

 <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>	
---	--	---

MAJ : 13/04/2018

Numéro SIREPA : 2695

1. FICHE DE SYNTHÈSE

Voir le document joint (celui-ci est repris en annexe)

2. RAPPORT D'ACTIVITÉ

EXECUTION DES TACHES PREVUES DANS LE PROJET, PARTENAIRES IMPLIQUES, DIFFICULTES RENCONTREES

Le projet RhizoDia est construit autour de deux actions : l'évaluation multisites d'une méthode de protection basée sur le lâcher de coccinelles *Rhizobius lophantae* et l'analyse de sa transposabilité vers d'autres espèces pérennes.

- **Action 1 : Evaluation multisites de la méthode de biocontrôle**

Cette action, qui est la plus conséquente du projet, comprend trois volets : le test de l'efficacité de la méthodes des lâchers, mené sur les trois années du projet sur quatre sites en Val-de-Loire et un site en Bourgogne ; l'appréciation des capacités d'hivernation de l'auxiliaire, réalisée aux hivers 2016/17 et 2017/18, et l'optimisation de la mise en œuvre des lâchers, débutée dès la mise en place de l'étude et qui s'est poursuivie par quelques ajustements au cours du projet.

⊕ Test de l'efficacité de la méthode des lâchers

Menée sur 5 sites sélectionnés au départ du projet selon des critères définis en commun (voir § 3.A.1-Dispositif expérimental et choix des sites d'étude), l'expérimentation a consisté à évaluer l'efficacité de deux lâchers annuels de *Rhizobius lophantae* ciblant chacune des générations de la cochenille, selon un dispositif expérimental à trois modalités et un même protocole d'observations appliqué sur les 3 années du projet. Ces travaux ont été réalisés par les deux partenaires impliqués sur les opérations de terrain, soit la Station La Morinière et la Chambre d'Agriculture de Côte d'Or. Le partenaire KOPPERT s'est chargé de la fourniture des auxiliaires.

Les indicateurs retenus pour cette évaluation sont la densité de cochenilles vivantes par dm², le taux de régression de cette densité de date à date, le taux d'infestation des buissons par notation visuelle et le nombre de coccinelles *Rhizobius* capturées par frappage. 84 000 coccinelles *Rhizobius* ont été lâchées sur les parcelles sur la durée du projet, 103 688 carapaces de cochenilles ont été observées sur 2 087 rameaux de cassissier au cours de 9 séries d'observations, 635 *Rhizobius* ont été capturées par frappage sur 13 dates de frappages et 7 800 buissons ont été notés visuellement au cours de trois séries d'observations (printemps 2016, 2017 et 2018).

⊕ Etude des capacités de survie hivernale de l'auxiliaire

Menée sur les mêmes sites d'étude, à la fois sur les parcelles d'introduction et sur les parcelles de référence, cette tâche a consisté d'une part à apprécier la survie des *Rhizobius* sous forme de pontes

hivernales par une expérience en éclosoirs, et d'autre part à évaluer l'intérêt d'abris installés sur les parcelles pour faciliter l'hivernation des auxiliaires sous forme d'adultes.

520 bandes cartonnées et 260 fagots de bambou ont été disposés sur les parcelles au cours de l'étude ; 122 adultes de *Rhizobius* ont été dénombrés dans ces pièges et classifiés en individus vivants ou morts ; la présence d'autres animaux (mollusques, arachnides, insectes) a également été notée.

✦ Caractérisation génétique des auxiliaires collectés sur les parcelles d'essai

Plus de 130 coccinelles *Rhizobius*, issues soit des frappages réalisés au cours du projet ou des collectes dans les pièges visités, soit de captures antérieures au projet sur la zone du Val-de-Loire ou d'individus d'élevage, ont été soumises à un protocole de caractérisation génétique par séquençage de la portion du génome mitochondrial COI. Plusieurs autres auxiliaires collectés sur les sites d'étude (Coccinellidae et Hymenoptères) ont également été soumis à ce protocole. Ces travaux ont été réalisés par le partenaire INRA Sophia Antipolis et avec ses équipements (équipe RDLB, UMR 1355), avec l'appui opérationnel de trois stagiaires en master 2 recrutés pour le projet et l'appui financier de l'AFIDEM et du GIS Fruits (pour deux d'entre eux).

✦ Optimisation de la mise en œuvre des lâchers

Le design de mise en œuvre des lâchers sur les parcelles (nombre de points, répartition, dose) et le type de contenant choisi ont été mis au point dès le début du projet, lors du premier comité de pilotage. Quelques améliorations ont été apportées par la suite au packaging, en tenant compte des comportements observés sur le terrain et en concertation entre l'ensemble des partenaires. Cette tâche a consisté également à faciliter le respect des délais d'approvisionnement des auxiliaires et à améliorer la qualité des lots fournis et à venir en appui aux lâchers par des visites sur le terrain. Cette partie du travail a été assurée par le partenaire KOPPERT en interaction avec les autres partenaires.

420 sachets de 200 individus ont été acheminés vers chacun des sites d'étude au cours du projet pour y être dispersés sur les parcelles.

- **Action 2 : Transposabilité de la méthode à d'autres cultures pérennes**

Cette deuxième action, qui n'est intervenue qu'en dernière année du projet, a consisté à réaliser une analyse critique de la synthèse des trois années d'observations, en introduisant deux facteurs explicatifs, la pression phytosanitaire et les données météorologiques, et en y intégrant la dimension économique. Cette analyse a été réalisée par les équipes de la Morinière et par le CTIFL, avec l'appui de l'INRA. Les seules données météo à disposition ont été celles de la station météo de La Morinière à Saint-Epain (37).

Une seconde tâche était prévue dans cette action : la rédaction d'un guide méthodologique pour faciliter le transfert de la méthode de protection vers les producteurs de cassis et vers d'autres cultures pérennes. **En l'absence de résultats concluants de la méthode des lâchers de *Rhizobius*, cette partie de l'action n'a pas été réalisée.**

- **Activités de coordination et d'animation du projet**

Les activités de coordination ont consisté à prendre en charge les aspects administratifs du projet (conventionnement, justificatifs financiers et reversement de la subvention), à s'assurer du respect du cadre imposé par la convention ONEMA-CTIFL, à déposer deux demandes de bourses de stage auprès du GIS Fruits et à organiser et animer quatre réunions du comité de pilotage.

- Organisation le 28/09/2015 d'une réunion téléphonique entre tous les partenaires du projet, rendue nécessaire par les modifications survenues depuis la date de son dépôt (CTIFL : départ de M.C. Dalstein, coordinatrice initiale du projet, et transfert vers M.M. Fernandez – KOPPERT : départ d'E. Lascaux et transfert vers T. Verfaille).

- Réunions du comité de pilotage les 16/03/16, 06/02/17, 13/11/17 et 23/02/18 – Rédaction des comptes-rendus correspondants. Le comité de pilotage comprend les responsables techniques du projet pour chacune des structures partenaires, trois représentants professionnels (ANCG, SOCOFRUITS et Les Vergers d'Anjou), le représentant de l'AFIDEM et le directeur financier du CTIFL.
- Dépôt de deux demandes de bourse GIS Fruits les 28/10/15 et 09/10/17 (bourses accordées)
- Participation à la Commission cassis de l'AFIDEM, le 30/05/16 (présentation du projet par A. Hurel, CTIFL)
- Contacts fréquents entre partenaires du projet et/ou via son coordinateur, par téléphone ou par courriel

- **Difficultés rencontrées**

- Dès le début du projet le degré d'implication de la CA 21 a dû être revu à la baisse par rapport à ce qui était annoncé au dépôt du projet, un recrutement initialement prévu pour venir en appui sur les opérations de terrain n'ayant pas été réalisé, en raison de la réorganisation des Chambres d'Agriculture suite à la redéfinition des régions. Sur les deux sites prévus initialement en Côte d'Or, un seul a donc pu être retenu. Les deux premières années du projet se dérouleront ainsi sur 5 sites au lieu de 6.
- Après des inquiétudes au démarrage du projet sur les capacités d'approvisionnement en auxiliaires, la société KOPPERT a réussi à valider auprès de son fournisseur Entocare la commande des Rhizobius dans les quantités convenues entre expérimentateurs. Mais un souci dans le conditionnement des coccinelles a conduit à apporter sur le 1^{er} essaimage en 2016 des doses probablement moindres que prévu ; ce problème a été réglé par la suite.
- La parcelle d'introduction du site de Merceuil en Côte d'Or (site 5 du projet), trop infestée par la cochenille, a été arrachée en fin d'année 2017 à la demande de l'exploitant pour permettre une replantation. Cette demande a été soumise aux membres du comité de pilotage et débattue en commun. La décision a été prise d'un commun accord, après vérification du respect des termes de la convention. Les travaux d'expérimentation de la dernière année du projet n'ont donc concerné que les 4 sites du Val-de-Loire.

