particularité de posséder deux résidus de cet acide liés à un acide organique, l'acide quinique (diCQ) ou l'acide tartrique (diCT). Ces composés, identifiés chez de nombreuses espèces d'intérêt agronomique de consommation courante, présentent une forte activité antioxydante qui leur confère un grand intérêt nutritionnel et ils possèdent par ailleurs de nombreuses propriétés médicinales. La valorisation de ces nouvelles molécules aphicides et fongicides dénuées d'effets négatifs connus pour la santé et l'environnement revêt dans ce contexte un intérêt majeur pour le secteur.

DicaBio vise à poursuivre les actions requises pour valoriser diCQ et diCT comme outils de biocontrôle. Il s'inscrit dans une démarche de valorisation soutenue depuis 2008 par différents contrats (prévalorisation, ANR) qui ont permis d'acquérir d'importantes connaissances sur l'action aphicide et fongicide de ces molécules, sur leur chimie et sur leur production dans la plante. La démarche adoptée par DicaBio est originale car elle s'intéresse, sur un cas concret, à tous les niveaux de la chaîne de développement d'un produit biopesticide et tente de lever les verrous qui y sont associés. En effet le problème de transfert des substances naturelles du laboratoire vers l'utilisation en plein champ dans des conditions de production nécessite d'une part la compréhension et la maîtrise des étapes en amont de l'action des molécules (obtention, propriétés et stabilité chimique) et d'autre part l'évaluation des risques de contournement par l'organisme cible et des risques de toxicité pour les organismes non-cibles. Pour aborder de manière intégrée ces sujets, DicaBio associe laboratoires de l'INRAE Avignon, spécialisés dans des disciplines différentes (génétique et biologie végétales, chimie, entomologie) et qui ont pour la plupart déjà travaillé ensemble sur ce thème avant ce projet de valorisation, et un partenaire privé, SBM Développement. Cette société phytopharmaceutique est spécialisée dans la formulation des pesticides et souhaite s'impliquer dans le développement de substances de biocontrôle.

DicaBio a trois objectifs structurés en quatre tâches :

- mener des travaux permettant de préciser les conditions nécessaires pour obtenir des préparations à base de diCQ/diCT aphicides (tâche 1) et fongicides (tâche 2) efficaces au champ. La formulation de ces préparations est une opération cruciale pour conserver et appliquer le produit, pour améliorer sa répartition, sa rémanence et sa pénétration dans les tissus de la plante et *in fine* pour améliorer son efficacité pesticide. Dans le cas de préparations aphicides, l'enjeu est de la faire pénétrer dans les tissus de la plante, le mode d'action des diCT/diCQ nécessitant *a priori* l'ingestion du produit selon nos travaux antérieurs. Le développement de ces formulations s'appuie sur les compétences de SBM.
- anticiper, en raison des grandes capacités d'adaptation des pucerons aux xénobiotiques, les contournements potentiels de la protection offerte par les diCQ/diCT vis-à-vis de ces insectes (tâche 3).
- caractériser les effets non intentionnels des diCQ/diCT sur l'abeille domestique, pour s'assurer de l'innocuité de ces molécules vis-à-vis d'organismes non cible (tâche 4).

Le démarrage du projet a été retardé en raison du changement de partenaire privé suite au renoncement du groupe Goëmar dont la société-mère a été rachetée. SBM Développement a été choisi en raison de ses compétences dans le domaine de la formulation des pesticides.

A la demande du nouveau partenaire, le projet a été orienté en priorité vers l'étude du diCT, molécule chimiquement plus stable et dont l'activité aphicide est mieux protégée par les brevets INRAE. Les organismes cibles étudiés ont été également choisis en fonction des stratégies commerciales de l'entreprise.

#### 2 – Résultats

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous pour chacune des quatre tâches du projet.

## Tâche 1 - Déterminer l'efficacité aphicide des diCQ/diCT sur le terrain vis-à-vis d'une gamme de pucerons et vis-à-vis d'autres insectes

(SBM Développement, UMR INRAE/AU Sécurité et Qualité des Produits Végétaux d'Origine Végétale, Plantes et Systèmes de culture Horticoles, Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Avignon)

Objectif : mettre au point un produit à base de diCQ/diCT et évaluer ses effets insecticides en conditions réelles d'application.

### Approvisionnement en diCT et connaissances des actifs (tâches 1.0.1, 1.0.2, 1.0.4, 1.0.5, 1.0.6)

#### Approvisionnement en diCT pour la réalisation des formulations (SBM)

La principale difficulté rencontrée pour lancer l'exécution de DicaBio a résidé dans l'approvisionnement en diCT en quantité suffisante à un prix raisonnable sur le marché. En effet, un premier lot de 20 g de diCT obtenu par extraction naturelle a été approvisionné grâce à Greenpharma, société spécialisée dans la fourniture de molécules et d'extraits de plante, pour un prix de 200 000 €/kg. Etant donné le prix très élevé du diCT obtenu par extraction naturelle, des travaux ont été engagés entre SBM et Greenpharma pour obtenir une source de diCT par synthèse chimique, une méthode de synthèse ayant été publiée. Cette tentative n'a pas été concluante en raison d'obstacles techniques pour cette synthèse. Pour les besoins de formulation, un second lot de 500 g de diCT obtenu par extraction naturelle par un fournisseur chinois a été approvisionné à 37 000€/kg. Sa très bonne pureté a été contrôlée par INRAE (SQPOV).

Cependant, ces quantités obtenues sont largement en dessous des prérequis de SBM pour procéder au développement de formulations qui consomment classiquement 3 à 10 kg d'actif. Aucune source de diCT capable de soutenir le développement de formulations optimisées n'a pu être trouvée pendant la durée du projet.

#### Approvisionnement en diCQ pour les études de laboratoire et recherche de plantes sources de diCT (INRAE GAFL)

Pour mener les travaux de laboratoire des différentes tâches, les équipes INRA ont eu un besoin important des molécules diCQ/diCT de haute pureté que l'on peut obtenir sur le marché européen à un prix très élevé (de l'ordre de 100 à 400 €/10 mg). Afin de disposer de molécules purifiées de haute qualité pour réaliser le programme prévu dans DicaBio, l'équipe GAFL a assuré la production de 3,5-diCQ à partir de racines de patate douce selon le procédé décrit dans le brevet INRA 08/00561 et a entrepris une recherche de plantes sources de diCT, sélectionnées à partir de la littérature, qui pouvaient permettre la fourniture de cette molécule.

Une culture de patate douce a été mise en place en serre en 2017. Elle a conduit à l'obtention d'un stock de racines dont la teneur en diCQ représente un potentiel de production de plus de 18 g de diCQ (figure 1). Un stock de 3,5-diCQ de haute pureté de plus de 500 mg (qui représente une valeur marchande de près de 15 000 €) a été constitué, ce qui a permis de répondre aux besoins de l'ensemble des travaux de laboratoire menés dans le cadre du projet.



**Figure 1.** Production en serre de plants de patate douce (A) et de racines issues des boutures 6 semaines après mise en culture (B).

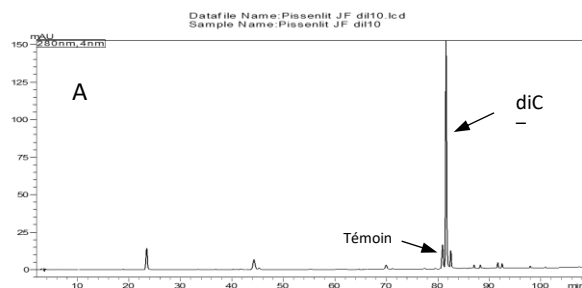
L'intérêt de la société SBM Développement se portant préférentiellement sur le développement du diCT comme biopesticide, nous avons entrepris pour subvenir aux besoins des équipes une recherche de plantes sources intéressantes, sélectionnées à partir de la littérature pour leur teneur en diCT. 5 espèces ont été cultivées en serre, la chicorée sauvage et l'endive (*Cichorium intybus*), l'arachide (*Arachis hypogaea*), le pissenlit (*Taraxacum sp.*) et le basilic (*Ocimum basilicum*). Les organes des plantes ont été analysés pour leur teneur en diCT (tableau 1).

Ces différentes espèces présentent des teneurs importantes en diCT dans les feuilles, alors que la molécule est quasiment absente des racines. Le pissenlit (5% de diCT dans la matière sèche des feuilles), et à un degré moindre l'arachide et la chicorée, représentent des plantes sources intéressantes. De plus, les profils chromatographiques sont remarquablement simples, permettant une purification aisée (figure 2, A). Nous avons effectué une production de diCT en 2018/2019 à partir d'une culture en serre de pissenlit, selon la méthode d'extraction et de purification mise au point pour la production du 3,5-diCQ issu de la patate douce. Cette méthode a été modifiée pour l'adapter aux feuilles de pissenlit et comprend les étapes suivantes : extraction hydroéthanolique, dépigmentation de l'extrait à l'éther de pétrole, purification du diCT par chromatographie HPLC semi-préparative, lyophilisation de la substance purifiée. Une extraction pilote nous a permis de produire avec un excellent rendement (14,6 mg de diCT par gramme de matière sèche de feuilles) 73 mg de diCT de très bonne pureté disponibles pour les études de laboratoire (figure 2, B). Ces travaux constituent une piste intéressante pour l'approvisionnement en masse du diCT à partir d'une source naturelle.

Par ailleurs les fortes teneurs en diCT de ces espèces végétales nous a amenés à les sélectionner pour leur mise en culture en parcelles pièges installées en plein champ dans l'objectif d'étudier l'adaptation des pucerons aux diCT et diCQ (tâche 3 du projet).

**Tableau 1.** Teneur en diCT des organes de quelques espèces végétales sélectionnées d'après la littérature et évaluation de la pureté de leurs profils chromatographiques.

		diCT g/100g MS	Pureté
Pissenlit "à cœur plein amélioré"	jeunes feuilles	5,1	+++
	feuilles âgées	4,1	+++
	racines	0,5	
Arachide	apex	2,0	+
	feuilles subterminales	1,6	+
	feuilles âgées	1,0	+
	tige	0,2	
	pédoncules	0,2	
Chicorée sauvage "Barbe de Capucin"	jeunes feuilles	1,8	+
	feuilles âgées	1,4	+
	racines	0,0	
Endive	feuille, limbe	1,0	+
	Feuille : nervure centrale	0,2	
	racines	0,0	
Basilic pourpre	apex	0,5	
	feuilles âgées	0,4	
	hampe florale	0,0	
	racines	0,0	



**Figure 2.** A: profil chromatographique HPLC à 280 nm d'un extrait de jeunes feuilles de pissenlit. B: diCT purifié obtenu par extraction et purification à partir de feuilles de pissenlit.

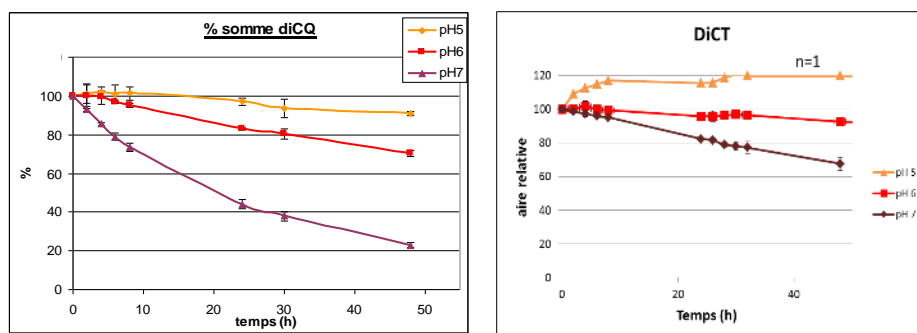


### Connaissances sur la stabilité chimique des molécules (INRAE SQPOV) tâche 1.0.3

Les travaux menés dans DicaBio comprennent un volet sur la caractérisation chimique des actifs. Les études de stabilité chimique, initiées sur diCQ et l'analogue acide chlorogénique (5-CQ, acide 5-caféoylquinique, ne comportant qu'un résidu caféique) lors de projets précédents, ont été poursuivies en milieux modèles et étendues au diCT afin d'acquérir une connaissance générique qui permettra d'apporter des éléments de réactivité face aux différentes situations rencontrées au cours du développement des formulations et de l'utilisation de biopesticides à base de diCT/diCQ. L'influence de différents facteurs jouant un rôle important a donc été étudiée.

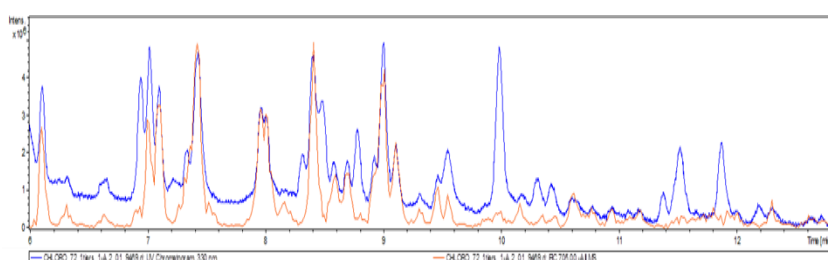
#### Impact du pH

Pour des pH de 7,0 et 6,0, le diCT se dégrade moins rapidement que le diCQ (figure 3). A pH 5,0, le diCT est stable alors que 10% de dégradation sont observés pour le diCQ après 48 h. Les formulations à base de diCT seront donc développées à des pH inférieurs ou égaux à 5,0 pour des raisons de stabilité chimique.



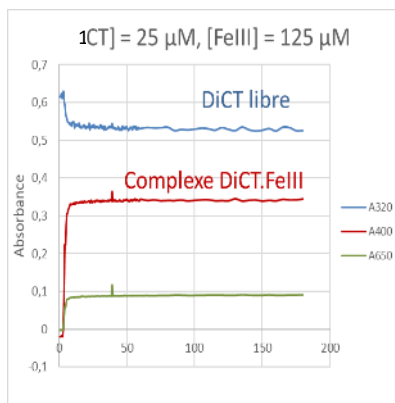
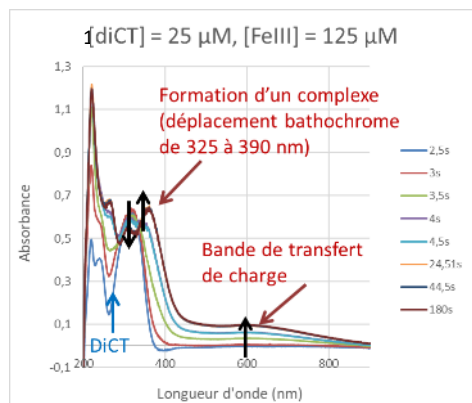
**Figure 3.** Evolution de la concentration relative en diCQ (somme 3,4-, 3,5- et 4,5-diCQ) (A) et diCT (B) en solution tampon acétate 100 mM (pH 5,0) et tampon phosphate 100 mM (pH 6,0 et 7,0).

Par ailleurs, le 3,5-diCQ se régio-isomérise pour produire deux autres isomères, les 3,4- et 4,5-diCQ. Diverses voies de dégradation ont également été identifiées, tout d'abord par hydrolyse avec formation d'acides 3-, 4- et 5-monocaféoylquiniques à partir du diCQ et de l'acide monocaféoyltartrique (acide caftarique) à partir du diCT. Néanmoins, la voie principale de dégradation apparaît être l'oxydation. Pour la molécule parent 5-CQ, une analyse en spectrométrie de masse de dizaines de produits formés en très faible quantité a confirmé la présence de plus de 30 dimères issus de l'oxydation (figure 4). Cette réactivité n'a pu être confirmée pour l'instant pour le diCQ et le diCT en raison du nombre de produits de dégradation, présents en trop faible quantité pour être identifiés. L'instabilité observée à des pH > 5,0 est bien corrélée avec l'oxydabilité accrue des unités ortho-diphénoliques lorsque le pH croît.



**Figure 4.** Chromatogramme HPLC à 280 nm (en bleu) de produits néoformés après 48 h à pH 7,0 et 40°C à partir de l'acide chlorogénique (5-CQ) et élués de 6 à 12 min. Recherche de dimères de 5-CQ en spectrométrie de masse (m/z 705, en orange).

