



Projet AttractMyFly

 <p>LIBERTÉ • ÉGALITÉ • FRATERNITÉ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE</p> <p>MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION</p>	<p>Appel à projets de recherche</p> <p>« Pour et Sur le Plan Ecophyto »</p> <p>Edition 2014 : Contribuer à l'essor du biocontrôle</p> <p>PSPE2</p>	
---	--	---

Modèle rapport final PSPE



Acronyme : ATTRACTMYFLY

Titre du projet :

Développement d'attractifs et auto-dissémination de champignons entomopathogènes pour lutter contre la mouche du melon *Bactrocera cucurbitae*

Mots-clés : Mouche des fruits, kairomone, *Beauveria* spp., auto-dissémination, entomopathogènes

Intitulé du ou des volets concernés

Volet 4 - Enrichir la gamme des méthodes et produits disponibles pour apporter des solutions de biocontrôle à une plus grande diversité d'usages

Durée : 36 mois

2. Rapport d'activité : doit permettre de juger

- Moyens (humains et techniques) effectivement mis en œuvre

Partenaire	Nom	Prénom	Emploi actuel	Discipline	Personne/mois	Rôle / Responsabilité
Cirad UMR PVBMT <i>Expertise : étude de l'écologie et du comportement des mouches des fruits</i> Développement de stratégie en matière d'IPM	Costet	Laurent	Chercheur	Microbiologie / Phytopathologie	3	Coordinateur du projet, Responsable action 2, A2-T1, A2-T2, A2-T3
	Duyck	Pierre-François	Chercheur HDR	Entomologie, écologie	3	Responsable de l'Action 1
	Nibouche	Samuel	Chercheur HDR	Entomologie	3	Participation réalisation A1, A2
	Glenac	Serge	Technicien	Entomologie	3	Elevage d'insectes
	Merle	Isabelle	Stage de fin d'étude d'ingénieure (ENSAIA Nancy)	Entomo-pathologie	6	Participation réalisation A2-T1, A2-T2, A2-T3
	Vénard	Julie	Stage de fin d'étude d'ingénieure (ESA Angers)	Entomo-pathologie	6	Participation réalisation A2-T2
	Verger	Manon	Stage Cesure (Ensa Toulouse)	Entomo-pathologie	6	Participation réalisation A2-T1
	Verger	Damien	Stage M2 Science Technologie Santé (Agro Campus Ouest - Angers/Rennes)	Entomo-pathologie	6	Participation réalisation A2-T2, A2-T3
	Tibère	Richard	Technicien	Entomologie	6	Participation réalisation A1-T1, A1-T3
	Lallemand	Cedric	Technicien	Entomologie	12	Participation réalisation A1-T1, A1-T3
Muller	Lucile	VSC	Entomologie	6	Participation réalisation A1-T1	
Armefflor <i>Expertise : expérimentation de nouvelles techniques de productions fruitières, légumières, horticoles</i>	Graindorge	Rachel	Ingénieure	Agronomie	1	Prévue Responsable de l'action A3, Réalisé participation A1-T2
HEUREUDE	Lucas	Technicien	Protection des cultures	1	Prevu participation réalisation A3-T2 Réalisé participation A1-T2	
BARET	Celine	Technicien	Protection des cultures	3	Prevu participation réalisation A3-T2 Réalisé participation A1-T2	
Zoogones	Anne-Sophie	Ingenieure	Protection des cultures	6	Participation réalisation A1-T2	
Natural Plant Protection (NPP) / Bétel Réunion (Arysta Life Sciences) <i>Expertise : développement de produits de biocontrôle, notamment à base de souches de Beauveria</i>	Besse	Samantha	Responsable R&D	Microbiologie / Mycologie	1	Fourniture des souches de <i>Beauveria</i> spp. et production d'échantillons, Participation A2 participation au pilotage du projet
	Cabrol	Ghislain	Technicien	Microbiologie / Mycologie	0.5	Production des échantillons pour les essais Participation A2
	Saubanère	Caroline	Technicienne	Microbiologie / Mycologie	0.5	Production des échantillons pour les essais Participation A2
	Zuin	Michel	Responsable technique Bétel Réunion	Mycologie	1	Production des échantillons pour les essais Participation A2 Participation aux instances de pilotage du projet
	Rohrlich	Clara	Doctorante	Entomo-pathologie	12	Participation réalisation A2-T1, A2-T2, A2-T3
	Personnel temporairement affecté au projet			Mycologie / Biologie moléculaire	4	Criblage des souches de <i>Beauveria</i> A2-T1
AB7 Innovation <i>Expertise : mise au point de polymère diffuseur actif</i>	Harraca puis	Vincent	Responsables scientifique et technique	Ecologie chimique	1	Creation, production et fourniture des polymères, participation au pilotage du projet
	Chuche	Julien				

En noir : Personnels financés sur le budget du projet AttractMyFly

En rouge : Stagiaires et CDD financés sur le budget du projet AttractMyFly

En vert : Personnel ayant travaillé sur le projet AttractMyFly mais non financés sur le budget du projet AttractMyFly

- Exécution du projet (par tâche, par partenaire),

Tâche	Partenaires	Livrables	2015				2016				2017				2018
			T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	
WP1-T1	AB7 Cirad	Tests attractifs en milieu contrôlé	■	■	■										
WP1-T2	ARMEFLHOR AB7 Cirad	Evaluation des attractifs au champ			■						■				
WP2-T1	NPP et Betel Réunion Cirad	Criblage des souches de <i>Beauveria</i>	■	■	■										
WP2-T2	NPP et Betel Réunion Cirad	Test de transfert horizontal				■	■	■	■			■			
WP2-T3	Cirad	Mise au point du dispositif d'attraction/contamination										■	■	■	■
WP1-T3	ARMEFLHOR AB7 Cirad	Efficacité du contrôle du contrôle de <i>Z. cucurbitae</i> au champ"													■

En vert prévu, en jaune extension ou décalage du prévisionnel, bleu poursuite au delà du projet

- Réalisation des jalons et de la production des livrables

Jalon (J) ou livrable (L)	Action - Tâche	Intitulé	Trimestre de livraison Prévue	Date de livraison	Partenaires impliqués
L1	A1	Polymère imprégné attractif	T6	Livré T8	AB7 Cirad
J1	A2-T1	Souches de <i>Beauveria</i> actives sur les adultes de <i>B. cucurbitae</i>	T4	Livré T4	NPP & BETEL Réunion Cirad
J2	A2-T2	Faisabilité du transfert horizontal des spores de <i>Beauveria</i>	T8	Livré T12	Cirad NPP & BETEL Réunion
L2	A2-T3	Dispositif de piégeage et contamination des mâles	T10	Version Beta fonctionnelle livrée T12 L'optimisation des dispositifs sera poursuivie au delà du projet	Cirad NPP & BETEL Réunion
L3	A3	Méthodes de biocontrôle	T12	Non Livré La mise au point champ sera poursuivie au delà du projet	ARMEFLHOR Cirad AB7 NPP & BETEL Réunion

- **de la collaboration effective à l'intérieur du projet et, éventuellement, entre projets,**
AttractMyFly associait Le Cirad, L'ARMEFLHOR, NPP et Betel Réunion, et AB7. La complémentarité entre les partenaires s'est avérée effective sur l'ensemble du déroulé du projet. L'ensemble des tâches réalisées en collaboration entre partenaires est détaillé dans le tableau d'exécution du projet.
- **des liens établis avec les acteurs du plan Ecophyto, en particulier du ou des dispositifs concernés,**
Les représentants du Plan Ecophyto à la Réunion ont participé au comité de pilotage du projet. Ils ont été directement impliqués via Le DEPHY et RITA pour communiquer sur la stratégie avec les agriculteurs au sein du projet notamment via les expérimentations de terrain

- **Différents produits du projet**

Produits

- Dispositif « Attract and Kill » basé sur des attractifs kairomonaux ciblant les femelles de la mouche du melon *Zeugodacus cucurbitae*
- Preuve de concept de la méthode d'auto-contamination-dissémination
- Version Beta du dispositif d'autocontamination-dissémination de champignons entomopathogènes
- Caractérisation du spectre d'hôtes des souches I2960, I2960 et B507 permettant d'envisager des extensions d'usages aux mouches des fruits

Publications scientifiques et autres valorisations du projet :

Rohrlich C., Merle I., Hassani I. M., Verger M., Zuin M., Besse S., Robene I., Nibouche S. & Costet L. (2018). Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria*. **PloS one**, 13(7), e0199199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199199>

Rohrlich, C., Merle, I., Venard, J., Verger, D., Besse, S., Nibouche, S., Costet, L. (2018) Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in melon flies *Zeugodacus cucurbitae* during mating. **In prep**

Graindorge R et Costet L (2018). Lutte biologique contre la mouche du melon des résultats prometteurs. **Fertile : Bulletin de l'Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière Légumière et HORTICOLE (Armefflor)**. N°41, P14

Costet L. (2017). Développement d'attractifs et auto-dissémination de champignons entomopathogènes pour lutter contre la mouche du melon *Zeugodacus cucurbitae*. **Séminaire intermédiaire des projets issus de la deuxième édition de l'appel à propositions de recherche "Pour et Sur le Plan Ecophyto, Contribuer à l'essor du biocontrôle"** (PSPE2) et de l'APR 2014 du Programme Pesticides "Résistance et pesticides : Résister aux bioagresseurs, vaincre les résistances au changement pour réduire les risques". 14 et 15 décembre 2017. Paris (France).

Rohrlich C., Merle I., Payet-Hoarau M., Télismart H., Besse S., Nibouche S., & Costet L. (2016). Characterization of the pathogenicity of commercial or precommercial *Beauveria* sp. strains against the melon fly *Bactrocera cucurbitae*. In Abstract of the **49th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology International** Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control. 24-28th of July 2016. Tour- France [Poster FU-5].

<https://umr-pvbm.cirad.fr/principaux-projets/attractmyfly>

<http://ecophytopic.fr/tr/innovation-en-marche/ecophyto-recherche/attractmyfly-d%C3%A9veloppement-d%E2%80%99attractifs-et-auto>

Rohrlich (2018) Lutte biologique à base de champignons entomopathogènes du genre *Beauveria* en zone tropicale. Thèse de doctorat en Biologie des Populations et Ecologie de l'Université de la Réunion. Soutenue le 3 octobre 2018. 149p

Verger (2017) Caractérisation de la capacité de transfert de spores de champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* des mâles aux femelles de la mouche du melon *Zeugodacus cucurbitae* lors de l'accouplement. Mémoire de Master 2 Sciences et Technologie Santé mention Biologie et Technologie du Végétal, spécialité Production et Technologie du Végétal (Protev) de l'Université d'Angers. 33p.

Venard (2016) Caractérisation de la capacité de transfert de spores de *Beauveria bassiana* des mâles aux femelles de la mouche du melon *Zeugodacus cucurbitae* lors de l'accouplement. Mémoire de fin d'étude d'ingénieur agronome de l'ESA d'Angers. 84p

Merle (2015), Caractérisation du pouvoir pathogène de souches de *Beauveria* sp. sur la mouche du melon *Bactrocera cucurbitae* et de la capacité de transfert horizontal des spores de champignon lors de l'accouplement. Mémoire de fin d'étude d'ingénieur agronome de l'ENSAIA spécialité « protection des cultures » et de l'Université de Lorraine. 39p

3. Rapport scientifique : 10 à 15 pages en format à peu près libre

Zeugodacus cucurbitae : des impacts économiques et environnementaux majeurs

La famille des Tephritidae, compte environ 4000 espèces, appelées « mouches des fruits ». Près de 250 espèces sont des ravageurs d'importance économique des cultures fruitières et maraichères. Elles sont largement distribuées dans le monde dans les régions tempérées, subtropicales ou tropicales. Parmi ces espèces, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) est l'une des plus nuisibles pour les cultures maraichères dans de nombreuses régions du monde, en Asie, en Afrique et dans plusieurs îles de l'océan Pacifique et de l'océan Indien. *Zeugodacus cucurbitae* a été recensée au total sur près de 125 espèces de plantes appartenant aux Cucurbitaceae, Passifloraceae et Solanaceae (Dhillon *et al.*, 2005). Les dégâts sont engendrés par la ponte des femelles de *Z. cucurbitae* et le développement des larves dans les fruits. Les pertes occasionnées par cette espèce sur les cultures peuvent atteindre 90% (Ryckewaert *et al.*, 2010).

La lutte contre ces Tephritidae est difficile, car les différents stades du cycle biologique sont localisés dans différents micro-habitats. Les œufs et les larves se développent dans les fruits, tandis que la puppe est enfouie dans le sol, le stade adulte étant le seul stade éventuellement exposé aux insecticides. Néanmoins les méthodes de contrôle des populations de *Z. cucurbitae* reposent encore majoritairement sur la lutte chimique (Rossler, 1989). Cette protection montre cependant ses limites notamment par ses conséquences sanitaires, environnementales et économiques.

La lutte contre les mouches des légumes à la Réunion

Les organismes nuisibles prioritaires identifiés dans le cadre du programme ECOPHYTO DOM (Côte *et al.*, 2011) sont majoritairement des insectes : aleurodes et mouches des fruits. Cependant à la Réunion, malgré une forte mobilisation pour la mise au point de stratégies alternatives au tout insecticide telles que le projet GAMOUR (Deguine & *al.* 2013), l'adoption de ces méthodes difficiles à mettre en œuvre est loin d'être généralisée et l'utilisation des insecticides de synthèse reste importante. L'amélioration de la compétitivité de la filière maraîchage et l'objectif de réduction de l'usage des pesticides dans le cadre du plan ECOPHYTO motivent la mise au point de techniques innovantes permettant de lutter contre ces organismes nuisibles tout en améliorant la durabilité des systèmes de culture.

Les méthodes alternatives aux insecticides de synthèse pour lutter contre les Tephritidae

Différentes méthodes alternatives à la lutte chimique ont été développées et certaines sont déjà utilisées à la Réunion. Les méthodes prophylactiques consistent à collecter et détruire ou isoler tous les fruits infestés qui constituent des réservoirs de mouches. Les méthodes de lutte biologique sont basées sur des lâchers de parasitoïdes. *Psytalia fletcheri* Silvestri (Braconidae) a ainsi été acclimaté à la Réunion où il contribue à la régulation biologique des populations de la mouche du melon. La stratégie de lutte autocide est basée sur le lâcher de mâles stériles en vue de les mettre en compétition avec la population de mâles sauvages et de diminuer le potentiel reproductif de la population-cible.

D'autres stratégies sont basées sur l'emploi d'attractifs afin de localiser et minimiser l'emploi d'insecticide ; il s'agit par exemple i/de la lutte par suppression des mâles qui consiste à attirer et tuer les mâles grâce à un dispositif associant un attractif sexuel (paraphéromone) à un insecticide ou ii/ du traitement par taches qui reposent sur la pulvérisation localisés d'un mélange d'insecticide et d'attractifs.

Plus récemment, de nouvelles stratégies de lutte biologique basées sur l'utilisation de champignons entomopathogènes ont également démontré un certain potentiel. Certaines souches de champignons entomopathogènes se révèlent en effet pathogènes de plusieurs Tephritidae. Plusieurs stratégies de contamination des mouches des fruits et de dispersion de ces champignons ont été évaluées, que ce soit par pulvérisations de couverture ou grâce à des dispositifs de contamination fongique. Dans ce dernier cas, cette stratégie dite « Attract and Contaminate » consiste à attirer les adultes par un attractif au sein d'un dispositif où sera opéré la contamination par l'agent entomopathogène. La contamination des insectes peut être amplifiée par autodissémination de l'agent pathogène lors des accouplements. L'objectif est d'obtenir une forte sélectivité grâce à la spécificité de l'attraction, le phénomène d'autodissémination lors de l'accouplement permettant en outre de limiter la quantité d'inoculum entomopathogène libéré au champ, diminuant ainsi les possibilités d'infection d'espèces non cibles. Les résultats préliminaires des tests d'efficacité de ce type de systèmes de contrôle des tephritides sur le terrain sont encore peu nombreux mais encourageants (Ekesi *et al.*, 2007; Navarro- Llopis *et al.*, 2012).

Éliminer les femelles : un enjeu majeur

A la Réunion, une stratégie de gestion agroécologique des populations de *Z. cucurbitae* a été mise à la disposition des agriculteurs dans le cadre du projet GAMOUR (Deguine *et al.*, 2012). Cette stratégie intègre notamment des méthodes prophylactiques et des méthodes biotechniques basées sur la médiation chimique. Cependant, dans le cas de *Z. cucurbitae* comme pour d'autres Tephritidae d'importance économique, on ne dispose comme attractifs que de paraphéromones sexuelles attractives uniquement pour les mâles.

Le piégeage des femelles constitue pourtant un enjeu majeur, car la diminution de leurs populations entraînerait un impact direct sur les dégâts immédiats et futurs (Jacobson *et al.*, 1971 ; Jang & Light, 1996). Le piégeage des femelles influence plus significativement la population de mouches de fruits que le piégeage des mâles, car une femelle fécondée peut déposer un grand nombre d'œufs dans divers hôtes avant un nouvel accouplement. Chez *Z. cucurbitae*, la fécondité totale est de l'ordre d'un millier d'œufs par femelle (Vargas *et al.*, 1997). Le piégeage des femelles constituerait pour le contrôle des populations de cette espèce une technique complémentaire, qui pourrait s'intégrer dans les programmes de gestion agroécologique.

Certains composés volatils impliqués dans la localisation des fruits-hôtes à distance par les femelles peuvent constituer une source d'attractifs pour les piéger. Chez les mouches des fruits, des attractifs basés sur des kairomones de plantes-hôtes ont permis de contrôler certaines espèces, comme *Rhagoletis pomonella* (Stelinski & Liburd, 2002) ou *Anastrepha* spp. (Gonzalez *et al.*, 2006). Les travaux réalisés récemment au CIRAD à la Réunion concernant l'étude de la composition chimique et l'attractivité des effluves de 27 fruits hôtes de cette espèce ont permis de déterminer 34 composés potentiellement impliqués dans l'attraction des femelles. Un mélange constitué de deux composés volatils de synthèse, aussi attractif qu'une odeur de fruits frais, a été identifié (Atiama-Nurbel 2013). La forte réponse des femelles de *Z. cucurbitae* à ce mélange synthétique simple ouvre des perspectives d'utilisation pour le piégeage de masse des femelles. Il reste à préciser les ratios optimaux de composés du mélange, le type de diffuseur à utiliser, ainsi que le système de piégeage le plus adapté. Il importe notamment de définir un diffuseur permettant de prévenir la dégradation des composés volatils et l'émission d'un mélange uniforme au cours du temps.

Les composés volatils sont des substances non solubles dans l'eau et, pour certains, instables. La combinaison de ces composés dans une matrice polymérique s'avère donc être une solution intéressante. Ces matrices sont composées de polymères actifs, qui sont des matières synthétiques ou d'origine naturelle pouvant contenir un principe actif et le libérer de façon continue pendant une période de temps allant de quelques heures à plusieurs mois, en fonction des utilisations (Femenia & Sancho, 2013). Une fois réalisée l'intégration de l'attractif dans la matrice polymère, des tests mesurant son attractivité en conditions semi-naturelles (grandes cages sous ombrière) et au champ doivent être menés. Ces tests permettront en outre d'évaluer son attractivité vis-à-vis des mâles de *Z. cucurbitae*, bien que ceux-ci ne constituent pas la cible prioritaire de ces attractifs. Le passage au champ nécessite la définition d'un système de piégeage permettant une bonne diffusion des composés volatils et la définition de sa durée d'efficacité.

Une autre stratégie pour neutraliser les femelles est d'utiliser une approche «*Attract and Contaminate*» combinée à de l'autodissémination de champignon entomopathogène. Les mâles attirés par la paraphéromone seraient contaminés par des spores de champignon entomopathogène et serviraient de vecteurs pour contaminer les femelles lors de l'accouplement (Flores *et al.*, 2013). Des études récentes ont révélé que des isolats réunionnais et mauriciens de champignons entomopathogènes, *B. bassiana* et *Metarhizium anisopliae*, sont pathogènes des adultes et larves de *Z. cucurbitae* (Pastou, 2008 ; Sookar *et al.* ; 2008, 2010, 2013). A la Réunion, la lutte contre le ver blanc de la canne à sucre *Hoplochelus marginalis* est un exemple de réussite d'une stratégie de biocontrôle aussi bien par l'importance des surfaces traitées que par la durée de mise en œuvre. Le Betel®, un bio-insecticide à base du champignon entomopathogène *Beauveria* spp. est appliqué lors des replantations de canne à sucre depuis plus de trente ans. Ce produit est fabriqué par Betel Réunion, une filiale de la société Natural Plant Protection (groupe Arysta LifeScience, arystalifescience.fr) spécialisée dans la production de produits de biocontrôle et notamment de *Beauveria* spp. Cette compagnie produit et commercialise en outre la souche *B. bassiana* I-2960 (Ostrinil®) pour lutter contre le papillon palmivore, *Paysandisia archon*, ravageur des palmiers ornementaux, et a développé récemment une nouvelle souche I-2961 (NPP111B005) efficace pour la lutte contre le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus* et le charançon rouge du palmier *Rhynchophorus ferrugineus*. Si une ou plusieurs de

ces souches de *Beauveria* présentaient une pathogénicité suffisante sur *Z. cucurbitae* une extension d'usage serait demandée.

L'analyse de cet état des connaissances permettait d'envisager deux voies innovantes pour lutter contre les femelles de *Z. cucurbitae* :

- l'utilisation d'un mélange attractif à base de kairomones pour des stratégies de contrôle par piégeage de masse des femelles
- le développement d'une stratégie d'autodissémination de *Beauveria* via les mâles de *Z. cucurbitae*.