CONTRIBUTION APPORTEE AU PROJET PAR CHACUN DES PARTENAIRES

CTIFL	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gestion financière et administrative du dossier ▪ Coordination, organisation des comités de pilotage et des échanges entre partenaires. Rédaction des comptes-rendus de réunions ▪ Participation au traitement statistique des données, consolidation des résultats, approfondissement de l'analyse ▪ Rédaction des rapports de réalisation et rapports scientifiques ▪ Participation aux séminaires de restitution
La Morinière	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mise en œuvre et suivi de l'expérimentation menée dans la zone Val-de-Loire (sites 1, 2, 3 et 4)) ▪ Appui opérationnel à la mise en œuvre des caractérisations génétiques de <i>R. lophantae</i> (sur le site de l'INRA Sophia Antipolis) ▪ Compilation, saisie et analyse des données des sites Val-de-Loire et Bourgogne ▪ Participation aux Comités de pilotage et aux échanges entre partenaires <p style="color: red; font-size: small;">Appui de trois stagiaires (fin d'études BAC+5) : Jeanne GOUVRION (2016), Antoine GAI (2017) et Simon DAUFFOUIS (2018) - Soutien financier par une bourse GIS Fruits en 2016 et 2018</p>
CA 21	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mise en œuvre et suivi de l'expérimentation menée dans la zone Côte d'Or (site 5) ▪ Participation aux Comités de pilotage et aux échanges entre partenaires

KOPPERT	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fourniture des auxiliaires ▪ Réflexion sur l'aspect optimisation de la méthode de lâcher et formes de l'auxiliaire à tester (adultes ou larves) ▪ Participation aux Comités de pilotage et aux échanges entre partenaires ▪ Visite des essais
INRA PACA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Expertise sur la biologie et l'écologie de <i>P. pentagona</i>, <i>R. lophantae</i> et d'autres ennemis naturels ▪ Identification morphologique des insectes. Caractérisation génétique de <i>R. lophantae</i>, d'autres coléoptères et d'hyménoptères ▪ Appui statistique ▪ Co-encadrement des stages GIS Fruits (avec La Morinière) et relecture des rapports de stages ▪ Visite des essais
Producteurs et AFIDEM	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PRODUCTEURS DE CASSIS : Mise à disposition des parcelles supports aux essais. Application des calendriers de traitements prévus par le protocole. Réalisation des opérations culturales ▪ AFIDEM : Versement d'une compensation financière aux producteurs mettant leurs parcelles à disposition pour la réalisation du projet RhizoDia. Prise en charge des frais de déplacements des stagiaires ▪ AFIDEM et 3 représentants de producteurs : Participation aux Comités de pilotage et aux échanges entre partenaires

REALISATION DES JALONS ET PRODUCTION DES LIVRABLES ANNONCES

Le planning des actions a été globalement respecté, seule la tâche sur l'optimisation des lâchers a été décalée puisqu'elle a démarré au départ du projet.

Par contre, comme expliqué plus haut puis développé plus loin dans le rapport scientifique, **la tâche de rédaction du guide méthodologique n'a pas été exécutée**, puisque la méthode de protection testée n'a montré qu'une efficacité aléatoire, sans que les facteurs de succès n'en soient maîtrisés.

Tableau 1 : Structuration du projet RhizoDia et planning de réalisation prévu/réalisé

	Année 1 : 2016	Année 2 : 2017	Année 3 : 2018
ACTION 1 : Evaluation multisites de la méthode de biocontrôle			
Volet 1.1 : Test multisites d'efficacité de la méthode			
Volet 1.2 : Travail sur l'hivernation des coccinelles			
Volet 1.3 : Travail sur la méthode de lâcher			
ACTION 2 : Transposabilité de la méthode à d'autres cultures fruitières			
Volet 2.1 : Synthèse des trois années d'essai, analyse et critique constructive pour le cas du cassis			
Volet 2.2 : Rédaction d'un guide méthodologique pour les autres cultures pérennes			

Tâche anticipée  Tâche non exécutée 

LIENS ETABLIS AVEC LES ACTEURS DU TERRAIN ET DU PLAN ECOPHYTO

Par sa réalisation sur des parcelles mises à disposition par des producteurs de cassis, le projet s'est intégré de fait dans un itinéraire technique vraie grandeur. Avec une expérimentation multisites hors station de recherche, l'idée était aussi, en cas de succès de la méthode, de faciliter son transfert vers les réseaux d'exploitants producteurs de cassis, que ce soit en Val-de-Loire ou en Bourgogne, les parcelles d'essai pouvant ainsi devenir des sites de démonstration idéaux pour un développement de la méthode. Les conclusions du projet n'étant pas celles escomptées, ceci ne sera pas le cas. Les

résultats nous montrent toutefois que les solutions chimiques homologuées contre la cochenille sur cassis n'ont pas non plus une bonne efficacité dans les conditions du terrain, probablement en raison de difficultés de positionnement. La recherche de solutions de biocontrôle contre ce ravageur reste donc encore d'actualité à l'issue du projet, même si en matière d'auxiliaires, aucun autre candidat que *Rhizobius* n'a pu nous être proposé aujourd'hui.

Les professionnels de la filière cassis restent donc mobilisés sur la piste du biocontrôle, notamment via les trois groupes de travail dédiés à cette production, qui ont été l'occasion de plusieurs échanges autour des avancées du projet RhizoDia pendant sa réalisation, et continueront à l'être pour les suites de l'étude à venir :

- Groupe Technique Régional Petits Fruits Rouges : animé par la station La Morinière sur le Val-de-Loire, ce groupe réunit une vingtaine de producteurs de cassis désignés par les OP pour représenter leur zone géographique de production
- Groupe de Travail National Petits Fruits : animé par le Ctifl, ce groupe se réunit en présence de la DGAL et est notamment l'occasion de remonter les usages mal pourvus en matière de protection contre les ravageurs
- Commission Cassis de l'AFIDEM

Concernant la collaboration entre projets sur la thématique « Contribuer à l'essor du biocontrôle », des ponts ont été établis avec les acteurs du biocontrôle via le projet XP-BC dans lequel le CTIFL est aussi impliqué, notamment pour mener une réflexion sur la conception d'outils non destructifs de détection de la présence de cochenilles actives, qui pourraient être utilisés pour améliorer l'expérimentation mais aussi par la suite comme outils de monitoring. Quelques rapprochements ont ainsi été établis avec le laboratoire BF2I de l'INSA de Lyon, qui démarre un travail de recherche en ce sens. Hors dispositif Ecophyto, un rapprochement a aussi été réalisé avec les chercheurs impliqués dans le projet COLBICS (projet de recherche Marie-Curie débuté en 2014), dont un des volets prévoyait d'étudier des voies d'amélioration de la production de masse de *Rhizobius*. Malheureusement, s'agissant d'un projet public-privé, peu d'informations sont sorties sur les progrès de cette étude, dont les résultats pourraient être publiés une fois passée une période de droit de première information réservée à la société impliquée.