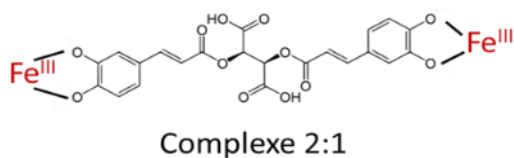
Les polyphénols sont connus pour leur capacité à produire des complexes avec les ions des métaux de transition, cette chélation pouvant potentiellement entraîner un transfert d'électron vers le centre métallique et donc une oxydation du polyphénol. Nous avons montré par spectroscopie UV-visible que le diCQ donnait des complexes avec les ions Fe(II) et Fe(III) mais apparemment pas avec Cu(I) et Cu(II). La chélation du diCT avec Fe(III) se fait aussi très rapidement en quelques secondes (figure 5). En présence d'un ratio Fe(III)/diCT > 2,5, une précipitation est observée suggérant que le complexe 2:1 peut se former et est ensuite insoluble.



**Figure 5.**

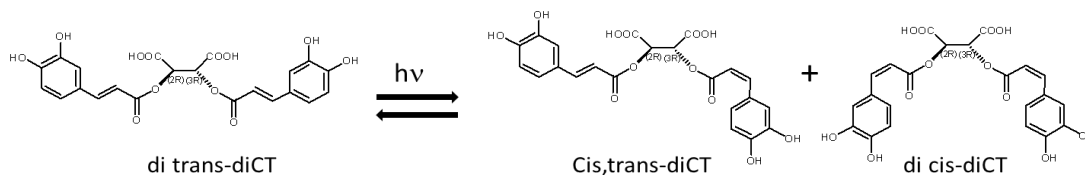
1 - Evolution spectrale (A) et cinétique (B) lors de la complexation entre le Fe(III) (125 µM) et le diCT (25 µM).

2 - Proposition d'un complexe de stœchiométrie 2:1 entre Fe(III) et le diCT.



### Impact de la lumière

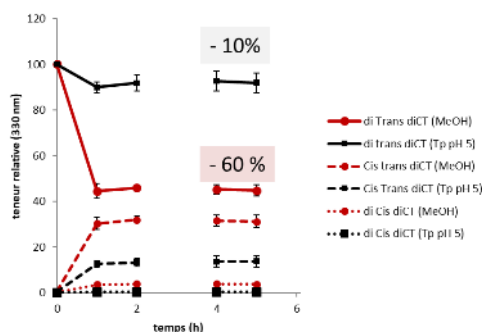
L'acide caféique qui est l'unité constituante essentielle du diCT est connu pour son aptitude à se stéréo-isomériser en présence de lumière, conduisant à une rotation de la double liaison C=C trans en cis. Nous avons montré que le diCT, naturellement di-trans, formait sous irradiation à 254 nm et 365 nm les stéréo-isomères cis,trans et di-cis. Cette réaction apparaît être un équilibre puisque seulement 10% de stéréo-isomères sont formés en milieu aqueux à pH 5,0 et 60% dans un solvant organique comme le méthanol, indépendamment de la longueur d'onde d'irradiation (figure 6).



**Figure 6.**

A -Schéma de stéréo-isomérisation du diCT en présence de lumière.

B – Suivi dans le temps de la stéréo-isomérisation conduite à 365 nm dans le méthanol et dans un tampon pH 5,0.

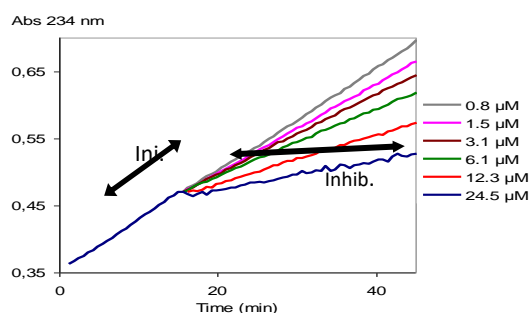


### Propriétés antioxydantes

L'action aphicide ou fongicide des diCQ et diCT peut impliquer diverses propriétés physico-chimiques comme leur affinité pour les protéines, la chélation des ions de métaux de transition, ou leur capacité antioxydante. Enfin, connaître leur stabilité face à l'oxydation est nécessaire dans un contexte de développement d'une formulation de composition complexe ou d'élucidation de mécanismes de dégradation.

La capacité antioxydante des diCT, diCQ et 5-CQ a été évaluée et comparée à quelques données que nous avons précédemment acquises. Le principe de mesure de la capacité antioxydante repose sur l'aptitude des molécules à transférer un hydrogène vers un radical peroxy  $ROO^\circ$  généré *in situ* par décomposition thermique du AAPH (2,2'-azobis(2-méthylpropionamide) dihydrochloride). En absence d'antioxydant, les  $ROO^\circ$  sont initiateurs de l'oxydation d'une sonde lipidique, l'acide linoléique. Le suivi de la cinétique d'accumulation des marqueurs d'oxydation (diènes conjugués lipidiques) se fait par spectroscopie UV à 234 nm. En présence d'antioxydant, l'oxydation est ralentie. La CI50 correspond à la concentration nécessaire pour réduire de 50% la vitesse d'oxydation (figure 7, tableau 2).

**Figure 7.** Oxydation de l'acide linoléique amorcée par du AAPH en milieu micellaire et inhibition après ajout de différentes concentrations en diCT.



	CI50 (µM) dans travaux précédents	CI50 (µM) dans DicaBio
5-CQ	14.5	20,6 ± 2,3
3,5-diCQ	2.6	3,5 ± 0,3
diCT		8,0 ± 0,5
α-tocophérol	0.13	
Quercétine	3.1	2,7 ± 0,5

**Tableau 2.** CI50 pour diCT, diCQ et acide chlorogénique et comparaison avec des antioxydants de référence (α-tocophérol et quercétine). Ecart-type rapporté pour la moyenne (n= 3-4).

La présence d'une unité caféoylle supplémentaire sur l'acide quinique (diCQ vs 5-CQ) multiplie par 6 la capacité antioxydante dans ce système micellaire. Par ailleurs, à nombre égal d'unités caféoyles, le diCQ est deux fois plus antioxydant que le diCT. La polarité de ces 2 molécules est différente, ce qui affecte leur partition entre les phases micellaire et aqueuse. La capacité à interagir avec le radical initiateur ROO<sup>•</sup> localisé à l'interface des phases est alors différente. D'une manière générale, les diCQ et diCT sont de très bons antioxydants avec des capacités proches de celle de la quercétine qui est connue à ce jour comme le meilleur antioxydant phénolique naturel.

En conclusion, la caractérisation des propriétés chimiques des diCT et diCQ menée dans DicaBio met en évidence une plus grande stabilité chimique du diCT par rapport au diCQ. Cependant ces deux molécules sont stables à pH acide (pH < 5,0). Ces molécules montrent des grandes capacités d'interaction avec le Fer et possèdent un pouvoir antioxydant élevé. La lumière entraîne une formation de stéréoisomères du diCT, surtout en milieu organique, comme cela a déjà été montré pour le diCQ. L'ensemble de ces caractéristiques chimiques devront être prises en considération pour la formulation de ces composés.

### Développement des pré-formulations (SBM) (tâche 1.1)

Plusieurs types de formulations foliaires à usage aphicide du diCT ont été développés au cours du projet par l'équipe SBM formulation de l'entreprise SBM et ont été délivrées à INRAE sous forme de concentré soluble (SL), poudre mouillable (WP), suspension concentrée (SC).

**Tableau 3.** Liste des formulations développées par SBM.

Type de formulation	Éléments déterminants pour le développement	Code des formulations développées	Difficultés rencontrées	Décision
Formulation SL n°1	Faible quantité de vrac technique disponible (20g)	SL3 (3 g/L diCT) SL1-F (1 g/L diCT) SL1P-ATP (1 g/L diCT)	Développement de micro-organismes Formulations peu optimisées à cause de la faible quantité de vrac technique disponible	Amélioration de ces formulations pour éviter le développement de micro-organismes
	Faible quantité de vrac technique disponible (20g) Ajout de conservateur pour corriger le développement de micro-organismes	SL3+C (3 g/L diCT) SL1-F+C (1 g/L diCT) SL1P-ATP+C (1 g/L diCT) SL1-P-F+C (1 g/L diCT)	Efficacité et phytotoxicité des blancs de formulations en test insecticide observées Formulations peu optimisées à cause de la faible quantité de vrac technique disponible	Abandon de ces formulations et développement d'un nouveau type de formulation WP
Formulation WP	500g de vrac technique disponible Possibilité de concentrer la formulation en actif par rapport aux SL	DT-300-WP-A (300 g diCT/ kg)	Formulation utilisée en test <i>in planta</i> insecticide et fongicide : l'efficacité observée est mitigée	Abandon de ces formulations et développement d'un nouveau type de formulation SC
Formulation SC	Moins de 500g de vrac technique disponible Formulation plus performante qu'une SL ou WP	SC à 135 g/L de diCT visée	Forte consommation en actif Précipitation du diCT à un pH inférieur à 5,0 lors de la préparation des bases de formulation	Abandon de la formulation SC et développement d'une nouvelle formulation SL
Formulation SL n°2	Utilisation de la base SC pour avoir une SL plus concentrée que les premières développées	19L10SL02 (135 g/L diCT)	Aucune difficulté supplémentaire rencontrée	Dernière formulation développée

Les premières formulations ont été fournies tardivement en raison du retard d'approvisionnement en matière active mentionné ci-dessus. Les dernières ont été mises au point début 2020.

En conclusion, trois types de formulation foliaires ont été développées par l'entreprise SBM: le premier lot de formulations SL avec et sans conservateur, la formulation WP DT-300-WP-A et une formulation SL plus concentrée 19L10SL02.

Deux contraintes ont rendu ces travaux de formulation complexes : la faible disponibilité en diCT et les propriétés physico-chimiques de la matière active. Tous les choix de développement de formulation ont été faits de façon à minimiser la consommation d'actif, ce qui ne permet pas d'obtenir des formulations optimisées pour l'efficacité de la matière active. Quant aux propriétés du diCT, sa précipitation à pH inférieur à 5,0 a empêché le développement d'une formulation SC qui aurait été potentiellement plus performante.

#### Suivi de la stabilité du diCT dans la formulation 19L10SL02 (INRAE SQPOV) (tâche 1.0.3)

La stabilité de la formulation 19L10SL02 utilisée pour les derniers essais de DicaBio a été suivie lors de son stockage à 4 °C à la demande de PSH et lors d'un vieillissement accéléré à 54 °C pendant 14 j à la demande SBM. Le diCT est très stable dans cette formulation puisque seulement 16% de la matière active a disparu en 14 j à 54 °C pour 0,7% lors du stockage à 4 °C pendant 4 mois (Tableau 4).

**Tableau 4.** Teneur en diCT dans la formulation 19L10SL02 conservée à 4°C ou après évolution accélérée à 54°C.

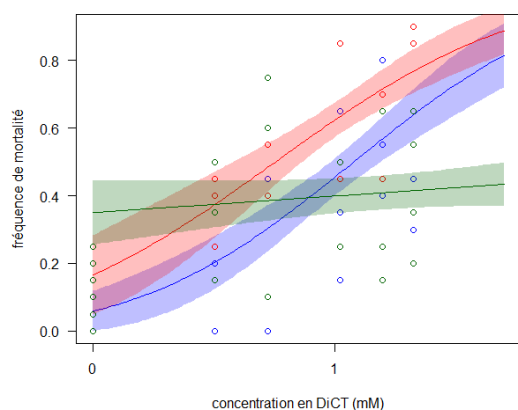
diCT] g/L théorique	[diCT] g/L mesuré	Ecart-type (n=3)	Variation
<b>Conservation à 4 °C pendant 4 mois 1 semaine</b>			
132,6	131,7	1,7	- 0,7%
<b>Conservation à 4 °C pendant 7 mois 2 semaines 3 jours</b>			
8,0	7,2		- 10%
<b>Après évolution accélérée (54 °C/14 j)</b>			
132,6	111,1	1,1	-16,2%
<b>Après évolution accélérée (54 °C/14 j) + 4 mois à θ ambiante</b>			
132,6	102,9	0,25	-22,4%

#### Tests d'efficacité des pré-formulations sur pucerons en laboratoire (INRAE PSH) (tâche 1.2)

Nous avons en premier lieu mis au point un mode opératoire pour pouvoir tester l'efficacité aphicide des différentes formulations de diCT fournies par SBM. Ce mode opératoire a été validé en prenant comme produit de référence le produit commercial Tepeki®, un insecticide de synthèse à base de flonicamide. Cette substance active a un mode d'action (modulateur d'organes chordotonaux) qui provoque chez les pucerons intoxiqués des réactions identiques à celles que l'on observe avec le diCT ou le 3,5-diCQ, c'est-à-dire une phagoréulsion suivi d'un arrêt de l'alimentation qui apparaît à la même vitesse. Ce mode opératoire consiste à pulvériser un volume connu de produit formulé à la surface de feuilles support excisées (dont l'espèce varie en fonction des espèces de pucerons testées). Les feuilles sont ensuite séchées sous une hotte chimique. La façon dont le produit s'étale, se répartit et sèche sur les feuilles est noté. Quand les feuilles sont sèches, des larves L1 âgées de 0 à 24h, sont déposées avec un pinceau à raison de 20 pucerons par feuille. Les feuilles sont maintenues dans des boîtes de pétri sur du papier absorbant. A 24 h et 48 h les pucerons sont décomptés selon les catégories suivantes: morts, vivants fixés sur la feuille, vivants en dehors de la feuille.

#### Première série de formulations: solutions liquides prête à l'emploi

Mi-mars 2018 nous avons reçu les 3 premières formulations sous forme de solutions prêtes à l'emploi : SL1-F (solutions à 1g/L de diCT contenant un agent filmogène) ; SL3 (solution à 3 g/L de diCT) et SL1P-ATP (solutions à 1g/L de diCT contenant un agent pénétrant) (Cf tableau 3 ci-dessus). Nous les avons conservées dans une chambre climatique à

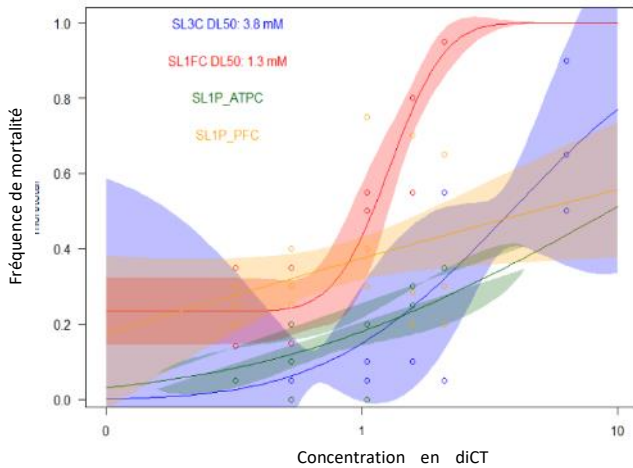


**Figure 8.** Courbes dose/mortalité des larves de *M. persicae* Mp06 déposées sur feuilles de piment après application de trois formulations SL de diCT : SL1-F (rouge), SL3 (bleu) et SL1-P (vert).

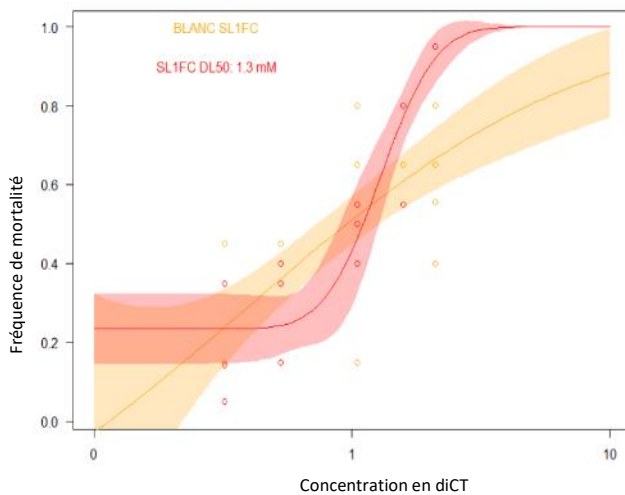
l'abri de la lumière à 11°C, selon les consignes de SBM. Les essais ont été menés sur notre principal modèle plante/puceron: feuille du cultivar de piment «Yolo Wonder» et notre clone de laboratoire *Myzus persicae* Mp06. Nous avons testé la gamme de concentration de diCT suivante: 0.32, 0.53, 1.05, 1.58, et 2.11 mM (soit 1g/L). Ces tests ont été effectués sur 1260 pucerons (figure 8). Les résultats préliminaires ont montré que la formulation SL1-F contenant l'agent filmogène semble avoir des propriétés intéressantes avec une DL50 de 0,56. Cependant l'absence de témoin de formulation ne contenant pas le diCT ne nous a pas permis de tirer de conclusions quant à l'implication de la substance active dans l'effet observé. De plus, des développements mycéliens ont rapidement fait leur apparition dans les solutions mères, nous empêchant d'aller plus avant dans ces investigations. SBM a donc mis en fabrication de nouvelles formulations contenant un «conservateur» pour pallier ce problème. Nous avons donc reçu fin avril 2018 quatre nouvelles formulations.