Quatre partenaires techniques rassemblant les compétences nécessaires au développement, l'évaluation et la variolisation de ces stratégies se sont associés pour le projet AttractMyFly

- Cirad, Unité mixte de Recherche Peuplement Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical
- Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière Légumière et HORTicole (ArmeFlhor) expérimente de nouvelles techniques afin de développer les productions fruitières, légumières, horticoles, l'agriculture biologique et la protection des cultures tropicales.
- Natural Plant Protection SA. et Betel Réunion SAS (groupe Arysta LifeScience), entreprises spécialisées dans le développement et la production de produits de biocontrôle, notamment à base de souches de *Beauveria*.
- AB7 Industrie entreprise spécialisée mise au point de polymères actifs : matières plastiques synthétiques ou d'origine naturelle pouvant contenir un principe actif libérer de façon continue pendant une période de temps allant de quelques heures à plusieurs mois.

Objectifs et résultats attendus

L'objectif du projet ATTRACTMYFLY était d'enrichir la gamme de méthodes et produits disponibles pour apporter des solutions de biocontrôle contre la mouche du melon, *Z. cucurbitae*, ravageur majeur des cultures légumières à la Réunion et dans de nombreuses régions tropicales.

Les objectifs spécifiques étaient (i) de mettre au point un dispositif attractif-diffuseur polymère permettant le piégeage de masse des femelles, (ii) de mettre au point une méthode d'auto-dissémination de champignons entomopathogènes, et (iii) de tester en plein champ l'efficacité de ces techniques.

Les résultats attendus du projet sont la mise au point d'innovations techniques dans le domaine du biocontrôle qui contribueront à la réduction de la consommation d'insecticides de synthèse en culture maraîchère dans les DOM et plus généralement en zones tropicales.

1. Approches scientifiques, techniques utilisées et résultats obtenus

Le projet ATTRACTMYFLY était structuré en trois actions. Les expérimentations ont été menées suivant les cas en milieu contrôlé (laboratoire), semi-contrôlé (grandes cages sous ombrière) ou en plein champ.

Action 1 : Mise au point des diffuseurs d'attractifs

Les travaux réalisés au CIRAD à la Réunion dans le cadre de la thèse de T. Atiama-Nurbel concernant la composition chimique et l'attractivité des effluves de 27 fruits hôtes avait permis de sélectionner 34 composés potentiellement impliqués dans l'attraction des femelles de *Z. cucurbitae*. Un mélange constitué de deux composés volatils de synthèse C1 et C2, aussi attractif qu'une odeur de fruits frais, avait été identifié sur la base de tests réalisés dans des olfactomètres à une voie.

L'objectif de l'action 1 était de mettre au point un diffuseur d'attractifs pour le piégeage de masse des femelles.

Action 1 – tâche 1 : Définition en milieux contrôlé et semi-contrôlé du ratio optimal de kairomones

A1-T1 : Objectifs

L'objectif était de valider l'attractivité du mélange de deux composés de synthèse en milieux contrôlé et semi-contrôlé, définir le ratio optimum de kairomones à incorporer dans des polymères contrôlant leur diffusion, et les quantités de polymères à utiliser pour obtenir une attractivité maximale vis-à-vis des femelles de *Z. cucurbitae*.

A1-T1 : Matériel et méthodes **a/ Matériel biologique**

Tableau 1 : Modalités utilisés au laboratoire pour évaluer l'attractivité des composés C1 et C2 incorporés dans les lanières polymériques en olfactomètre à une voie. Les lanières sont chargées a 1% de matière active.

Modalité	Nature	Longueur lanière polymérique	Quantité composé intégré dans le polymère(mg)
M0	-	-	-
M1	Concombre frais 30g		
M2	Lanière « Témoin »	1 cm	-
M3	Lanière « C1 »	0,3 cm	1.6
M4	Lanière « C2 »	0,2 cm	1.1
M5	Lanière « C1 » et « C2 »	0,3 cm (C1) + 0,2 cm (C2)	2.7

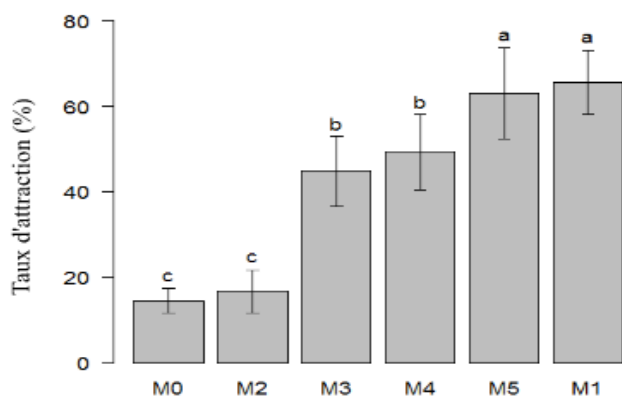


Figure 1 : Taux d'attraction des femelles (%) de *Z. cucurbitae* à C1 et C2 mesuré à l'aide d'olfactomètre une voie. M0 : Témoin négatif, M1: Témoin positif, M2 : Lanière T, M3 : Lanière C1, M4 : Lanière C2, M5 : Lanières C1 et C2. Neuf répétitions par modalité ont été réalisées. L'effet des modalités a été modélisé à l'aide d'un modèle linéaire généralisé. Les moyennes représentées par des lettres différentes sont significativement différentes.

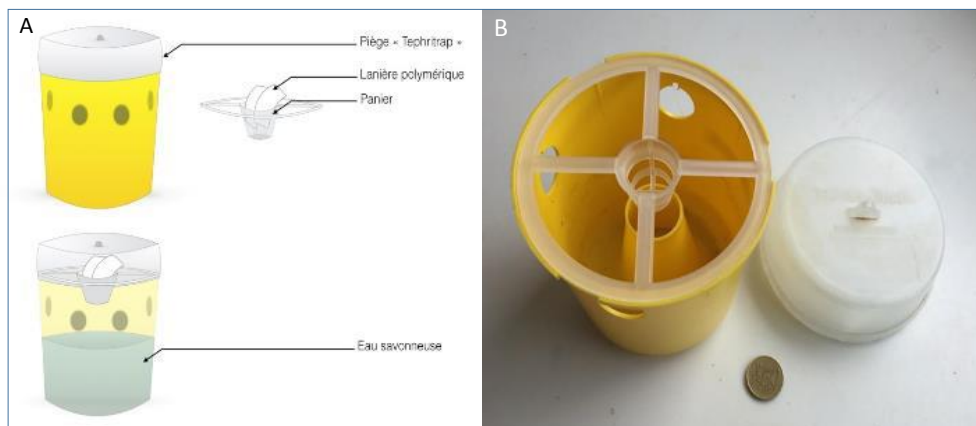
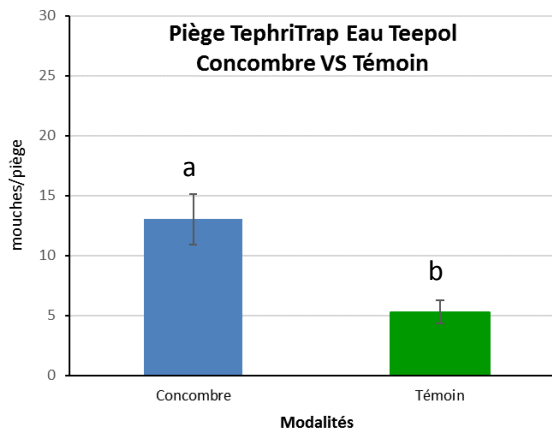


Figure 2 : Schéma (A) et photographie (B) du dispositif de piégeage avec lanières polymériques. Les mouches adultes pénètrent dans le piège par ses trous, ne peuvent plus en ressortir et se noient dans l'eau savonneuse (Schéma et photographie : A. S. Zoogonès)

Figure 3 : Capacité de piégeage de femelles *Z. cucurbitae* du dispositif TephriTrap rempli d'eau additionnée de « Teepol ». Deux modalités sont testées : pièges contenant du concombre face à un piège vide. Le dispositif consiste en quatre cages, dans chaque cage chaque modalité est représentée deux fois. L'expérimentation a été répétée à deux dates. L'effet des modalités a été modélisé à l'aide d'un modèle linéaire généralisé. Les moyennes représentées par des lettres différentes sont significativement différentes.



Les femelles de *Z. cucurbitae* adultes sont élevées dans des chambres climatiques en conditions contrôlées et sont sexuellement matures (25 à 30 jours). Pour les essais en grandes cages de comportement, des *Ficus*, plantes non-hôtes pour les femelles de *Z. cucurbitae*, sont placés dans les cages. Les fruits les plus attractifs pour les femelles de *Z. cucurbitae* sont les concombres « pays » (*Cucumis sativus* L.). Les concombres mûrs, n'ont subi aucun traitement phytosanitaire et sont indemnes de toutes attaques de ravageur.

b/ Composés de synthèse et lanières polymériques

Les composés chimiques proviennent de l'entreprise Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Afin de faciliter la lecture, les composés (6Z)-non-6-én-1-ol et (2E,6Z)-nona-2,6-diénaal sont nommés «C1» et «C2». « C1-C10 » nomme l'association de 10 composés C1, C2 auquel s'ajoute les (6Z)-non-6-énaal, (2E)-2-non-énaal, diénaal decanal, Hexanal, Nonanal, 1-Nonanol, 1-Hexanol, Limonene. Les composés sont intégrés à 1% dans les lanières polymériques produites par AB7 Innovation.

c/ Dispositif expérimental en conditions contrôlées : olfactomètre à une voie

Des olfactomètres à une voie ont été utilisés pour évaluer l'attractivité au laboratoire de C1 et C2 incorporés dans les polymères. Ils sont composés d'un tube cylindrique (84cm de longueur et 11.5cm de largeur) compartimenté en trois chambres consécutives, terminé par un ventilateur créant un flux d'air (0.35ms^{-1}). La chambre de stockage contient les mouches; elle est délimitée par un entonnoir en tissu maillé métallique conduisant à la chambre de capture, et suivie par la chambre à odeur contenant les polymères imprégnés. Les olfactomètres sont placés sur une paille en série de quatre unités, trois avec un polymère imprégné et un témoin, qui fonctionnent simultanément. Dans chaque olfactomètre, trente femelles sont placées dans la chambre de stockage et sont exposées pendant une heure aux composés chimiques. A l'issue de ce temps, les femelles présentes dans la chambre de capture sont comptées.

d/ Dispositif expérimental en conditions semi-naturelles

Le dispositif en condition semi-naturelles consiste en des cages cylindriques en toile insect-proof de 3 m de diamètre et de 2,5 m de hauteur disposées sous ombrière. Une plante (ficus) est disposée au centre de la cage. Dans chaque cage, 4 systèmes de piégeage sont disposés sur un support à 30cm autour de la plante. Les essais se déroulent de 9h à 14h, horaire le plus favorable à la recherche d'un site d'oviposition pour les femelles. Deux heures avant le début de l'expérimentation, 100 femelles de *Z. cucurbitae* sont acclimatées dans chaque cage. La disposition des systèmes de piégeage suit une randomisation intra-cage. Eau et ressource alimentaire sont à disposition durant toute l'expérimentation. A 14h, le nombre de mouches dans chaque piège est relevé.

d/ Analyses statistiques

Pour chacune des expérimentations, afin de tester l'effet des différents facteurs, un modèle linéaire généralisé a été utilisé. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels R ou SAS.

A1-T1 : Résultats

a/Attractivité en conditions contrôlées des composés C1 et C2 incorporés dans les lanières polymériques

Les tests préliminaires suggéraient que C1 diffusait environ 1,5 fois moins que C2 du polymère (VAT lot 1). Nous avons donc utilisé un ratio C1/C2 de 1.5 pour respecter les proportions utilisées avec produit liquide sur coton dans la thèse de T Nurbel.

Les modalités utilisées au laboratoire en condition contrôlée pour évaluer l'attractivité des composés C1 et C2 incorporés dans les lanières polymériques en olfactomètre à une voie. Afin d'évaluer les effets des modalités présentées dans le **Tableau 1** Neuf répétitions ont été réalisées pour chaque modalité

Les résultats sont présentés **Figure 1** révèlent :

- i/ L'absence de différence significative d'attractivité entre M0 et M2. La matrice polymérique composant les lanières n'est pas attractive pour les femelles de *Z. cucurbitae*.
- ii/ Les deux modalités M3 et M4 correspondant aux lanières chargées avec un seul composé, attirent significativement plus de mouches que les témoins négatifs M0 et M2 alors qu'elles ne sont pas statistiquement différentes entre elles.
- iii/ L'attractivité de la modalité M5, mélange des lanières C1 et C2 n'est pas significativement différent du témoin concombre frais (M1) mais est significativement différentes des quatre autres modalités. En

Tableau 2 : Détail des lanières polymériques et des quantités de composés de matière active testées en condition semi contrôlée

Polymère	Quantité totale de composés testés (mg)	Génération du polymère	Lot du polymère	C1/C2
Témoin	0	VAT	Lot n°1	
C1 + C2	0.27	VAT	Lot n°1	1.5
	0.56	TAT	Lot n°2	1.5
	2.7	VAT	Lot n°1	1.5
C1-C10	2.4	TAT	Lot n°2	1.5

Tableau 3 : Détail des expérimentations réalisées en condition semi contrôlée

Expérience	Nb répétitions	Modalités				
		C1+C2_0.27mg_L1_VAT	C1+C2_0.56mg_L2_TAT	C1+C2_0.56mg+C3-C10_1.84_L2_TAT	C1+C2_2.7mg_L1_VAT	Témoin
1	3				X	X
2	5	X				X
3	12		X			X
4	5			X		X
5	5		X	X		

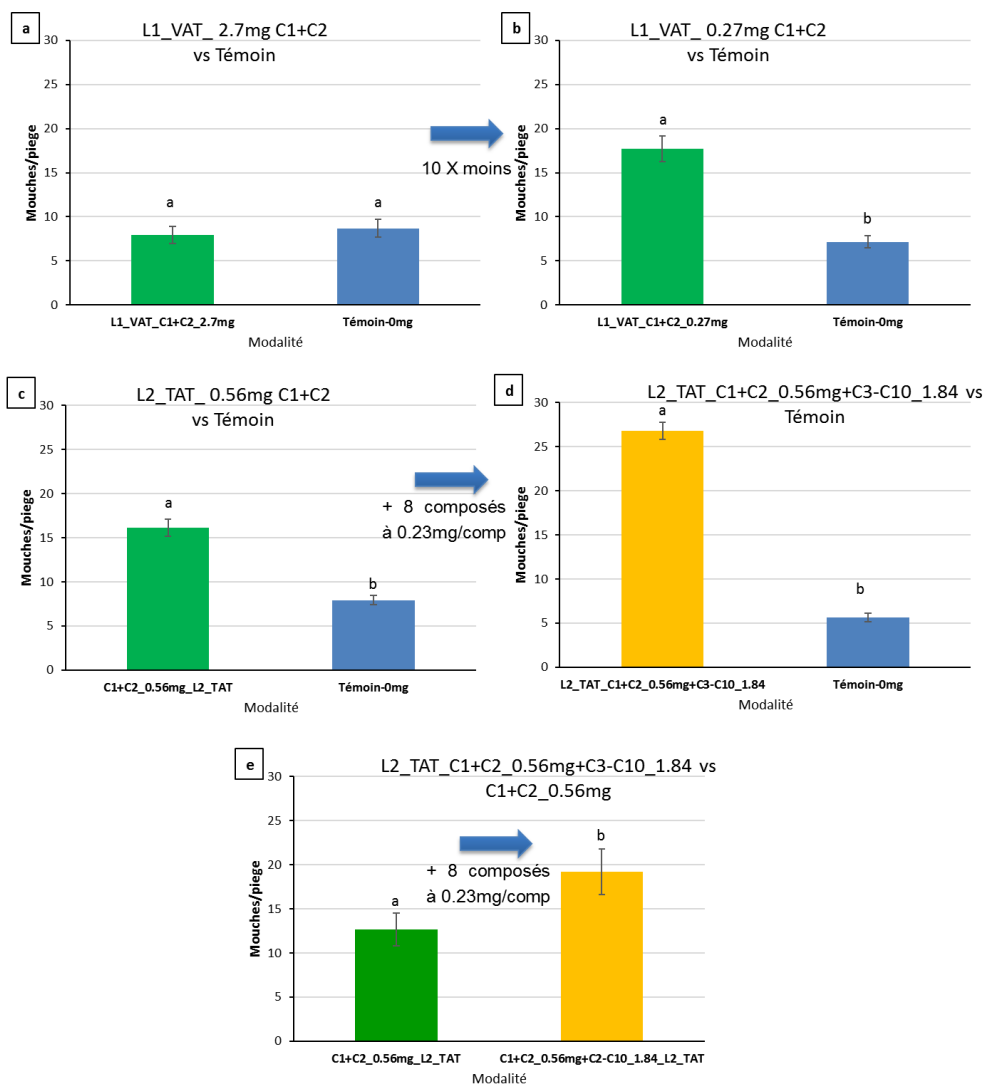


Figure 4 : Capacité Les composés kairomonaux sont attractifs pour les femelles de *Z. cucurbitae* en condition semi-contrôlées. Le piégeage dispositif est un TephriTrap rempli d'eau additionnée de « Teepol ». Le dispositif consiste en quatre cages, dans chaque cage chaque modalité est représentée deux fois. Les expérimentations ont été répétées à plusieurs dates (entre 5 et 12 en fonctions des expérimentations). L'effet des modalités a été modélisé à l'aide d'un modèle linéaire généralisé. Les moyennes représentées par des lettres différentes sont significativement différentes.

mélange, les composés C1 et C2 intégré dans le polymère attirent statistiquement plus de femelles de *Z. cucurbitae* qu'individuellement.

Conclusions :

En conditions contrôlées, la combinaison de lanières polymériques contenant 2.7 mg de C1 et C2 (ratio C1/C2=1.5) attire autant que le concombre

b/ Attractivité des lanières polymériques diffusant C1 et C2 et C1-C10 en conditions semi-naturelles

Une première étape était le choix d'un système de piégeage en conditions semi-naturelles. Pour cela, nous avons évalué la capacité de piégeage des femelles de *Z. cucurbitae* de différents types de pièges disponibles sur marché.

- Mc Phail jaune intégrant les bandes collantes Sticky Trap,
- Tephri-Trap jaune intégrant les bandes collantes Sticky Trap,
- Tephri-Trap noir intégrant les bandes collantes Sticky Trap,
- CeratiPack jaune piège intégrant un couvercle imprégné de deltaméthrine.
- Tephri-Trap jaune avec le couvercle imprégné de deltaméthrine du CerariPack
- Tephri-Trap jaune avec de l'eau additionnée de savon de type « Teepol » à raison de trois gouttes de

savon par piège (**Figure 2**). Les mouches adultes pénètrent dans le piège par ses trous (latéraux et central). Avant leur utilisation les pièges sont lavés dans un bain de « TFD4 » à 4% pendant une période pouvant aller de 3 à 24 heures. Le « TFD4 » est un détergent, permettant d'éliminer les odeurs qui seraient présentes sur les pièges.

Neuf expérimentations (plus de 6500 mouches), préliminaires croisant différentes modalités entre elles ont été réalisées. A l'issue de ces expérimentations, nous avons retenu le piège Tephri-Trap rempli d'eau additionnée de « Teepol ». La capacité de piégeage de ce dispositif contenant du concombre face à un piège vide est représentée **Figure 3**.

Neuf expérimentations (plus de 14000 mouches) ont été conduites afin d'évaluer l'attractivité de différentes quantités du mélange C1 + C2 et C1-C10 en grande cage. Pour, les premiers tests, nous avons commencé par utiliser les quantités ou augmenter les quantités de kairomones par rapport à celle que nous avons identifiées comme attractives au laboratoire en olfactomètre à une voie. Cependant aucune des quantités testées n'étaient attractives en grande cages. Nous avons alors diminué les quantités testées. Les expérimentations les plus informatives sont présentées ci-dessous. Les polymères disponibles sont décrits dans le **Tableau 2**.

Le ratio C1/C2 est toujours égale à 1.5 et le ratio C2/Cn (avec n de 3 à 10) est de 1. Deux polymères différents par leur nature ont été testés, le polymère TAT étant supposé relarguer moins vite les composés que le polymère VAT. Dans le **Tableau 3** est présenté le détail des expérimentations réalisées en condition contrôlée (grande cage). Le dispositif consiste en quatre cages, dans chaque cage chaque modalité est représentée deux fois. Dans chaque cage, il est disposé deux pièges contenant la modalité à évaluer et deux témoins chaque expérimentation est répétée à plusieurs dates. Le nombre de répétition varie entre 5 et 12 en fonction des expérimentations.

Les résultats sont présentés **Figure 4** :

- I/ Absence de différence significative d'attractivité en grande cage pour les femelles de *Z. cucurbitae* entre les lanières polymériques L1 VAT incorporant 2.7mg de C1+C2 comparées au témoin (**Figure 4a**) alors que cette modalité était attractive au laboratoire en olfactomètre à une voie.
- ii/ Si l'on diminue par 10 la quantité de composés, L1 VAT incorporant 0.27mg de C1+C2 est significativement plus attractif que le témoin (**Figure 4b**)
- iii/ Un polymère L2 TAT incorporant 0.56mg de C1+C2 est significativement plus attractif que le témoin (**Figure 4c**). Son attractivité n'est pas significativement différente du polymère L1 VAT incorporant 0.27mg de C1+C2 soit deux fois moins de composé mais VAT est aussi supposé en relarguer deux fois plus.
- IV/ On constate que si l'on rajoute à L2 TAT incorporant 0.56mg de C1+C2 0.23mg de chacun des composés de C3 à C10 que l'attractivité pour les femelles augmente très significativement (**Figure 4d et 4e**). Ce

Tableau 4 : Informations relatives aux parcelles utilisées pour évaluer au champ l'efficacité du dispositif de piégeage.