ACTIONS DE DIFFUSION ET DE TRANSFERT

Si le guide méthodologique prévu n'a pas été produit, quelques actions de diffusion ont été réalisées autour du projet RhizoDia au cours de sa réalisation. D'autres sont à venir, la période de confidentialité prévue par la convention étant désormais arrivée à son terme.

Ainsi plusieurs présentations du projet ont été réalisées devant des publics plus ou moins restreints :

- Commission Cassis de l'AFIDEM le 30/05/16 (présentation par A. HUREL, CTIFL)
- GTR Petits Fruits Rouges de la station La Morinière, 08/06/17 (deux présentations, par N. RIS et P. KREITER, INRA)
- Séminaire de restitution intermédiaire des appels à projets PSPE2, le 14/12/2017 (présentation par MM. FERNANDEZ, CTIFL)
- 6^{ème} Congrès Mondial du Cassis (IBMA), 07/06/2018 à Angers (présentation par P. GUIGNEBAULT, La Morinière)
- Journée Technique Nationale Petits Fruits Rouges le 10/10/2018 à Saint Laurent d'Agny (co-organisation CTIFL/ANCG/AVFF/SPMF) : présentation par P. GUIGNEBAULT, La Morinière

Le projet a donné lieu à la rédaction de plusieurs rapports dont certains ont été publiés :

- **GOUVRION, J. 2016.** La coccinelle *Rhizobius lophanthae*, agent de bio-contrôle pertinent dans la lutte contre la cochenille *Pseudaulacaspis pentagona*? Rapport de stage GIS-Fruits 2016. <https://www.gis-fruits.org/content/download/3697/36570/file/RhizoDia-Gouvriion.pdf>

- **GUIGNEBAULT, P. 2018.** Biological control of the White Peach Scale on blackcurrant: the RhizoDia project. Actes du 6ème Congrès Mondial du Cassis, Angers 6-8 juin 2018. <https://www.blackcurrant-iba.com/event/wp-content/uploads/2018/07/5-Rhizodia-program.pdf>
- **GAY, A. 2017.** Etude de la régulation de populations de cochenilles diaspiques en culture de cassis par des lâchers de coccinelles coccidiphages. Mémoire de fin d'études (non publié)
- **DAUFFUIS, S. 2018.** Projet RhizoDia : essais en protection du cassis par *Rhizobius lophantae* contre la cochenille blanche du mûrier. Rapport de stage GIS-Fruits 2018. https://www.gis-fruits.org/content/download/3876/38621/version/1/file/Simon_Dauffouis_RhizoDia2018.pdf

Enfin, une publication est parue dans le magazine l'Arboriculture Fruitière du mois d'octobre 2018 : « Projet RhizoDia : une coccinelle pour lutter contre les cochenilles ? » (A. BRESSOLLIER).

3. RAPPORT SCIENTIFIQUE

A. Problématique, enjeux et état de l'art

Avec un verger national de 2 400 ha, le cassis est une culture mineure qui représente peu d'enjeux pour les firmes phytosanitaires, mais qui se situe tout de même au 3^{ème} rang des tonnages produits au niveau européen. Elle fait partie des productions étudiées dans le cadre du Groupe de Travail National Petits Fruits animé par le CTIFL, qui réunit la DGAL, les stations régionales d'expérimentation et les représentants professionnels, dans l'objectif, entre autres, de définir les usages à examiner en priorité par la Commission des Usages Orphelins, et les spécialités commerciales à expérimenter dans le réseau.

En 2012-2013, plusieurs acteurs de la filière cassis ont désigné la protection contre la cochenille blanche du mûrier (*Pseudaulacaspis pentagona*) comme étant un enjeu majeur de par son incidence économique sur tous les bassins de production.

Apparue pour la première fois en France en 1918, *Pseudaulacaspis pentagona* est responsable de dépérissements sévères dans les parcelles de cassissier, qui connaissent depuis une quinzaine d'années une résurgence mal expliquée du ravageur. Comme l'ensemble des représentants des cochenilles diaspiques, ce ravageur se caractérise par la présence d'un bouclier cireux qui le protège d'un grand nombre d'agressions physiques et chimiques, le rendant peu accessible aux traitements insecticides. Au démarrage du projet RhizoDia, trois matières actives sont homologuées sur l'usage Cassissier*Traitement des Parties Aériennes*Cochenilles : l'huile de paraffine, utilisable sur les stades hivernants, le thiaclopride, applicable sur le 1^{er} et le 2nd essaimage (produit de la famille des néonicotinoïdes, désormais retiré) et le chlorpyrifos-méthyl, dont l'application n'est autorisée qu'après récolte, donc sur le 2nd essaimage. Testés dans le cadre du programme d'expérimentation de la station La Morinière, l'huile de paraffine s'avère d'une efficacité largement insuffisante, et les deux insecticides autorisés ne montrent qu'une efficacité aléatoire et présentent de surcroît une action négative avérée sur la faune auxiliaire.

Avec un développement en foyers, une faible capacité de dissémination, un cycle bien documenté et plusieurs prédateurs connus, la cochenille blanche du mûrier, qui met ainsi en échec la lutte chimique, est un candidat idéal pour la mise en œuvre d'une méthode de lutte biologique par l'utilisation d'un macro-organisme ; c'est donc vers cette voie que, dès 2012, se sont orientés les travaux de La Morinière. En s'appuyant sur les essais menés sur pêcher et agrumes par la station AREFLEC en collaboration avec P. Kreiter (INRA PACA), le choix de l'agent de biocontrôle s'est porté sur la coccinelle *Rhizobius lophantae*, qui conjugue plusieurs avantages : forte sélectivité pour les cochenilles diaspiques, capacité de prédation importante, capacité de dispersion jusqu'à 100 m du point de lâcher, fécondité élevée et facilité d'élevage. Cette cochenille, originaire d'Australie, est par ailleurs déjà présente sur une grande partie du territoire sans sembler y poser de problème écologique.

De 2012 à 2015 l'équipe de La Morinière s'est donc employée, avec l'appui scientifique de l'INRA PACA (N. Ris et P. Kreiter), à explorer l'intérêt de lâchers de *Rhizobius lophantae* contre la cochenille

sur cassis, d'abord par des expériences en boîte d'élevage pour s'assurer des capacités de prédation de l'auxiliaire, puis en conditions semi-contrôlées sur des buissons ensachés dans de la toile insect-proof, puis en plein champ en cherchant à définir la période des lâchers et le nombre d'individus à introduire. A l'issue de ces travaux, qui ont donné des résultats mitigés mais toutefois encourageants, de nombreuses questions sont restées en suspens, notamment l'efficacité de lâchers à une dose économiquement acceptable, ou la technique de mise en œuvre des lâchers eux-mêmes pour que la méthode soit supportable pour le producteur de cassis. L'appréciation des capacités de dispersion des cochenilles *Rhizobius* au cours de ces travaux préliminaires a par ailleurs permis de proposer un dispositif d'étude pour une expérimentation de l'auxiliaire en vraie grandeur, qui sera exploité dans les expérimentations multisites menées dans le projet RhizoDia.

La famille des cochenilles diaspinées regroupe 2 595 espèces, souvent généralistes et capables d'affecter une diversité de ligneux. Signalées en recrudescence sur cultures fruitières à l'occasion des groupes de travail nationaux, certaines espèces sont ainsi à l'origine de dépérissements importants et difficiles à réguler, conduisant parfois jusqu'à l'arrachage de parcelles, notamment en système AB. On peut ainsi citer la cochenille blanche du mûrier sur cassis mais aussi sur pêcher, cerisier et agrumes, la cochenille rouge du poirier sur prunier, le pou de San José sur pommier, prunier, poirier et cerisier, ou la cochenille virgule du pommier sur abricotier ou noyer.