### Deuxième série de formulations: solution liquide prête à l'emploi avec conservateurs

Les quatre formulations reçues étaient identiques aux précédentes avec addition d'un conservateur, SL1-F-C (solutions à 1g/L de diCT contenant un agent filmogène et un conservateur) ; SL3-C (solution à 3 g/l de diCT plus conservateur), SL1P-ATP-C (solutions à 1g/L de diCT plus agent pénétrant et conservateur), plus une formulation combinant un agent filmogène et un agent pénétrant, SL1-P-F-C (solutions à 1g/L de diCT plus agent filmogène, agent pénétrant et conservateur). Nous avons reçu en même temps les témoins de formulation de ces produits. Nous avons conservé les formulations à 4°C et à l'obscurité. Le même protocole de test a été suivi en ajoutant une dose plus élevée pour la formulation SL3 à 6,22 mM. Comme pour les premières formulations les résultats montrent une efficacité de la formulation contenant l'agent filmogène (SL1-F-C, figure 9). Les réponses de *M. persicae* aux autres formulations sont très variables. Cependant les témoins de formulations ont montré les mêmes effets biologiques que les produits contenant la substance active (figure 10). Nous en avons donc conclu que les co-formulants étaient présents à des concentrations trop élevées dans ces formulations. Des tests similaires ont été effectués sur *Dysaphis plantaginea* (Puceron cendré du pommier) élevé sur feuille de plantain. Les blancs de formulation se sont avérés également toxiques pour les pucerons aux fortes doses masquant aussi les effets potentiels du diCT. L'ensemble de cette série de tests a été réalisé sur 3639 individus de *M persicae* et 733 individus de *D plantaginea*. Suite à ces résultats SBM a modifié sa stratégie et s'est orienté vers une formulation solide sous forme de poudre mouillable (WP) pour limiter les concentrations des co-formulants.



**Figure 9.** Courbe dose/mortalité des larves de *M. persicae* Mp06 déposées sur feuilles de piment après application de la 2ème série de formulations de diCT.



**Figure 10.** Courbe dose-mortalité de *Myzus persicae* Mp 06 déposés après application de la formulation SL1-F-C et de son blanc de formulation.

### Troisième série de formulation : La formulation solide avec adjuvant extemporané

En mai 2019 nous avons reçu le témoin d'une formulation solide ainsi qu'un adjuvant commercial (Elvis®). Cet adjuvant est constitué de 355 g/L de lécithine de soja sous forme d'émulsion aqueuse. Il est commercialisé comme agent mouillant et pénétrant.

Afin de s'assurer de leur innocuité sur *M. persicae* aux doses d'emploi nous avons testé 3 doses des blancs de formulations, 3 doses d'Elvis® et leur combinaison pour les deux doses les plus fortes de blanc (tableau 5). Ces tests ont été réalisés sur 800 pucerons pour garantir la robustesse des résultats. La mortalité est faible pour toutes les modalités. Elle atteint jusqu'à 10,5% ce qui est un seuil acceptable pour ce type de biotest. Nous en avons donc conclu que les co-formulants de la formulation solide n'induisaient pas de biais comme ceux observés avec les solutions SL prêtes à l'emploi précédemment testées. Nous avons cependant choisi d'utiliser l'adjuvant Elvis à la dose la plus faible soit 0,125 % pour limiter au maximum l'impact direct qu'il pourrait avoir sur les pucerons. SBM a donc fabriqué une nouvelle formulation sur cette base : DT-300-WP-A concentré à 300 g de diCT/kg. Nous avons reçu 20 g de cette formulation en juillet 2019 et nous avons effectué des biotests avec la gamme de concentration suivante : 16,9; 8,4; 4,2; 2,1 et 1,1 mM de diCT plus 0,125% d'Elvis®. Nous avons de nouveau testé les blancs de formulation en parallèle. Cette formulation sous forme de poudre mouillable nous a permis d'augmenter les concentrations par rapport à ce que nous appliquions précédemment. Nous avons ainsi pu tester une concentration de 16,9 mM de diCT alors que nous nous étions limités à



**Tableau 5.** Liste des modalités de blancs de formulation et d'adjuvant testées avant obtention de la formulation solide WP.

Elvis (%)	Total	Mort	Mortalité corrigée (%)
0	80	1	0,00
0,125	60	6	8,86
0,2	60	5	7,17
0,3	60	7	10,55

Blanc (g/l)	Total	Mort	Mortalité corrigée (%)
0	80	1	0,00
3,5	60	4	5,49
5,83	60	0	0,00
8,16	60	5	7,17

Elvis (%)	Blanc (g/l)	Total	Mort	Mortalité corrigée (%)
0	0	80	1	0,00
0,125	5,83	60	0	0,00
0,2	5,83	60	3	3,80
0,3	5,83	60	3	3,80
0,125	8,16	60	0	0,00
0,2	8,16	60	6	8,86
0,3	8,16	60	1	0,42

**Tableau 6.** Tests de mortalité de *M persicae* après application de la formulation solide (DT-300-WP-A) de diCT plus 0,125% d'Elvis®.

Blanc (g/l)	Total	Mort	Mortalité corrigée (%)
0	60	1	0,00
1,1	60	5	6,78
2,1	60	6	8,47
4,2	60	2	1,69
8,4	60	3	3,39
16,9	60	7	10,17

DiCT (mM)	Total	Mort	Mortalité corrigée (%)
0	60	1	0,00
1,1	60	0	0,00
2,1	60	3	3,39
4,2	60	4	5,08
8,4	60	15	23,73
16,9	60	11	16,95

6,22 mM avec les solutions liquides. Cependant les résultats de mortalité même aux doses fortes ne sont pas concluants avec 16% de mortalité à la plus forte dose (tableau 6). Au vu de ces résultats nous avons augmenté les doses d'Elvis® à 0,2 et 0,3% pour tenter d'améliorer la pénétration du diCT dans les feuilles. Ces tests additionnels qui ont été réalisés sur 780 pucerons n'ont pas montré d'amélioration d'efficacité de la formulation en poudre mouillable. Nous avons donc choisi de comparer l'efficacité de cette formulation sur trois autres espèces de pucerons : *Sitobion avenae* le puceron des épis de céréales (tableau 7), *Acyrtosiphon pisum* le puceron du pois (tableau 8) et *Dysaphis plantaginea*, le puceron cendré du pommier (tableau 9). Comme pour *Myzus persicae* les résultats des biotests n'ont pas montré de relation claire dose/mortalité. Cependant une tendance laissant envisager un effet a pu être observée sur *D. plantaginea*. Nous avons donc persévéré en augmentant le nombre de pucerons testés. Cette tendance s'est alors confirmée avec des mortalités de 30,3 % et 32 % avec 0,2 et 0,3 % d'Elvis respectivement à la dose la plus forte de diCT. Ce résultat reste cependant très inférieur ce que l'on peut observer dans des tests où cette matière active est incorporée à l'alimentation des pucerons. En effet 100% des individus de ces trois espèces de pucerons meurent à la dose de 2mM de diCT lorsqu'il est présent dans un milieu nutritif.

**Tableau 7.** Test de mortalité de *S. avenae* après application de la formulation de diCT en poudre mouillable.

Elvis	DiCT (mM)	n total	n mort	Mortalité corrigée (%)
0	0	100	2	0,0
0,125	0	60	0	0,0
	4,2	60	4	4,8
	8,4	60	7	9,9
	16,9	60	10	15,0
0,2	0	60	22	35,4
	4,2	60	2	1,4
	8,4	60	13	20,1
	16,9	60	5	6,5
0,3	0	60	9	13,3
	4,2	60	9	13,3
	8,4	60	7	9,9
	16,9	60	10	15,0

**Tableau 8.** Test de mortalité de *A. pisum* après application de la formulation de diCT en poudre mouillable.

Elvis	DiCT (mM)	n total	n mort	Mortalité corrigée (%)
0	0	100	25	0,0
0,125	0	60	8	0,0
	4,2	60	21	13,3
	8,4	80	13	0,0
	16,9	80	42	36,7
0,2	0	60	7	0,0
	4,2	60	12	0,0
	8,4	80	29	15,0
	16,9	80	22	3,3
0,3	0	60	7	0,0
	4,2	80	18	0,0
	8,4	60	23	17,8
	16,9	60	21	13,3

**Tableau 9.** Test de mortalité de *D. plantaginea* après application de la formulation de diCT en poudre mouillable.

Elvis	DiCT (mM)	n total	N Mort	Mortalité corrigée (%)
0	0	100	2	0,0
0,125	0	60	2	1,4
	4,2	60	5	6,5
	8,4	60	3	3,1
	16,9	60	8	11,6
0,2	0	60	0	0,0
	4,2	60	7	9,9
	8,4	60	13	20,1
	16,9	60	19	30,3
0,3	0	120	9	5,6
	4,2	120	17	12,4
	8,4	120	34	26,9
	16,9	120	40	32,0

On peut émettre l'hypothèse que la formulation en poudre mouillable même associée à un adjuvant ne pénètre pas dans les feuilles des 4 plantes support testées : orge pour *S. avenae*, plantain pour *D. plantaginea*, piment pour *M. persicae* et fève pour *A. pisum*. Ces résultats ont conduit SBM à fabriquer une ultime formulation.

#### Quatrième série de formulation: la solution concentrée avec adjuvants extemporanés

En mai 2020 nous avons reçu une solution très concentrée : «19L10SL02» à 123,6 g/L de diCT ce qui est largement au-dessus de la limite de solubilité que nous avons observée dans des solutions aqueuses jusque-là. Cette solution avait pour vocation à être testée avec 3 adjuvants devant faciliter la pénétration du diCT dans les feuilles :

- Tween20, un tensioactif non ionique de type polysorbate,
- Radia7955 à base d'huile de graines méthylée (MSO),
- NatureN, à base d'huile de colza estérifiée, ce produit commercial est vendu pour lutter contre les pucerons en agissant par contact direct.

Etant donné le nombre de modalités à tester, nous avons fixé les concentrations de ces trois adjuvants à 0,2% pour ne pas multiplier les traitements et avoir des résultats plus robustes.

**Tableau 10.** Test de mortalité de *M. persicae* après application de la formulation de diCT sous forme de solution concentrée.

Adjuvant	Cons DiCT (g/l)	Mortalité corrigée du produit (19L10SL02)
NatureN	0	0
	8,4	0
	16,8	0
Radia	0	0
	8,4	0
	16,8	0
Tween	0	1,75
	8,4	0
	16,8	5,26

**Tableau 11.** Test de mortalité de *D. plantaginea* après application de la formulation de diCT sous forme de solution concentrée.

Adjuvant	conc DiCT (mM)	Mortalité Corrigée (%)	
		Produit (19L10SL02)	Blanc de formulation
0	33,6	19,80	2,73
	67,2	19,80	19,11
	0	12,97	-
naturen	33,6	21,50	-
	67,2	26,62	-
	0	11,26	-
radia	33,6	18,09	-
	67,2	38,57	-
	0	14,68	-
tween	33,6	24,91	-
	67,2	47,10	-
	0	-	-

**Tableau 12.** Test de mortalité de *A. pisum* après application de la formulation de diCT sous forme de solution concentrée.

Adjuvant	conc DiCT (mM)	Mortalité Corrigée (%)	
		Produit (19L10SL02)	Blanc de formulation
0	8,4	18,9	33,1
	16,8	75,7	24,0
	33,6	69,6	-
	67,2	75,7	-
naturen	8,4	93,9	93,9
	16,8	93,9	97,0
	33,6	91,9	-
	67,2	81,8	-
radia	8,4	37,2	33,1
	16,8	54,4	57,4
	33,6	51,4	-
	67,2	51,4	-
tween	8,4	14,9	43,2
	16,8	33,1	60,5
	33,6	39,2	-
	67,2	33,1	-

Les premiers biotests ont été réalisés sur 600 individus de *M. persicae* (tableau 10). Ces résultats ne montrant aucune mortalité à la dose de 16,8 mM de diCT, nous avons testé cette formulation sur d'autres espèces de pucerons. Nous avons effectué des tests sur 1160 individus de *D. plantaginea* (tableau 11) et 1380 individus d'*A. pisum* (tableau 12). Aucun des résultats obtenus sur les trois espèces de pucerons avec chacun des trois adjuvants testés ne montre que la formulation a permis au diCT d'exprimer son potentiel aphicide. Nous notons que le NatureN a bien une activité aphicide mais qu'il n'a pas d'action synergiste avec le diCT. Nous avons donc testé une éventuelle toxicité de cette formulation par contact direct sur *M. persicae* et *D. plantaginea* bien que cela ne soit pas en adéquation avec le mode d'action du diCT sur respectivement 1280 et 780 individus (tableau 13 et 14). Comme précédemment nous constatons que la mortalité observée est due aux co-formulants ainsi qu'aux adjuvants. Là encore aucun effet synergiste notable n'est observé avec le diCT.

Lors de ces trois années de tests nous avons testé 4 générations de formulations sur un total de 15 732 pucerons appartenant à 4 espèces différentes avec deux protocoles d'administration du diCT et différents adjuvants sans que nous n'ayons réussi à obtenir une action aphicide du diCT formulé et pulvérisé sur les feuilles.

**Tableau 13.** Tests par contact direct de la formulation 19L10SL02 sous forme de solution concentrée sur *M. persicae*.

Adjuvant	conc DiCT (mM)	Mortalité corrigée (%)	
		Produit (19L10SL02)	Blanc de formulation
0	16,8	47,4	54,4
	8,4	38,6	10,5
	4,2	10,5	10,5
naturen	16,8	84,2	57,9
	8,4	82,5	68,4
	4,2	81,6	86,8
radia	16,8	73,7	65,8
	8,4	28,1	42,1
	4,2	34,2	7,9
tween	16,8	52,6	36,8
	8,4	33,3	49,1
	4,2	81,6	55,3

**Tableau 14.** Tests par contact direct de la formulation 19L10SL02 sous forme de solution concentrée sur *D. plantaginea*.

Adjuvant	conc DiCT (mM)	Mortalité corrigée (%)	
		Produit (19L10SL02)	Blanc de formulation
0	67,2	-	62,4
	33,6	-	33,7
	16,8	0,54	-
naturen	67,2	98,2	-
	33,6	89,2	-
	16,8	83,9	86,8
radia	67,2	67,74	-
	33,6	83,87	42,1
	16,8	-	-
tween	67,2	94,6	-
	33,6	69,5	-
	16,8	57,0	-

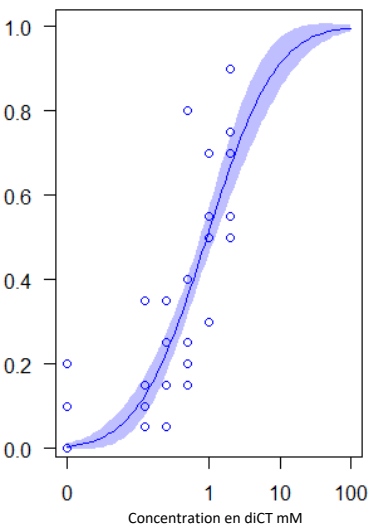
### Etudes sur la rémanence et la pénétration de la formulation (INRAE PSH, SQPOV) (tâches 1.6 et 1.7)

En réponse à cette série d'échecs, nous avons, ainsi que nous l'avons prévu dans le projet DicaBio en solution de repli, initié des expérimentations pour en comprendre la cause. Nous avons d'une part testé une première hypothèse d'une dégradation du diCT en surface de la feuille et d'autre part une seconde hypothèse d'une insuffisance de la pénétration de la formulation dans les tissus foliaires, nécessaire pour que le puceron ingère la molécule. Ces expérimentations ont été menées avec la formulation liquide concentrée 19L10S02 fournie au printemps 2020.