Localisation des parcelles	Espèce(s) cultivée(s) sur la parcelle (noms vernaculaires)	Espèce(s) cultivée(s) sur la parcelle	Altitude (m)	Superficie (m ²)
Petite-Ile	Concombre puis Citrouille	<i>Cucumis sativus</i> L. puis <i>Cucurbita moschata</i>	130	1700
Petite-Ile	Concombre	<i>Cucumis sativus</i> L.	130	5000
Petite-Ile	Concombre - Agrumes	<i>Cucumis sativus</i> L. – <i>Citrus</i> spp.	210	5500
Entre-Deux	Calebasse	<i>Lagenaria siceraria</i> (Molina) Standl.	230	2800
Saint-Paul	Courgette	<i>Cucurbita pepo</i> L.	490	800
Saint-Paul	Concombre	<i>Cucumis sativus</i> L.	490	800
Saint-Paul	Margose	<i>Momordica charantia</i> L.	490	750
Saint-Paul	Citrouille	<i>Cucurbita moschata</i> Duchesne	760	760
Saint-Paul	Citrouille	<i>Cucurbita moschata</i> Duchesne	450	850
Saint-Louis	Citrouille - Concombre - Papaye	<i>Cucurbita moschata</i> Duchesne - <i>Cucumis sativus</i>	60	800
Entre-Deux	Margose	<i>Momordica charantia</i> L.	230	1600
Saint-Louis	Citrouille - Concombre -	<i>Cucurbita moschata</i> Duchesne - <i>Cucumis sativus</i>	60	750
Petite-Ile	Concombre - Canne à sucre	<i>Cucumis sativus</i> L. - <i>Saccharum officinarum</i> L.	138	3500

Tableau 5 : Descriptifs des essais mis en place pour l'évaluation de l'attractivité des mélanges de composés kairomonaux vis-à-vis des femelles *Z. cucurbitae*

N° essai	Nombre de modalités testées	Parcelles mises en place	Durée de suivi (jours)	Nb. de répétitions intraparcelles
1	6	Petite-Ile – Concombre puis Citrouille	118	2
		Petite-Ile - Concombre	82	5
		Entre-Deux - Calebasse	77	3
2	10	Petite-Ile - Concombre - Agrumes	79	4
		Saint-Paul - Courgette	70	1
		Saint-Paul - Concombre	70	1
		Saint-Paul - Margose	70	1
		Saint-Paul - Citrouille	63	1
		Saint-Paul - Citrouille	63	1
		Saint-Louis - Citrouille - Concombre - Papaye	55	2
3	6	Petite-Ile - Concombre	28	2
		Saint-Paul - Margose	28	2
		Saint-Paul - Citrouille	30	2
		Saint-Louis - Citrouille - Concombre - Papaye	28	3
		Entre-Deux - Margose	17	3
		Saint-Louis - Citrouille - Concombre - Aubergine	14	3
4	3	Petite-Ile - Concombre	29	4
		Saint-Paul - Margose	28	4
		Saint-Paul - Citrouille	28	4
		Saint-Louis - Citrouille - Concombre - Papaye	28	6
		Entre-Deux - Margose	28	6
		Saint-Louis - Citrouille - Concombre - Aubergine	27	6
		Petite-Ile - Concombre - Canne à sucre	28	8
		5	2	Petite-Ile - Concombre
Saint-Paul - Margose	26			3
Saint-Paul - Citrouille	26			3
Entre-Deux - Margose	25			5
Saint-Louis - Citrouille - Concombre - Aubergine	27			5
Petite-Ile - Concombre - Canne à sucre	8			7

phénomène n'avait pas été observé en olfactomètre une voie avec les composés purs sur coton (travaux de T Nurbel)

A1-T1 : Conclusions

I/ Le dispositif Tephri-Trap contenant de l'eau additionnée de Teepol et des kairomones C1+ C2 ou C1-C10 piègent significativement les femelles de *Z. cucurbitae*.

II/On ne retrouve pas en condition semi contrôlée en grande cage les mêmes résultats qu'au laboratoire avec les olfactomètres une voie :

- les doses de C1+C2 qui étaient attractives ne le sont plus en grande cage. Il faut diminuer par 10 les quantités pour retrouver de l'attractivité pour les femelles
- Les 10 composés C1-C10 attirent significativement plus que C1+C2

Action 1 – tâche 2 : Evaluation au champ de l'efficacité du dispositif de piégeage

A1-T2 : Objectifs

Test au champ de l'efficacité de piégeage de la combinaison optimale kairomones / piège identifiée dans la tâche 1.

- Valider au champ l'attractivité du dispositif de piégeage comprenant un mélange de composés kairomomiaux de synthèse (C1+C2 et C1-C10).
- Evaluer les quantités de composés à utiliser au champ pour obtenir une attractivité maximale vis-à-vis des femelles *Z. cucurbitae*.
- Evaluer la sélectivité du dispositif de piégeage (sexe des individus *Z. cucurbitae* et autres espèces de Tephritidae capturées).

A1-T2 : Matériel et méthodes

a/ Sites d'études

L'étude a été menée sur un total de 13 parcelles de Cucurbitaceae sur une période allant de Juin 2017 à Janvier 2018. La culture de Cucurbitaceae était en culture seule ou couplée à la culture d'une autre espèce de Cucurbitaceae ou d'une espèce appartenant à une famille différente (**Tableau 4**).

b/ Composés attractifs et lanières polymériques

Idem A1-T1a. Sont utilisées les lanières suivantes

- Lanières chargées en C1-C2-C3-C4-C5-C6-C7-C8-C9-C10
- Lanières ne contenant aucun composé
- Lanières chargées en *Cue-lure*

Les lanières sont découpées de manière à obtenir les quantités de composés désirés. Sauf pour C1-C10 à 0.18mg ou tous les composés sont incorporés dans le même polymère. Le ratio C1/C2 est toujours égal à 1.5 et le ratio C2/Cn (avec n de 3 à 10) est de 1

c/ Dispositif expérimental au champ

L'ensemble de l'expérimentation s'est déroulée sur cinq phases d'essais. Chaque essai regroupe les parcelles sur lesquelles les modalités mises en place ont été identiques, sur une période de temps donné (**Tableau 5**). Pendant la durée d'un essai, les lanières polymériques ne sont pas changées.

Les pièges sont maintenus sur un piquet à 50 centimètres du sol et disposés le long de la bordure du champ avec une distance de 10 mètres entre chaque piège (**Figure 5**). Deux pièges correspondant à la même modalité ne sont pas placés côte à côte. Le nombre de pièges disposés sur chaque parcelle est dépendant du périmètre de celle-ci, et par conséquent le nombre de répétitions (des modalités) intra-parcelle peut varier d'une parcelle à une autre. L'observation des pièges est faite une fois par semaine après leur pose. Les mouches des fruits capturées sont comptées puis identifiées (espèce et sexe) selon un guide d'identification des Tephritidae de La Réunion (Franck et al., 2017). A chaque relevé, l'eau des pièges est remplacée et les pièges sont déplacés entre piquets de manière à ce qu'ils effectuent une rotation autour de la parcelle. La rotation des pièges permet d'éviter un effet de leur emplacement sur la capture des mouches. A chaque relevé, le stade phénologique global de la parcelle a été relevé.

e/Analyses statistiques

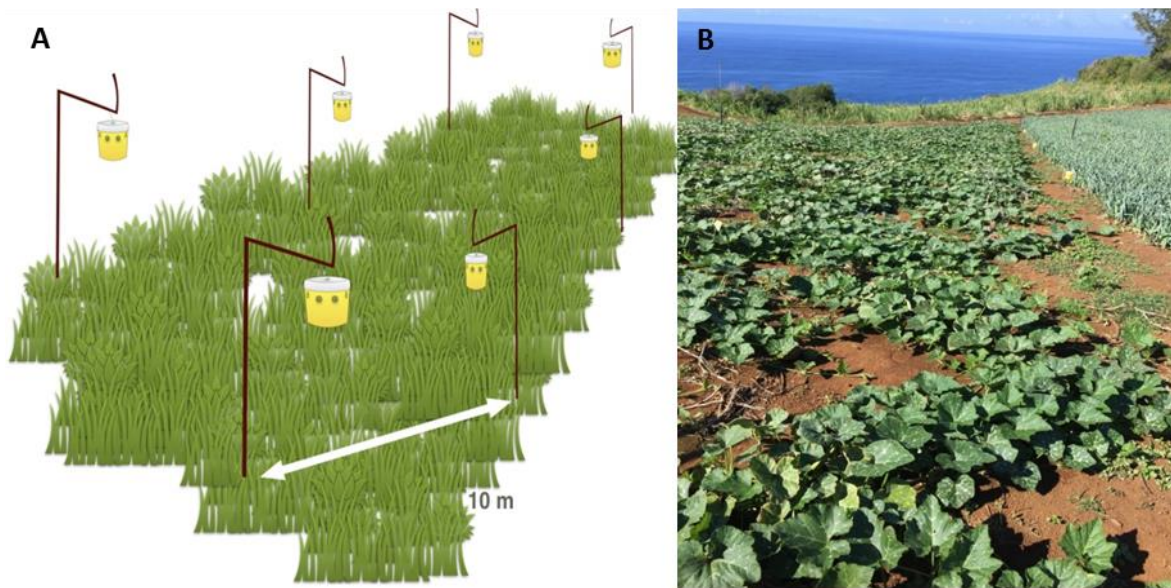


Figure 5 : Schéma (A) et photographie (B) du dispositif expérimental au champ. Les pièges sont maintenus sur un piquet en fer à 50 centimètres du sol. Ils sont disposés le long de la bordure du champ avec une distance de 10 mètres séparant chaque piège. (Schéma et photographie: A. S. Zoogonès).

Tableau 6: Résultats de l'évaluation au champ de l'efficacité du dispositif de piégeage Nombre moyen de mouches/piège pour *Z. cucurbitae* (SE = erreur-standard). Les moyennes sont faites entre les parcelles d'un même essai. Les lettres représentent les résultats de la comparaison multiple de moyennes (test de Tukey HDS). En vert les modalités pour laquelle les moyennes sont significativement différentes du témoin.

N° d'essai	Modalités	Femelles		Mâles			
		Nb. moyen /piège	SE	Nb. moyen /piège	SE		
1	Témoin 0 mg	34.2	ab	11.6	24.2	a	9.9
	<i>Cue-lure</i> 5 mg	21.6	a	7.2	169.7	c	69.8
	L2_TAT_C1-C10 2.4 mg	50.9	bc	18.9	28.3	ab	13.7
	L2_TAT_C1 + C2 0.56 mg	46.7	bc	12.1	22.3	a	13
	L2_TAT_C1 + C2 5.6 mg	68.1	cd	21.5	36.2	ab	11.4
	L2_TAT_C1 + C2 56 mg	113.5	d	44.3	55.3	b	37.4
2	Témoin 0 mg	6.1	ab	1.8	7	ab	2.6
	<i>Cue-lure</i> 5 mg	8.9	ab	3.8	140	d	19.8
	L2_TAT_C1-C10 2.4 mg	6	a	1.9	4.3	a	1.6
	L3_VAT_C1-C10 - 0.18 mg	6.6	ab	2.1	7.4	ab	1.5
	L3_VAT C1 + C2 0.44 mg	7	a	3.2	7.7	ab	2.9
	L2_TAT_C1 + C2 0.56 mg	6.4	ab	2.7	6	ab	3
	L3_VAT C1 + C2 4.4 mg	7.4	ab	2	9.3	ab	4.1
	L2_TAT_C1 + C2 5.6 mg	14.8	a c	7.2	10	a c	4.5
	L3_VAT C1 + C2 44 mg	15	bc	6.7	15	bc	7
L2_TAT_C1 + C2 56 mg	28.6	c	13.1	17.4	a c	6.8	
3	Témoin 0 mg	3.4	ab	1.2	2.3	ab	1.3
	<i>Cue-lure</i> 5 mg	2.7	a	1.4	200	c	59.3
	L1_VAT_C1 + C2 2.7 mg	11.4	bc	5.8	1.1	a	0.7
	L3_VAT C1 + C2 9 mg	28.6	cd	21	2.7	ab	1.3
	L1_VAT_C1 + C2 27 mg	43.3	cd	28.8	3.4	b	1.9
	L3_VAT C1 + C2 90 mg	45.9	d	34.3	4.5	b	3.1
4	Témoin 0 mg	3.5	b	1.8	2.9	a	1.8
	<i>Cue-lure</i> - 5 mg	1.1	a	0.6	156.2	c	31.2
	L3_VAT C1 + C2 90 mg	26.7	c	14.1	19.3	b	10.8
5	Témoin 0 mg	1.5	a	0.7	13.7	a	9.3
	L3_VAT C1 + C2 112.5 mg	28	b	16.2	60	b	35.3

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel R. Au sein de chaque essai, les mâles et les femelles de chaque espèce de Tephritidae capturés sont analysés séparément. L'effet des « modalités » et l'effet des « parcelles » sur les nombres de mouches capturées ont été évalués en utilisant un modèle linéaire généralisé (GLM) avec une distribution binomiale négative et une fonction de lien logarithmique. La significativité des effets étudiés a été testée par des ANOVA basées sur des tests de rapport de vraisemblance (Khi-Deux, χ^2). Des tests de comparaison de moyennes deux à deux de Tukey HSD ont été réalisés pour identifier les modalités ayant le nombre moyen de mouches capturées significativement supérieurs.

A1-T2 : Résultats

a/ Attractivité au champ du mélange de composés kairomomax vis-à-vis des femelles *Z. cucurbitae*

Pour, les premiers tests, nous avons commencé par utiliser les mêmes quantités de composés que celles que nous avons identifiées comme attractives en condition semi contrôlée en grande cage. Cependant aucune des quantités testées n'étaient attractives au champ. Nous avons alors augmenté les quantités des deux kairomones C1 et C2. Nous n'avons pu augmenter les quantités pour l'évaluation du cocktail de kairomones C1-C10 par manque de matériel.

L'ensemble des résultats est présenté dans le **Tableau 6**. Pour la variable nombre de femelles *Z. cucurbitae* capturées, les effets parcelles et modalités sont hautement significatifs. Ceci signifie que certaines modalités sont plus attractives que d'autres, mais avec des différences de captures selon les parcelles. Le faible effectif des captures sur certaines parcelles pourrait être dû une faible pression de *Z. cucurbitae* (liée par exemple aux pratiques agricoles de l'agriculteur ou de ces voisins).

Sur l'ensemble des essais, les tests de comparaisons multiples de moyennes indiquent que :

- Le cue-lure est toujours très significativement attractif pour les mâles alors qu'il n'est jamais différent du témoin en pour l'attraction des femelles
- C1-C10 n'est pas significativement attractif pour les quantités utilisées
- le mélange C1-C2 a toujours été toujours significativement attractif pour les femelles pour des quantités supérieures ou égales à 27 mg et cela jusqu'à 112 mg quantité maximale que nous avons testées
- Le mélange C1 +C2 a été significativement attractif pour les mâles dans trois des essais sur cinq
- En milieu semi-contrôlé ce sont les modalités C1+C2 à 0.56 mg et C1-C10 à 2.4 mg qui étaient les plus attractives. Les résultats obtenus ici montrent qu'au champ elles ne le sont pas.

b/Piégeage d'autres tephritidae

Des captures anecdotiques sont observées pour les espèces *D. ciliatus*, *B. zonata* et *C. quilicii*. Des captures plus nombreuses sont observées pour l'espèce *N. cyanescens*, mais cela quelle que soit la modalité et le sexe considérés, ceci révélant probablement une attraction visuelle (couleur et forme) du dispositif de piégeage). Dans le cas de l'espèce *D. demmerezi*, les analyses des modèles linéaires généralisés par ANOVA indiquent que sur l'ensemble des cinq essais, il existe un effet très significatif des modalités et des parcelles sur les nombres de captures. De manière générale, ce sont les nombres moyens de captures correspondant aux modalités C1+C2 avec les quantités les plus hautes qui sont significativement supérieurs au témoin. Le mélange C1+C2 avec les quantités les plus élevées est attractif vis-à-vis des mâles *Z. cucurbitae* (**Tableau 6**) et vis-à-vis des mâles et des femelles de l'espèce *D. demmerezi*. Le mélange C1+C2 n'attire donc pas uniquement les femelles *Z. cucurbitae*.

A1-T2 : Conclusions et perspectives

Conclusions

- I/ Le dispositif Tephri-Trap contenant de l'eau additionnée de Teepol et des kairomones C1+ C2 intégrés dans les polymères piègent significativement les femelles de *Z. cucurbitae* pour des quantités supérieures ou égales à 27 mg. Nous disposons donc d'un dispositif de piégeage efficace**
- II/ Le dispositif attire également avec les plus fortes quantités de C1+ C2 les femelles de *D. demmerezi* une autre mouche des fruits ravageurs des cucurbitacées et des mâles de *Z. cucurbitae***
- II/On ne retrouve pas au champ les mêmes résultats qu'en condition semi contrôlée en grande cage au laboratoire avec les olfactomètres une voie**

Tableau 7. Insectes utilisés dans les essais biologiques.

Espèce	Nom commun	Ordre	Famille	Stade	Nb. insectes par traitement	Suspension (conidie.mL ⁻¹)
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Mouche orientale des fruits	Diptera	Tephritidae	Adulte	90	10 ⁶
<i>Bactrocera zonata</i>	Mouche des fruits de pêche	Diptera	Tephritidae	Adulte	90	10 ⁶
<i>Ceratitis capitata</i>	Mouche méditerranéenne de fruits	Diptera	Tephritidae	Adulte	90	10 ⁶
<i>Ceratitis catoirii</i>	Mouche des fruits des Mascariènes	Diptera	Tephritidae	Adulte	90	10 ⁶
<i>Dacus demmerezi</i>	Mouche des cucurbitacées de l'Océan Indien	Diptera	Tephritidae	Adulte	90	10 ⁶
<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	Mouche du melon	Diptera	Tephritidae	Adulte	150	10 ⁶
<i>Alphitobius diaperinus</i>	Petit ténébrion	Coleoptera	Tenebrionidae	Larve	90	10 ⁸
<i>Hoplochelus marginalis</i>	Ver blanc de la canne à sucre	Coleoptera	Scarabaeidae	Larve (3eme stade)	90	10 ⁸
<i>Galleria mellonella</i>	Fausse teigne des ruches	Lepidoptera	Pyralidae	Larve	390	10 ⁶ and 10 ⁸

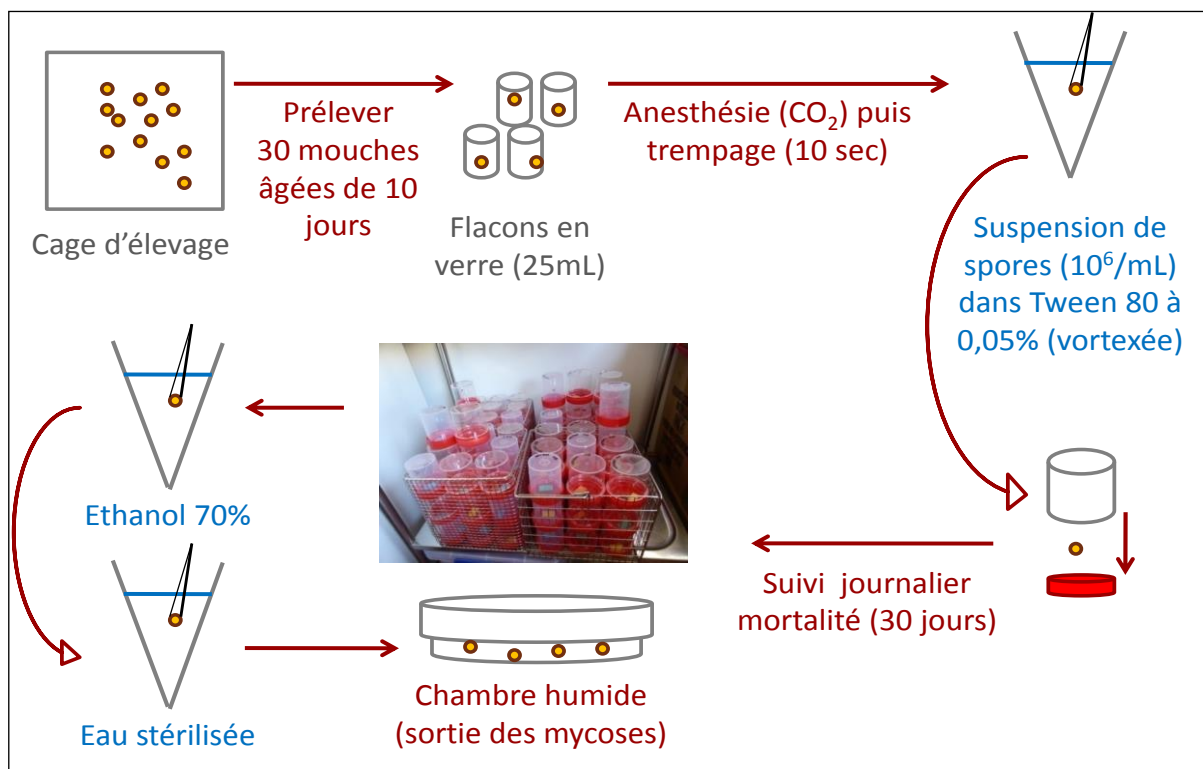


Figure 6 : Représentation schématique du dispositif expérimental utilisée pour évaluer les pouvoirs pathogènes des souches de *Beauveria* sur les mouches de fruits

Perspectives:

Les résultats sont encourageants et les perspectives sont nombreuses :

- Nous devrions définir la quantité de composés présente dans les pièges pour obtenir une attractivité maximale vis-à-vis des femelles *Z. cucurbitae*, notamment pour le mélange C1-C10, qui a révélé un fort potentiel en grande cage mais que nous n'avons pu évaluer en plein champ.
- Le dispositif Tephri-Trap contenant de l'eau additionnée de « Teepol » est efficace mais peu pratique à mettre en œuvre au champ. Les pièges « Ceratipack » et « Decistrap » ont tous les deux des couvercles imprégnés de deltaméthrine. Ces deux pièges sont homologués pour le piégeage d'espèces de Tephritidae appartenant au genre *Ceratitis*. Leur usage faciliterait la mise en place de la lutte. Nous avons réalisé des essais préliminaires en grandes cage et en plein champ, mais pour l'instant ces essais étaient peu concluants et nous laisse imaginer que les populations de *Z. cucurbitae* pourraient avoir développé des résistances à la deltaméthrine.
- Il faudra évaluer la durée d'efficacité au-delà de laquelle les lanières polymériques ne sont plus attractives est un autre enjeu. Pour cela, nous pourrions comparer le nombre de captures obtenues pour des lanières qui ne sont pas renouvelées pendant 1 à 3 mois avec le nombre de captures obtenues pour un renouvellement hebdomadaire des lanières.
- Dans la perspective d'une homologation, il sera nécessaire de faire un point bibliographique approfondi sur la toxicologie et les impacts environnementaux associés à ces composés et étendre l'évaluation de la sélectivité du dispositif de piégeage à des espèces non cibles appartenant à d'autres familles d'insectes.