Au-delà du pathosystème particulier directement visé ici (*Pseudaulacaspis pentagona* sur cassis) le projet RhizoDia visait aussi le transfert de la démarche (méthode de protection et méthodologie d'expérimentation) vers d'autres cultures pérennes affectées par des cochenilles diaspinées de manière économiquement préjudiciable.

Afin d'apporter de la robustesse aux résultats obtenus, et dans l'espoir de lever les incertitudes constatées dans les essais préliminaires, c'est à travers une expérimentation multisites que le projet RhizoDia est mené, dans les bassins de production du Val-de-Loire et de Bourgogne. Les expérimentations sont réalisées par la station La Morinière et la Chambre d'Agriculture de Côte d'Or, en collaboration avec l'INRA de Sophia Antipolis pour la caractérisation génétique des auxiliaires, avec la société KOPPERT pour l'optimisation de la ressource en cochenilles *Rhizobius*, et avec le CTIFL pour la coordination du projet.

Celui-ci s'articule autour de trois thématiques : l'évaluation pluriannuelle de l'efficacité de la méthode de protection, l'appréciation de la capacité d'hivernation de l'auxiliaire et l'optimisation de la méthode des lâchers. Une analyse critique des résultats est réalisée en dernière année d'étude, en intégrant les aspects climatiques et les interventions phytosanitaires.

B. Approche scientifique et techniques utilisées

1) EVALUATION MULTISITES ET PLURIANNUELLE DE L'EFFICACITE DE LACHERS DE RHIZOBIUS LOPHANTAE CONTRE PSEUDAULACASPIIS PENTAGONA SUR CASSIS

Il s'agit ici de faire la preuve de concept, selon une démarche expérimentale multisites, de l'efficacité d'un schéma de lutte augmentative contre la cochenille sur cassis, par introduction de l'auxiliaire *Rhizobius lophantae*. L'idée étant de parvenir à décroître les populations de cochenilles, tout en restant dans des limites économiquement acceptables quant au coût de mise en œuvre de cette protection.

Au-delà de cet objectif technique, ce travail est aussi l'occasion de valider une méthodologie d'expérimentation suffisamment robuste, spécifiquement adaptée à la problématique posée : l'évaluation de la qualité du contrôle d'une cochenille – qui comme d'autres insectes piqueurs-suceurs se caractérise par un développement en foyers – par des lâchers d'un auxiliaire en milieu ouvert.

- **Dispositif expérimental et choix des sites d'étude**

Conformément à ce qui était prévu, l'étude a été mise en place simultanément sur plusieurs sites en conditions de production, localisés sur les bassins Val-de-Loire et Bourgogne : trois en Maine-et-

Loire, un dans la Sarthe et un en Côte d'Or. Ces parcelles sont mises à disposition pour le projet par des producteurs de cassis ; ce sont donc les producteurs eux-mêmes qui se chargent des opérations culturales et de l'application des traitements phytosanitaires.

Le dispositif utilisé s'appuie sur les enseignements des travaux préliminaires menés sur le sujet par La Morinière, qui ont permis d'apprécier la capacité d'extension spatiale de l'auxiliaire et de définir ainsi une **distance tampon minimale entre modalités**.

Chacun des sites comprend ainsi un couple de parcelles, qui sont le support de 3 modalités :

- ❖ **Une parcelle conduite sous protection par lâchers de *Rhizobius lophantae***. Cette modalité sera désignée ici « **INTRO** »
- ❖ **Une parcelle conduite sous stratégie classique de protection insecticide contre la cochenille** (référence chimique producteur), sur laquelle un bloc témoin d'environ 50 ares est maintenu sans protection anti-cochenille pour valoir de **témoin non traité**. La référence chimique sera désignée ici « **REF(+)** » et le témoin non traité « **REF(-)** ».

La parcelle INTRO, comme le témoin REF(-), ne reçoivent sur les 3 années de l'étude, ni interventions anti-cochenille, ni insecticides connus pour leur toxicité vis-à-vis des coccinelles ; seuls devraient donc être tolérés, en matière de lutte contre les ravageurs, le Bt, le pyrimicarbe (aphicide) et le pyridabène (acaricide).

Afin d'isoler l'efficacité des auxiliaires introduits, **la parcelle support de la modalité INTRO est distante d'au moins 500 m des modalités REF(+) et REF(-)**.

Pour sélectionner les sites adéquats, les expérimentateurs se sont attachés à respecter les critères qui avaient été définis au départ dans le souci d'éviter au mieux les biais susceptibles d'interférer sur les résultats : pression cochenille avérée et si possible homogène sur la parcelle ; plantations jeunes et d'âge équivalent pour le couple de parcelles ; degrés d'infestation équivalents. Toutefois, dans la pratique le choix a dû s'effectuer selon un compromis entre cet « idéal », la réalité de terrain et les facilités de coopération des producteurs de cassis ; ce choix a conduit aux 5 sites décrits dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Caractérisation des 5 sites d'étude

Site Localisation Variété	Parcelle	Distance entre parcelles	Date plantation	Vigueur des arbustes	Nature de l'infestation
SITE 1 Villevêque (49) <i>Blackdown</i>	REF	700 m	2011	Vigueur moyenne (1,20 m)	Foyers d'infestation sporadiques, peu de buissons contaminés, infestation légère
	INTRO		2012	Vigueur moyenne (1,20 m)	Foyers d'infestation réguliers et conséquents
SITE 2 Villevêque (49) <i>Noir de Bourgogne</i>	REF	5 300 m	2011	Vigueur moyenne (1,20 m)	Foyers importants sur jeunes rameaux. Plus de la moitié des arbustes touchés
	INTRO		2009	Vigueur forte (1,70 m)	Infestations en hauteur sur des foyers très réduits et ponctuels
SITE 3 Chambellay (49) <i>Noir de Bourgogne</i>	REF	1 000 m	2011	Vigueur moyenne (1,20 m)	Plusieurs petits foyers avec des infestations faibles à moyennes
	INTRO		2010	Vigueur moyenne (1,20 m)	Foyers réguliers avec une infestation moyenne à sévère
SITE 4 Thorée-Les-Pins (72) <i>Noir de Bourgogne</i>	REF	500 m	2010	Vigueur faible (1 m maxi). Peu de renouvellement de bois	Foyers très sporadiques avec infestation très sévère, nombreux pieds morts
	INTRO		2010	Vigueur faible (1 m maxi). Peu de renouvellement de bois	Foyers très sporadiques avec infestation très sévère, nombreux pieds morts
SITE 5 Merceuil (21) <i>Noir de Bourgogne</i>	REF	1 200 m	2010	Vigueur moyenne (1,20 m)	Alternance de séries de pieds atteints à très atteints et de pieds sains
	INTRO		2010	Vigueur faible. Très peu de renouvellement de bois	Foyer central d'infestation avec presque tous les pieds atteints

Sur chacun de ces sites, un ensemble d'opérations sont menées selon un protocole commun aux équipes d'expérimentation Val-de-Loire et Bourgogne, afin de permettre un traitement multisites des résultats. Le parti a été pris de n'apporter aucune modification à ce protocole sur les 3 années du projet, pour conforter les conclusions et intégrer les effets annuels.

- **Réalisation des lâchers de *Rhizobius lophantae***

Les lâchers sont réalisés sur la parcelle d'introduction sur une zone préalablement délimitée de 0,5 à 0,6 ha. En s'appuyant sur les travaux préliminaires de La Morinière, il a été convenu lors du 1^{er} comité de pilotage de procéder à **deux lâchers sur la saison, au démarrage de chacun des cycles d'essaimage de la cochenille**, soit sur les périodes fin mars-mi-avril et fin juillet. La dose des lâchers a été fixée par consensus à **3 000 individus par site et par période de lâchers** (compromis le plus raisonnable entre les résultats passés et la contrainte économique), soit l'équivalent pour un lâcher d'1,5 à 2 coccinelles par pied. La méthode de mise en œuvre des apports de *Rhizobius* sera explicitée plus loin (§ 3) *Optimisation des lâchers*).