Nous avons évalué la rémanence et la pénétration du diCT déposé sous forme de gouttes de la formulation à 7.2 g/L de diCT sur des feuilles détachées de piment. Le diCT résiduel sur feuille a été récupéré par lavage des feuilles à l'aide d'une solution éthanol/eau (70:30, v/v). Les feuilles lavées ont ensuite été lyophilisées, broyées et extraites par le

même solvant d'extraction. L'analyse du diCT montre une rémanence totale sur la feuille durant 3h40 avec une absorption négligeable dans les tissus foliaires (0.5-1%). Après 24h et 48h, seulement 76-77% du diCT sont retrouvés sur les feuilles alors que l'absorption reste faible (1.9-2.3%). Une recherche de métabolites du diCT (isomères, produits d'hydrolyse) s'est révélée infructueuse et n'a pas permis d'expliquer la perte importante du diCT (ca.1/4) après 24h. Ces résultats confirment bien d'une part que la rémanence de l'actif sur la feuille est limitée et d'autre part que la formulation 19L10SLO2 du diCT ne pénètre pas dans les tissus foliaires et ne peut donc pas exprimer son potentiel aphicide.

Dans une seconde expérimentation, pour déterminer si la formulation était réellement active après pénétration dans les tissus foliaires, nous avons cherché à vérifier son efficacité et la stabilité du diCT formulé dans les tissus en forçant sa pénétration par une infiltration à la seringue dans des feuilles excisées de piment. De manière remarquable le produit formulé infiltré montre une très bonne efficacité vis-à-vis de *M persicae*. 97 % de mortalité en 48h à la dose 16,8 mM contre 3% de mortalité pour les blancs de formulation correspondants. Ceci démontre l'efficacité de la formulation lorsqu'elle pénètre dans la feuille et qu'elle est en contact avec le stylet du puceron et vraisemblablement ingérée. A titre de comparaison, nous rappelons qu'à cette même dose nous n'observons pas de mortalité après pulvérisation sur la feuille. Cependant le dosage par HPLC du diCT contenu dans les feuilles de piment 56 h après infiltration montre qu'il ne reste plus que 11,3% du diCT infiltré et 19,7% si on prend en considération deux métabolites nouvellement apparus. Aucun produit d'hydrolyse ou d'isomérisation par la lumière n'a été observé et la disparition du diCT n'est pas expliquée. Il semblerait donc que ce produit soit très labile dans les feuilles. Cette faible persistance est cependant suffisante pour induire une forte mortalité des pucerons et est sans doute gage d'un impact écologique limité.



**Figure 11.** Courbe dose-mortalité de *M. persicae* après infiltration de diCT en solution aqueuse dans les feuilles de piment

Pour compléter et confirmer que cet effet aphicide est bien dû au diCT nous avons utilisé le même protocole d'infiltration avec une solution de diCT non formulé et avons obtenu une courbe dose-mortalité de type classique (figure 11). Nous n'observons aucune mortalité dans les témoins infiltrés par l'eau. Ces derniers résultats confirment le potentiel aphicide du diCT et montrent que les formulations proposées ne sont pas parvenues à faire pénétrer cette molécule dans la feuille. Ces expérimentations encore préliminaires montrent donc que la pénétration du produit formulé constitue le principal verrou pour l'obtention d'une préparation aphicide efficace.

### Effet du diCQ et diCT après application topique dorsale (tâche 1.8)

L'objectif de cette étude était de déterminer si diCT et diCQ étaient actifs par application direct sur le corps du puceron. L'expérimentation a consisté à déposer une goutte de 0.25µl contenant l'actif sur le dos d'individus de *M persicae*. L'absence de mortalité observée nous a conduits à constater que ces molécules n'avaient pas d'efficacité par contact. Cela confirme donc nos résultats précédents montrant que ces molécules doivent être ingérées pour être actives et doivent donc pénétrer dans les tissus foliaires pour être efficaces.

### **Conclusion de la tâche 1**

Le travail réalisé par les équipes de DicaBio a permis d'apporter un corpus important d'informations nouvelles pour le développement d'une préparation aphicide à base de diCT.

Un des points clé pour la valorisation d'un biopesticide réside dans l'approvisionnement en substance active. La difficulté d'approvisionnement en diCT sur le marché (et en diCQ similairement) a constitué un verrou pour la réalisation par SBM des essais de formulation qui, selon le savoir-faire de l'entreprise, nécessitaient plusieurs kg d'actif. Bien que diCT et diCQ présentent l'avantage de s'accumuler à forte concentration dans certains organes végétaux et que leur extraction soit aisée, ce qui constitue un cas modèle pour leur valorisation comme biopesticide, les prix sont très élevés sur le marché en l'absence de demande. Bien que s'appuyant sur un procédé de synthèse publié, la mise en œuvre de la synthèse chimique s'est avérée complexe et n'a pu être utilisée. L'approvisionnement en diCT est donc resté limité (520 g au total) en fonction des moyens financiers disponibles. Cependant grâce à une recherche de sources végétales riches en diCT, nous avons montré que des espèces courantes, comme le pissenlit ou l'arachide, accumulent des teneurs considérables (5 % de la matière sèche) et nous avons démontré la facilité de leur extraction et de leur purification.

Les propriétés chimiques du diCT ont été caractérisées et comparées à celles du diCQ. Selon le pH, le diCT présente une moindre dégradation mais les deux molécules restent cependant stables à pH acide  $\leq 5,0$ . La dégradation du diCT est en grande partie due à un phénomène d'oxydation. Les deux molécules sont très fortement antioxydantes, le diCQ de manière plus importante que le diCT. Le diCT comme le diCQ interagit avec le Fer pour former un complexe. L'action de la lumière sur le diCT a été étudié et nous avons observé la formation de stéréoisomères. L'ensemble de ces données sur la chimie du diCT a permis d'orienter la fabrication des formulations. Le contrôle de la stabilité du diCT dans la formulation liquide concentré fournie en fin de projet a mis en évidence une bonne stabilité de la molécule.

Malgré le retard dans la mise à disposition des formulations en raison des difficultés d'approvisionnement, des préparations ont été élaborées par SBM tout au long du projet en interaction continu avec les équipes d'INRAE. Ces travaux de formulations se sont avérés complexes en raison des contraintes inhérentes aux propriétés physico-chimiques de la molécule. Après mise au point d'un protocole de test en laboratoire, différents types de formulation,

solutions liquides, poudre mouillable, suspension concentrée, solution liquide concentrée, ont été étudiées pour leur activité aphicide sur différentes espèces de pucerons. Malgré l'adaptation des formulations pour résoudre les difficultés rencontrées (contaminations des préparations, phytotoxicité, concentration limitée...), les tests de laboratoire effectués en nombre très important n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet aphicide net. Nos travaux sur le mode d'action de la formulation montrent clairement que le verrou réside dans l'absence de pénétration de la préparation dans les tissus foliaires. Si le diCT est artificiellement infiltré dans la feuille, seul ou formulé, une excellente efficacité est observée, ce qui confirme que le diCT, comme le diCQ, est toxique lorsqu'il interagit avec le stylet du puceron lors de son comportement alimentaire et vraisemblablement après son ingestion. Nos résultats pointent également sur le manque de rémanence de la substance sur la surface de la feuille et dans les tissus foliaires où il est vraisemblablement métabolisé rapidement.

L'ensemble de ces travaux nous éclaire sur les pistes de recherches futures qui devront être privilégiées pour réussir le développement de préparation aphicide à base de diCT ou diCQ.

En raison de l'absence d'efficacité des pré-formulations sur pucerons en laboratoire les travaux d'optimisation des formulations, de tests sous serre sur plantes entières et d'expérimentations plein champ n'ont pu être conduits.

## Tâche 2 - Déterminer l'efficacité fongicide du diCQ sur le terrain vis-à-vis d'une gamme de micro-organismes phytopathogènes (SBM Développement)

Objectif : Mettre au point un produit à base de diCQ/diCT et évaluer ses effets fongicides en conditions réelles d'application.

Les cibles fongiques étudiées sont celles définies au début du projet en fonction de la stratégie commerciale et de l'expérience de SBM sur les pathogènes des céréales (parasite foliaire *Septoria tritici* et parasites des semences *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Microdochium nivale* et *Septoria nodorum*) et en fonction des résultats acquis par INRAE antérieurement au projet (mildiou de la pomme de terre *Phytophthora infestans*).

### Tests d'efficacité fongicide *in vitro* (tâche 2.1)

L'objectif est de déterminer si la croissance de différents pathogènes foliaires et de semences est inhibée au contact du diCT, en utilisant des tests *in vitro* en surface de gélose. Ces tests consistent à ensemercer la gélose avec le pathogène étudié et à déposer le diCT dans des perforations réalisées dans la gélose. Ils ont été menés par SBM en partenariat avec le prestataire de service GERME. Les pré-formulations développées par SBM Formulation pour la tâche 1 ont été utilisées pour l'évaluation de cette efficacité fongicide du diCT.

L'action inhibitrice du diCT est appréciée suivant une notation d'inhibition autour du disque contenant le diCT (de ZI + : 1 à 2 mm à ZI ++++ : > 10 mm d'inhibition autour du disque, IC : Inhibition au contact du disque, IT : Inhibition totale).

Les résultats sont présentés ci-dessous pour les pathogènes des semences (tableau 15) et pathogènes foliaires (tableau 16).

Tableau 15. Résultats des tests *in vitro* de sensibilité des pathogènes fongiques des semences des céréales au diCT.

Produit	Teneur en actif testée	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Microdochium nivale</i>	<i>Septoria nodorum</i>
diCT pur	Pur	ZI +++ (2 j) ZI ++ (≥ 15 j)	ZI ++ (4 j) IC (≥15 j)	ZI ++++ (3 j) ZI ++ (4 j) IC (≥15 j)	ZI ++ (≥ 15 j)
SL-3	3 g/L	ZI + (9 j)	Aucune efficacité	ZI ++ (4 j)	ZI ++ (≥15 j)

Tableau 16. Résultats des tests *in vitro* de sensibilité des pathogènes fongiques foliaires au diCT.

Produit	Teneur en actif testée	<i>Septoria tritici</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
diCT pur	Pur	ZI++ (15 j)	Aucune efficacité
	3 g/L	IC (6j)	Non testé
	0,1 g/L	Aucune efficacité	Non testé
SL-3+C	3 g/L	IT (≥ 15 j)	ZI ++++ (≥ 15 j)
	2 g/L		Non testé
	1 g/L		Non testé
	0,1 g/L		Non testé
Blanc de SL-3+C	Équivalent 3 g/L	IT (≥ 15 j)	Non testé
	Équivalent 2 g/L		
	Équivalent 1 g/L		
	Équivalent 0,1 g/L		

Le diCT pur est inhibiteur pour les 4 pathogènes des semences. Cependant avec la formulation SL-3, une perte totale ou partielle d'efficacité est observée.

Concernant les pathogènes foliaires, l'efficacité du blanc de formulation ne permet pas de conclure à l'intérêt de la formulation SL-3+C sur *S. tritici*. Cependant le diCT pur montre une efficacité durable. Sur *P. infestans*, aucune efficacité n'est observée pour le diCT pur et l'efficacité de la formulation SL-3+C pourrait être dû à l'effet du blanc.

En conclusion, nous avons montré que le diCT a un potentiel fongicide *in vitro* contre les pathogènes des semences et contre la septoriose foliaire du blé. Le potentiel de cet actif doit être confirmé lors d'essais *in planta*.

### Développement des pré-formulations pour une utilisation fongicide (tâche 2.2)

#### Développement de formulation pour le traitement de semences

Dans le cadre des travaux sur l'activité fongicide du diCT, il a été nécessaire de développer une formulation adaptée au mode d'application particulier qu'est le traitement de semences (TS). Les formulations foliaires développées pour les insecticides décrits en tâche 1 n'étaient pas adaptées à ce mode d'application, notamment du fait d'une trop faible concentration en actif. Des travaux de formulations spécifiques pour l'application en TS sous forme de poudre pour poudrage (DP) ont donc été réalisés et sont résumés dans le tableau 17 ci-dessous.

**Tableau 17.** Synthèse des travaux de formulation développés pour l'application en traitement de semences.

Type de formulation	Éléments déterminants pour le développement	Code des formulations développées	Difficultés rencontrées	Décision
Formulation DP (poudre pour poudrage)	500g de vrac technique disponible Nécessité d'obtenir une formulation très concentrée (cible : 500 g/kg), sous forme d'une poudre très fine et très fluide sans formation d'agrégats lors de l'application Compatible en association avec un adjuvant de collage Nécessité d'avoir un pH de 4,5 et ne doit pas être hydrophobe	Blancs de formulations 19D02DP02 19D05DP01 19D05DP02	Trouver des charges neutres Granulométrie un peu élevée	Pas d'incidence sur la germination La base de formulation 19D05DP02 est retenue
		Formulation 19D05DP02 (500 g de diCT/kg)	Mesure du pH difficile à cause du manque de fluidité de la formulation pH des bouillies estimé autour de 2 : nécessité d'intégrer un correcteur de pH (NaOH) Réaction du diCT avec la soude lors du broyage de la formulation avec formation d'agrégats et probablement une dégradation du diCT pH de la formulation trop bas	Abandon des travaux de développement d'une formulation de type DP

Les propriétés physico-chimiques du diCT n'ont pas permis d'aller au bout du développement de la formulation DP destinée à une application en traitement de semences. La formulation foliaire de type SC développée pour les insecticides (voir tâche 1) aurait été une solution qui aurait pu être adaptée à l'application en TS mais son développement n'a pas abouti. Quant à la dernière formulation SL foliaire disponible (19L10SL02), elle n'est pas adaptée car pas assez concentrée en actif pour un TS (135 g/L de diCT pour la formulation SL alors que la concentration visée pour le TS était de 500 g/kg).

La formulation du diCT pour des applications TS constitue donc à la fin de ce projet un verrou technique qui nécessiterait des études supplémentaires et une disponibilité en actif plus importante pour être levé.

#### Développement de formulations foliaires

Les formulations foliaires développées pour les insecticides et décrits en tâche 1 ont été utilisées pour le traitement de la septoriose du blé car elles étaient adaptées à ce type d'application.

### Tests d'efficacité fongicide en conditions contrôlées sur plante (tâche 2.3)

#### Test efficacité pour les traitements de semences

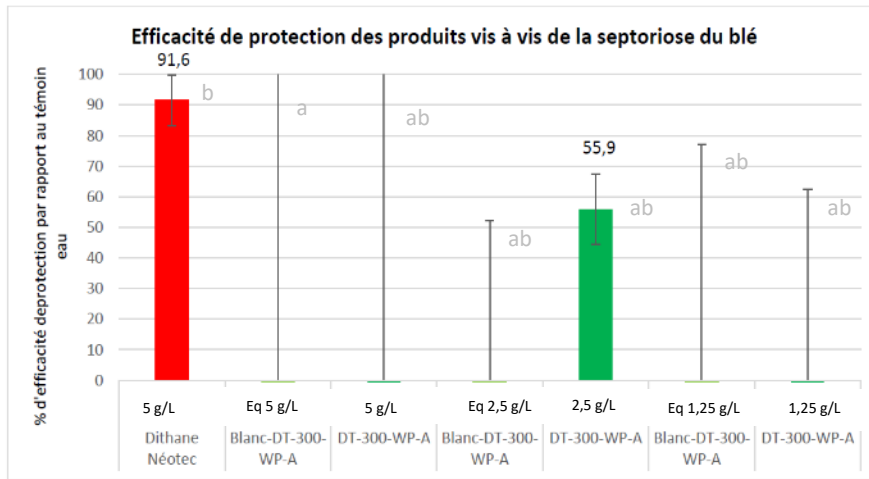
En absence d'une formulation adaptée, il n'a pas été possible de réaliser de tests *in planta* pour les pathogènes des semences.

#### Test efficacité contre *Septoria tritici*

L'objectif était d'évaluer l'efficacité de protection de la formulation poudre mouillable DT-300-WP-A et l'effet de son blanc vis-à-vis de *Septoria tritici* en conditions contrôlées.