Enfin dernier point qui faisait l'objet de l'Action 3 et que nous n'avons pu réaliser du fait du stade d'avancement du projet : évaluer l'efficacité du dispositif de piégeage en terme de protection des cultures. Pour cela, il faudrait comparer les dégâts sur cultures observés sur des parcelles non traitées avec pièges à ceux observés sur des parcelles non traitées sans piège. Dans un second temps, il faudra évaluer le nombre de pièges nécessaires par unité de surface pour obtenir une protection maximale de la culture.

Action 2 : Mise au point d'une méthode d'auto-dissémination de spores de Beauveria

L'objectif est de mettre au point une méthode d'auto-dissémination qui permette d'attirer les mâles grâce à une paraphéromone (cue-lure), de les contaminer par des spores d'un champignon entomopathogène (*Beauveria*), ces mâles deviendraient alors disséminateurs du champignon pour contaminer les femelles par transfert horizontal des spores lors de l'accouplement.

Action 2 – tâche 1 : Criblage des souches de Beauveria sp.

A2-T1 : objectifs

Les tests de pathogénicité ont pour objectif de déterminer la souche présentant le meilleur potentiel pour être utilisée dans un système d'auto-dissémination des spores au champ. La souche du champignon entomopathogène ne doit pas tuer trop rapidement les insectes mâles pour qu'ils aient le temps d'aller contaminer les femelles à l'accouplement, mais doit tuer suffisamment rapidement les femelles pour limiter le dépôt des œufs. Il s'agit de tester et comparer le pouvoir pathogène des souches de *Beauveria* Betel, I-2960 et I-2961 (NPP111B005) en laboratoire sur des adultes de *Z. cucurbitae* par trempage dans une suspension de conidies 1×10^6 spores/mL. Par ailleurs, huit autres espèces d'insectes ravageurs ont été incluses dans ces tests de pathogénicités, afin de préciser le spectre d'hôtes des souches de *Beauveria* commerciales utilisées et envisager des extensions de leurs usages.

A2-T1 : matériel et méthodes

a/Tests de pathogénicité des souches de Beauveria sur Z. cucurbitae et huit autres insectes

Le pouvoir pathogène des trois souches de *Beauveria* spp. a été évalué sur neuf espèces d'insectes appartenant à trois ordres : diptère, coléoptère et lépidoptère (**Tableau 7**). Les tests ont été effectués sur : i/ des adultes de six mouches (diptères) des fruits la mouche du melon : *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett), mais aussi la mouche méditerranéenne des fruits : *Ceratitis capitata* (Wiedemann) ravageur également présent en métropole, la mouche orientale des fruits, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), une espèce très envahissante introduite récemment à la Réunion mais non détectée à la Réunion au moment de l'étude, la

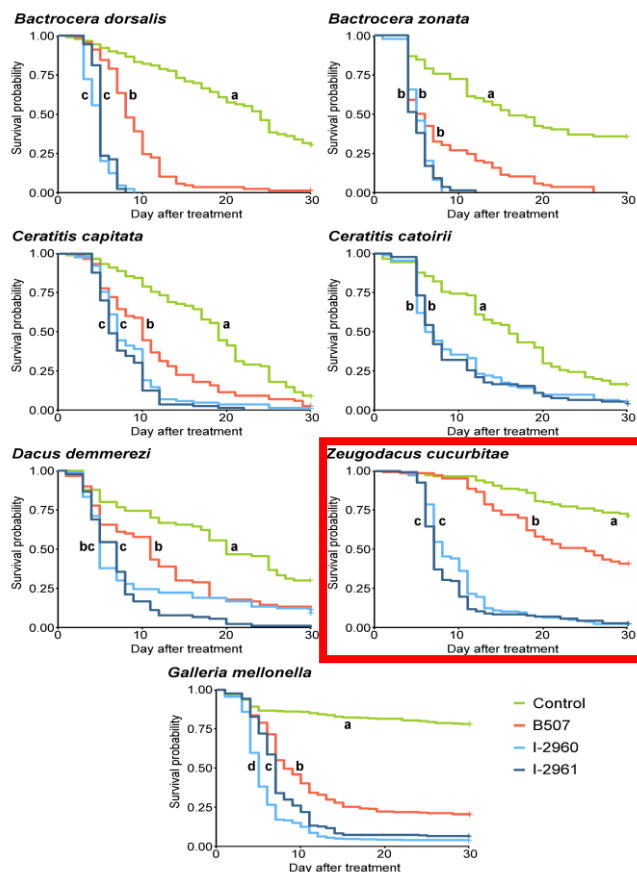
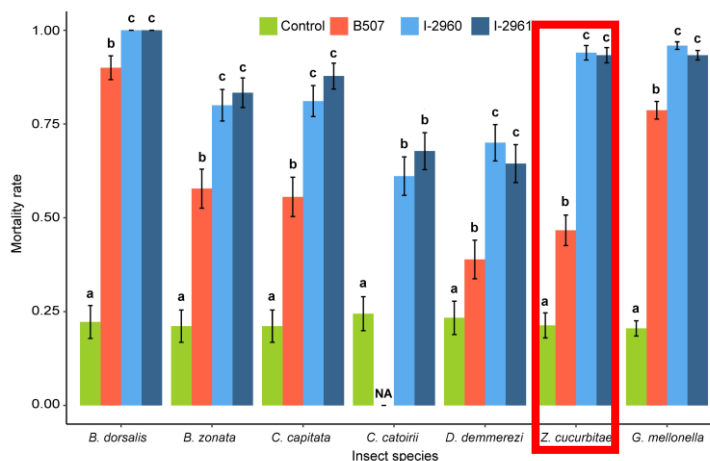


Figure 7 Courbes de survie de Kaplan-Meier pour six espèces de mouches des fruits et *G. mellonella* traitées avec la souche B507 de *B. hoplocheli* et les souches I-2960 et I-2961 de *B. bassiana* en utilisant des suspensions à 10^6 conidies.mL⁻¹. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements au sein d'une espèce d'insecte (test du log-rank, $P < 0,05$ après correction de Sidak).

Figure 8. Taux de mortalité de six espèces de mouches des fruits et de *G. mellonella* traitées avec la souche B507 de *B. hoplocheli*, et les souches I-2960 et I-2961 de *B. bassiana* en utilisant des suspensions à 10^6 de conidies.mL⁻¹. Les données présentées sont des moyennes \pm SEM, de trois répétition de 30 insectes pour chaque traitement et chaque espèce. Les taux de mortalité ont été calculés au moment où le taux de mortalité du témoin a atteint 0,2. Pour chaque espèce d'insecte, un modèle linéaire généralisé a été ajusté et les différences entre les traitements ont été testées deux à deux en utilisant un test de rapport de vraisemblance. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements ($P < 0,05$).



Insecte	Temps de survie moyen (Moyenne \pm erreur standard)			
	Témoin	B507	I-2960	I-2961
10^6 conidies.mL⁻¹				
<i>Bactrocera dorsalis</i>	21.0 \pm 1.0	9.1 \pm 0.5	4.7 \pm 0.2	5.2 \pm 0.1
<i>Bactrocera zonata</i>	17.9 \pm 1.1	8.1 \pm 0.6	5.3 \pm 0.2	5.2 \pm 0.2
<i>Ceratitis capitata</i>	18.2 \pm 0.8	11.4 \pm 0.7	8.5 \pm 0.5	7.6 \pm 0.4
<i>Ceratitis catoirii</i>	16.6 \pm 0.9	NA	10.1 \pm 0.8	9.8 \pm 0.7
<i>Dacus demmerezi</i>	19.0 \pm 1.1	12.6 \pm 0.9	9.6 \pm 1.0	7.3 \pm 0.5
<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	26.5 \pm 0.6	22.2 \pm 0.7	9.9 \pm 0.4	8.9 \pm 0.4
<i>Galleria mellonella</i>	25.4 \pm 0.5	12.8 \pm 0.6	6.5 \pm 0.3	8.7 \pm 0.3
10^8 conidies.mL⁻¹				
<i>Alphitobius diaperinus</i>	26.7 \pm 0.7	24.5 \pm 0.9	22.3 \pm 0.9	21.5 \pm 0.9
<i>Hoplochelus marginalis</i>	27.8 \pm 0.7	16.9 \pm 0.9	28.1 \pm 0.7	26.4 \pm 0.8
<i>Galleria mellonella</i>	26.3 \pm 0.8	5.4 \pm 0.3	5.0 \pm 0.2	4.8 \pm 0.3

Tableau 8 : Courbes de survie de Kaplan-Meier pour six espèces de mouches des fruits et *G. mellonella* traitées avec la souche B507 de *B. hoplocheli* et les souches I-2960 et I-2961 de *B. bassiana* en utilisant des suspensions

mouche des fruits de la pêche, *Bactrocera zonata* (Saunders), une autre espèce de mouches des fruits invasive, la mouche des fruits des Mascareignes, *C. catairii* (Guérin-Méneville), et la mouche des cucurbitacées de l'Océan Indien : *Dacus demmerezi* (Bezzi). ii/ Les larves de « ver blanc » *H. marginalis* (Fairmaire) ravageur de la canne à sucre à la Réunion et de petits ténébrions, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) peste mondiale des poulaillers, pour les coléoptères. iii/ Des larves de fausse teigne des ruches *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptères)

Les tests de pathogénicité ont été effectués sur deux espèces d'insectes à la fois, en utilisant *G. mellonella* dans tous les essais. Chaque test comparait quatre modalités: les trois souches de *Beauveria* B507, I-2960 et I-2961 et un témoin non traité. Chaque modalité a été réalisée sur 30 insectes. La souche B507 n'a pas été testée sur *C. catairii*. Chaque essai biologique a été répété trois fois. Les expériences ont été menées de mai 2015 à août 2016 dans le laboratoire du Cirad (Réunion). *B. dorsalis* n'étant pas présent à la Réunion au moment de l'étude, des essais biologiques sur cette espèce ont été effectués dans le laboratoire INRAPE (Comores).

La contamination des insectes a été réalisée en les trempant dans une suspension de conidies pendant 10 secondes (**Figure 6**). Les mouches des fruits adultes ont été anesthésiées avec du CO₂ avant le traitement et trempées dans une suspension à 10⁶ conidies mL⁻¹. Des tests préliminaires ont montré que, avec 10⁶ conidies.mL⁻¹, la mortalité des larves de *A. diaperinus* et *H. marginalis* ne différait pas du témoin pour toutes les souches testées. Par conséquent, les insectes ont été traités avec des suspensions à 10⁸ conidies.mL⁻¹. Après traitement, tous les insectes ont été isolés dans des dispositifs d'élevage nourrissage individuel. La mortalité des insectes a été enregistrée quotidiennement pendant 30 jours pour les mouches des fruits et tous les deux jours pour les autres espèces. Les cadavres ont été stérilisés et placés en chambre humide. Le développement de la mycose a été vérifié à 10 jours.

b/ Analyse des données

La première analyse a pour but de comparer l'effet des traitements sur deux variables utilisées pour estimer la virulence: le taux de mortalité et le taux de mycose. Le dispositif expérimental, nous a permis de comparer quatre traitements sur deux espèces d'insectes dans chaque essai biologique. La présence de *G. mellonella* dans chaque test a permis d'estimer l'effet test comme un effet fixe et le dispositif a donc été analysé comme un plan factoriel classique. Les suspensions de spores ayant été utilisées à des concentrations de 10⁶ ou 10⁸ conidies.mL⁻¹, nous avons effectué des analyses séparées pour chacune des deux doses. Nous avons effectué l'analyse avec un modèle linéaire généralisé utilisant une distribution binomiale et une transformation logit (procédure SAS GLIMMIX). Les insectes utilisés dans les expériences avaient une durée de vie et des stades de développement différents (adultes ou larves). Par conséquent, la durée moyenne de survie des insectes témoins variait selon les espèces d'insectes. Afin de tenir compte de ce facteur et de s'assurer que les taux de mortalité ne sont pas trop élevés dans les contrôles, nous avons analysé les taux de mortalité des mouches traitées lorsque le taux de mortalité du groupe témoin a atteint 0,2. L'interaction entre espèces d'insectes et traitements était significative (P<0,05) pour les deux suspensions à 10⁶ et 10⁸ conidies.mL⁻¹. En conséquence, nous avons effectué les comparaisons entre traitements pour chaque espèce d'insecte séparément. Nous avons utilisé un modèle linéaire généralisé avec une distribution binomiale (procédure SAS GENMOD).

La seconde analyse a porté sur les courbes de survie. Nous avons utilisé l'estimateur de Kaplan-Meier (procédure SAS LIFETEST), une statistique non paramétrique, pour comparer les effets des trois souches de *Beauveria* sur la survie des insectes au sein d'une espèce. Un test de log-rank a été réalisé pour détecter les différences significatives entre les traitements. La virulence des souches a été estimée par la durée de survie moyenne (procédure SAS LIFETEST).

A2-T1 : Résultats

L'analyse des taux de mortalité révèle que les effets traitement (F=36,76; DF=3,81 ; P<0,0001), espèce d'insectes (F=8,62 ; DF=5,81) ; P<0,0001), ainsi que l'interaction espèce d'insecte x traitement (F=3,55 ; DF=17,81; P<0,0001) étaient très significatifs pour les six espèces de mouches des fruits et *G. mellonella* traitées avec 10⁶ conidies.mL⁻¹. L'analyse des taux de mortalité a également révélé que les effets traitement (F = 53,28 ; DF =3,25 ; P<0,0001), espèce (F=45,69 ; DF=2,25 ; P<0,0001) et l'interaction espèces d'insectes x traitement (F=29 ; D F= 6,25 ; P<0,0001) étaient hautement significatifs pour *H. marginalis*, *A. diaperinus* et *G. mellonella* traitées 10⁸ conidies.mL⁻¹. L'interaction hautement significative entre les espèces d'insectes et

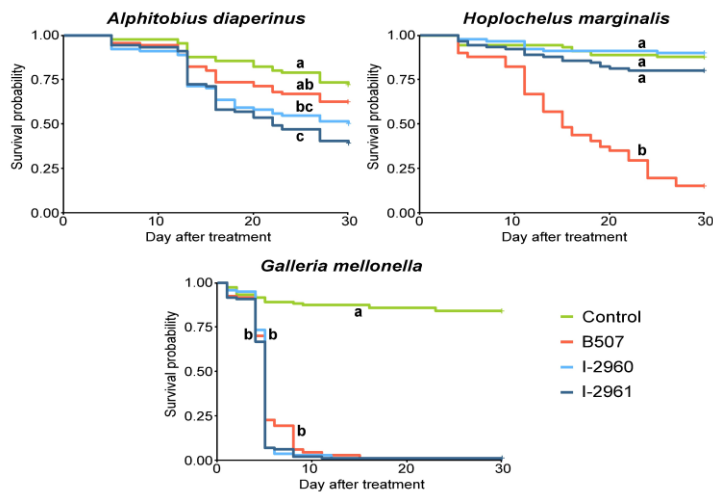


Figure 9. Courbes de survie de Kaplan-Meier pour *A. diaperinus*, *H. marginalis* et *G. mellonella* traitées avec la souche B507 de *B. hoplocheli* et les souches I-2960 et I-2961 de *B. bassiana* en utilisant des suspensions à 10^8 conidies.mL⁻¹. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements au sein d'une espèce d'insecte (test du log-rank, $P < 0,05$ après correction de Sidak). Les croix indiquent les données censurées.

Figure 10. Taux de mortalité d'*A. diaperinus*, *H. marginalis* et *G. mellonella* traités avec la souche B507 de *B. hoplocheli*, et les souches I-2960 et I-2961 de *B. bassiana* à l'aide de suspensions à 10^8 conidies.mL⁻¹. Les données présentées sont des moyennes \pm SEM, de trois répétitions de 30 insectes pour chaque traitement et chaque espèce. Les taux de mortalité ont été calculés au moment où le taux de mortalité du témoin a atteint 0,2. Pour chaque espèce d'insecte, un modèle linéaire généralisé a été ajusté et différences entre les traitements ont été testées deux à deux en utilisant un test de rapport de vraisemblance. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements ($P < 0,05$).

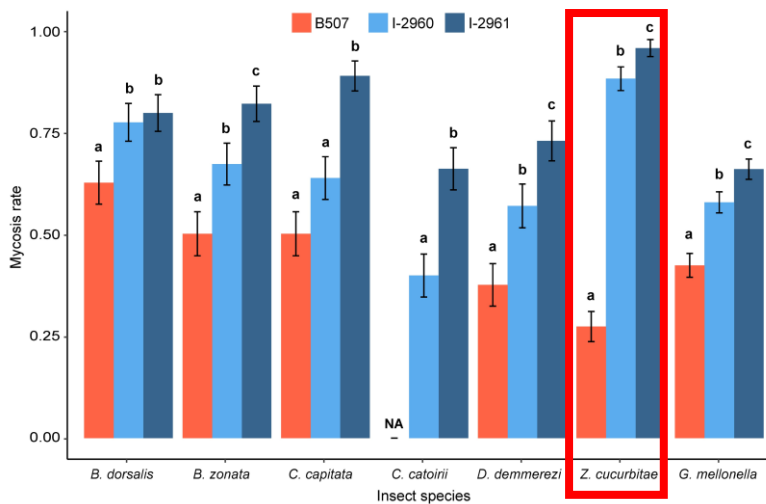
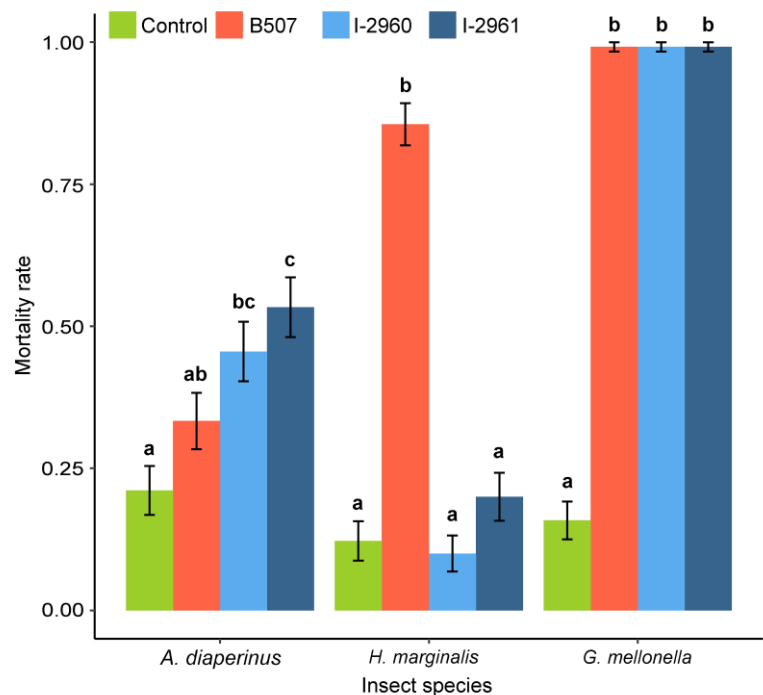


Figure 11. Taux de mycose de six espèces de mouches des fruits et de *Galleria mellonella* traitées avec la souche de *Beauveria hoplocheli* B507 et les souches de *Beauveria bassiana* I-2760 et I-2761 en utilisant des suspensions à 10^6 conidies.mL⁻¹. Les données présentées sont des moyennes \pm SEM, de trois répétitions de 30 insectes pour chaque traitement et chaque espèce. Les taux de mycose ont été calculés en utilisant le pourcentage de cadavres présentant une croissance fongique externe par rapport au nombre total d'insectes testés. Pour chaque espèce d'insecte, un modèle linéaire généralisé a été ajusté et deux différences entre les traitements ont été testées en utilisant un test de rapport de vraisemblance. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements ($P < 0,05$).

le traitement montre que les différences entre les traitements dépendent des espèces d'insectes. Par conséquent, pour comparer les traitements, le taux de mortalité et la survie des insectes ont été analysés indépendamment pour chaque espèce.