Préalablement aux lâchers, trois types d'observations sont relevées sur les modalités INTRO et REF(-) pour caractériser l'état initial des parcelles concernant la pression de la cochenille. Elles seront répétées ensuite chaque année sur les 3 modalités (INTRO, REF(-) et REF(+)), à plusieurs reprises dans l'année.

- **Relevé des indicateurs de présence de la cochenille *Pseudaulacaspis pentagona***

Appréciation du degré d'infestation des buissons

Les observations sont réalisées sur 4 blocs de 50 buissons notés individuellement, selon une échelle de 0 à 3 définie d'un commun accord et standardisée par le biais de photographies (voir **Figure 1**) et d'un ensemble d'indicateurs, ceci dans le souci d'éviter les biais liés à l'observateur : 0=buisson sain, 1=début d'infestation, 2=infestation installée, 3=infestation importante. Le degré d'infestation est évalué chaque année au démarrage de la végétation.

Figure 1 : Echelle de notation visuelle du degré d'infestation des buissons

0	1	2	3
			
Arbuste sain Sans trace d'infestation	Début d'infestation 1 rameau touché à sa base	Infestation installée 1 ou 2 rameaux touchés sur leur longueur	Infestation importante Plus de 2 rameaux touchés sur toute leur longueur

Suivi des populations de *Rhizobius lophantae* et des prédateurs ou parasitoïdes de la cochenille

Rhizobius lophantae étant une espèce présente à l'état naturel sur le territoire, l'objectif du suivi ne peut aller au-delà de celui d'établir le lien entre l'évolution des populations de cette espèce quelle qu'en soit l'origine, et de celle des populations de cochenilles. Par sa méthode de mise en œuvre, ce

suivi est aussi l'occasion d'apprécier la biodiversité fonctionnelle dans l'environnement des cassissiers infestés.

La méthode utilisée est celle du **frappage sur parapluie japonais**, appliquée à 20 buissons répartis sur chacune des parcelles d'essai, repérés en début d'année 1 et choisis sur le critère d'une infestation de degré 3. Les individus de *R. lophantae* collectés sont dénombrés puis repositionnés dans la végétation, sauf un échantillon conservé dans l'alcool qui donnera lieu à une caractérisation par marquage moléculaire. La présence d'autres auxiliaires connus est notée et en cas de doute les individus sont conservés en vue d'une identification à l'espèce. Ce suivi a été réalisé à 13 reprises le long du projet.

Suivi des populations de *Pseudaulacapsis pentagona*

Le suivi des populations de cochenilles est réalisé avant chaque lâcher et en fin de saison, sur un échantillon de 20 rameaux prélevés sur des buissons infestés répartis sur la parcelle. Ces rameaux, qu'on essaie de choisir suffisamment jeunes (1 ou 2 ans) pour ne pas risquer de porter d'encroûtements anciens de boucliers de cochenilles, sont observés depuis leur apex vers leur base, jusqu'à dénombrer 50 boucliers de *P. pentagona*. Sur ces 50 boucliers sont relevés le nombre de cochenilles vivantes, de cochenilles mortes, de même que le nombre de boucliers vides ; la longueur de la portion du rameau portant les 50 premiers boucliers est relevée, ainsi que son diamètre, afin de calculer la densité de cochenilles vivantes par unité de surface.

La question de l'indicateur à retenir pour apprécier la prédation par *R. lophantae* s'est posée. Au contraire d'un test d'efficacité de produit phytosanitaire, le pourcentage de cochenilles mortes n'est pas pertinent ici, puisque les cochenilles dévorées au stade larvaire pendant l'essaimage ne peuvent conduire à des adultes sous bouclier. Les boucliers vides sont quant à eux le reflet d'une variété d'évènements qui peuvent inclure la prédation, mais aussi l'action de parasitoïdes, de champignons entomophages, ou la mort naturelle de l'adulte en fin d'essaimage ; cet indicateur ne peut donc pas non plus être retenu. Les résultats suivants s'appuieront donc sur l'indicateur « **densité de cochenilles vivantes** », qui semble le plus approprié pour apprécier le résultat de cette prédation, quoi qu'il soit à lui seul encore insuffisant.

Une réflexion a été menée au sein du consortium pour décider du traitement statistique à appliquer à ces données, dont la distribution, très loin d'être normale, ne satisfait pas les exigences de l'ANOVA. Sur proposition de l'Inra le traitement par le Modèle Linéaire Généralisé a été adopté, puis sa mise en œuvre a été affinée avec entre autres l'appui scientifique de F. Da Costa (chaire de statistique de Bordeaux Sciences Agro), pour aboutir à un traitement par le GZLM, par ajustement à une loi de quasi-Poisson et utilisation de la fonction de lien Log.

- **Caractérisation moléculaire des auxiliaires et des populations de *Rhizobius lophantae***

Cette activité, mise en œuvre par l'Inra PACA avec l'appui de stagiaires recrutés pour le projet, a pour finalité : i) d'essayer de comprendre d'où proviennent les *R. lophantae* collectés sur le terrain (descendance des individus lâchés ou autres origines) ; ii) d'identifier les autres ennemis naturels susceptibles d'interagir, positivement (synergie) ou négativement (compétition, prédation intra-gilde) avec les *R. lophantae* lâchés et leurs éventuels descendants.

Pour les deux cas, la méthode utilisée est la même, à savoir le **séquençage de la portion du génome mitochondrial qui code pour la cytochrome c oxydase (COI)**. Les séquences obtenues permettent d'identifier les espèces par comparaison avec celles déjà entrées dans la base de données GeneBank, en caractérisant leur variabilité génétique par l'établissement d'arbres phylogénétiques (méthode du Neighbor-Joining, quantification des distances évolutives par la méthode de Kimura à deux paramètres). Cette approche se développe rapidement dans le domaine de l'entomologie, elle est bien maîtrisée par l'Inra de Sophia Antipolis, et elle a l'avantage de présenter un coût raisonnable.

Plus de 130 séquençages ont été réalisés dans le cadre du projet RhizoDia, soit à partir des individus collectés lors des frappages, soit d'individus provenant d'élevages.

2) APPRECIATION DES CAPACITES D'HIVERNATION DE RHIZOBIUS LOPHANTAE DANS LE CONTEXTE CLIMATIQUE DU VAL-DE-LOIRE

Si elle s'avère efficace, l'application de la méthode de lutte par des lâchers de *Rhizobius* risque de rester limitée par le coût de fourniture de l'auxiliaire à des doses efficaces. Un maintien suffisamment pérenne de ces coccinelles dans les zones de lâchers, qui permettrait de réduire la fréquence des apports, serait le gage d'un meilleur contrôle du ravageur (installation précoce dans la culture en relais des lâchers), mais aussi d'une meilleure acceptation de la méthode par les professionnels et donc d'un développement sur le terrain.

L'objectif de ce travail est donc d'une part de vérifier les capacités de l'auxiliaire à survivre aux conditions hivernales des zones de production, et d'autre part de tester des moyens de faciliter son maintien par l'installation de divers types d'abris dans les parcelles.

Ce travail a démarré en début d'hiver 2016/17.

Survie hivernale sous forme d'œufs

R. lophantae pond sous les boucliers de femelles de cochenille, ce qui permet à la larve néonate de s'alimenter à partir des œufs de cochenille qui sont ses proies privilégiées. Il s'agit ici par de simples tests d'émergence d'évaluer la capacité de la coccinelle à survivre sous forme d'œufs sous les boucliers formés à l'automne : des rameaux infestés sont donc prélevés en cours d'hiver sur les sites d'étude, puis placés en boîte d'émergence.