L'essai a été mené sur des jeunes plants de blé au stade 3 feuilles. Le traitement a lieu 1 jour avant l'inoculation. Les modalités comportent un témoin négatif (traitement à l'eau), le fongicide de référence Dithane Néotech (Mancozèbe), la formulation DT-300-WP-A à 3 doses différentes ainsi que le blanc de formulation, Blanc-DT-300-WP-A, également à trois doses. La lecture du niveau d'infection du blé par la septoriose est réalisée à l'aide d'une échelle de notation prenant en compte le pourcentage de surface foliaire présentant des symptômes. Une observation des symptômes de phytotoxicité sur les plants est également réalisée.

Aucun symptôme de phytotoxicité n'a été observé pendant la durée de l'essai. Les résultats d'efficacité de l'essai sur septoriose sont présentés dans la figure 12 ci-dessous.



**Figure 12.** Efficacité de protection vis-à-vis de la septoriose par rapport au témoin (eau) d'un fongicide de référence (Dithane Néotech), de la formulation DT-300-WP-A à trois concentration de diCT et des blancs de formulation équivalents.

Le premier constat est que l'infection des plants du témoin eau est assez hétérogène et atteint une pression d'infection moyenne de 50%. Le Dithane neotec obtient une très bonne efficacité contre *S. tritici*. Aucun des blancs de formulation ne montre d'effet. Concernant la formulation, toutes les doses donnent 0% d'efficacité sauf la dose médiane de 2.5 g/L qui apporte une efficacité moyenne de 56%. Cependant, aucune différence statistique n'est observée pour les trois doses car les résultats sont très hétérogènes. De manière générale, les données sont très dispersées pour la formulation de diCT et le blanc, contrairement à la référence. Ces résultats peuvent être dus à la formulation. Il est très difficile de conclure sur cet essai au regard de l'efficacité qui est nulle pour toute les doses sauf la dose médiane de la formulation.

En conclusion, l'efficacité observée *in vitro* sur *S. tritici* n'a pu être confirmée *in planta*. La formulation WP n'est peut-être pas optimisée pour maximiser l'efficacité du diCT sur ce pathogène. Il n'a pas été possible de tester la formulation 19L10SL02 sur *S. tritici* faute de temps.

### Conclusion de la tâche 2

Nous avons montré que le diCT a un potentiel fongicide *in vitro* contre les pathogènes des semences et contre la septoriose foliaire du blé. Cependant, en raison de ses propriétés physico-chimiques, la formulation du diCT pour des applications en traitement des semences constitue un verrou technique qui nécessiterait des études supplémentaires et une disponibilité en actif plus importante pour être levé. Les essais *in planta* n'ont donc pu être menés. En ce qui concerne les parasites foliaires l'efficacité observée *in vitro* sur la septoriose du blé n'a pu être confirmée *in planta*. La formulation poudre mouillable DT-300-WP-A n'est peut-être pas optimisée pour maximiser l'efficacité du diCT sur ce pathogène. Il n'a pas été possible de tester la formulation 19L10SL02 faute de temps en raison du confinement.

### Tâche 3 - Évaluer ex ante la durabilité des diCQ/diCT en tant que toxines aphicides (INRAE, Plantes et Systèmes de culture Horticoles et Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Avignon)

Objectif : Etudier les risques d'adaptation des pucerons aux diCQ/diCT et des processus de métabolisation de ces molécules par ces insectes.

Nous avons choisi de focaliser les recherches menées lors du projet DicaBio sur l'espèce de puceron *Myzus persicae* qui est un ravageur d'importance mondiale, fortement polyphage. De plus, cette espèce dispose d'une très grande capacité d'adaptation aux insecticides. Ainsi, elle a développé des résistances à plus de principes actifs que n'importe quelle autre espèce connue d'insectes. Les capacités d'adaptation du genre *Myzus* résultant en une résistance aux insecticides peuvent être classées en trois catégories. La première est la réduction de l'absorption de l'insecticide par la limitation de la perméabilité de la cuticule. La deuxième est la détoxification du principe actif via la modulation de certaines activités enzymatiques permettant la dégradation ou la chélation de l'insecticide. La troisième consiste en la perte d'affinité des cibles moléculaires des insecticides grâce à des mutations ponctuelles dans les séquences nucléotidiques de leurs gènes. Etant donné les propriétés de nos actifs (toxiques par ingestion, et nouveaux sur le marché avec une cible moléculaire probablement nouvelle) la détoxification semble le mécanisme de résistance le plus probablement impliqué dans d'éventuelles résistances aux diCQ/diCT. Nous avons donc investigué ces aspects en 2016/2019. Parallèlement nous avons recherché dans la variabilité aphidienne naturelle des pucerons susceptibles de présenter une préadaptation à l'action toxique des diCQ/diCT lors de leur usage futur comme biopesticides. Nous avons d'une part exploré la variabilité naturelle de *Myzus persicae* et d'autre part la variabilité naturelle d'autres espèces de pucerons. Pour aborder ce second point, nous avons émis l'hypothèse que ces espèces de pucerons éventuellement préadaptées pourraient être découvertes sur des plantes naturellement riches en diCT et diCQ. Pour tester cette hypothèse des parcelles expérimentales pièges de plein champ ont été mises en place en 2018 et 2019 sur le domaine des Garrigues de l'Unité GAFL, comportant 5 espèces végétales pour lesquelles les travaux menés en 2017 au GAFL ont montré une forte teneur en diCQ ou diCT (cf tâche 1). Nous avons régulièrement prospecté les colonies aphidiennes se développant naturellement sur ces plantes. Celles-ci ont été prélevées, identifiées et évaluées pour leur sensibilité aux diCQ/diCT sur milieu synthétique au laboratoire.

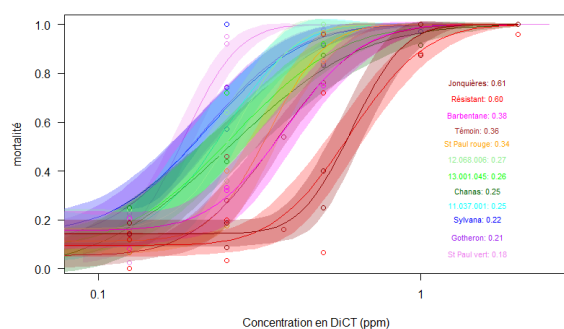
### Variation de sensibilité aux diCT/diCQ de populations de *Myzus persicae*, ravageur très polyphage (tâche 3.1 et 3.3)

Au printemps 2017, nous avons réalisé une étude sur les différences de sensibilité que pouvaient posséder des populations naturelles de *Myzus persicae* se nourrissant sur leur hôte primaire le pêcher, qui contient du 3,5-diCQ. 10 populations sauvages et deux souches de laboratoire ont été testées (tableau 18). Parmi les populations sauvages trois nous ont été fournies par l'Anses de Lyon sur demande de Myriam Siegwart. Elles sont très résistantes à différentes familles d'insecticides de synthèse: organophosphorés, pyréthrinoides et néonicotinoïdes. Ces tests ont donc permis de rechercher d'éventuels cas de résistances croisées entre des insecticides de synthèse et nos actifs. Nous avons directement prélevé les 7 autres populations sauvages en 2017 lors de prospections en verger de pêchers commerciaux dans la vallée du Rhône. Les deux souches de laboratoire testées sont : notre référence sensible aux insecticides élevée au laboratoire depuis plusieurs années dénommée «Mp06» (témoin) et «Resistant» souche connue pour être résistante à des organo-phosphorés grâce à une surexpression de la carboxylestérase E4 provoquée par une méthylation dans le promoteur de son gène. Cette souche d'origine anglaise (Rothamsted Research) nous a été fournie par Thierry Fricaux d'INRAE Sophia-Antipolis.

**Tableau 18.** Liste des populations/souches de *Myzus persicae* testées pour leur sensibilité au diCT.

Nom	Particularités/traitements insecticides utilisés dans les parcelles de prélèvement.	Localisation d'origine	Mode d'acquisition
<b>Souches</b>			
Témoin (Mp06)	Sensible aux insecticides	Vaucluse (84)	Collection INRAE Avignon
Resistant	Résistante aux organophosphorés par surproduction de carboxylestérases E4	Rothamsted Research (UK)	Collection INRAE Sophia
<b>Populations sauvages</b>			
Barbentane	Traitement à l'azadirachtine (Bio)	Barbentane (13)	Campagne de terrain INRAE
Jonquièrè	Traitement avec acétamipride (famille des néonicotinoïdes)	Jonquières (84)	Campagne de terrain INRAE
Chanas	Traitements huile de paraffine (traitement flonicamide en n-1)	Chanas (38)	Campagne de terrain INRAE
Sylvana	2 traitements huile de paraffine, 1 traitement acétamipride (néonicotinoïde), 1 traitement flonicamide (modulateurs des organes chordotonaux)	St Gilles (30)	Campagne de terrain INRAE
Gotheron	Traitement à l'huile de paraffine	Châteauneuf sur Isère (26)	Campagne de terrain INRAE
St Paul Vert	Traitement à l'huile de paraffine	Montfavet (84)	Campagne de terrain INRAE
St Paul Rose	Traitement à l'huile de paraffine	Montfavet (84)	Campagne de terrain INRAE
11.037.001	Hautement résistante aux néonicotinoïdes et pyréthrinoides	Saint-Martin-de-Crau (13)	Anses Lyon
12.068.006	Hautement résistante aux néonicotinoïdes et pyréthrinoides	Beaumont-Monteux (26)	Anses Lyon
13.001.045	Hautement résistante aux néonicotinoïdes, organophosphorés et pyréthrinoides	Bésayes (26)	Anses Lyon

La toxicité du diCT sur ces populations/souches a été évaluée grâce à des biotests menés sur milieu nutritif synthétique Ap3 mis au point pour l'alimentation des pucerons par l'UMR INRAE/INSA Biologie Fonctionnelle des Insectes et Interactions à Lyon (Febvay, *et al.*, 1988). L'actif est mélangé au milieu Ap3 à des concentrations croissantes (0,125; 0,250; 0,5; 1 et 2 mM) sur lesquelles sont installées des larves L1 issues d'une même cohorte de 24h. La mortalité des pucerons (25 pucerons par dose avec deux répétitions du test, 8440 pucerons testés au total) est estimée 48h après mise en contact. Des courbes doses-mortalité ont pu être obtenues grâce à une régression probit des données brutes réelles (figure 13).

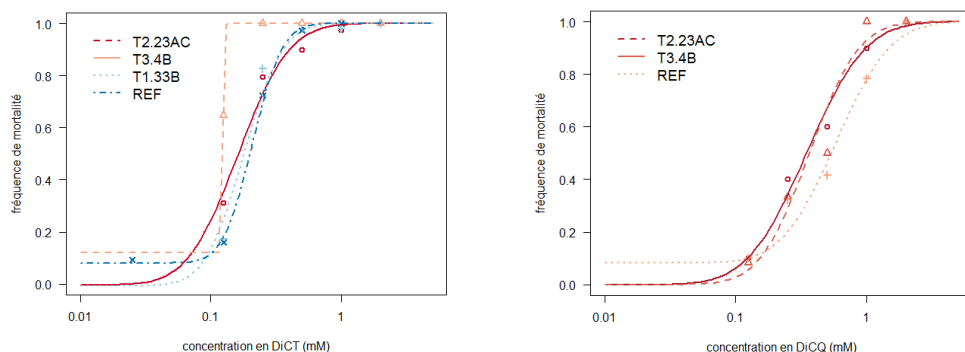


**Figure 13.** Courbes dose-réponse au diCT de 12 populations/souches de *Myzus persicae* prélevées sur des pêchers. Les nombres suivant chaque nom de population correspondent aux CL50.

Les CL50 (concentration létale médiane) du diCT sur les populations et souches testées sont comprises entre 0,18 mM pour la population St Paul Vert et 0,61 mM pour la population Jonquières. On observe donc des différences significatives de sensibilité entre populations. Les moins sensibles sont Jonquières et Resistant. Le ratio des CL50 entre la population la plus sensible, St Paul Vert, et la moins sensible, Jonquièrè, atteint un maximum de 3,34. Une population est déclarée résistante si ce rapport atteint dix par rapport à la souche la plus sensible. Il n'y a donc pas de populations

de *Myzus persicae* résistantes au diCT parmi celles étudiées en 2017, que ce soit dans les populations naturelles ou dans les souches de laboratoire.

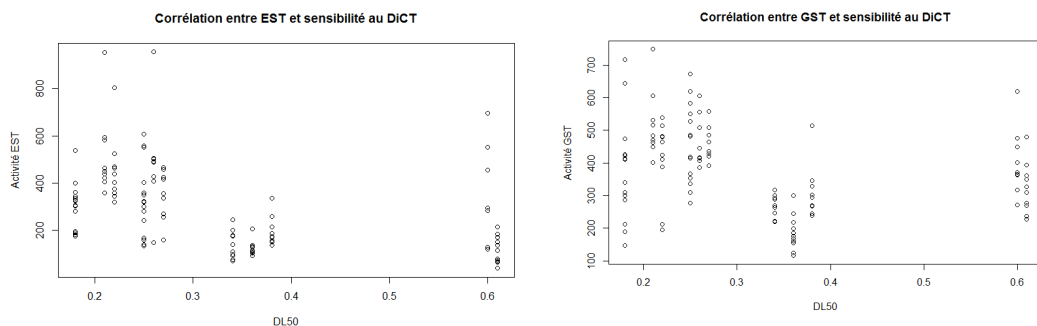
En 2018 nous avons étendu notre recherche de clones de *M. persicae* potentiellement résistants au diCT et diCQ en testant des clones provenant de culture de tabac. En effet, la capacité d'adaptation développée par ces clones pour se nourrir sur une culture riche en nicotine, un autre composé naturellement insecticide, leur confère des résistances à des insecticides de synthèse (Singh, *et al.*, 2020). Pour cela, nous avons estimé la sensibilité de 3 clones provenant de cultures de tabac ici nommés T1.33B, T2.23AC et T3.4B qui nous ont été transmis par Benoît Barres de l'Anses de Lyon (Unité Casper) (figure 14).



**Figure 14.** Courbes dose-réponse A : au diCT et B : au 3,5-diCQ de 3 souches de *Myzus persicae* prélevées sur culture de tabac en comparaison de notre souche de référence (REF).

Comme pour les différentes populations prélevées sur pêcher nous n'avons pas observé de différence de sensibilité aux diCT/3,5-diCQ parmi ces trois souches.

Afin d'appréhender les processus potentiels de métabolisation de nos actifs nous avons étudié deux familles d'enzymes connues pour être impliquées dans la détoxification chez les pucerons : les carboxylestérases (EST) et les glutathion-S-transférases (GST), l'objectif final étant de rechercher une éventuelle relation entre l'activité de ces familles enzymatiques et la sensibilité à nos actifs chez les populations/souches de *Myzus persicae* étudiées précédemment. La mesure de l'activité de ces deux familles d'enzymes a été effectuée sur des femelles parthénogénétiques âgées de 8 jours. Les substrats choisis pour ces mesures d'activités sont l'alpha-naphtyl acétate pour les EST et le 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) pour les GST. Les résultats montrent une très bonne corrélation entre niveaux d'activité des EST et GST (test corrélation Pearson pp-value < 2.2e<sup>-16</sup>) mais une absence de corrélation entre les activités enzymatiques EST ou GST et les variations de sensibilité au diCT des différentes populations et souches (test corrélation Pearson pp-value= 0.11 et 0.22 respectivement) (figure 15).



**Figure 15.** Corrélation entre la sensibilité au diCT chez différentes populations de *M. persicae* et leur niveau d'activité de détoxification a) carboxylestérase (EST) et b) glutathion-S-transférase (GST) exprimée en mg de produit formé/min/mg de protéines totales extraites.

Ces résultats permettent d'avancer l'hypothèse que ces familles enzymatiques ne sont pas impliquées dans la détoxification du diCT. Ils vont dans le même sens que les études menées en parallèle à l'INRAE Sophia Antipolis (UMR ISA équipe Défense des Insectes) portant sur le rôle de la carboxylestérase E4 dans la détoxification du diCQ (Fricaux *et al.*, in prep). Celles-ci montrent l'absence d'implication de cette enzyme dans le mécanisme de détoxification du diCQ.

Ces résultats nous permettent de conclure que les populations sauvages testées et la souche résistante aux insecticides de synthèse ne présentent pas de résistances pour le diCT et sont donc très encourageants pour la durabilité d'un éventuel produit de biocontrôle à base de diCT. Ils nous ont amené à aller plus loin dans la recherche de résistances potentielles aux diCT et 3,5-diCQ. Nous avons pour cela élargi nos recherches à d'autres espèces de pucerons provenant de plantes hôtes connues pour leur richesse en composés de défense contre les insectes.