Les trois souches de *Beauveria* utilisées à 10^6 conidies.mL⁻¹ sont pathogènes pour toutes les espèces de mouches des fruits testées et pour les larves de *G. mellonella*, comme le montrent les courbes de mortalité et de survie de Kaplan-Meier, qui diffèrent significativement des témoins quelques soient la souche de *Beauveria* utilisée (**Figures 7 et 8**). Le taux de mortalité et l'analyse de survie de Kaplan-Meier révèlent des différences de virulence entre les souches de *Beauveria*. Les souches *B. bassiana* I-2960 et I-2961 étaient significativement plus virulentes que la souche B507 de *B. hoplocheli* pour toutes les mouches des fruits testées en se basant sur les courbes de survie de Kaplan-Meier (sauf *B. zonata*) et les taux de mortalité (**Figures 7 et 8**). Ce résultat est également illustré par les durées moyennes de survie estimées à partir de l'analyse de survie de Kaplan-Meier (**Tableau 8**). Les souches I-2960 et I-2961 présentent une virulence très similaire sur les différentes mouches des fruits (**Figure 7, 8 et Tableau 8**). Le taux de mortalité et les courbes de survie de Kaplan-Meier de *G. mellonella* traitée avec 10^6 conidies.mL⁻¹ montrent que B507 est significativement moins virulente que les souches de *B. bassiana* (**figures 7 et 8**). L'analyse de survie de Kaplan-Meier montre que I-2961 est significativement moins virulente que I-2960 à 10^6 conidies.mL⁻¹ (**Figure 7**).

Les trois souches ont présenté un niveau élevé de virulence similaire sur *G. mellonella* à 10^8 conidies.mL⁻¹ (**Figure 9, 10 et Tableau 3**). La souche B507 de *B. hoplocheli* était la seule souche pathogène de *H. marginalis* à la dose testée de 10^8 conidies.mL⁻¹. Le taux de mortalité et les courbes de survie de Kaplan-Meier des larves d'*H. marginalis* traitées avec les deux souches de *B. bassiana* n'étaient pas significativement différentes de celles du témoin (**Figures 9 et 10**). Les deux souches de *B. bassiana* étaient pathogènes pour les larves d'*A. diaperinus*, entraînant des taux de mortalité et des courbes de survie de Kaplan-Meier significativement différentes de celles du témoin (**Figures 9 et 10**). Lorsque les larves d'*A. diaperinus* ont été traitées avec la souche B507, le taux de mortalité et la courbe de survie de Kaplan-Meier n'étaient pas significativement différents de ceux du groupe témoin (**Figures 9 et 10**).

L'analyse du taux de mycose révèle que les traitements ($F=31,60$; $DF=2,55$; $P<0,0001$) et l'interaction insectes x traitement ($F=2,08$; $DF=1,55$; $P=0,038$) ont un effet significatif pour les six espèces de mouches des fruits et *G. mellonella* traitées avec 10^6 conidies.mL⁻¹, tandis que l'effet espèces d'insectes n'est pas significatif ($F=0,66$; $DF=5,55$; $P=0,66$). Aucune mycose n'a été enregistrée chez les insectes témoins. Le taux de mycose induit par la souche B507 de *B. hoplocheli* était significativement inférieur aux taux induits par les deux souches de *B. bassiana* pour quatre mouches des fruits testées et pour *G. mellonella* (**Figure 11**). La souche I-2961 de *B. bassiana* a induit des taux de mycose significativement plus élevés que la souche I-2960 pour toutes les mouches des fruits testées (sauf *B. dorsalis*) et *G. mellonella*, bien que les taux de mortalité soient similaires. Dans le cas de *H. marginalis*, la souche de *B. hoplocheli* a provoqué un taux de mycose de $0,27 \pm 0,05$ pour un taux de mortalité de $0,86 \pm 0,04$. Aucune des larves blanches mortes après le traitement avec la souche I-2960 n'a développé de croissance fongique externe. Pour la souche I-2961, le taux de mycose était de $0,04 \pm 0,02$, ce qui était significativement différent du contrôle ($\chi^2=5,66$; $DF=1$; $P=0,0174$). Aucune mycose n'a été observée chez les larves d'*A. diaperinus*, quelle que soit la souche de *Beauveria* considérée.

Conclusions 1 :

-Les trois souches sont pathogènes pour toutes les espèces de diptères et de lépidoptères testées. Dans le cas des coléoptères, seule la souche de *B. hoplocheli* est pathogène pour le ver blanc *Hoplochelus marginalis* et seules les souches de *B. bassiana* sont pathogènes pour *Alphitobius diaperinus*

- ➔ **Des extensions d'usages peuvent être envisagées pour les trois souches de *Beauveria***
- ➔ **Il existe des différences de spécificité, leur spectre est néanmoins large, les effets non intentionnels sont à prendre en compte**

Conclusions 2 :

-Toutes les souches sont pathogènes pour *Z. cucurbitae*

-Les trois souches diffèrent entre elles en termes de virulence :

- ➔ **pathogénicité des souches de *Beauveria* sur *Z. cucurbitae*: I-2961 (NPP111B005) > I-2960 > Betel**

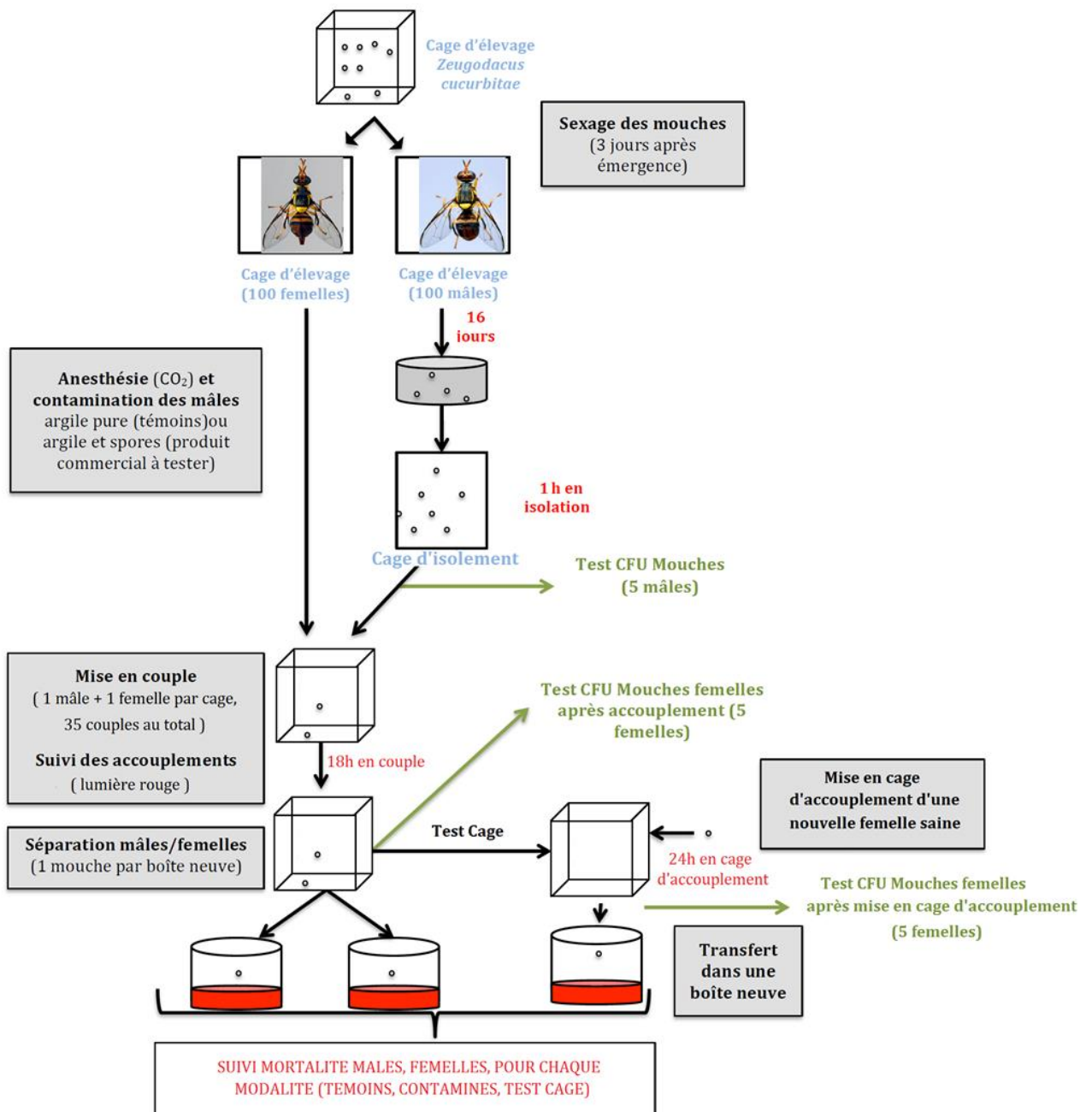


Figure 12: Représentation schématique du protocole d'évaluation de la capacité de transfert des spores de la souche i-2961 (NPP111B005) des mâles aux femelles lors de l'accouplement

La souche I-2961 (NPP111B005) ayant été isolée en zone tropicale et présentant un pouvoir pathogène supérieur à celui de la souche I-2960 et bien supérieur à la souche Betel®, cette souche a été retenue pour les expérimentations ultérieures

Action 2 – tâche 2 : Etude au laboratoire de la capacité de transfert horizontal des spores de *Beauveria* spp. lors de l'accouplement

A2-T2 : objectif

L'objectif est d'évaluer, pour la souche de *Beauveria* I-2961 (NPP111B005), la possibilité du transfert des spores du mâle vers la femelle lors de l'accouplement, en déterminant le pourcentage de mortalité et la LT50 des femelles après accouplement. Le principe général de l'expérimentation est décrit **Figure 12**

A2-T2 : matériel et méthode

a/ La souche de *Beauveria*

La souche I-2961 de *B. bassiana* a été fournie par Arysta LifeScience. Les conidies formulées sur des microgranules de montmorillonite ont été maintenues à -20°C après leur arrivée et sorties à température ambiante une heure avant chaque expérience. La quantité de conidies et la viabilité dans le produit formulé ont été contrôlées par mise en suspension puis étalement sur milieu PDA.

b/Insectes

Les mouches du melon *Z. cucurbitae* ont été élevées sur des courgettes au laboratoire. Les mouches ont été séparées selon leur sexe trois jours après émergence afin de s'assurer qu'elles ne se soient pas accouplées avant les expérimentations. Les mouches utilisées pour les tests de transmission horizontale avaient 16 ± 3 jours et étaient sexuellement matures.

c/ Quantification des conidies transportables par les mouches mâles

Une expérience a été réalisée pour estimer la quantité de conidies de *B. bassiana* captées par mouche mâle lors de sa contamination et son évolution dans le temps. Soixante mâles ont été anesthésiés au CO₂ et placés par groupes de cinq dans une boîte de Pétri contenant 5 g de conidies de *B. bassiana* formulées. Les mouches ont été agitées doucement pendant cinq secondes puis transférées dans une cage en plexiglas de 30 x 30 x 60 cm. Dix mouches ont été immédiatement recueillies dans la cage, anesthésiées pendant 5 minutes à -20°C et placées individuellement dans un tube Eppendorf de 2 mL contenant 1 mL de solution TWEEN® 80 à 0,05%. Le tube a été vortexé pendant trois minutes pour déloger les conidies de l'insecte. Le nombre de conidies a été estimé par étalement sur milieu PDA. Le processus a été répété 2, 4, 8 et 24 h après la contamination. Une répétition de l'expérience a été réalisée, avec une mesure supplémentaire 1 h après la contamination.

d/Tests de transmission horizontale de spores

Accouplement en grandes boîtes une heure après la contamination des mâles

Vingt-cinq mouches mâles ont été contaminées comme décrit ci-dessus (c). Quinze mouches mâles témoins ont été exposées à des microgranules de montmorillonite sans conidies. Les mouches mâles sont restées isolées pendant une heure pour imiter le temps passé à trouver une femelle. Cinq mouches ont été utilisées pour quantifier les conidies comme décrit ci-dessus (c). Après le temps d'isolement, chacun des 20 mâles restants a été mis individuellement en présence d'une unique femelle vierge dans une grande cage (30 x 30 x 30 cm). Comme l'accouplement chez *Z. cucurbitae* a lieu au crépuscule et peut durer jusqu'à 10 heures, les couples ont été formés autour de 16h et maintenus pendant 18 heures. Les mouches ont été observées toutes les 15 minutes entre 16h30 et 18h30 pour enregistrer l'accouplement. A l'issue des 18 h, cinq femelles ont été échantillonnées pour la quantification des conidies et les autres ont été placées séparément dans des récipients en plastique de 125 mL contenant de la nourriture et de l'eau. Ensuite, une femelle «saine» a été placée dans chaque cage d'accouplement pendant 24 h pour contrôler une éventuelle contamination de la cage par les conidies laissées par le mâle contaminé. Après 24 h, cinq de ces femelles ont été échantillonnées pour la quantification des conidies et les autres ont été placées dans un récipient en plastique propre de 125 mL. Les mouches ont été nourries trois fois par semaine. La mortalité des insectes a été enregistrée

Table 9. Nombre de conidies récupérées par mâles de *Z. cucurbitae* après contamination par la formulation de *B. bassiana*

Temps après contamination (h)	Nbre de conidies/mouches (moyenne ± ESM)	
0	$2.2 \times 10^6 \pm 2.6 \times 10^5$	a
1	$1.3 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^5$	b
2	$4.8 \times 10^5 \pm 8.8 \times 10^4$	c
4	$3.8 \times 10^5 \pm 5.3 \times 10^4$	cd
8	$2.8 \times 10^5 \pm 7.8 \times 10^4$	d
24	$9.1 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^4$	e

Des lettres différentes indiquent des moyennes significativement différentes (GLMM, $P < 0.05$).

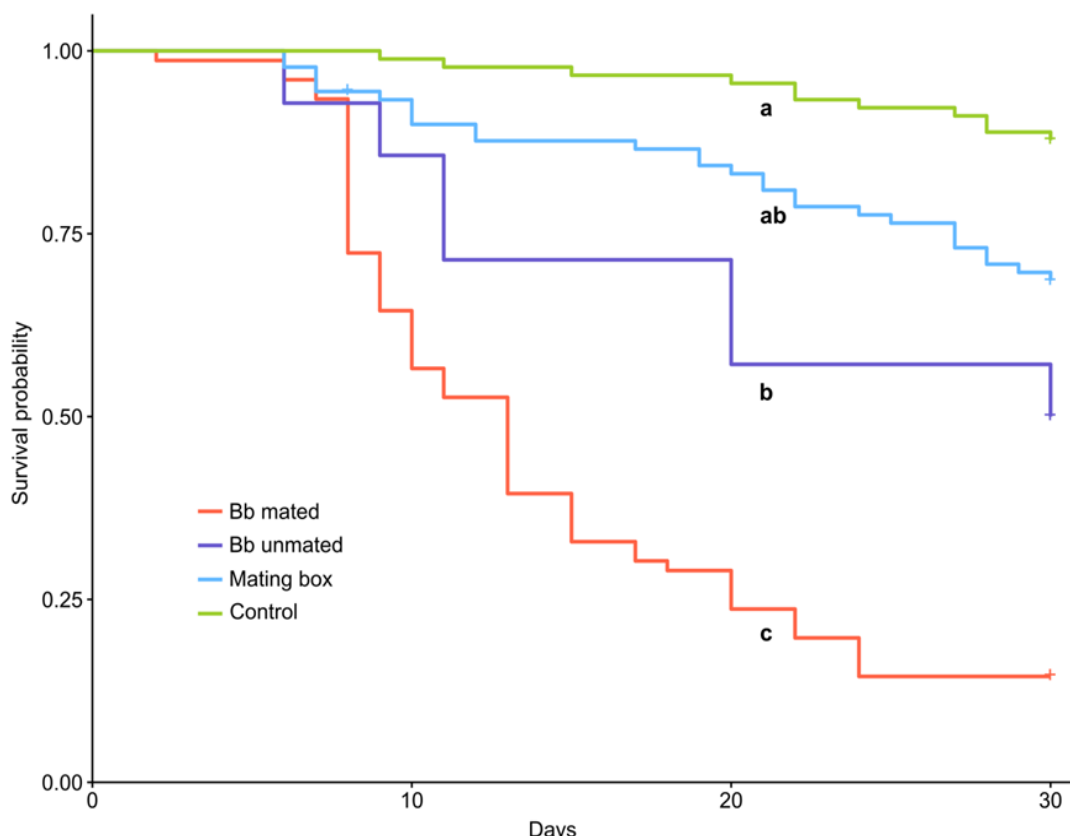


Figure 13. Courbes de survie de Kaplan-Meier pour les femelles de *Z. cucurbitae*. Les mouches mâles ont été contaminées par des conidies de *B. bassiana* puis isolées pendant une heure. Bb mated: femelles accouplées avec des mâles contaminés; Bb unmated: femelles en contact avec des mâles contaminés sans s'accoupler; Mating box: femelles placées dans la boîte d'accouplement après l'accouplement; Control: femelles en contact avec des mâles non contaminés. Différentes lettres indiquent des courbes significativement différentes (test du log-rank, $P < 0,05$ après la correction de Sidak). Les croix indiquent les données censurées.

quotidiennement pendant 30 jours. Les cadavres ont été stérilisés et placés en chambre humide. Le développement de la mycose a été vérifié à 10 jours. L'expérience entière a été répétée six fois.

Accouplement en petites boîtes 24 heures après la contamination des mâles

Pour évaluer la capacité des mâles à transmettre les conidies après un temps d'isolement plus long, nous avons effectué la même expérience, mais en isolant les mâles pendant 24 h après la contamination. Nous avons utilisé des récipients en plastique de 125 mL comme cage d'accouplement. Nous avons utilisé 30 couples pour chaque modalité (*Beauveria* et témoin non contaminé) et 30 femelles pour contrôler la contamination des conteneurs. L'expérimentation a été répétée trois fois.

Analyse des données

Les expériences de transmission horizontale ont comparé deux traitements pour les mouches mâles: contaminés et témoins; et quatre traitements pour les mouches femelles: les femelles qui se sont accouplées avec des mâles contaminés, les femelles en contact avec des mâles contaminés sans s'accoupler, les femelles placées seules pendant 24 h dans la cage d'accouplement, témoin. Nous avons utilisé l'analyse de survie de Kaplan-Meier (procédure SAS LIFETEST) pour étudier les effets de la contamination et de la transmission de *Beauveria* sur la survie des mouches. Un test de log-rank a été réalisé pour détecter les différences significatives entre les traitements. La correction de Sidak a été utilisée pour ajuster la valeur P pour comparaisons multiple deux à deux. Le temps de survie moyen a été calculé. Nous avons également analysé le taux de mortalité des mouches après 30 jours, ainsi que les taux de mycose et de reproduction en utilisant des modèles linéaires généralisés avec la procédure SAS GENMOD. Les modèles incluent les traitements et les répétitions en tant que facteurs fixes. La significativité des comparaisons de traitement deux à deux a été testée en utilisant un test de rapport de vraisemblance.

L'évolution de la quantité de conidies sur les mâles a été réalisée à cinq ou six temps après la contamination avec dix mouches individuelles et les mesures répétées (plusieurs plaques pour le comptage des CFU) pour chaque mouche. L'analyse a été analysée comme pour un dispositif en bloc incomplet, où chacune des deux répétitions est-elle même considérée comme un bloc incomplet. Les analyses ont été réalisées avec un modèle mixte linéaire généralisé utilisant une distribution binomiale négative et une transformation log (procédure SAS GLIMMIX). Le modèle inclut le temps comme facteur fixe alors que les tests et les mouches individuelles sont considérés comme des facteurs aléatoires.

A2-T2 : Résultats

a/Quantification des conidies portées par les mâles: la disponibilité des conidies diminue avec le temps

La quantité de conidies viables dans le produit formulé était de $1,51 \times 10^9 \pm 0,18 \times 10^9$ CFU g⁻¹. Le nombre de conidies récupérées par mouche mâle immédiatement après était de $2,2 \times 10^6 \pm 0,26 \times 10^6$. Le nombre de conidies diminue après contamination ($F_{5; 109} = 26,6$; $P < 0,0001$). Il est divisé par deux après 1 heure et par 24 après 24 heures (**Tableau 9**).

b/Tests de transmission horizontale de spores **Survie des mâles et accouplement**

Le nombre de conidies viables dans le produit formulé était de $1,68 \times 10^8 \pm 0,53 \times 10^8$ UFC g⁻¹ pour les essais de transmission où les mâles ont été isolés pendant une heure après la contamination, les mâles portaient alors en moyenne $6,6 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$ conidies après isolement. Le nombre de conidies viables dans le produit formulé était de $1,51 \times 10^9 \pm 0,18 \times 10^9$ UFC g⁻¹ pour les essais où mâles ont été isolés pendant 24 heures et les mâles portaient en moyenne de $2,4 \times 10^4 \pm 0,8 \times 10^4$ conidies après la période d'isolement.

Les mâles contaminés par *B. bassiana* sont tous morts et développé une mycose. Leur courbe de survie est significativement différente de celle du témoin, que ce soit pour les tests en grandes cages ($\chi^2=189,93$, $DF=1$, $P < 0,0001$) ou en petites boîtes ($\chi^2=152,79$, $DF=1$, $P < 0,0001$). Dans les expériences en grande cages, leur temps de survie moyen était de $6,2 \pm 0,04$ jours et de $5,5 \pm 0,3$ jours dans les petites boîtes tandis que les temps de survie moyens des mâles témoins dépassaient toujours 24 jours.