Evaluation de l'intérêt d'abris en place sur les parcelles pour faciliter l'hivernation de Rhizobius

Trois types d'abris pouvaient être envisagés : les « cabanes à insectes », les abris artisanaux en bambou et les bandes pièges. Un travail préliminaire réalisé en 2014 par la station La Morinière a orienté ce choix vers les **bandes pièges** (à raison de 20 bandes de carton ondulé distribuées sur les parcelles d'introduction et disposées autour de rameaux infestés) et les **pièges-bambou** (fagots de sections de tiges de bambou déposés au pied des plants de cassis à raison de 10 plots par parcelle). Les abris sont posés à l'automne et inspectés en fin d'hiver.

3) OPTIMISATION DE LA METHODE DE LACHERS

L'optimisation des méthodes de lâchers est un facteur de succès dans l'efficacité des stratégies de biocontrôle basées sur l'apport d'auxiliaires. Elle passe par la recherche des quantités d'individus à apporter, du nombre et de la répartition des points de lâchers, de la fréquence des apports, et du conditionnement sous lequel les effectuer. Elle peut aussi aller jusqu'à l'exploitation de plantes relais ou l'apport de substrats nutritifs en accompagnement de la phase d'installation des auxiliaires.

Concernant les facteurs dose et fréquence, la définition du projet s'appuie déjà sur des travaux effectués antérieurement sur le sujet par La Morinière, et s'impose pour cadre une limite dans le coût de la protection ; ces facteurs ne feront donc pas ici l'objet d'une optimisation supplémentaire. La piste de l'apport des auxiliaires avec leur support d'élevage a quant à elle été écartée d'entrée par les expérimentateurs face au risque d'introduction de nouveaux ravageurs dans la culture.

Dans le cadre de ce projet, il n'a donc été retenu sur ce point que de s'intéresser à l'aspect **praticité des lâchers et conditionnement des auxiliaires**, dans un double objectif de gain de temps d'application pour le producteur et d'optimisation de la survie et de la dispersion des coccinelles.

Mise en œuvre des lâchers

Après concertation entre les différents partenaires du projet, l'option d'un lâcher généralisé sur l'ensemble de la parcelle a tout de suite été écartée. En effet, cette méthode induirait un temps de lâcher considérable et un coût en main d'œuvre qui ne pourrait être assumé par le producteur,

même si elle aurait permis d'homogénéiser la répartition des auxiliaires au sein de la parcelle. Le choix s'est donc porté sur un lâcher par points d'introduction (**15 par zone de lâchers de 0,5 à 0,6 ha dans les parcelles d'introduction, à raison de 200 individus par point**) permettant de couvrir d'un point de vue théorique la parcelle dans son ensemble. Bien que la répartition des auxiliaires ne soit pas optimale au sein même de la parcelle, leur capacité de dispersion doit permettre de pallier cette hétérogénéité de lâcher.

Choix du conditionnement

Un packaging amélioré a été demandé d'entrée au partenaire KOPPERT à l'occasion du 1^{er} comité de pilotage du projet : ainsi, les auxiliaires sont aujourd'hui fournis dans **un emballage papier contenant 200 individus et munis d'une bague permettant de le fixer au pied du plant**. Ceci dans le but d'éviter tout risque de perte par le vent et de laisser le temps aux auxiliaires de sortir de l'emballage pour se disperser dans la culture. Ce conditionnement représente par sa praticité une évolution par rapport aux manipulations nécessaires dans les expériences passées (réception des individus en cartonnets, déconditionnement puis distribution dans des filtres à café disposés au pied des cassissiers), et un gain considérable dans le temps de pose.

On notera toutefois qu'en raison d'un mauvais réglage de l'outil d'ensachage d'Entocare (fournisseur des Rhizobius pour la société KOPPERT), des hétérogénéités d'effectifs dans les sachets ont été constatées sur la première série de lâchers ; ce défaut, corrigé depuis, ne s'est plus reproduit.

C. Résultats obtenus

- Caractérisation de l'état initial des parcelles d'essai

Le tableau suivant reprend l'appréciation visuelle des parcelles d'essai, telle que qualifiée globalement lors du choix des sites, et la met en relation avec le relevé des indicateurs de pression du ravageur retenus dans le projet, établi au « point 0 » en avril 2016 :

Tableau 2 : Etat initial des parcelles selon les les indicateurs « densité de cochenille vivante par dm² » et « degré d'infestation des buissons » - Point 0 avril 2016

Site Localisation Variété	Parcelle	Appréciation globale de l'infestation	Degré d'infestation des buissons : fréquence de buissons de note > 2		Densité de cochenilles vivantes par dm ²	
SITE 1 Villevêque (49) Blackdown	REF	Foyers d'infestation sporadiques, peu de buissons contaminés, infestation légère	3%	8% (A)	44	37 (A)
	INTRO	Foyers d'infestation réguliers et conséquents	9%		30	
SITE 2 Villevêque (49) Noir de Bourgogne	REF	Foyers importants sur jeunes rameaux. Plus de la moitié des arbustes touchés	29%	23% (BC)	51	40 (A)
	INTRO	Infestations en hauteur sur des foyers très réduits et ponctuels	11%		30	
SITE 3 Chambellay (49) Noir de Bourgogne	REF	Plusieurs petits foyers avec des infestations faibles à moyennes	21%	30% (C)	102	101 (B)
	INTRO	Foyers réguliers avec une infestation moyenne à sévère	45%		99	
SITE 4 Thorée-Les-Pins (72) Noir de Bourgogne	REF	Foyers très sporadiques avec infestation très sévère, nombreux pieds morts	20%	17% (B)	167	134 (B)
	INTRO	Foyers très sporadiques avec infestation très sévère, nombreux pieds morts	16%		101	
SITE 5 Merceuil (21) Noir de Bourgogne	REF	Alternance de séries de pieds atteints à très atteints et de pieds sains	60%	76% (D)	130	193 (B)
	INTRO	Foyer central d'infestation avec presque tous les pieds atteints	93%		256	

Les lettres majuscules entre parenthèses indiquent le classement des sites en groupes statistiques homogènes (test de Kruskal-Wallis)

Au démarrage du projet, avant les 1^{ers} lâchers, les parcelles d'introduction qui, rappelons-le, sont distantes d'au moins 500 m des parcelles de référence, ont globalement une pression cochenille inférieure, d'après l'indicateur « densité de cochenilles vivantes par dm² » (moyenne de 124 individus/dm² pour les parcelles INTRO, contre 144 pour les parcelles de référence). Cette différence établie tous sites confondus n'est toutefois pas significative du point de vue statistique, car elle masque des divergences de situation entre sites, avec notamment une situation inversée pour le site 5 qui démarre avec une parcelle destinée aux introductions nettement plus infestée.

Globalement, **sur la base de cet indicateur, les sites 1 et 2 démarrent avec une pression du ravageur relativement faible et de niveau comparable, des effectifs de cochenilles plus élevés sont dénombrés sur les sites 3 et 4 et le site 5 a la pression cochenille la plus forte.**

A noter que l'indicateur « degré d'infestation » établi par notation visuelle donne un état initial nuancé par rapport à celui-ci, puisque le site 4 se retrouve en position 2 avec une infestation relativement faible, alors que les parcelles destinées aux lâchers semblent plus infestées dans 3 sites sur 5 (sites 1, 3 et 5).