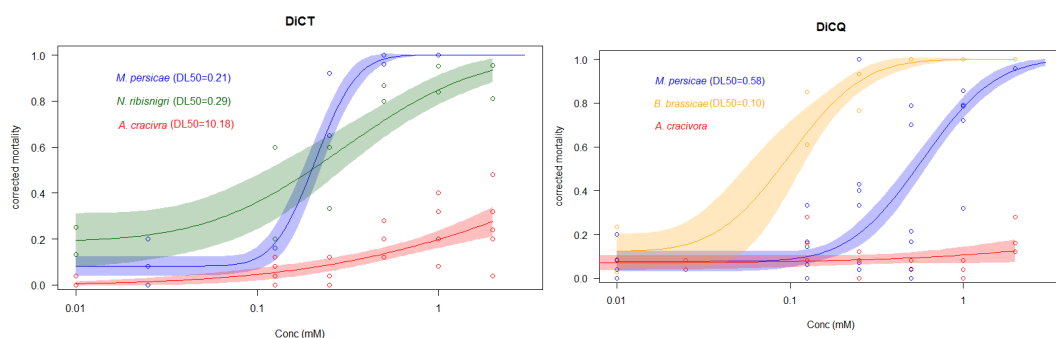
#### Variation de sensibilité aux diCT/diCQ de différentes espèces de pucerons provenant de cultures riches en composés de défense contre les insectes (tâche additionnelle 3.4)

D'une part, nous avons étudié des populations sauvages de pucerons obtenues dans des parcelles commerciales d'endive (riche en diCT) et de Colza (riche en composés soufrés, les glucosinolates). Nous avons reçu une colonie de *Nasonovia ribisnigri* trouvée sur endive à proximité d'Arras (62) par Marc Benigni (association des producteurs d'endives de France). Nous avons prospecté dans les parcelles de colza sur notre centre de recherche à Avignon (84) en 2018 et récolté une colonie de *Brevicoryne brassicae*.



D'autre part, nous avons mis en place des parcelles expérimentales pièges de plein champ sur le domaine expérimental des Garrigues (GAFL INRAE Avignon), comportant 5 espèces de plantes riches en diCQ ou diCT : patate douce (*Ipomoea batatas*, diCQ), chicorée sauvage et endive (*Cichorium intybus*, diCT), arachide (*Arachis hypogaea*, diCT) et pissenlit (*Taraxacum sp.*, diCT). Cette expérimentation a été réalisée durant deux années : 2018 et 2019. Une prospection des colonies aphidiennes a été réalisée deux fois par semaine sur ces plantes. Les colonies détectées furent prélevées, mises en élevage et évaluées pour leur sensibilité aux diCQ/diCT sur milieu synthétique au laboratoire si l'élevage et le changement d'alimentation étaient suffisamment bien tolérés par les insectes.

Nous avons récolté un total de 11 colonies (1 en 2018 sur arachide et 10 en 2019 dont 5 sur arachides, 2 sur chicorée, 1 sur patate douce et 2 sur pissenlits) appartenant aux espèces *Aphis craccivora*, *Aphis taraxacicola*, *Aphis pisum*, *Aphis fabae*. Seule une souche d'*A. craccivora* prélevée en 2018 sur arachide a pu faire l'objet des biotests. Les clones d'*A. taraxacicola* supportent très mal l'élevage et les autres espèces d'*Aphis* refusaient de s'alimenter sur milieu artificiel. Il est intéressant de souligner cette obtention de plusieurs espèces de pucerons se développant spontanément sur des plantes riches en diCT ou 3,5-diCQ et supportant donc la présence de ces composés toxiques. Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène : soit ces molécules sont enfermées dans des compartiments cellulaires non accessibles au stylet des pucerons ou sont en trop faible teneur pour avoir une action, soit ces espèces y sont insensibles. Les résultats des tests de sensibilité offrent une réponse beaucoup plus contrastée que ceux obtenus avec les souches et populations de *M. persicae* (figure 16). Le clone d'*A. craccivora* montre une claire faculté à résister aux deux matières actives, alors que celui de *B. brassicae* est très sensible au diCQ et que le clone de *N. ribisnigri* montre la même sensibilité que *M. persicae*. Il est remarquable de souligner qu'avec ce clone d'*Aphis craccivora* c'est la première fois que nous mettons en évidence des pucerons capables de survivre à une dose de 2mM de diCT et 3,5-diCQ. Mieux connaître l'origine de ce phénomène d'insensibilité pourrait nous aider à comprendre le mode d'action de ces substances actives et donc les utiliser à meilleur escient.

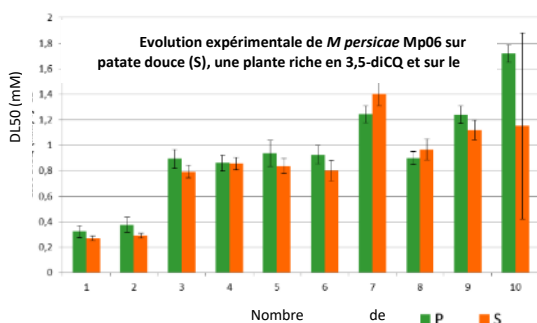


**Figure 16.** Courbes dose-réponse au diCT et au 3,5-diCQ de 2 espèces de pucerons prélevées sur des plantes riches en composés de défense en comparaison de notre souche de référence de *M. persicae*.

D'une manière plus large, les résultats de DicaBio et des projets antérieurs montrent une action aphicide notable du diCT et/ou du 3,5-diCQ sur les 6 espèces suivantes : *Dysaphis plantaginea*, *Acyrtosiphon pisum*, *Myzus persicae*, *Sitobion avenae*, *Brevicoryne brassicae* et *Nasonovia ribisnigri*. Dans le projet DicaBio nous avons nouvellement mis en évidence également quatre espèces se nourrissant sur des plantes riches en ces molécules : *Aphis craccivora*, *Aphis taraxacicola*, *Aphis pisum*, *Aphis fabae*. Les 6 premières espèces appartiennent à la tribu macrosiphini alors que les 4 dernières à celle des aphidini. Nous pouvons donc bâtir une nouvelle hypothèse qu'il serait intéressant de tester : les espèces appartenant à la tribu des aphidini sont moins sensibles à ces molécules que celle appartenant à la tribu des macrosiphini. Pour pouvoir tester cette hypothèse, il faudrait utiliser un protocole innovant d'infiltration de feuilles avec des solutions d'actifs pour pallier l'absence de milieu artificiel adéquat pour la plupart des clones du genre *Aphis* que nous avons récoltés dans cette étude.

#### Adaptation expérimentale sur plante riche en 3,5-diCQ (tâche additionnelle)

Pour étudier l'évolution de la sensibilité des pucerons au diCT/diCQ au cours de plusieurs générations parthénogénétiques en présence de ces molécules, nous avons élevé notre souche de laboratoire de *M. persicae* Mp06 par repiquage de femelles parthénogénétiques sur des plantes riches en diCQ tout en suivant l'évolution de sa DL50 au fil des générations. Pour cela nous avons fait évoluer à partir du même clone d'origine deux lignées, l'une sur piment (sans diCQ) l'autre sur patate douce (riche en diCQ) et ce sur 10 générations. A chaque génération la sensibilité au diCQ a été mesurée par biotest (figure 17) sur milieu artificiel comme précédemment décrit et les activités GST et EST ont également été mesurées.

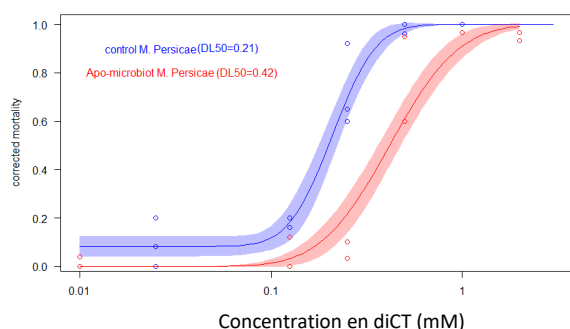


**Figure 17.** Evolution de la sensibilité au 3,5-diCQ de deux lignées de *M. persicae*, clone Mp06, l'une élevée sur piment, et l'autre sur patate douce.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative de sensibilité au 3,5-diCQ observée entre les deux lignées au cours des 10 générations de l'expérimentation. Les activités enzymatiques de détoxification EST et GST restent elles aussi identiques entre lignées. La présence de cette molécule dans la plante hôte ne révèle donc pas, sur les critères que nous avons choisi d'observer, de capacités d'adaptation du clone de *M. persicae* au 3,5-diCQ. Cette observation va elle aussi dans le sens d'une bonne durabilité de l'activité aphicide de cette molécule.

### Influence des endosymbiotes facultatifs dans la détoxification du diCT (tâche additionnelle)

Pour étudier l'impact des endosymbiotes des pucerons sur l'action toxique du diCT, nous avons créé une lignée de *M. persicae* avec moins d'endosymbiotes facultatifs. D'après la littérature, nous savons que cette espèce de puceron est potentiellement porteuse des bactéries endosymbiotes suivantes : *Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola* ou *Serratia symbiotica*, sensibles à l'ampicilline qui constituent le microbiote secondaire du puceron. Ces bactéries peuvent être impliquées dans la détoxification de xénobiotiques provenant de l'alimentation. Pour créer cette lignée avec moins d'endosymbiotes secondaires nous avons laissé se nourrir des larves au stade L1 durant 48 h sur du milieu artificiel contenant un antibiotique (ampicilline 50 µg/ml), puis nous les avons élevées sans antibiotique sur des plants de piments. Nous avons effectué en parallèle des biotests sur les lignées possédant ou non des endosymbiotes secondaires (figure 18) (*Buchnera aphidicola*, un endosymbiote obligatoire n'est pas sensible au traitement antibiotique avec de l'ampicilline et reste présent après traitement. Lorsqu'il est privé de *Buchnera*, le puceron hôte souffre d'un retard de croissance et de stérilité, nous n'avons donc pas pu créer de lignée apo-*Buchnera*).



**Figure 18.** Courbe dose-réponse sur deux lignées de *M. persicae* issues du même clone. L'un (en bleu) n'a pas subi de traitement antibiotique, l'autre (en rouge) a subi un traitement à l'ampicilline éliminant certains endosymbiotes facultatifs.

Les résultats montrent qu'en absence d'endosymbiotes secondaires ces pucerons sont significativement ( $p = 6.9316e^{-29}$ ) moins sensibles au diCT que s'ils sont porteurs de ces bactéries. Bien que le rapport de résistance ne soit que de 2, cela illustre les interactions entre les biopesticides agissant par ingestion et les bactéries présentes dans les bactériocytes de l'appareil digestif. Ce phénomène peut donc expliquer une partie des variations de sensibilité observées entre clones.

### **Conclusions de la tâche 3**

La tâche 3 du projet DicaBio a permis d'obtenir des courbes dose-mortalité sur milieu pour des clones de *M. persicae* différant dans leur niveau d'expression d'estérases (L3.1) et pour une gamme de clones de *M. persicae* échantillonnés dans les populations naturelles (L3.3) ces deux livrables ont été fournis. Le livrable L3.2 : Courbe dose-mortalité pour des clones de *M. persicae* traités avec des inhibiteurs, s'est avéré peu pertinent au vu des résultats obtenus dans le livrable L3.1 nous l'avons donc remplacé par l'étude d'évolution expérimentale et par l'étude des activités des enzymes de détoxification EST et GST dans les populations naturelles de *M. persicae*.

Les DL50 du diCQ pour les clones de *M. persicae* surexprimant les estérases sont supérieures à celle des clones témoins mais restent inférieures au seuil définissant la résistance. Nous pouvons donc conclure que la surexpression des estérases ne suffit donc pas rendre résistants les clones testés (jalon J3.1).

En conclusion générale, nous pouvons affirmer qu'en l'état de nos connaissances les deux substances actives extraites de plantes étudiées montrent une bonne durabilité d'action aphicide sur *Myzus persicae*, une espèce de puceron très problématique en agriculture, qui pourtant a développé des résistances à de nombreux insecticides de synthèse. Les enzymes appartenant aux familles des carboxylestérases et des glutathion-S-transférases ne semblent pas impliquées dans des mécanismes de tolérance de cette espèce de puceron aux diCT/diCQ. Il n'y a donc a priori pas de risque de résistances croisées entre les produits insecticides de synthèse et ces deux substances actives. Parmi les autres espèces de pucerons testées, un clone d'*A. craccivora* s'est avéré insensible aux deux molécules. C'est la première fois que l'on détecte des pucerons capables de survivre à une dose de 2mM de diCT et 3,5-diCQ. Mieux connaître l'origine de ce phénomène d'insensibilité pourrait nous aider d'une part à comprendre le mode d'action de ces substances actives et donc les utiliser à meilleur escient et d'autre part à mieux évaluer les risques d'adaptation des pucerons au traitement par le diCT. Par ailleurs, nous avons observé une modification de la sensibilité du clone Mp06 de *Myzus persicae* lorsque l'on opère un changement dans la composition du microbiote. Ces substances agissent donc très probablement au niveau du tube digestif et il faut s'attendre à des variations de sensibilité inter-clonales.

### Perspectives et valorisation

Les résultats obtenus dans ce projet nous ont permis d'apporter des réponses importantes sur la durabilité aphicide des diCQ/diCT, mais on ouvre la porte à de nouvelles questions sur le mode d'action de ces deux actifs naturels. Nous souhaitons donc poursuivre nos investigations sur *A. craccivora* qui représente un moyen d'étudier la capacité d'adaptation des pucerons aux diCT/diCQ notamment en comparant clones sensibles et résistants de cette espèce. La

piste de la spécificité d'action en fonction de la tribu d'appartenance des espèces de pucerons évoquée plus haut est à explorer. En effet, ce niveau de spécificité ferait de nos actifs des agents de biocontrôle particulièrement peu impactants pour l'environnement.

Les travaux réalisés dans cette tâche ont été présentés dans deux colloques : 'Natural Products and Biocontrol 2018' à Perpignan et 'Resistance 19' à Rothamsted (UK) en 2019. Une publication est également en cours de rédaction : «Siegwart, M ; Saugé, MH ; Lecerf, E ; Mascle, O ; and Poëssel JL. Mode of action and sustainability of the use of caffeoyl acid derivatives in the control of aphids in agriculture In prep».

#### Références bibliographiques

Febvay G, Delobel B and Rahbé Y (1988) Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Canadian Journal of Zoology* 66:  
Singh K S, Troczka B J, Duarte A, Balabanidou V, Trissi N, Carabajal Paladino L Z, Nguyen P, Zimmer C T, Papapostolou K M, Randall E, Lueke B, Marec F, Mazzoni E, Williamson M S, Hayward A, Nauen R, Vontas J and Bass C (2020) The genetic architecture of a host shift: An adaptive walk protected an aphid and its endosymbiont from plant chemical defenses. *Science Advances* 6: eaba1070

## Tâche 4 - Évaluer les effets non intentionnels des diCQ et diCT sur l'abeille domestique (INRAE Abeille et Environnement Avignon).

Objectif : Déterminer la toxicité aigüe des diCQ et diCT sur l'abeille et évaluer les effets sublétaux.

### Introduction

Dans le programme de recherche DicaBio, le partenaire 4 avait pour objectif d'évaluer d'éventuels effets nocifs des composés diCQ et diCT sur les abeilles domestiques. Des méthodes toxicologiques classiques ont été utilisées pour mesurer la toxicité après exposition par contact ou par ingestion. La toxicité orale a été mesurée au cours d'expositions subchroniques ou chroniques alors que la toxicité de contact a été explorée après une exposition aigüe. Dans les deux cas, les gammes de doses utilisées ont été limitées par la solubilité des deux produits dans les solvants aqueux ou organiques. Une nouvelle méthode de toxicologie mise au point au laboratoire A&E a pu être perfectionnée afin de mettre en évidence d'éventuels effets sublétaux, en particulier sur la prise alimentaire et sur le comportement locomoteur. Les résultats des expériences sont décrits ci-après.