Dans ces conditions (test sans choix), la contamination des mâles n'a pas d'effet significatif sur le succès de l'accouplement, qu'ils aient été isolés pendant 1 h ($\chi^2 = 2,73$, $ddl = 1$, $P = 0,10$) ou 24 h ($\chi^2=0,32$, $ddl=1$, $P=0,57$) après contamination. Les taux d'accouplement moyens étaient de $0,88 \pm 0,02$ dans les grandes cages (1h) et de $0,66 \pm 0,04$ dans les petites boîtes (24h).

Tableau 10. Mortalité et survie des femelles de *Z. cucurbitae*.

Les mâles ont été contaminés avec les conidies de *B. bassiana* puis isolés durant une heure

Traitement	Taux de mortalité à 30 jours (moyenne ± ESM)		Temps moyen de survie (moyenne ± ESM) en jours
	Total	Mortes et mycosées	
Bb accouplées	0.86 ± 0.04 c	0.94 ± 0.03 c'	14.9 ± 0.9
	0.50 ± 0.13 b	0.86 ± 0.13 bc'	22.6 ± 2.7
Enceinte d'accouplement	0.31 ± 0.05 b	0.64 ± 0.09 b'	26.2 ± 0.8
Témoins	0.12 ± 0.03 a	0 ± 0.0 a'	29.0 ± 0.4

Bb accouplées : femelles accouplées avec un male contaminé; Bb non-accouplées : femelles non accouplées en contact avec un male contaminé; Enceinte d'accouplement : femelles saines placées seules pendant 24 h dans l'enceinte d'accouplement après les accouplements; Témoins : Femelles mises dans une enceinte d'accouplement avec un male sain. Different letters indicate significantly different means (GLM, P < 0.05). Temps moyen de survie calculer sur la base de l'analyse de Kaplan-Meier analysis et limitée à 30 jours.

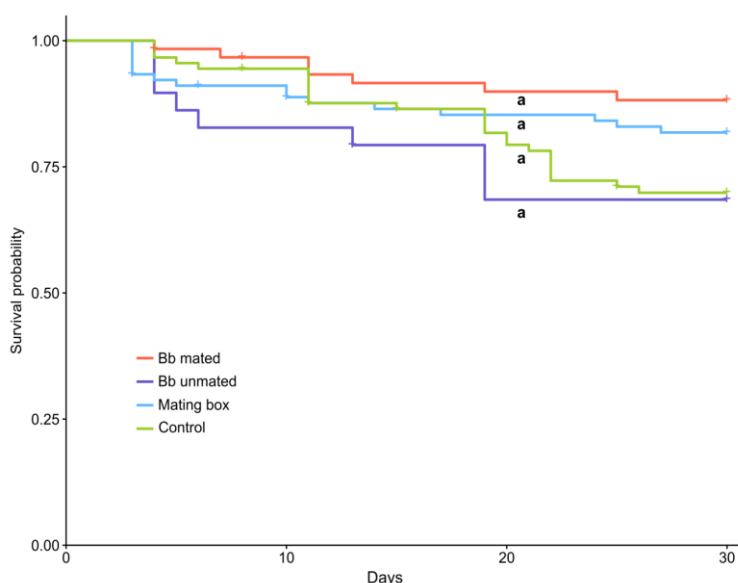


Figure 14. Courbes de survie de Kaplan-Meier pour les femelles de *Z. cucurbitae*. Les mouches mâles ont été contaminées par des conidies de *B. bassiana* puis isolées pendant 24 heures. Bb mated: femelles accouplées avec des mâles contaminés; Bb unmated: femelles en contact avec des mâles contaminés sans s'accoupler; Mating box: femelles placées dans la boîte d'accouplement après l'accouplement; Control: femelles en contact avec des mâles non contaminés. Différentes lettres indiquent des courbes significativement différentes (test du log-rank, P < 0,05 après la correction de Sidak). Les croix indiquent les données censurées.

Tableau 11. Mortalité et survie des femelles de *Z. cucurbitae*.

Les mâles ont été contaminés avec les conidies de *B. bassiana* puis isolés durant 24 heures

Traitement	Taux de mortalité à 30 jours (moyenne ± ESM)		Temps moyen de survie (moyenne ± ESM) en jours
	Total	Mortes et mycosées	
Bb accouplées	0.11 ± 0.04 b	0.43 ± 0.19	28.0 ± 0.8
	0.31 ± 0.09 a	0 ± 0.0	23.8 ± 1.9
Enceinte d'accouplement	0.18 ± 0.04 ab	0 ± 0.0	26.4 ± 0.9
Témoins	0.27 ± 0.05 a	0 ± 0.0	25.9 ± 0.8

Bb accouplées : femelles accouplées avec un male contaminé; Bb non-accouplées : femelles non accouplées en contact avec un male contaminé; Enceinte d'accouplement : femelles saines placées seules pendant 24 h dans l'enceinte d'accouplement après les accouplements; Témoins : Femelles mises dans une enceinte d'accouplement avec un male sain. Different letters indicate significantly different means (GLM, P < 0.05). Temps moyen de survie calculer sur la base de l'analyse de Kaplan-Meier analysis et limitée à 30 jours.

b/ Transmission des spores une heure après la contamination des mâles

L'accouplement n'a pas d'effet significatif sur les courbes de survie des femelles témoins ($\chi^2=0,06$, DF=1, P=0,80). L'analyse des femelles à 30 jours montre que le traitement a un effet significatif sur leur courbe de survie ($\chi^2=146,9$, DF=3, P<0,0001) et leur taux de mortalité ($\chi^2=122,7$, DF=3, P<0,0001). Les courbes de survie et les taux de mortalité des femelles accouplées et non-accouplées qui ont été en contact avec des mâles contaminés sont significativement différents de celles des témoins (**Figure 13, Tableau 10**). Parmi les femelles qui ont été en contact avec des mâles contaminés, les courbes de survie et les taux de mortalité des femelles accouplées étaient significativement différents de ceux des femelles non accouplées (**Figure 1, Tableau 10**). Les femelles accouplées avec un mâle contaminé ont un temps de survie moyen réduit de 14 jours par rapport aux témoins et de 7 jours par rapport aux femelles non accouplées qui ont été en contact avec un mâle contaminé (**Tableau 10**). Ces résultats démontrent qu'il y a eu transmission horizontale des conidies de *B. bassiana* des mâles aux femelles et que cette transmission est plus importante s'il y a accouplement. La courbe de survie des femelles « saines » placées dans les cages d'accouplement après l'accouplement n'est pas significativement différente de celle du témoin (**Figure 13**), mais lors de l'analyse des taux de mortalité, les deux modalités étaient significativement différentes (**Tableau 13**). Les femelles « saines » placées dans la boîte d'accouplement après l'accouplement ont été contaminées par les conidies de *B. bassiana* libérées par le mâle dans la boîte.

Sur les 30 mouches femelles utilisées pour quantifier la quantité de conidies qu'elles portent après contact avec un mâle contaminé, une seule ne s'est pas accouplée. Nous n'avons donc pas pu comparer le nombre de conidies présentes chez les femelles accouplées et non-accouplées. Les femelles qui se sont accouplées ou ont été en contact avec des mâles une heure après leur contamination portent en moyenne $1,4 \times 10^3 \pm 0,17 \times 10^3$ conidies, soit significativement plus que les mouches saines qui ont passées 24 h dans la boîte d'accouplement après les accouplements $2,9 \times 10^2 \pm 0,5 \times 10^2$ ($F_{1; 145} = 177,0$; P<0,0001).

Nous avons enregistré significativement plus de mycoses chez les cadavres de femelles qui se sont accouplées avec un mâle contaminé que chez les femelles utilisées pour contrôler la contamination des boîtes, mais aucune différence avec les femelles ayant été en contact avec un mâle contaminé sans s'accoupler (**tableau 2**).

c/ Transmission des spores 24 heures après la contamination des mâles

L'analyse de survie de Kaplan-Meier montre que lorsque les mâles sont isolés pendant 24 h avant d'être mis en contact avec des femelles, le traitement n'a pas d'effet significatif sur les courbes de survie des femelles ($\chi^2 = 7,2$, DF = 3; **Figure 14**). Les durées moyennes de survie des femelles sont de plus de 23 jours pour les quatre traitements (**Tableau 11**). Le traitement n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de mortalité ($\chi^2 = 7,0$, DF = 3, P = 0,07) (**Tableau 11**). Les femelles en contact avec des mâles contaminés portent en moyenne $4,5 \pm 1,7$ conidies par mouche.

Conclusions

-La contamination des mouches mâles par la souche I-2961 (NPP111B005) de *B. bassiana* tue 100% des individus qui développent une mycose en sept jours.

-Les mâles portent $1,3 \times 10^6 \pm 0,12 \times 10^6$ conidies une heure après leur contamination

-Les mâles isolés pendant une heure avant d'être mis en présence d'une femelle leur transmettent suffisamment de conidies pour réduire de manière significative leur temps de survie.

-Une transmission de spores a eu lieu, que les mouches se soient accouplées ou non, mais elle est significativement plus importante s'il y a accouplement.

-Les femelles accouplées ont un temps de survie moyen réduit de 14 jours par rapport aux témoins et de 7 jours par rapport aux femelles non accouplées qui étaient en contact avec des mâles contaminés.

-La quantité et la disponibilité des conidies chez les mâles diminuent rapidement avec le temps et aucune transmission horizontale n'a eu lieu après 24 heures d'isolement.

À l'aide d'un dispositif expérimental original, nous avons démontré que la transmission de spores des mâles aux femelles lors de l'accouplement augmente significativement la mortalité des femelles. Nous avons également détecté un biais expérimental causé par la contamination des cages d'accouplement par des mâles contaminés. Cette contamination « passive » a entraîné une augmentation significative de la mortalité chez les femelles introduites dans les cages contaminées. Cette contamination indésirable n'a jamais été prise en compte par des études antérieures de transmission horizontales.

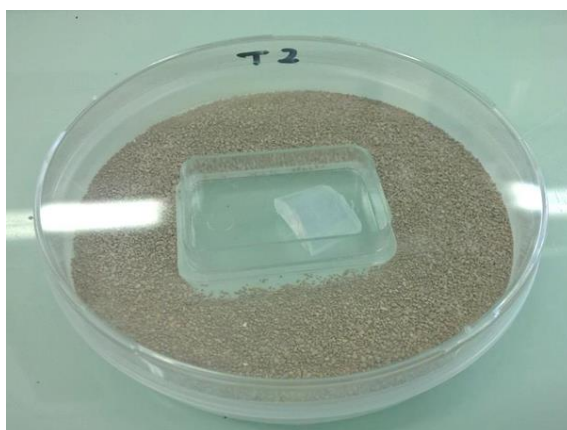


Figure 15 : Dispositif de test de compatibilité cue-lure / formulation (Photo : Damien Verger)



Figure 16 : Pièges Ceratipack (a) et Tephri-Trap© (b) modifiés

Tableau 12 : Modalités des facteurs testés pour l'évaluation du dispositif attract and contaminate individuel de *Z. cucurbitae*

N°	Sexe	Age	Contamination	Dispositif
Dispositif avec cue-lure	m	20 jours	-	Tephri-Trap modifié
Dispositif avec cue-lure et spores de NPP111B005	m	20 jours	NPP111B005	Tephri-Trap modifié
Poudrage avec spores de NPP111B005	m	20 jours	NPP111B005	Poudrage

Action 2 – tâche 3 : Mise au point du dispositif d'auto-dissémination

A2-T3 : objectif

Il s'agit de mettre au point en conditions contrôlée et semi contrôlée, un dispositif qui permette l'attraction des mâles de *Z. cucurbitae* par du cue-lure, leur contamination par les spores de *Beauveria* et leur redécollage pour leur permettre de s'accoupler.

A2-T3 : matériel et méthodes

a/ Test de compatibilité de la formulation du Beauveria et du Cue-lure

Le cue-lure (C-L; 4-(p-acetoxyphenyl)-2-butanone), est une paraphéromone utilisée comme attractif pour les mâles de la mouche du melon. Un morceau de bande de polymère chargé à 1% de cue-lure (produit par AB7 innovation) d'un centimètre (0,6 g) a été mis en milieu confiné en présence de la formulation contenant les spores de la souche I-2961 afin d'observer un éventuel effet du cue-lure sur la germination des spores du champignon. Un réceptacle rectangulaire (2,7 x 4 x 0,5 cm) a été fixé au fond d'une boîte de Pétri stérile, le morceau de polymère libérant le cue-lure y a été placé. Autour du réceptacle, 3 g du produit formulé contenant la souche I-2961 ont été déposés pour former une fine couche au fond de la boîte de Pétri (**Figure 15**). Cinq boîtes ont été réalisées par modalité, le même dispositif a été mis en place en présence d'une bande de polymère témoin. Les mesures de taux de germination ont été effectuées à J+0, J+3 et J+7, par étalement sur milieu PDA.

b/Dispositif de contamination

Les seuls dispositifs d'attraction des mouches de la famille des Tephritides disponibles sur le marché ont pour objectif le piégeage de celles-ci. Notre objectif étant l'auto-dissémination de spores, le dispositif doit permettre aux mouches de ressortir. Des modifications ont donc été apportées à deux types de piège : le Tephri-Trap et le Ceratipack. Des trous ont été percés dans le couvercle et une plateforme de couleur jaune a été placée dans le piège pour réduire l'espace intérieur (**Figure 16**).

c/Evaluation de la capacité de la sortie des mouches des dispositifs de contamination

Dans cette expérimentation, des lots de 20 mâles *Z. cucurbitae* vierges et âgés de 13,5 – 16,5 jours ont été endormis au CO₂ puis placés dans les pièges modifiés, le tout placé dans une cage de plexiglas.

Le nombre de mouches sorties du dispositif a été relevé toutes les heures pendant trois heures. Deux répétitions ont été réalisées pour chacun des deux dispositifs.

d/Evaluation du comportement des mouches en présence du dispositif de contamination contenant du cue lure

L'objectif de cette expérimentation était de vérifier que les mouches étaient capables de sortir du Tephri-Trap© modifié malgré la présence du cue-lure.

Le Tephri-Trap modifié a été placé dans une cage d'élevage (30 x 30 x 30cm) placée sous une sorbonne d'extraction. Après l'ajout d'un morceau de 500mg (soit la libération de 50mg de matière active par heure) de polymère imprégné de cue-lure dans le dispositif, un lot de 5 mâles *Z. cucurbitae* vierges et âgés de 13,5 – 16,5 jours a été endormi au CO₂ puis introduit dans ce dispositif. Les sorties, entrées des mouches dans le dispositif ainsi que leur comportement face au cue-lure ont été observés en continu pendant une heure, puis un relevé du nombre de mouches sorties a été effectué les deuxième, troisième, quatrième et septième heures après le début de l'expérimentation. Deux répétitions ont été réalisées.

e/Evaluation de la capacité de contamination des mouches mâles du dispositif de contamination contenant du cue lure :

1^{ER} TEST

Cette expérimentation utilise le piège modifié contenant un plateau sur lequel est disposé 5.7g du produit formulé contenant la souche I-2961 (NPP111B005) et d'un morceau de 190mg de polymère imprégné de cue-lure 1%. Le dispositif est placé sous une cage de plexiglas contenant un lot de 30 mâles *Z. cucurbitae* vierges et âgés de 20 jours où ils sont laissés libres durant 7h. A l'issue de 7h, cinq mouches sont utilisées pour évaluer le nombre de spores portés par les individus. La survie des mouches restantes est suivie dans le dispositif d'élevage individuel. Deux lots de mouches témoins sont utilisés i/ le premier est placé dans le même dispositif sans le produit formulé contenant la souche I-2961 (NPP111B005) ii/ le second témoin correspondant un lot de mouche contaminé par poudrage des individus dans une boîte de pétri (tel que décrit en A2-T2 matériel et méthode b/). L'ensemble des modalités est décrit dans le **tableau 12**

Figure 17 : Dispositif du test d'auto-inoculation en cage plexiglass contenant un Tephritrap modifié (photo : Damien Verger)

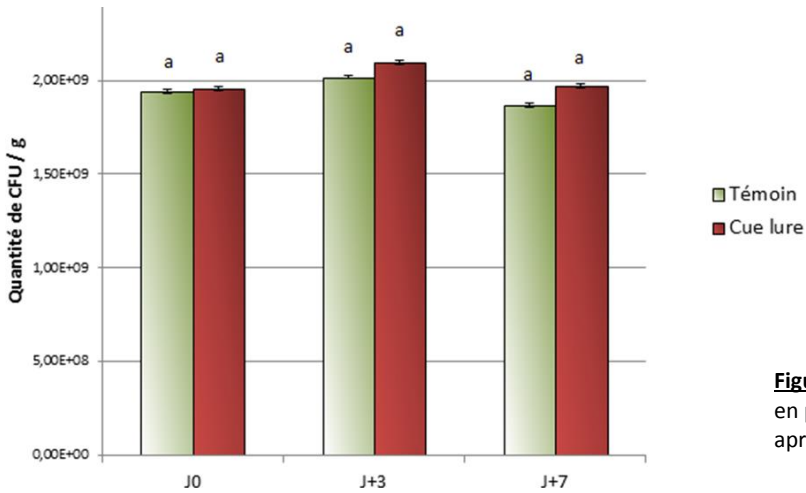
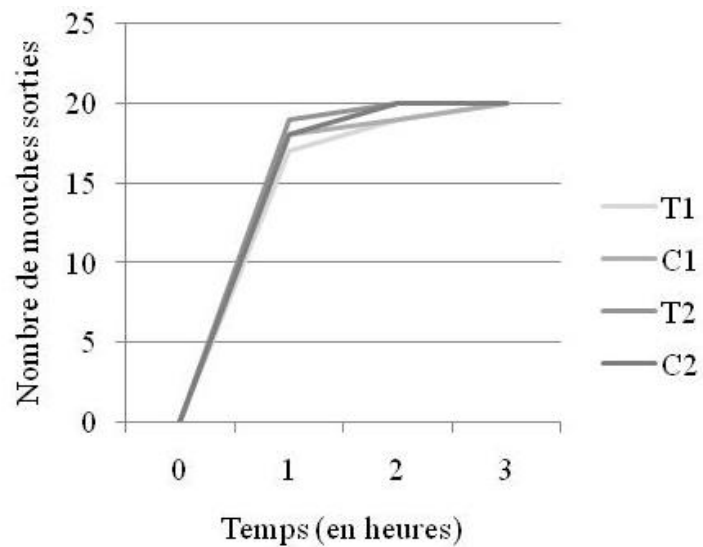


Figure 18 : Quantité de CFU par gramme en présence ou en absence de cue-lure après 3 et 7 jours

Figure 19 : Suivi de la sortie des mouches au cours du temps en fonction du dispositif : Tephri-Trap modifié (T) et le Ceratipack modifié (C). 2 répétitions ont été réalisées.



2nd TEST

Des tests d'auto-inoculation ont été effectués dans une cage en Plexiglas (30 x 30 x 60 cm) en présence d'un Tephri-Trap fixé sur la paroi supérieure de la cage (**Figure 17**). Au fond de ce piège, 10 g du produit formulé contenant la souche I-2961 (NPP111B005) ont été déposés. Un morceau de bande d'un centimètre de polymère contenant du cue-lure (1%) a été déposé sur la formulation. Quinze mâles vierges ont été placés pendant 4h dans cette cage, sous sorbonne. Toutes les 30 minutes la position des mouches (dans le piège, sur le piège, sur une paroi de la cage) a été notée. Au bout de 4h les mouches étaient ressorties du piège, elles ont été collectées à l'aide d'un flacon en verre de 30mL. Elles ont ensuite été endormies cinq minutes au congélateur puis placées chacune dans un tube Eppendorf 2 mL contenant 1 mL de solution de Tween 80[®] à 0,05% (solution mère). Le nombre de spores viables portés par les individus a été estimé par comptage du nombre de CFU sur milieu PDA.

A2-T3 : Résultats

a/ Test de compatibilité de la formulation du Beauveria et du Cue-lure

La comparaison des quantités de CFU obtenues après différents temps d'exposition n'a montré aucune différence significative (p -value < 0,05). On retrouve en moyenne $1,80 \cdot 10^9$ CFU par gramme (**Figure 18**).

Conclusion :

Pas de différences significative quant à la germination des spores de la souche I-2961 (NNPP11B005) en l'absence ou présence de quantité cue-lure, permettant l'attraction de *Z. cucurbitae*.

b/Evaluation de la capacité de la sortie des mouches des dispositifs de contamination

Les deux types de dispositifs testés, à savoir le Tephri-Trap (T) et le Ceratipack (C) modifiés permettent tous deux la sortie des mouches avec des dynamiques très similaires (**Figure 19**).

Conclusion

Les pièges de type Tephri-Trap étant déjà utilisés en piégeage de masse des mâles *Z. cucurbitae* et plus pratiques à utiliser, la suite des tests de conception du dispositif d'attraction et contamination a été effectuée avec le Tephri-Trap modifié.

c/Evaluation du comportement des mouches en présence du dispositif de contamination contenant du cue lure

Le suivi comportemental des mouches en présence du cue-lure fait apparaître que celles-ci sont capables de sortir du dispositif malgré la présence de l'attractif (**Figure 20**). De plus, dans les deux répétitions de l'expérience, les mouches sont entrées à nouveau dans le dispositif. La libération progressive de l'attractif semble avoir attiré les mouches de manière optimale deux heures après le début de l'expérience puisque toutes les mouches étaient présentes dans le piège et la majorité déployée sur le polymère plastique diffusant le cue-lure. Par la suite, l'attractivité du cue-lure a diminué car sept heures après le début de l'expérience, toutes les mouches se trouvaient en dehors du dispositif.