Il est intéressant de mettre ces incohérences en regard de l'appréciation globale des parcelles établie de manière purement visuelle préalablement au projet. Ainsi sur le site 4, signalé comme caractérisé par des foyers sporadiques mais sévèrement touchés, les rameaux sont volontairement prélevés sur ces buissons très infestés, ce qui conduit à une surestimation de la pression du ravageur par l'indicateur « densité de cochenilles ». En effet, si les buissons repérés pour la notation des infestations sont choisis sciemment dans une zone infestée, ils sont toutefois sélectionnés sous forme d'un bloc de 50 pieds qui inclue des buissons de degrés d'infestation variés ; les rameaux prélevés pour le dénombrement des cochenilles sont quant à eux volontairement choisis sur des buissons particulièrement infestés, ce qui pourrait tendre à surestimer la pression dans le cas de foyers concentrés plutôt que diffus. **De ce point de vue, les sites qui pourraient être ici les plus robustes sont les sites 1, 3 et 5, qui sont signalés comme présentant des foyers réguliers.** Ceci est corroboré par l'analyse de la corrélation entre les deux indicateurs pour cette première date de mesure, avec un coefficient de détermination R² qui passe à 0,92 en ne considérant que ces 3 sites, contre 0,65 en incluant les 5.

- **Evaluation de l'efficacité de la méthode de protection**

Le démarrage du cycle de la cochenille a été détecté chaque année par sondage sur des échantillons de rameaux afin de déceler le début des pontes pour chacune des deux générations annuelles et de positionner correctement les lâchers ; les dates-clés du site sont données sur le tableau suivant :

Tableau 3 : Phases-clé du cycle de la cochenille sur la zone d'étude et positionnement des lâchers

STADES-CLES	2016		2017		2018	
	1 ^{ère} génération	2 ^{ème} génération	1 ^{ère} génération	2 ^{ème} génération	1 ^{ère} génération	2 ^{ème} génération
Début des pontes	04/05/16	08/08/16	24/04/17	20/06/2017	25/04/18	20/07/18
Début de l'essaimage	28/05/16	22/08/16	19/05/17	03/08/17	22/05/18	31/07/18
Fin de l'essaimage	31/08/16	31/08/16	02/06/17	21/08/17	04/06/18	10/08/18
Lâchers de Rhizobius	04/05/16	27/07/16	27/04/17	27/07/17	25/04/18	26/07/18

De manière générale le cycle du ravageur s'est caractérisé sur les 3 années du projet par une forte pression en 2016, une raréfaction de la cochenille en 2017 et une remontée des populations en 2018.

Appréciation de l'efficacité des lâchers par le dénombrement des cochenilles sur échantillons de rameaux

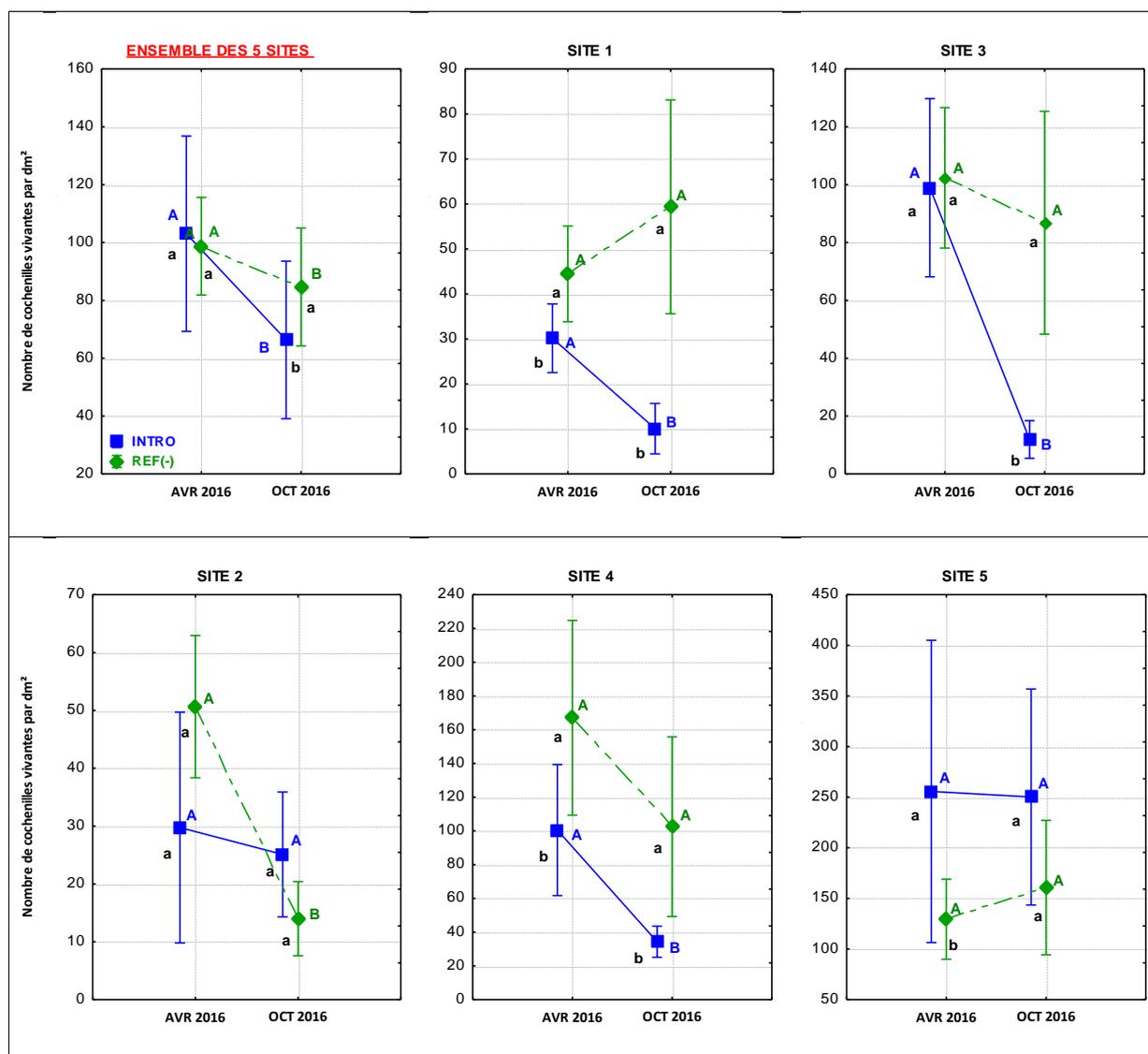
Sur les deux premières années du projet, deux constantes se retrouvent sur chacun des sites sur la base de l'indicateur « densité de cochenilles vivantes » : en 2016 un fort pic des populations de cochenilles entre les observations d'avril et juillet, et en mars 2017 une raréfaction généralisée des cochenilles vivantes sur les rameaux observés, et ceci quelle que soit la modalité.

Par rapport à l'état initial en début d'expérience de l'année 1, c'est ainsi, lors de la première série d'observations de l'année 2 (mars 2017), qu'une régression globale de 69 % de la densité de cochenilles vivantes est observée, tous sites confondus, par rapport à l'état initial (avril 2016), sans distinction significative entre parcelles d'introduction et références non traitées. Cet état se maintiendra jusqu'en fin d'année 2017.

Aucun facteur n'a pu être mis en évidence pour expliquer cette raréfaction du ravageur, ni du point de vue des pratiques phytosanitaires ni du climat.

Toutefois, si on ne considère que l'année 1, les résultats sont plus contrastés et semblent en faveur de la méthode de lutte biologique testée. Ainsi, après deux séries de lâchers (génération printanière et génération estivale), **une régression des cochenilles vivantes de 48 % est constatée sur les parcelles d'introduction, contre seulement 14 % sur les témoins**, entre les comptages d'avril 2016 et ceux d'octobre de la même année. (Graphique 1).