### Toxicologie classique (tâches 4.1 et 4.2)

#### Exposition par contact

Afin d'évaluer les effets d'une exposition aigüe au diCQ par contact, les abeilles ont été exposées sur le thorax (solvant acétone). Une gamme de doses (0, 1.25, 2.5 et 5 µg par abeille) a été employée (3x10 abeilles par modalité). La mortalité a été suivie sur 5 jours (abeilles maintenues à l'obscurité, dans un incubateur à température et humidité contrôlée). Le composé n'a pas induit de surcroît de mortalité par rapport au contrôle (0% de mortalité dans toutes les modalités à 5 jours). La même expérience a été effectuée avec le diCT aux doses 0, 0.75, 1.5 et 3 µg par abeille, montrant que ce composé n'induisait pas de mortalité (0% de mortalité dans toutes les modalités à 5 jours). Il serait intéressant de reproduire ces expériences à des concentrations plus fortes, puisque la solubilité du produit dans l'acétone a limité notre gamme de concentration à un maximum de 3 et 5 mg/ml. A titre indicatif, la dernière suspension concentrée proposée dans la tâche «formulation» était de 135 mg/ml, soit une concentration ~30 à 40 fois plus élevée.

#### Exposition par ingestion

Pour évaluer les effets d'une ingestion subchronique, les abeilles ont été nourries pendant 3 jours avec une alimentation contenant l'un des deux composés (sirop à 50% de saccharose, pH 5,0, mis à disposition pour chaque abeille, *ad libitum* et renouvelé quotidiennement pour limiter la dégradation et la régio-isomérisation des composés diCQ et diCT, qui sont sensibles à plusieurs facteurs physiques d'après les résultats obtenus dans la tâche 1 du programme DICABIO). Les abeilles ont été exposées à des concentrations de 0, 0.125, 0.5 et 1 mg/ml de composé (3x10 abeilles par modalité). Les abeilles ont ensuite été alimentées avec une nourriture traditionnellement prodiguée aux abeilles en captivité (pâte sucrée et eau à volonté). La survie en incubateur a été mesurée pendant 12 jours. Dans ces expériences, aucune des concentrations de diCQ ou de diCT n'a induit de mortalité accrue, ainsi que le suggère un test statistique de survie (Log-rank Mantel-Cox, P=0.4726 et P=0.3243, respectivement pour le diCQ et le diCT).

Pour explorer plus avant les effets chroniques de l'ingestion de diCQ sur la survie, les abeilles ont été nourries pendant 10 jours avec la concentration la plus élevée (sirop contenant 1 mg/ml de diCQ mis à disposition pour chaque abeille, *ad libitum*). Par la suite, une alimentation dépourvue de diCQ a été fournie aux abeilles (pâte sucrée et eau) et la survie a été évaluée pendant 40 jours sur un total de 120 abeilles (deux séries de 6x10 abeilles). Alors que la première mortalité d'abeille survient au 15<sup>e</sup> jour seulement dans la modalité contrôle, la première abeille meurt dès le 6<sup>e</sup> jour avec le diCQ. Pendant les 33 premiers jours, la courbe de survie est légèrement décalée (~4 jours) vers des temps plus précoces avec le diCQ. Après cette date, les deux modalités subissent une mortalité plus abrupte (dans les deux séries d'expériences). Un test statistique (Log-rank Mantel-Cox) révèle que la survie n'est pas significativement différente avec une nourriture contenant le diCQ (P=0.2295), la survie médiane étant de 27 jours en contrôle et de 24 jours dans la modalité diCQ. Le même dispositif a été utilisé pour évaluer l'effet de l'ingestion de la concentration saturante de diCT pendant 10 jours (1 mg/ml de sirop). La survie a été évaluée pendant 47 jours sur un total de 120 abeilles (deux séries de 6x10 abeilles). La première mortalité a été plus précoce dans la modalité diCT, car elle intervient au 5<sup>ème</sup> jour alors que la première abeille meurt au 12<sup>ème</sup> jour seulement dans la modalité contrôle. Tout comme pour le diCQ, la courbe

de survie est décalée vers des temps plus précoces avec le diCT (~4 jours) et cela jusqu'au 27<sup>ème</sup> jour d'observation. Un test statistique (Log-rank Mantel-Cox) révèle cependant que la survie n'est pas significativement différente avec une nourriture contenant le diCT (P=0.9918). Il serait intéressant de réitérer ces expériences à des concentrations plus fortes, puisque la solubilité du produit dans l'eau a limité notre gamme de concentration à un maximum de 1 mg/ml (concentration saturante de diCQ et de diCT en milieu aqueux, déterminée dans la tâche 1 du programme DICABIO). Une des dernières solutions concentrées produites dans le projet permettrait d'augmenter fortement les concentrations. L'intérêt des résultats obtenus ici sur les abeilles réside également dans le fait que les protocoles expérimentaux permettent de mesurer la quantité réellement ingérée par chacun des individus (ainsi que la dose précise reçue individuellement dans les tests par contact), ce qui n'est pas toujours le cas pour les tests toxicologiques dédiés aux insectes ravageurs.

En conclusion, dans la gamme de doses utilisée, l'exposition aigüe au diCQ et au diCT ne provoque pas de mortalité par contact. De plus, dans la gamme de concentrations utilisée, ces deux produits peuvent être consommés par les abeilles pendant plusieurs jours sans induire d'effets sur la survie (exposition subchronique), mais une tendance délétère se dessine après 5 jours d'exposition (dans les expériences d'exposition chronique), avec une mortalité légèrement plus précoce qui pourrait être vérifiée dans des essais ultérieurs en prolongeant l'exposition à plus de 10 jours. Ces essais pourront être réalisés avec des concentrations plus élevées que celles que nous avons pu utiliser, grâce aux solutions concentrées disponibles depuis peu.

### Exploration des effets sublétaux (tâche 4.3)

Compte-tenu des résultats de toxicologie classique évoqués précédemment, il est apparu opportun d'évaluer la toxicité des produits par des méthodes plus élaborées. Ainsi, nous avons évalué la prise alimentaire individuelle et le comportement locomoteur individuel.

#### Consommation de sirop contenant diCT ou diCQ

Dans la littérature, Liu *et al.* (2015) ont montré que certains acides phénoliques naturel dérivés de l'acide caféique, comme l'acide chlorogénique ou le diCQ (mentionné comme acide isochlorogénique dans cette référence) semblaient avoir des propriétés 'antiappétantes' ou dissuasives pour les abeilles, peut-être du fait de leur amertume. Afin de confirmer l'existence de telles propriétés pour ces substances, des abeilles ont été nourries avec des sirops contenant du diCQ ou du diCT (sirop à 50% de saccharose, pH5). Dans une première série d'expériences, un total de 120 abeilles ont été exposées pendant 3 jours (exposition subchronique) à une gamme de diCQ (0, 0.01, 0.1 et 1 mg/ml). La consommation quotidienne de sirop n'a pas été altérée par le composé (respectivement 24.17±2.17, 27.03±1.93, 21.90±2.24, et 23.01±2.00 µl/abeille, N.S.). Une exposition chronique sur 10 jours a également été effectuée à la concentration la plus élevée (1 mg/ml, 2 séries de tests sur un total de 110 abeilles). Dans ces conditions non plus, le diCQ n'a produit aucune altération de la consommation quotidienne de sirop (15.7±1.1 et 17.9±1.3 µl/abeille respectivement dans les modalités contrôle et diCQ, N.S.). Dans nos conditions expérimentales, si le diCQ ne semble donc pas altérer la consommation de sirop par les abeilles, les résultats sont plus complexes pour le diCT. Dans une première série de tests, un total de 120 abeilles ont été exposées pendant 3 jours (exposition subchronique) à une gamme de diCT (0, 0.25, 0.5 et 1 mg/ml) et la consommation de sirop n'a été altérée à aucune des concentrations (respectivement 35.64±1.04, 35.80±0.98, 34.77±0.96, et 36.00±1.03 µl/abeille, N.S.). En revanche, dans le cas d'une exposition chronique sur 10 jours (diCT à 1 mg/ml), si la consommation était similaire dans les 5 premiers jours, il s'avère que la consommation a été diminuée de manière drastique à partir du 6<sup>e</sup> jour d'exposition. Ainsi, entre les jours 6 et 10, la consommation quotidienne de sirop a été en moyenne diminuée de 59% (20.3±0.17 et 8.3±2.4 µl/abeille respectivement dans les modalités contrôle et diCT, p<0.05). Au dixième jour, la consommation moyenne était au plus bas, avec une consommation de sirop près de 4,5 fois plus faible, les abeilles s'étant manifestement résolues à éviter le plus possible le diCT. Il serait intéressant de réitérer ces expériences sur des durées plus longues et à des concentrations plus fortes grâce aux dernières solutions concentrées récemment mises au point dans le projet DicaBio.

#### Capacités locomotrices

Les effets de l'ingestion du diCT à sa concentration de solubilité maximale (1 mg/ml) ont été évalués sur les capacités locomotrices individuelles grâce à un dispositif automatique de trajectométrie. Ce dispositif de suivi vidéo permet de mesurer les déplacements de chaque abeille dans une arène individuelle pendant 24 heures (à une fréquence de 25 Hz). Le comportement locomoteur de 72 abeilles a ainsi pu être exploré. Au bout de 24h, la mortalité a été quantifiée et elle s'élevait en moyenne à 11% dans la modalité contrôle et 28% dans la modalité diCT. En moyenne, les abeilles des deux modalités ont consommé la même quantité de sirop en 24h (43.3±1.8 et 42.6±2.4 µl respectivement pour les modalités contrôle et diCT, N.S.). Les abeilles des deux modalités avaient parcouru une distance équivalente au bout de 6h (160.0±12.9 et 134.5±11.4 m respectivement pour la modalité contrôle et diCT, N.S.). A 24h, une distance similaire avait été parcourue dans les deux modalités (452.6±27.6 et 391.5±31.8 m respectivement pour la modalité contrôle et diCT, N.S.). Les effets de l'ingestion de diCQ ont été évalués par la même méthode. Pour améliorer la survie sur 24h des abeilles dans le dispositif, la solution n'a cependant été mise à disposition que 7h puis remplacée par de la pâte sucrée. Sur un total de 48 abeilles, la consommation de sirop contenant une solution de 1 mg/ml de diCQ a été équivalente à celle de la solution contrôle (15.3±2.8 et 14.6±2.2 µl) et aucune mortalité n'a été à déplorer dans les deux modalités. Les abeilles des deux modalités avaient parcouru une distance équivalente au bout de 6h (66.5±7.1 et 65.2±6.6 m, respectivement pour la modalité contrôle et diCQ, N.S.). La même tendance s'est maintenue au bout de 24h (285.6±31.8 et 269.9±15.8 m respectivement pour les modalités contrôle et diCQ, N.S.).

En conclusion, des effets phagoréceptifs du diCT ont pu être mis en évidence après 5 jours d'exposition par voie orale, avec une diminution importante de la prise alimentaire. En revanche, de tels effets délétères sur les abeilles n'ont

pu être mis en évidence pour le diCQ, en tous cas dans la gamme d'exposition explorée, à la différence des résultats de Liu *et al.*, 2015. Si les approches de trajectométrie n'ont révélé aucun effet locomoteur sur 24h, il serait donc particulièrement intéressant de les réitérer sur une durée plus conséquente (les multiples améliorations apportées au dispositif au fil du programme DICABIO seraient désormais de nature à le permettre).

#### Conclusions de la tâche 4

Les expériences prévues dans cette tâche du programme ont été intégralement réalisées et ont permis de mettre en évidence que dans la gamme de doses utilisée, l'exposition aiguë au diCQ et au diCT ne provoque pas de mortalité par contact. De plus, dans la gamme de concentrations utilisée, ces deux produits peuvent être consommés par les abeilles pendant plusieurs jours sans induire d'effets sur la survie (exposition subchronique), mais une tendance délétère se dessine après 5 jours d'exposition (dans les expériences d'exposition chronique), avec une mortalité légèrement plus précoce qui pourrait être vérifiée dans des essais prolongeant l'exposition à plus de 10 jours.

Des effets sublétaux phagorépulseurs du diCT sur la prise alimentaire chez les abeilles domestiques ont été mis en évidence. Par ailleurs, bien que non significatifs, des effets légers sur la survie ont été décelés pour le diCQ et le diCT et devraient faire l'objet de la plus grande attention dans des expériences à réaliser dans le futur (en particulier à des doses/concentrations plus fortes que dans la présente étude). Ces résultats mettent en lumière les effets 'non-intentionnels' (selon l'expression consacrée) dont pourraient pâtir les insectes utiles (auxiliaires, pollinisateurs...) en cas d'une utilisation non adaptée de ces substances, dont la toxicité pour les abeilles apparaît cependant bien plus légère que la plupart des insecticides de synthèse utilisés couramment en agriculture.

#### Référence

Liu F.L., Gao J., Di N.Y., Adler L.S. (2015) Nectar Attracts Foraging Honey Bees with Components of Their Queen Pheromones. *Journal of Chemical Ecology* 41: 1028-1036.

### 3 - Discussion et conclusions

DicaBio a pour objectif de développer des substances naturelles comme biopesticides. Bien que de multiples publications montrent l'effet pesticide de nombreuses substances botaniques, leurs propriétés n'ont que très rarement débouché sur une utilisation comme outils de biocontrôle en raison de nombreux obstacles à leur développement. DicaBio vise à développer des molécules phénoliques végétales, les acides dicaféoylquiniques (diCQ) et dicaféoyltartrique (diCT) comme aphicides et fongicides biologiques. La démarche adoptée par DicaBio est originale car elle s'intéresse, sur un cas concret, à tous les niveaux de la chaîne de développement d'un produit biopesticide et tente de lever les verrous qui y sont associés, de sa production à l'analyse des risques liés à son utilisation. La réalisation de ce projet s'appuie sur un consortium de laboratoires de différentes disciplines d'INRAE d'Avignon, déjà investis depuis quelques années dans la valorisation de ces composés et SBM une entreprise phytopharmaceutique spécialisée dans la formulation des pesticides.

L'approvisionnement en substances actives constitue le premier verrou pour le développement de biopesticides. Le diCT et diCQ sont des molécules présentes en teneur importante dans des plantes de grande culture, facilement extractibles, ce qui constitue un cas modèle pour leur valorisation comme biopesticides. Malgré cela, leur faible disponibilité sur le marché et leur coût se sont avérés être une entrave pour le déroulement du programme, d'autant que le savoir-faire de SBM dans le domaine de la formulation n'est applicable que sur des quantités de plusieurs kg. Les difficultés liées au changement d'échelle entre les quantités de matière active nécessaires d'une part aux expérimentations de laboratoire et d'autre part à la manipulation industrielle sont apparues clairement au début du projet. La synthèse chimique de ces molécules, bien que publiée, s'avère complexe à mettre en œuvre à l'échelle industrielle et n'a pas pu aboutir. Cependant, dans le cadre de ce projet DicaBio, nous avons pu caractériser de nouvelles sources de production de diCT qui pourraient permettre un approvisionnement à partir de plantes.

La connaissance de la réactivité chimique des molécules candidates comme biopesticides est fondamentale pour leur maîtrise. Nous avons étudié les propriétés chimiques du diCT en comparaison de celles du diCQ (tâche 1). Ces deux molécules sont très fortement antioxydantes. Le diCT se dégrade moins vite que le diCQ, mais les deux molécules restent cependant stables à pH acide. Leur dégradation est en grande partie due à des phénomènes d'oxydation. L'ensemble des données obtenues sur la chimie du diCT a permis d'orienter la fabrication des formulations. Nous avons mis en évidence une bonne stabilité de la molécule dans la formulation liquide concentrée fournie en fin de projet.

Les travaux de formulations se sont avérés complexes en raison des contraintes inhérentes aux propriétés physico-chimiques de la molécule (tâche 1). Après mise au point d'un protocole de test en laboratoire, différents types de formulation, solutions liquides, poudre mouillable, suspension concentrée, solution liquide concentrée, ont été étudiées pour leur activité aphicide sur différentes espèces de pucerons, avec addition ou non de co-formulants devant notamment permettre d'améliorer la pénétration de l'actif. Malgré l'adaptation progressive des formulations pour résoudre les difficultés rencontrées, les tests de laboratoire n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet aphicide net. Nos travaux sur le mode d'action de la formulation montrent clairement que le verrou réside dans l'absence de pénétration de la préparation dans les tissus foliaires malgré l'addition des adjuvants. Nos résultats pointent également le manque de rémanence de la substance sur la surface de la feuille et dans les tissus foliaires où elle est vraisemblablement métabolisée rapidement. Des recherches futures sur la pénétration et la rémanence du produit formulé devront être privilégiées pour élaborer des préparations aphicides efficaces à base de diCT ou de diCQ. Les

nanoformulations de pesticides qui font actuellement l'objet de nombreux travaux dans le monde ouvrent des perspectives qu'il serait intéressant de considérer.