Conclusion

Les mouches sortent du dispositif en présence de l'attractif

d/Evaluation de la capacité de contamination des mouches mâle du dispositif de contamination contenant du cue lure :

1^{ER} TEST

Il s'agit d'un test préliminaire d'évaluation du dispositif d'attraction contamination. Après 7h dans l'enceinte en plexiglas en présence du dispositif d'attraction contamination, les mouches portent en moyenne $1 \cdot 10^4$ spores. Toutes les mouches sont mortes au bout de 7 jours (**Figure 21**)

2nd TEST

Les mâles vierges se sont auto-inoculés entre $2,5 \cdot 10^4$ au minimum à $0,11 \cdot 10^5$ au maximum conidies. Soit une quantité moyenne de $3,51 \cdot 10^5 \pm 0,55 \cdot 10^5$ spores par mouche. Cette quantité représente environ 75% de la quantité reçue par inoculation par poudrage manuel en boîte de pétri comme réalisé dans les manipulations de transfert horizontal.

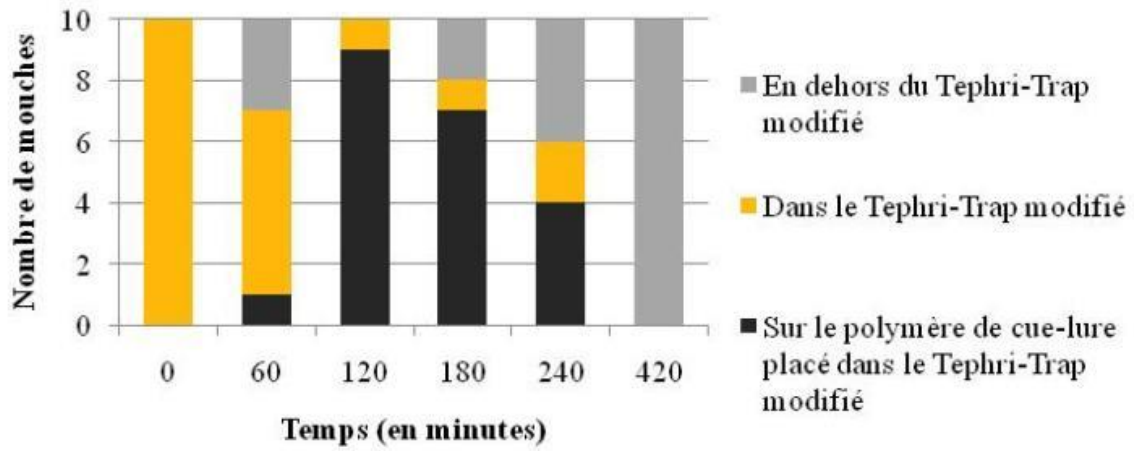


Figure 20 : Suivi des entrées et sorties de mâles de *Z. cucurbitae* Tephri-Trap modifié, en présence de cue-lure, en fonction du temps

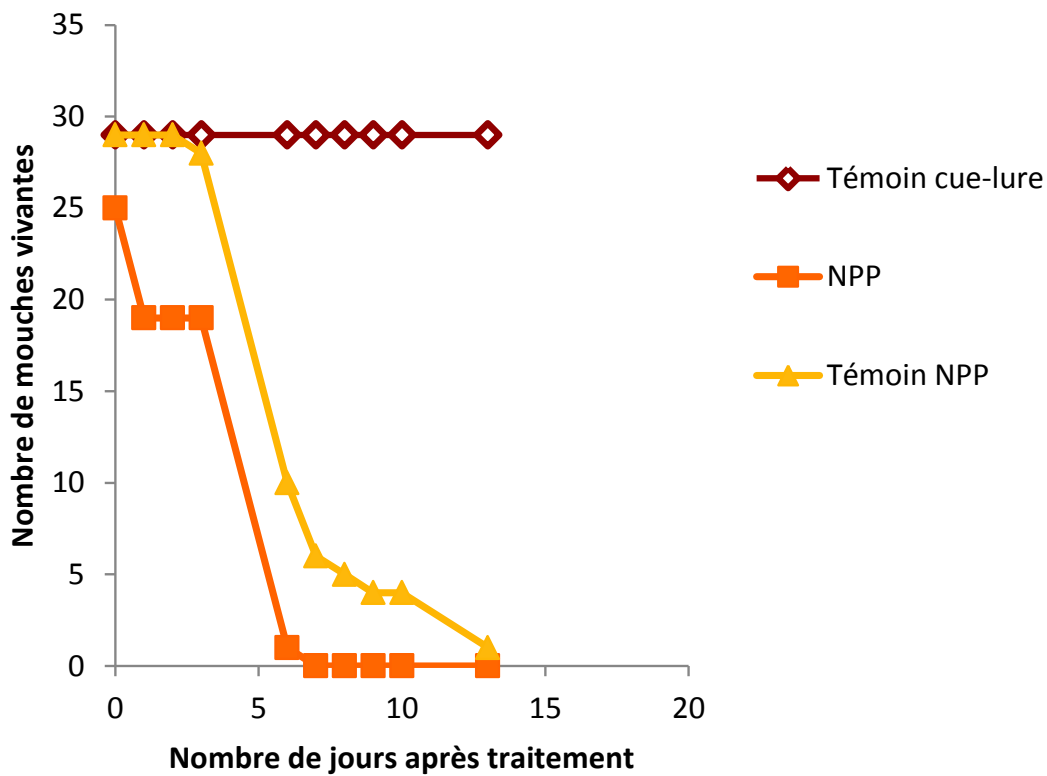


Figure 21 : Suivi de la mortalité des mâles de *Z. cucurbitae*. Après 7h dans l'enceinte en plexiglas en présence du dispositif d'attraction contamination Tephri-Trap modifié contenant les spores de la souche I-2961 (NPP111B005) et cue-lure

A2-T3 : Conclusions et perspectives

Conclusion

Le dispositif d'attraction contamination est fonctionnel, il attire les mouches mâles qui se contaminent, et leur permet de ressortir pour rechercher une partenaire.

Perspectives

I/ Le taux de mortalité des mouches est dose dépendant. Il pourrait être envisagé de modifier la formulation du produit contenant le champignon afin qu'il ait une concentration plus élevée ou qu'il permette à la mouche de capter et transférer plus de spores. Certaines formulations existent telles que EntostatTM (Barton et al., 2006) dont le support inerte est une cire chargée de façon électrostatique permettant une meilleure adhérence des conidies à la cuticule. NPP est déjà en contact avec la compagnie produisant ce produit

II/II sera nécessaire d'optimiser le dispositif et/ou la formulation du champignon pour maximiser la conservation des spores

III/ Les résultats de ce projet associés à des travaux que nous réalisons actuellement sur la durabilité de la lutte biologique à la Réunion contre *H. marginalis*, suggèrent que a/ les souches de *Beauveria*, tout en ayant une certaine spécificité, ont un large spectre d'hôte ; b / les souches possèdent la capacité à se maintenir dans les agrosystèmes.

Il sera donc important de reproduire les résultats obtenus dans les cadres des A2T2 et A2T3 avec une souche locale telle que la souche Betel. Ceci permettra de limiter les risques associés à l'introduction de souches exotiques dans un écosystème insulaire très sensible aux perturbations, et de poursuivre l'évaluation du dispositif d'attraction contamination au champ comme il était prévu dans l'Action 3

Action 3 : Efficacité du contrôle de *Z. cucurbitae* au champ – Intégration au paquet technique GAMOUR.

L'état d'avancement des Actions 1 et 2 n'a pas permis de débiter cette action avant la fin du projet. La finalisation des questions de recherche qui restent en suspens sur les actions 1 et 2 et la réalisation de l'action 3 feront l'objet d'un nouveau projet.

Bibliographie

- Atiama-Nurbel 2014. Réponse des femelles de *Bactrocera cucurbitae* (Diptera, Tephritidae) aux composés volatils de fruits-hôtes. Thèse. Univ. Reunion. 234p
- Barton & al. (2006). Adhesive powder uptake and transfer by Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Dipt., Tephritidae). *Journal of applied entomology*, 130(5), 257-262.
- Deguine & al. (2012) Agroecological crop protection: Concepts and a case study from Reunion. *Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics*.(S. Soloneski) pp 63-76.
- Deguine & al. (2013). Gestion agroécologique des Mouches des légumes à La Réunion. *Innovations agronomiques*, 28, 59-74.
- Dhillon & al. (2005) The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management.16pp. *Journal of Insect Science*, 5:40
- Ekesi & al. 2007. The role of entomopathogenic fungi in the integrated management of fruit flies (Diptera: Tephritidae) with emphasis on species occurring in Africa. In: Ekesi, S., Maniania, N.K. (Eds.), *Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management*. Research SingPost, Kerala, India, pp. 239–274.
- Femenia & al. (2013). Mass trapping of red palm weevil in the context of integrated control protocol and case studies in Spain. In *Colloque méditerranéen sur les ravageurs des palmiers*, Nice, France, 16-18 Janvier 2013. Association Française de Protection des Plantes (AFPP)
- Flores & al. (2013). Sterile males of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) as disseminators of *Beauveria bassiana* conidia for IPM strategies. *Biocontrol Science and Technology*. 23: 1186-1198.
- Franck & al. (2017) Guide de reconnaissance des mouches des fruits et des légumes à la Réunion. Application de la protection agroécologique Saint-Denis : CIRAD-Chambre d'Agriculture de la Réunion, 30 p

- Gonzalez & al. (2006) A new blend of white sapote fruit volatiles as potential attractant to *Anastrepha ludens* (Diptera : Tephritidae). Journal of Economic Entomology, 99: 1994-2001
- Jacobson & al. (1971) Synthetic nonenyl acetates as attractants for female melon flies. Journal of Medicinal Chemistry, 14, 236-239.
- Jang & al. (1996) Olfactory semiochemicals of tephritids. Fruit fly pests: a world assessment of their biology and management. (B. A. McPherson and G. J. Steck), 73–90. St. Lucie Press, Delray Beach, FL.
- Navarro-Llopis & al. (2012). Field evaluation of a *Metarhizium anisopliae* based attractant-contaminant device for the biological control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Second International Symposium of TEAM (Tephritid Workers of Europe Africa and the Middle East), 2-6 Julio 2012. Kolymbari, Creta (Grecia).
- Pastou (2008), Etude au laboratoire de la virulence de champignons entomopathogènes sur plusieurs espèces de mouches des fruits ou des légumes (Diptera : Tephritidae). Rapport de stage de M2, Univ. Reunion 46p
- Ryckewaert & al. (2010) Fruit flies (Diptera: Tephritidae) on vegetable crops in Reunion Island (Indian Ocean): state of knowledge, control methods and prospects for management. Fruits, 65, 113-130
- Sookar & al. (2008). Isolation of entomopathogenic fungi from the soil and their pathogenicity to two fruit fly species (Diptera: Tephritidae). Journal of Applied Entomology, 132, 778-788.
- Sookar & al. (2010) Mortality in tephritid fruit fly puparia and adults caused by *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Beauveria bassiana*. Univ. Res. J. Univ. Mauritius 16(1), 281-298
- Sookar & al. (2013). Mating compatibility of wild and sterile melon flies, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) treated with entomopathogenic fungi. Journal of Applied Entomology. 138(6), 409-417.
- Stelinski & al. (2002) Attraction of apple maggot flies, *Rhagoletis pomonella* (Walsh)(Diptera: Tephritidae), to synthetic fruit volatile compounds and food attractants in Michigan apple orchards. Great Lakes Entomology, 35, 37-46.

4. Contribution au plan Ecophyto (et à l'agroécologie)

Il s'agit de discuter des sorties opérationnelles du projet (par rapport à ce qui avait été annoncé), en distinguant :

- Ce qui a été effectivement produit et transféré (ex : un outil proposé avec un guide d'utilisation et ayant fait l'objet de formation avec des utilisateurs)
- Les sorties identifiées, produites à l'état de prototypes ayant fait l'objet de discussion avec des utilisateurs potentiels
- Les sorties projetées ou envisageables en indiquant comment une finalisation pourrait intervenir
- Les connaissances, informations et/ou recommandations que des acteurs pourront exploiter, afin de contribuer au développement du biocontrôle, dans un cadre qu'on essaiera de préciser

Dans tous les cas, on suggérera comment « aller plus loin » et avec qui.

Inclure dans cette partie :

- Une réflexion plus large, sur la promotion du biocontrôle dans la/les filière(s) concernée(s) par le projet et sur les possibilités de transposer à d'autres méthodes de biocontrôle ou à d'autres situations analogues les résultats du projet.

L'objectif de l'action 1 était de mettre au point un diffuseur d'attractifs pour le piégeage de masse des femelles de *Z. cucurbitae*, espèces cibles de traitements insecticides car ravageurs majeurs limitant la culture de toutes Cucurbitaceae.

Le dispositif Tephri-Trap que nous avons développé contient de l'eau additionnée de « Teepol » et des kairomones C1 + C2 intégrés dans des polymères. **Le dispositif piège significativement les femelles de *Z. cucurbitae* pour des quantités supérieures ou égales à 27 mg de C1 + C2. Nous disposons à la fin du projet d'un dispositif « Attract and Kill » qui cible plutôt les femelles.** Ce dispositif attrape également des mâles et des femelles de *Dacus demmerezi* à des concentrations plus importantes. Le contrôle de *Z. cucurbitae* ne laisserait donc pas le champ libre à cet autre ravageur des Cucurbitaceae.

Les stratégies d'évaluation de l'attractivité que nous avons utilisées, nous ont permis de passer du laboratoire au champ. Les systèmes simplifiés en condition semi contrôlée en grande cage ou au laboratoire avec les olfactomètres une voie permettent, par des screening rapides, de dégager de grandes tendances. Néanmoins, au niveau quantitatif, on ne retrouve pas au champ les mêmes ordres de grandeurs. La mise au point du dispositif optimal sur le terrain nécessite d'investir plus de temps et de moyens pour l'évaluation de nombreuses modalités. Les résultats sont encourageants et ce dispositif pourrait encore être optimisé. Une première piste a été ouverte en ce qui concerne le mélange C1-C10, qui a révélé un fort potentiel en grande

cage mais que nous n'avons pas pu évaluer réellement en plein champ. Les pièges « Ceratipack » et « Decistrap » ont tous les deux des couvercles imprégnés de deltaméthrine. Ces deux pièges sont homologués pour le piégeage d'espèces de Tephritidae appartenant au genre *Ceratitis*. Leur usage faciliterait la mise en place de la lutte. Nous pourrions évaluer plus précisément les quantités optimales de kairomones à intégrer dans les polymères permettant d'atteindre l'attractivité maximale vis-à-vis des femelles de *Z. cucurbitae* et évaluer leur durée d'efficacité au-delà de laquelle les lanières polymériques ne sont plus attractives. Il sera aussi important dans la perspective d'une homologation, de faire un point bibliographique approfondi sur la toxicologie et les impacts environnementaux associés à ces composés et étendre l'évaluation de la sélectivité du dispositif de piégeage à des espèces non cibles appartenant à d'autres familles d'insectes.

Enfin dernier point qui faisait l'objet de l'Action 3 et que nous n'avons pu aborder du fait du stade d'avancement du projet est d'évaluer l'efficacité du dispositif de piégeage en terme de protection des cultures. Pour cela, il faudrait comparer les dégâts sur cultures observés sur des parcelles non traitées avec pièges à ceux observés sur des parcelles non traitées sans piège. Dans un second temps, évaluer le nombre de pièges nécessaires par unité de surface pour obtenir une protection maximale de la culture.

L'objectif de l'Action 2 était de mettre au point une méthode d'auto-contamination-dissémination qui permette d'attirer les mâles grâce à une paraphéromone (cue-lure), de les contaminer par des spores d'un champignon entomopathogène (*Beauveria*), ces mâles devenant alors disséminateurs du champignon pour contaminer les femelles par transfert horizontal des spores lors de l'accouplement. **Après avoir sélectionné une souche commerciale de *Beauveria* pathogène des adultes de *Z. cucurbitae*, nous avons validé le concept de transmission horizontal des mâles vers les femelles lors de l'accouplement et finalement développer un dispositif fonctionnel d'autocontamination des mâles avec les spores de *Beauveria*.** L'évaluation de la méthode au champ n'a pu être réalisée dans le temps du projet comme prévu dans l'Action 3.

Lors de la première étape, nous cherchions à identifier un agent de lutte biologique « homologable » à court ou moyen terme. Pour cela, nous avons caractérisé pour trois souches commerciales de *Beauveria* appartenant à deux espèces leur pouvoir pathogène sur *Z. cucurbitae*, mais aussi pour huit autres espèces d'insecte. Les trois souches sont pathogènes pour toutes les espèces de diptères et de lépidoptère testées. Dans le cas des coléoptères, seule la souche de *B. hoplocheli* est pathogène pour le ver blanc *Hoplochelus marginalis* et seules les souches de *B. bassiana* sont pathogènes pour *Alphitobius diaperinus*. Ces résultats nous ont permis de choisir la souche la plus pathogène pour la suite de l'étude. **Ces travaux permettent aussi dès aujourd'hui d'envisager des extensions d'usages pour les trois souches de *Beauveria* notamment contre les mouches des fruits.**

L'objectif de la seconde étape de l'Action 2 était de valider pour *Z. cucurbitae* la possibilité d'un transfert des spores de *Beauveria* du mâle vers la femelle lors de l'accouplement sur lequel repose le concept d'auto-contamination-dissémination. À l'aide d'un dispositif expérimental original, nous avons démontré que la transmission de spores des mâles aux femelles lors de l'accouplement augmente significativement la mortalité des femelles si les mâles ont la possibilité de s'accoupler rapidement (entre 0 et une 1h) après leur contamination. Au-delà de 24 h plus aucune mortalité des femelles n'est possible. Nous noterons néanmoins que tous les mâles sont morts en 7 jours. Nous avons également détecté un biais expérimental causé par la contamination des cages d'accouplement par des mâles contaminés. Cette contamination « passive » a entraîné une augmentation significative de la mortalité chez les femelles introduites seules dans les cages contaminées. Cette contamination indésirable n'a jamais été prise en compte par des études antérieures de transmission horizontales.

Finalement l'Action 2-3 a permis de concevoir un dispositif d'attraction contamination fonctionnel, attirant les mouches mâles qui se contaminent et ressortent, leur permettant de trouver une partenaire potentielle. Nous avons donc mis au point une méthode d'auto-contamination-dissémination. Cette stratégie pourrait être évaluée et transférée pour lutter contre d'autres mouches des fruits. Néanmoins, les résultats de ce projet associés à des travaux que nous réalisons actuellement sur la durabilité de la lutte biologique à la Réunion contre *H. marginalis*, suggèrent que i/ les souches de *Beauveria*, tout en ayant une certaine spécificité, ont un large spectre d'hôte ; ii / les souches ont la capacité à se maintenir dans les agrosystèmes. Les effets non intentionnels sont à prendre en compte notamment pour les écosystèmes insulaires particulièrement fragile. En France métropolitaine, la souche I-2961 (NPP111B005) a été introduite et

exploitée commercialement. Son utilisation dans ce type de dispositif est envisageable à court ou moyen terme. Pour La Réunion, la souche I-2961 (NPP111B005) n'a pas été introduite, il sera donc important de reproduire les résultats obtenus avec une souche locale telle que la souche Betel.

5. Rapport financier

Rappel :

Ce tableau de synthèse fait partie des pièces du bilan financier à envoyer à la chargée de gestion de l'AFB lors du versement du solde. Il doit par conséquent être visé, ainsi que toute pièce faisant partie de ce bilan, par l'agent comptable du porteur de projet.

Attention !

Ce tableau ne constitue pas l'intégralité du bilan financier. Pour que le bilan financier soit recevable, il faut y ajouter l'ensemble des factures réalisées justifiant les dépenses engagées pour le projet.

Tableau de synthèse du Bilan Financier

Décomposition du **COUT COMPLET REALISE** par postes de dépenses et par axes :

Postes de dépenses	Credit	Annuler	NPP	Bdel	A37	Total des coûts comptabilisés réalisés par poste de dépenses
Charges de personnel	158 337,14 €	22 214,62 €	9 527,23 €	3 825,00 €	8 305,40 €	202 213,39 €
Autres frais de fonctionnement	22 469,02 €	1 820,10 €	- €	- €	- €	24 689,10 €
Total des coûts comptabilisés réalisés	181 325,14 €	23 834,72 €	9 527,23 €	3 825,00 €	8 305,40 €	
Total du coût comptabilisé global par projet	225 821,49 €	<<< Montant 1				

Décomposition de **L'ASSETTE SUBVENTIONNABLE DEFINITIVE** par poste de dépenses et par axes :

Postes de dépenses	Credit	Annuler	NPP	Bdel	A37	Total de l'assiette subventionnable définitive par poste de dépenses
Charges de personnel	158 337,14 €	22 214,62 €	9 527,23 €	3 825,00 €	8 305,40 €	202 213,39 €
Autres frais de fonctionnement	22 469,02 €	1 820,10 €	- €	- €	- €	24 689,10 €
Total de l'assiette subventionnable définitive par dépenses	181 325,14 €	23 834,72 €	9 527,23 €	3 825,00 €	8 305,40 €	
Total de l'assiette subventionnable définitive globale du projet	225 821,49 €	<<< Montant 2				

Décomposition de **LA PARTICIPATION DEFINITIVE DE L'AFB** par poste de dépenses et par axes :

Postes de dépenses	Credit	Annuler	NPP	Bdel	A37	Total de la participation définitive de l'AFB par poste de dépenses
Charges de personnel	81 185,81 €	16 311,41 €	667,25 €	- €	3 735,23 €	81 907,14 €
Autres frais de fonctionnement	8 883,26 €	1 191,20 €	- €	- €	- €	10 071,62 €
Total de la participation définitive de l'AFB par dépenses	70 045,80 €	17 625,87 €	667,25 €	- €	3 735,23 €	
Total de la participation définitive globale de l'AFB au projet	81 978,66 €	<<< Montant 3				

COUT COMPLET TTC	225 821,49 €	<<< Montant 1
TOTAL DES COUTS ELIGIBLES	225 821,49 €	<<< Montant 2
PARTICIPATION TOTALE DE L'AFB	81 978,66 €	<<< Montant 3
PARTICIPATION TOTALE DE L'AFB L'ASSETTE SUBVENTIONNABLE	41%	
MONTANT SOLICITE A L'AFB (ÉTALE DE GESTION INCLUS)	81 978,66 €	
AUTOFINANCEMENT	59%	



Brigitte NESIUS
 Directeur Adjoint de la
 Comptabilité et des Affaires
 Financières

P.O.

 S. Vaysiere

Rapport final- Projet Attractmyfly : APR "PSPE 2" Du 01/01/2015 au 11/03/2018

Partenaire : AB7

Date d'engagement	Date de paiement	Numéro de pièce comptable	Libellé de la dépense	Descriptif	Montant
Coût complet de la recherche					
12/03/2015			Heures Vincent Harraca	18 heures	684,72
2016			Heures Vincent Harraca	75,5 heures	3 093,99
2017			Heures Vincent Harraca	77 heures	3 348,73
2017			Heures Julien Chucho	11 heures	522,28
11/03/2018			Heures Julien Chucho	19 heures	659,68
Total coût complet					8 309,40
Taux de subvention 45%					3 739,23
TOTAL					3 739,23

3 330,00
1 000,00
1 332,00
998,00

Subvention allouée

02/07/2015 Subvention déjà reçue
10/02/2017 Subvention déjà reçue
2018 Subvention restant à recevoir

Certifié conforme,
A Deyme, le 02/05/2018

[Signature]
Christophe CHELLE
Directeur Général

ab7 innovation

Annexe financière coût complet

Une par partenaire

L'existence d'une comptabilité en coût complet et son mode de calcul doivent être dûment certifiés par la personne habilitée.

Sigle de l'appel à propositions de recherche : PSPE 2 - 2014		
Titre et acronyme du projet : Développement d'attractifs et auto-dissémination de champignons entomopathogènes pour lutter contre la mouche du melon <i>Bactrocera cucurbitae</i> : AttractMyFly		
Coordinateur scientifique du projet	Nom : Quilici	Prénom : Serge
Organisme contractant	Sigle : ARMEFLHOR	
Statut juridique : Association	N° de SIRET : 390 767 564 000 37	
Responsable du suivi scientifique	Nom : GRAINDORGE	Prénom : Rachel
N° subvention :		

1 - Coût complet de la Recherche (Incluant coûts de personnel, de fonctionnement et utilisation des équipements généraux)				
Catégorie	Effectif (mois)	Durée d'emploi (jour)	Taux (pourcent)	€ Année 2018
[?] Réseaux sociaux mobile				
Revue 2014/2015/2016, Responsable scientifique et technique	1,00	3 375	326,00	3 243,52 €
Lozer HOUERDUC, secrétaire d'opérations	1,00	2 430	219,60	531,30 €
Coline DABIT, secrétaire d'opérations	1,00	4 860	212,00	1 466,27 €
Marie-Laure DUBOIS, technicien d'expérimentation	1,00	60	244,00	14 973,03 €
Tout d'équipement				1 600,10 €
TOTAL 1				23 834,22 €

2 - Equipement spécifique indispensable aux recherches	
Nature de la dépense (part des amortissements correspondant à la durée du projet, voire la totalité du coût si matériel non réutilisable)	€ toutes taxes confondues ou hors taxe si non assujetti
TOTAL 2	

3 - Frais d'investissement et de fonctionnement n'entrant pas dans le coût complet	
Nature de la dépense (les dépenses seront justifiées - les devis estimatifs seront joints à ce dossier, les factures seront jointes à la présentation des relevés de dépenses)	€ toutes taxes confondues ou hors taxe si non assujetti
TOTAL 3	

ASSIETTE SUBVENTIONNABLE DU PROJET	
	€ toutes taxes confondues ou hors taxe si non assujetti
1 - Coût complet de la Recherche	23 834,22 €
2 - Equipement spécifique indispensables recherches	- €
3 - frais d'investissement et de fonctionnement n'entrant pas dans le coût complet	- €
TOTAL	

MONTANT DU FINANCEMENT DEMANDE DANS LE CADRE DU PLAN ECOPHYTO (net de taxe)	
Total demandé	€ 17 625,58 €
Taux de subvention / assiette subventionnable	73,53%

MONTANT DES FONDS PROPRES et AUTRES SOUTIENS FINANCIERS/assiette subventionnable du projet (TOTAL B)		
Identification du partenaire	Taux de participation	€ toutes taxes confondues ou hors taxe si non assujetti
Fonds propres		
[Financier 1]	25,42%	6 309,19 €
[Financier 2]	0,00%	
[Financier 3]	0,00%	
[Financier 4]	0,00%	

Date : 29/05/2018	Signature de la personne habilitée à engager l'établissement cadre du Financement Aline DAMPREVILLE Présidente de l'ARMEFLHOR	 <p>ARMEFLHOR Centre de l'Inra - Bassin d'Arles 37410 SAILLON 049210 22 60 Fax: 0662 56 22 61 Site: 390 767 564 000 37</p>
-------------------	--	--

Modèle 3cc

Annexe financière coût complet

Une par partenaire

L'existence d'une comptabilité en coût complet et son mode de calcul doivent être dûment certifiés par la personne habilitée.

Sigle de l'appel à propositions de recherche : PSPE 2 - 2014		
Titre et acronyme du projet : Titre et acronyme du projet : Développement d'attractifs et entomovection de champignons entomopathogènes pour lutter contre la mouche du melon <i>Bactrocera cucurbitae</i> - AttractMyFly		
Coordinateur scientifique du projet	Nom : Quilici	Prénom : Serge
Organisme contractant	Sigle : BETEL REUNION	
Statut juridique : SA	N° de SIRET : 40163093400016	
Responsable du suivi scientifique	Nom : BESSE	Prénom : Samantha
N° subvention :		

1 - Coût complet de la Recherche (incluant coûts de personnel, de fonctionnement et utilisation des équipements généraux)				
Catégories	Effectif (mois)	Durée d'emploi en heures	Taux horaire	€
(*) Sayer la mention "autre"				
Michel DUBO - mise en culture de souches et participation aux activités de pilotage du projet, Année 2015	1,0	25,00	45,00 €	1 125,00 €
Michel DUBO - mise en culture de souches et participation aux activités de pilotage du projet, Année 2016	1,0	30,00	45,00 €	1 350,00 €
Michel DUBO - mise en culture de souches et participation aux activités de pilotage du projet, Année 2017	1,0	25,00	45,00 €	900,00 €
Michel DUBO - mise en culture de souches et participation aux activités de pilotage du projet, Année 2018	1,0	25,00	45,00 €	450,00 €
TOTAL 1				3 825,00

2 - Equipement spécifique indispensable aux recherches		€
Nature de la dépense (selon des amortissements correspondant à la durée du projet, voir la rubrique du coût si matériel non réutilisable)		toutes taxes confondues ou hors taxes si non assujettis
TOTAL 2		0,00

3 - Frais d'investissement et de fonctionnement n'entrant pas dans le coût complet		€
Nature de la dépense (les dépenses seront justifiées - les devis estimatifs seront joints à la dossier, les factures seront jointes à la présentation des relevés de dépenses)		toutes taxes confondues ou hors taxes si non assujettis
TOTAL 3		0,00

ASSIETTE SUBVENTIONNABLE DU PROJET		€
		toutes taxes confondues ou hors taxes si non assujettis
1 - Coût complet de la Recherche		3 825,00
2 - Equipement spécifique indispensable aux recherches		0,00
3 - Frais d'investissement et de fonctionnement n'entrant pas dans le coût complet		0,00
TOTAL		3 825,00

MONTANT DU FINANCEMENT DEMANDE DANS LE CADRE DU PLAN ECOPHYTO (net de taxe)		€
Total demandé		0,00
Taux de subvention / assiette subventionnable		0,00%

MONTANT DES FONDS PROPRES et AUTRES SOUTIENS FINANCIERS/assiette subventionnable du projet (TOTAL B)		
Identification du partenaire	Taux de participation	€
Fonds propres		toutes taxes confondues ou hors taxes si non assujettis
[Financier 1] BETEL - REUNION	104,58%	4 000,00
[Financier 2]	0,00%	
[Financier 3]	0,00%	
[Financier 4]	0,00%	

Date : 6 05/06/2018
 Tél: 0262 50 33 59 - Fax: 0262 50 34 55
 RCS St Denis 05 B 362 Siren: 401 630 934
 betel-run@wanadoo.fr
 P/O 

Rapport final- Projet Attractmyfly : APR "PSPE 2" Du 01/01/2015 au 11/03/2018

Salairé (143 690 €)					
2015	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC COSTET 2015	Laurent COSTET	20	13 269,60 €
2015	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC DUYSK 2015	Pierre François DUYSK	20	5 729,60 €
2015	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC GLENAC 2015	Serge GLENAC	20	5 454,20 €
2015	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC NIBOUCHE 2015	Samuel NIBOUCHE	20	14 812,60 €
2016	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC COSTET 2016	Laurent COSTET	19	12 606,12 €
2016	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC DUYSK 2016	Pierre François DUYSK	1	486,48 €
2016	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC GLENAC 2016	Serge GLENAC	10,5	2 053,10 €
2016	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC NIBOUCHE 2016	Samuel NIBOUCHE	14,5	10 739,12 €
2017	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC COSTET 2017	Laurent COSTET	8	5 481,50 €
2017	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC DUYSK 2017	Pierre François DUYSK	1	514,64 €
2017	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC GLENAC 2017	Serge GLENAC	33	9 251,70 €
2017	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC NIBOUCHE 2017	Samuel NIBOUCHE	20	15 523,20 €
2018	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC COSTET 2018	Laurent COSTET	23	15 795,70 €
2018	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC GLENAC 2018	Serge GLENAC	20	5 706,00 €
2018	PAIE JOURNAL 009	INTERFACE C3/X3-MO-FS DEC NIBOUCHE 2018	Samuel NIBOUCHE	30	23 171,50 €
Sous total				200	143 690 €
Stagiaire (11 844 €)					
20/05/2015	010-7001*500005	PAIE DU MOIS DE 05 A 05	MERLE Isabelle		1 791,50 €
20/06/2015	010-7001*500020	PAIE DU MOIS 06	MERLE Isabelle		505,20 €
20/06/2015	010-7001*500053	PAIE DU MOIS 06	MERLE Isabelle		116,16 €
20/07/2015	010-7001*500067	PAIE DU MOIS 07	MERLE Isabelle		505,20 €
20/07/2015	010-7001*500096	PAIE DU MOIS 07	MERLE Isabelle		110,88 €
20/08/2015	010-7001*500030	PAIE DU MOIS 08	MERLE Isabelle		481,10 €
20/08/2015	010-7001*500058	PAIE DU MOIS 08	MERLE Isabelle		110,88 €
01/04/2016	280-4004*600006	REFACT. VENARD	VENARD Julie		594,21 €
30/06/2016	280-4004*600010	REFACT. VENARD	VENARD Julie		905,43 €
30/04/2016	280-7124*600011	PAIE DU MOIS 04	VENARD Julie		532,04 €
20/05/2016	010-7001*600181	PAIE DU MOIS 05	VENARD Julie		504,20 €
20/06/2016	010-7001*600209	PAIE DU MOIS 05	VENARD Julie		100,32 €
20/06/2016	010-7001*600213	PAIE DU MOIS 05	VENARD Julie		520,10 €
20/06/2016	010-7001*600252	PAIE DU MOIS 05	VENARD Julie		105,10 €
20/07/2016	010-7001*600276	PAIE DU MOIS 07	VENARD Julie		475,50 €
20/07/2016	010-7001*600295	PAIE DU MOIS 07	VENARD Julie		116,16 €
20/10/2016	280-4004*600025	PAIE DU MOIS 10	VENARD Julie		202,10 €
31/10/2016	010-7100*600675	PAIE DU MOIS 10	VERGER Damien		1 107,80 €
30/11/2016	010-7100*600816	PAIE DU MOIS 11	VERGER Damien		705,00 €
20/03/2017	010-7001*700094	PAIE DU MOIS 03	VERGER Damien		504,20 €
20/04/2017	010-7001*700133	PAIE DU MOIS 04	VERGER Damien		475,50 €
20/04/2017	010-7001*700159	PAIE DU MOIS 04	VERGER Damien		121,44 €
20/05/2017	010-7001*700171	PAIE DU MOIS 05	VERGER Damien		504,20 €
20/05/2017	010-7001*700197	PAIE DU MOIS 05	VERGER Damien		95,00 €
20/06/2017	010-7001*700210	PAIE DU MOIS 06	VERGER Damien		525,20 €
20/06/2017	010-7001*700235	PAIE DU MOIS 06	VERGER Damien		100,32 €
20/07/2017	010-7001*700248	PAIE DU MOIS 07	VERGER Damien		504,20 €
20/07/2017	010-7001*700274	PAIE DU MOIS 07	VERGER Damien		110,88 €
20/08/2017	010-7001*700287	PAIE DU MOIS 08	VERGER Damien		354,40 €
20/09/2017	010-7001*700311	PAIE DU MOIS 08	VERGER Damien		105,60 €
Sous total					13 021,32 €
Mission (3 000 €)					
31/05/2015	010-7100*600201	REAFFECT 290377 & 460622	Billet avion Isabelle MERLE		1 370,79 €
04/01/2017	280-4011*7001568	RUL1728191 AMEX AMERICAN EXPRE	Billet avion Damien VERGER		988,75 €
31/05/2015	010-7100*600201	REAFFECT 290377 & 460622	Billet avion Isabelle MERLE		36,09 €
01/04/2016	280-7124*600020	RJ11524580 HAVAS VOYAGES	Billet avion Julie VENARD		36,09 €
01/04/2016	280-7124*600020	RJ11524580 HAVAS VOYAGES	Billet avion Julie VENARD		953,54 €
31/10/2016	010-7100*600623	REAFFECT 290377 & 460622	Billet avion Damien VERGER		949,75 €
04/01/2017	280-4011*7001568	RUL1728191 AMEX AMERICAN EXPRE	Billet avion Damien VERGER		9,09 €
19/12/2017	280-0294*000102	Missions COSTET CM ASS 20 - MLP 13/12-24/01	Mission Costet		1 739,61 €
Sous total					5 582,72 €

Rapport final- Projet Attractmyfly : APR "PSPE 2" Du 01/01/2015 au 11/03/2018

Fonctionnement (20 000 €)				
12/05/2015	280-ACH*5002198	RU11522258 PROMONET C G A	consommable	354,00 €
12/05/2015	280-ACH*5003199	RU11522258 PROMONET C G A	consommable	421,76 €
19/05/2015	280-ACH*5002559	RU11522515 CORO SREPC	consommable	231,10 €
24/05/2015	280-ACH*5002775	RU11522684 PROMONET C G A	consommable	36,80 €
25/07/2015	280-ACH*5003061	RU11522684 PROMONET C G A	consommable	38,40 €
01/07/2015	280-ACH*5003155	RU11522657 SIGMA ALDRICH CHIMI	consommable	674,13 €
01/08/2015	280-ACH*5003195	RU11525191 SETCARBIS	consommable	157,35 €
25/08/2015	280-ACH*5003315	RU11522684 PROMONET C G A	consommable	652,07 €
15/09/2016	280-ACH*6001064	RU11625085 EQUINOXE	disque dur	65,00 €
20/04/2016	280-ACH*6001642	RU11615421 SID SAS	consommable	80,51 €
05/06/2016	280-ACH*6001839	RU11525420 PROMONET C G A	consommable	118,69 €
01/04/2016	280-7124*6000115	RU11624766 PROMONET	consommable	702,04 €
01/04/2016	280-7124*6000221	RU11624808 PROMONET	consommable	306,20 €
19/05/2016	280-ACH*6001954	RU11625689 BIOTOP	consommable	434,00 €
08/05/2016	280-ACH*6001332	RU11625420 PROMONET C G A	consommable	197,51 €
30/05/2016	280-ACH*6002553	RU11625420 PROMONET C G A	consommable	474,74 €
13/09/2016	280-ACH*6003736	RU11625419 PROMONET C G A	consommable	724,08 €
16/12/2016	280-ACH*6005439	RU11627104 SIGMA ALDRICH CHIMI	consommable	571,30 €
16/11/2016	280-ACH*6005489	RU11627104 SIGMA ALDRICH CHIMI	consommable	137,30 €
29/01/2017	280-0204*7001156	VERGER BRICCLAGE FERTIS AGRI	consommable	14,84 €
02/04/2017	280-2520*7000100	AUCHAN POUTS MACHINIA LAVER	consommable	6,01 €
30/05/2017	280-7124*7000116	REP CH AUTO SEME TR 2017	réservation véhicule	10,25 €
30/05/2017	280-7124*7000117	REP CH AUTO SEME TR 2017	réservation véhicule	61,12 €
30/05/2017	280-7124*7000118	REP CH AUTO SEME TR 2017	réservation véhicule	50,61 €
30/05/2017	280-7124*7000119	REP CH AUTO SEME TR 2017	réservation véhicule	34,21 €
16/08/2017	280-ACH*7000187	RU11729926 ATELIER FERRONNERIE	paquet en fer	300,00 €
13/10/2017	280-ACH*7004052	RU11728128 CROUS	location studio VERGER Damien	357,00 €
13/10/2017	280-ACH*7004053	RU11728128 CROUS	location studio VERGER Damien	306,00 €
14/10/2017	280-ACH*7004054	RU11728128 CROUS	location studio VERGER Damien	306,00 €
13/10/2017	280-ACH*7004055	RU11728128 CROUS	location studio VERGER Damien	306,00 €
13/10/2017	280-ACH*7004056	RU11728128 CROUS	location studio VERGER Damien	306,00 €
31/10/2017	280-7124*7000661	REP CH AUTO SE TR 2017	réservation véhicule	317,19 €
31/10/2017	280-7124*7000662	REP CH AUTO SE TR 2017	réservation véhicule	1 009,64 €
31/10/2017	280-7124*7000663	REP CH AUTO SE TR 2017	réservation véhicule	351,30 €
31/10/2017	280-7124*7000664	REP CH AUTO SE TR 2017	réservation véhicule	21,92 €
27/11/2017	280-ACH*7004846	RU11730359 PROMONET C G A	consommable	29,10 €
18/12/2017	280-ACH*7005240	RU11730551 SIGMA ALDRICH CHIMI	consommable	1 184,00 €
06/03/2018	280-ACH*8000770	RU11832025 B&B OLIVIER	lecture anglais	184,00 €
28/02/2018	280-0204*8001177	CCS BY DICK FRAP	consommable	212,00 €
11/03/2018	280-7124*8000005	REP CH PARC AUTO JT 18	réservation véhicule	177,83 €
11/03/2018	280-7124*8000006	REP CH PARC AUTO JT 18	réservation véhicule	575,15 €
11/03/2018	280-7124*8000007	REP CH PARC AUTO JT 18	réservation véhicule	102,94 €
11/03/2018	280-7124*8000008	REP CH PARC AUTO JT 18	réservation véhicule	182,04 €
20/02/2018	280-ACH*8000026	RU11730912 BIOTOP	consommable	260,25 €
16/01/2018	280-ACH*8000025	RU11730912 BIOTOP	consommable	1 846,50 €
13/05/2018	280-ACH*8000808	RU11851987 CORO SREPC	consommable	231,20 €
06/05/2018	280-ACH*8000768	RU11851735 BIOTOP	consommable	754,00 €
20/02/2018	280-ACH*8000020	RU11730912 BIOTOP	consommable	260,25 €
Sous total				17 405,28 €
Total coût complet				181 325,14 €
Taux de subvention 38,33%				70 045,90 €



Brigitte NESIUS
 Directeur Adjoint de la
 Comptabilité et des Affaires
 Financières

P.-o.

J. Vayssières

Rapport final- Projet Attractmyfly : APR "PSPE 2" Du 01/01/2015 au 11/03/2018

Partenaire : NATURAL PLANT PROTECTION

Date d'engagement	Date de paiement	Nombre de pièce comptable	Libellé de la dépense	Descriptif	Montant
Coût complet de la recherche					
01/01/2015	31/12/2015		Temps de travail	Samantha Besse - 20h - 45,75€/h	915,0
01/01/2016	31/12/2016		Temps de travail	Grigaliu Gabriel - 47h - 25,61€/h	1205,67
01/01/2016	31/12/2016		Temps de travail	Samantha Besse - 32h - 36,20€/h	1158,4
01/01/2016	31/12/2016		Temps de travail	Charlotte Garret - 58h - 14,28€/h	828,24
01/01/2016	31/12/2016		Temps de travail	Caroline Saubanière - 64h - 25,40€/h	1625,6
01/01/2017	31/12/2017		Temps de travail	Samantha Besse - 20h - 39,95€/h	799
01/01/2017	31/12/2017		Temps de travail	Caroline Saubanière - 50h - 24,65€/h	1232,5
01/01/2017	31/12/2017		Temps de travail	Christine Cabrol - 12h - 25,42€/h	305,04
01/01/2018	30/09/2018		Temps de travail	Samantha Besse - 15h - 39,95€/h	599,25
01/01/2018	30/03/2018		Temps de travail	Caroline Saubanière - 38,5h - 24,65€/h	949,725
Sous Total					9 527,23
Total coût complet					9 527,23
Taux de subvention 45%					4 287,25
TOTAL					4 287,25

Certifié conforme,
A Pau, le 05/06/2018