Ainsi que nous l'avions montré précédemment pour le diCQ avec d'autres champignons phytopathogènes, nous avons mis en évidence que le diCT a un potentiel fongicide *in vitro* contre les pathogènes des semences des céréales et contre la septoriose foliaire du blé (tâche 2). Cependant, en raison de ses propriétés physico-chimiques, la formulation du diCT pour des applications en traitement des semences constitue un verrou technique qui nécessiterait des études supplémentaires et une disponibilité en actif plus importante pour être levé. Des études complémentaires seraient également nécessaires pour évaluer la possibilité de développer un biofongicide à base de diCT pour contrôler la septoriose du blé.

Les risques liés à l'utilisation d'un biopesticide, risques d'apparition de pucerons résistants ou risques d'effets non-intentionnels pour l'environnement, constituent une préoccupation majeure pour sa valorisation. Dicabio a abordé ces questions dans les tâches 3 et 4 du projet.

Les travaux engagés sur le risque d'adaptation des pucerons aux traitements avec les diCT ou diCQ (tâche 3) montrent qu'en l'état de nos connaissances les deux substances actives présentent une bonne durabilité d'action aphicide sur *Myzus persicae*, espèce qui pourtant a développé des résistances à de nombreux insecticides de synthèse. Il n'y a *a priori* pas de risque de résistances croisées aux produits insecticides de synthèse et à ces deux substances actives. Cependant, pour la première fois nous avons découvert un clone d'*Aphis craccivora* insensible aux deux molécules. Mieux connaître l'origine de ce phénomène d'insensibilité pourrait nous aider d'une part à comprendre le mode d'action de ces substances actives et donc les utiliser à meilleur escient et d'autre part à mieux évaluer les risques d'adaptation des pucerons au traitement par le diCT.

Les risques d'effet non-intentionnels ont été évalués sur l'abeille (tâche 4). L'exposition aiguë au diCQ et au diCT ne provoque pas de mortalité par contact. Ces deux produits peuvent être consommés par les abeilles pendant plusieurs jours sans induire d'effets sur la survie, mais une tendance délétère se dessine dans les expériences d'exposition chronique qui devra être vérifiée dans des essais prolongeant l'exposition plus longtemps. Des effets sublétaux de diminution de la prise alimentaire chez les abeilles domestiques ont été mis en évidence avec le diCT mais pas avec le diCQ. Ces résultats mettent en lumière les effets non-intentionnels dont pourraient pâtir les insectes utiles (auxiliaires, pollinisateurs...) en cas d'une utilisation non adaptée de ces substances. Cependant la toxicité pour les abeilles de ces substances naturelles apparaît bien plus légère que celle de la plupart des insecticides de synthèse utilisés couramment en agriculture.

L'ensemble de ce corpus de nouveaux résultats obtenus grâce à la réalisation du programme DicaBio constitue un nouveau pas dans la valorisation des diCT et diCQ comme substances naturelles et contribue significativement au développement novateur de substances botaniques de biocontrôle.

---

## DicaBio

### «Valorisation des acides Dicaféoylquiniques et Dicaféoyltartriques comme substances naturelles de Biocontrôle»

---

N° SIREPA 2878

#### Contribution au plan Ecophyto

L'objet du projet DicaBio concerne la valorisation de substances naturelles comme biopesticides aphicides et fongicides. La démarche adoptée par DicaBio est originale car elle s'intéresse, sur un cas concret, à tous les niveaux de la chaîne de développement d'un produit biopesticide et tente de lever les verrous qui y sont associés, de sa production à l'analyse des risques liés à son utilisation. Il s'agit d'un cas modèle qui illustre l'ensemble des étapes nécessaires au développement d'un biopesticide à base de substances botaniques. Il a été développé en partenariat avec une entreprise du secteur de la phytopharmacie spécialisée dans le domaine de la formulation des substances actives. DicaBio n'a pas débouché, dans le temps imparti au projet, sur la mise au point de produits formulés efficaces aphicides ou fongicides en raison des difficultés d'approvisionnement et de formulation des actifs. Néanmoins DicaBio a permis de mieux cerner les propriétés de ces molécules et les risques qui leur sont associés en terme d'adaptation de l'organisme cible ou d'effet non intentionnels sur l'environnement. Ces connaissances ont déjà été présentées lors de Colloques au cours du projet et seront valorisées dans des publications. Pour progresser dans la valorisation de ces molécules pour le biocontrôle, il nous paraît nécessaire de développer maintenant des approches innovantes de formulation des produits biopesticides comme par exemple les nanoformulations, objets de nombreux travaux actuellement dans le monde, qui peuvent par exemple apporter de nouvelles solutions pour améliorer la très faible pénétration des produits actifs dans les tissus foliaires, principal verrou identifié au cours de DicaBio qui entrave leur efficacité. Par ailleurs différentes pistes de recherches ont été identifiées pour mieux gérer les risques d'adaptation des pucerons aux substances et mieux cerner d'éventuels effets de ces substances sur les abeilles. Dans le premier cas nous avons mis en évidence pour la première fois un clone non sensible aux matières actives, ce qui nous fournit un modèle d'étude du mode d'action de ces substances et de prévision des risques d'adaptation des pucerons. Dans le second cas, nos résultats nous avertissent de la nécessité d'étudier plus finement les effets sublétaux de l'ingestion à long terme de ces substances par les abeilles.

# Annexes

Posters présentés en Colloque pendant la réalisation de DicaBio.

Siegwart M., Lecerf E., Mascle O., Salette M. and Poëssel J.L. (2018). Risks of aphid adaptation to caffeic acid derivatives used as bioinsecticides. Natural Products and Biocontrol Conference. 25-28 September 2018, Perpignan, France.



## Risks of aphid adaptation to caffeic acid derivatives used as bioinsecticides

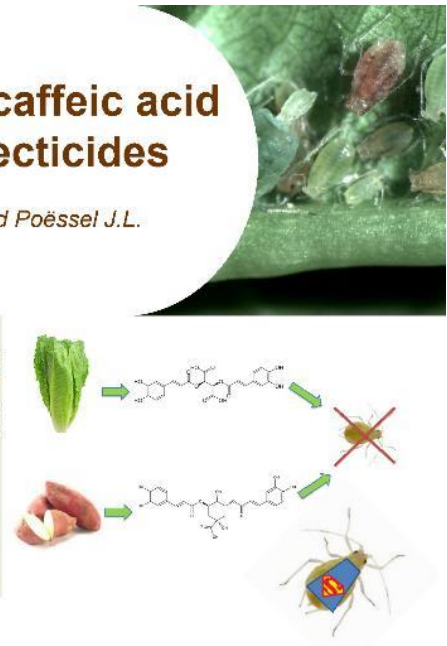
Siegwart M., Lecerf E., Mascle O., Salette M. and Poëssel J.L.

### Introduction

In DicaBio project we are looking if Dicafeoylquinic (DiCQ) and Dicafeoyltartaric (DiCT, chicoric acid) acids, natural substances toxic for aphids, can be used for their biocontrol. However, aphids are well known for quickly developing resistances. Bioinsecticides have a reputation of better sustainability, but several have already been bypassed. Mechanisms of resistance developed by pests for natural substances are often those used to resist chemical insecticides.

### Goal

- Estimate the sustainability of these two molecules
- If we find resistant aphids, determine their resistance mechanisms
- Compare the mechanisms between biocontrol agent and chemical insecticides? Cross-resistances?



### 1. Resistant individuals in commercial orchard ?



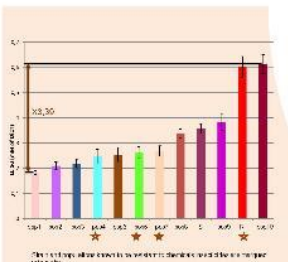
10 wild populations of *M. persicae* including 3 populations resistant to pyrethroids and neonicotinoids

2 laboratory strains: one susceptible (S) and one resistant (R) to DiCQ

Biotests on artificial diet (AoS) with DiCT



Mortality after 48h feeding



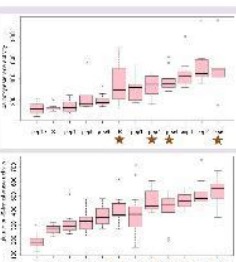
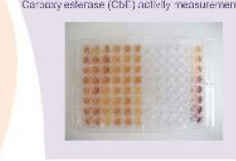
Significant, but tiny differences in susceptibility to DiCT are observed between *M. persicae* populations and strains

These differences illustrate genotype diversity but the less susceptible population cannot be considered as resistant

### 2. Relationship between detox and DiCT sensibility ?

Protein extract on for the 10 wild populations and 2 laboratory strains reared on pepper

In vitro activity measurements of GST and CBT



Differences in GST and CBT activities between populations but no correlation to susceptibility to DiCT

### 3. Can aphids evolve on plants rich in DiCQ ?

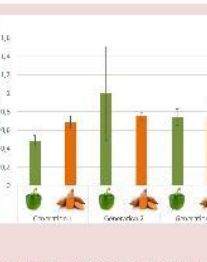
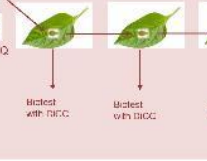
High level of DiCQ

Generation 1

Generation 2

Generation 3

No DiCQ



No changes in susceptibility to DiCQ after 3 generations reared on a naturally plant rich in this molecule

Inability to maintain the *M. persicae* thus more than 3 generations on sweet potato leaves

### 4. Are there species or host races less sensitive ?

Have natural aphid populations or plants accumulating DiCQ or DiCT or other secondary compounds and their susceptibility to these molecules in biotests



on aphid species and *M. persicae* can not feed on it

3 populations *Aphis terrestris* very specific to one individual plant No testing possible in biotests

1 population of *M. persicae* although 5 susceptibility to DiCT similar to S

Adaptation of *M. persicae* strains but not susceptibility variation (see question 2)

1 population of *M. persicae* susceptibility to DiCT similar to S

1 population of *Trioxys* resistance susceptibility to DiCT similar to S

### Conclusions

- Wild sampled populations of *M. persicae*, resistant or not to chemical insecticides, are susceptible to DiCT
- Their carboxylesterase and glutathion-S-transferase activities, which are classically involved in detoxification mechanisms, are not correlated with variation of susceptibility to DiCT
- Experimental evolution of a *M. persicae* strain on a plant naturally rich in DiCQ did not change its susceptibility to the purified molecule in biotests
- We did not find any aphid species or host race with less susceptibility to DiCT or DiCQ

### Take home message

No evidence of the ability of aphids to bypass the toxicity of diCT and DiCT. Good hope for the sustainability of these natural compounds as biopesticides







# Risks of aphid adaptation to caffeic acid derivatives used as bioinsecticides

Siegwart M., Lecerf E., Mascle O., Salette M., Blot A. and Poëssel J.L.

Resistance'19 Rothamsted, Harpenden, UK - 16-18 sept 2019

[myriam.siegwart@inra.fr](mailto:myriam.siegwart@inra.fr)

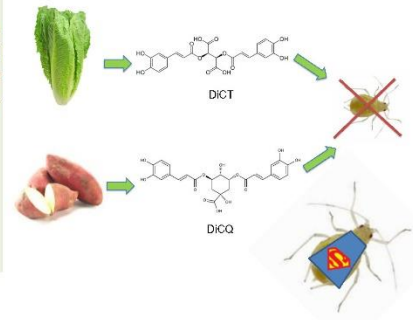


## Introduction

In Dicabio project we are looking if Dicafeoylquinic (DiCQ) and Dicafeoyltartaric (DiCT, chicoric acid) acids, natural substances toxic for aphids, can be used for their biocontrol. However, aphids are well known for quickly developing resistances to different insecticides. Bioinsecticides have a reputation of better sustainability, but several have already been bypassed. Mechanisms of resistance developed by pests for natural substances are often those used to resist chemical insecticides.

## Goal

- Estimate the sustainability of these two molecules
- If we find resistant aphids, determine their resistance mechanisms
- Compare the mechanisms between biocontrol agent and chemical insecticides? Cross-resistances?



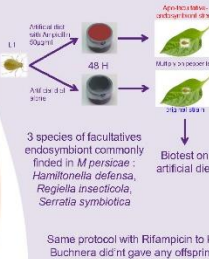
### 1. Resistant individuals in commercial orchard ?

10 wild populations of *Myzus persicae* including 3 populations resistant to pyrethroids and neonicotinoids  
 2 laboratory strains : one susceptible (S) one resistant (R) to OPs



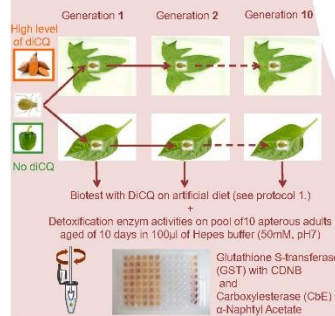
Mortality after 48h feeding  
 See protocol 3. for biochemical tests

### 2. May facultative endosymbiont influence sensibility to DiCT ?

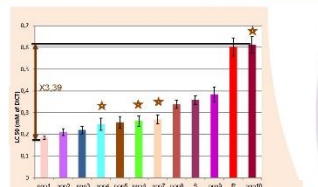
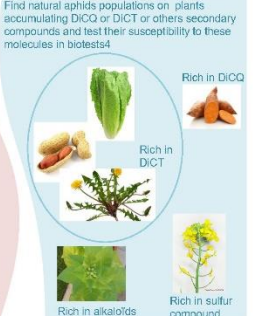


Same protocol with Rifampicin to kill Buchnera didn't give any offspring

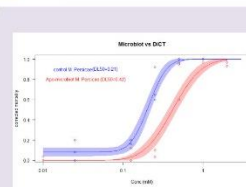
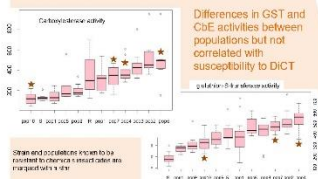
### 3. Can aphids evolve on plants rich in DiCQ ?



### 4. Are there species or host races less sensitive ?

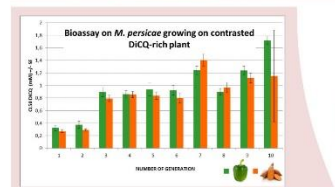


These differences illustrate genotype diversity but the less susceptible populations cannot be considered as resistant

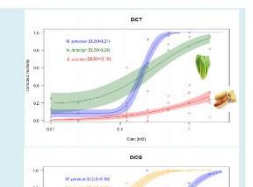
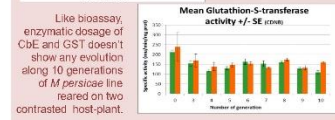


Removing facultative endosymbiont of *M. persicae* strain make it significantly less susceptible to DiCT  
 The ratio between both strain is weak

More tests are needed to evaluate the involvement of Buchnera in susceptibility to those two molecules



We observe some differences between generations probably due to experimental conditions but no differences between both plant-host lines



One population of *Aphis craccivora* found on peanut plant is more resistant to both DiCT and DiCQ, but the population of *Myzus persicae* found on tobacco is equivalent compared to *M. persicae* susceptibility to DiCT unlike the *Brevicoryne brassicae* population tested which is more susceptible to DiCQ.  
 Other populations of *M. persicae* found on tobacco have similar susceptibilities to DiCT and DiCQ as our reference strain  
 3 *Aphis traxacivola* additional populations were not tested because of their inability to feed on Ap3 diet

## Conclusions

- Wild sampled populations of *M. persicae*, resistant or not to synthetic insecticides, are susceptible to DiCT. Their CbE and GST activities, which are classically involved in detoxification mechanisms, are not correlated with variation of susceptibility to DiCT
- Removing facultative endosymbiont made our reference strain of *M. persicae* less susceptible to DiCT
- Experimental evolution during 10 generations of a *M. persicae* strain on a plant naturally rich in DiCQ did not change its susceptibility to the purified molecule in biotests
- We found one population of *A. craccivora* resistant to DiCT and DiCQ proving that adaptation to these molecules already exists in nature.

## Take home message

We found a small evidence of the ability of aphids to bypass the toxicity of DiCT and DiCQ. Good hope for the sustainability of these natural compounds as biopesticides