Graphique 1 : Evolution de l'indicateur « densité de cochenilles vivantes par dm² » entre avril et octobre 2016



Significativité par la statistique de Wald (analyse GZLM) ; test de Kruskal Wallis en post-hoc (A, B : groupes homogènes entre dates d'observation ; a, b : entre modalités pour une date donnée)

Ceci masque toutefois une variabilité de comportement importante entre sites :

- Régression très significative de la densité de cochenilles vivantes sur les parcelles d'introduction des sites 1 et 3 (-66 % et -88 % respectivement), d'autant plus forte que le niveau d'infestation de départ est élevé, et ceci alors que les populations stagnent ou augmentent dans les témoins
- Régression très significative (-66 %) sur le site 4 relativement infesté d'après cet indicateur, mais également baisse sensible (-39 %) quoique statistiquement non significative, sur la parcelle de référence non traitée
- Stagnation des effectifs de cochenilles vivantes par cm^2 sur les 2 parcelles du site 5, le plus sévèrement infesté
- Et enfin comportement atypique du site 2, peu infesté, où les densités régressent significativement sur la parcelle non traitée (-72 %) alors qu'elles ne baissent que de 16 % dans la zone des lâchers. On apprendra toutefois a posteriori que la parcelle REF(-) a reçu trois applications d'huiles minérales à 10 jours d'intervalle au printemps 2016 (sans qu'on ne sache si certaines ont été lessivées), puis (étrangement) une quatrième application en août, ce qui pourrait être un élément d'explication.

On a donc en fin de saison 2016, sur 3 sites sur 5 et sur le pool de rameaux observés, une régression très significative des populations de cochenilles par rapport aux parcelles non traitées contre le ravageur (-75 %), et bien plus nette que ce que laisse entrevoir le traitement multisites des résultats. Il est cependant délicat d'établir le lien entre cette évolution et la seule prédation par les *Rhizobius* introduits, comme on le verra plus loin.

L'année 2017 est marquée par une stagnation des populations de cochenilles dénombrées sur les rameaux prélevés, sur l'ensemble des sites 1 à 4 et sans distinction entre modalités.

Seul le site 5 se distingue par une remontée des populations en juillet sur la parcelle d'introduction (+112 % entre mars et juillet 2017) et une baisse drastique de cet indicateur à cette même date sur la parcelle dite de référence (-88 %) (voir les courbes d'évolution par site portées en [Annexe](#)). Il faut toutefois noter que le calendrier de traitements appliqué, transmis a posteriori par le producteur, indique sur cette parcelle une intervention avec une huile blanche le 26/03/17 suivie d'une application de Movento le 09/05/17 (insecticide accordé en dérogation en 2017 contre la cochenille sur cassis), qui pourraient avoir montré une efficacité.

Le site 5 doit donc être exclu de l'analyse multisites pour cette deuxième année d'étude, ce qui conduit en fin d'année 2017 à un classement des modalités légèrement en faveur des modalités « INTRO » et « REF(+) » (4 cochenilles en moyenne par dm^2 contre 12 cochenilles/ dm^2 pour la modalité REF(-)), sans qu'il soit permis d'en tirer de conclusion puisqu'on se situe dans tous les cas à des niveaux très faibles.

Sur demande de son propriétaire, la parcelle d'introduction du site de Merceuil en Bourgogne sera arrachée en fin d'année 2017 avec l'accord des partenaires du projet, car trop sévèrement infestée par la cochenille. La dernière année d'étude se poursuit donc sur 4 sites au lieu de 5.

L'année 2018 démarre avec une situation à nouveau très encourageante pour la méthode des lâchers de *Rhizobius*, puisqu'au global, si sur tous les sites le niveau des populations est remonté au mois de mars 2018, les parcelles d'introduction se distinguent par des effectifs de cochenilles vivantes significativement plus faibles (29 individus/ dm^2) que ceux dénombrés dans les modalités REF(-) et REF(+) qui sont de niveau équivalent (74 individus/ dm^2).

Mais cet espoir ne se maintient pas, puisqu'on assiste à une remontée des populations du ravageur sur les sites d'introduction, d'abord « relativement » douce (+58 % jusqu'en juillet) puis accélérée après le 2nd essaimage (+310 % entre juillet et septembre), pour aboutir à une situation finale où la modalité INTRO se distingue par des valeurs de présence du ravageur très significativement plus élevées (101 individus/ dm^2 contre 74 en moyenne pour REF(-) et REF(+)).

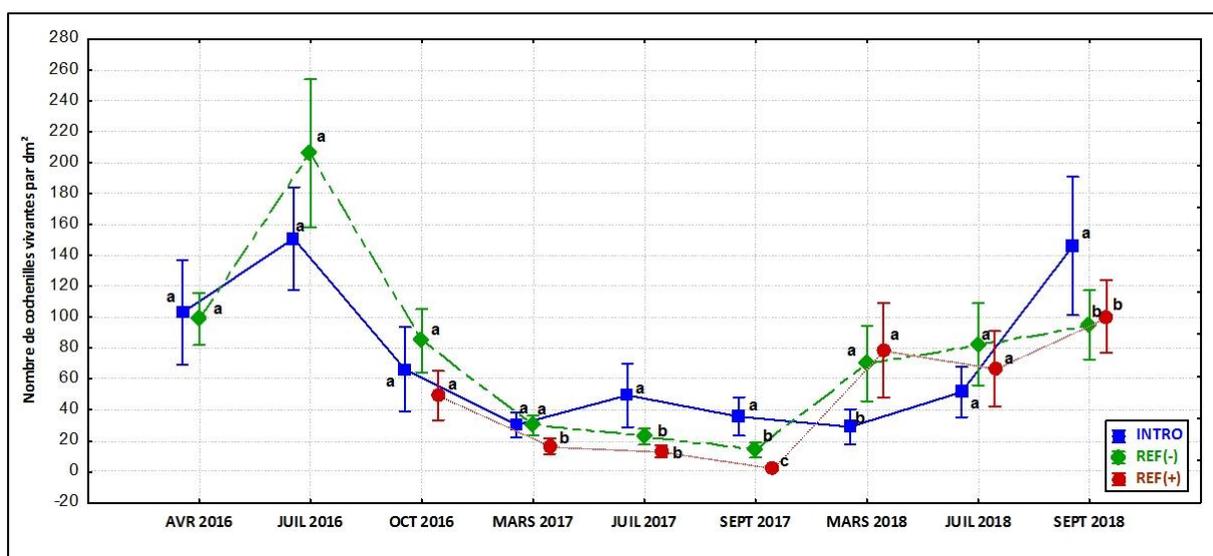
A noter que ces résultats sont fortement liés au comportement des sites 1 et 2, puisque nous ne disposons pas de jeu de données pour le site 3 à la date de septembre, ce qui aurait peut-être pu les

nuancer, et que le site 4 est quant à lui le seul où les populations restent stables sur la parcelle d'introduction, tandis qu'elles augmentent sur la parcelle non traitée (voir les courbes d'évolution par site en [Annexe](#)).

On se retrouve donc en fin de projet avec une situation qui, sur la base de cet indicateur, s'est empirée sur les sites d'introduction (évolution des populations de 54 % depuis le point 0) alors qu'elle a stagné sur les modalités REF(-) et REF(+). On notera d'ailleurs que ces dernières ne se distinguent que rarement sur les 3 années de l'étude, ce qui va dans le sens d'une relative inefficacité des anti-cochenilles spécifiques homologués sur l'usage cassis.

Le [graphique 2](#) illustre l'évolution des populations de cochenilles sur la durée du projet. Le détail par site est donné en Annexe.

Graphique 2 : Evolution de la densité moyenne de cochenilles vivantes par dm², tous sites confondus, d'avril 2016 à septembre 2018



Significativité par la statistique de Wald (analyse GZLM) ; test de Kruskal Wallis en post-hoc (a, b, c : groupes homogènes pour une date donnée)

Appréciation de l'efficacité par la notation visuelle de l'infestation des buissons

Les notations d'infestation des buissons sont réalisées chaque année avant la 1^{ère} série de lâchers, selon l'échelle de notation de 0 à 3 définie au départ, à laquelle on peut ajouter la notation des buissons morts, qui apparaîtront en fin d'année 2 sur le site 5 de Merceuil en Bourgogne. La notation 2016 est le point 0 avant la mise en œuvre des protocoles de lâchers.

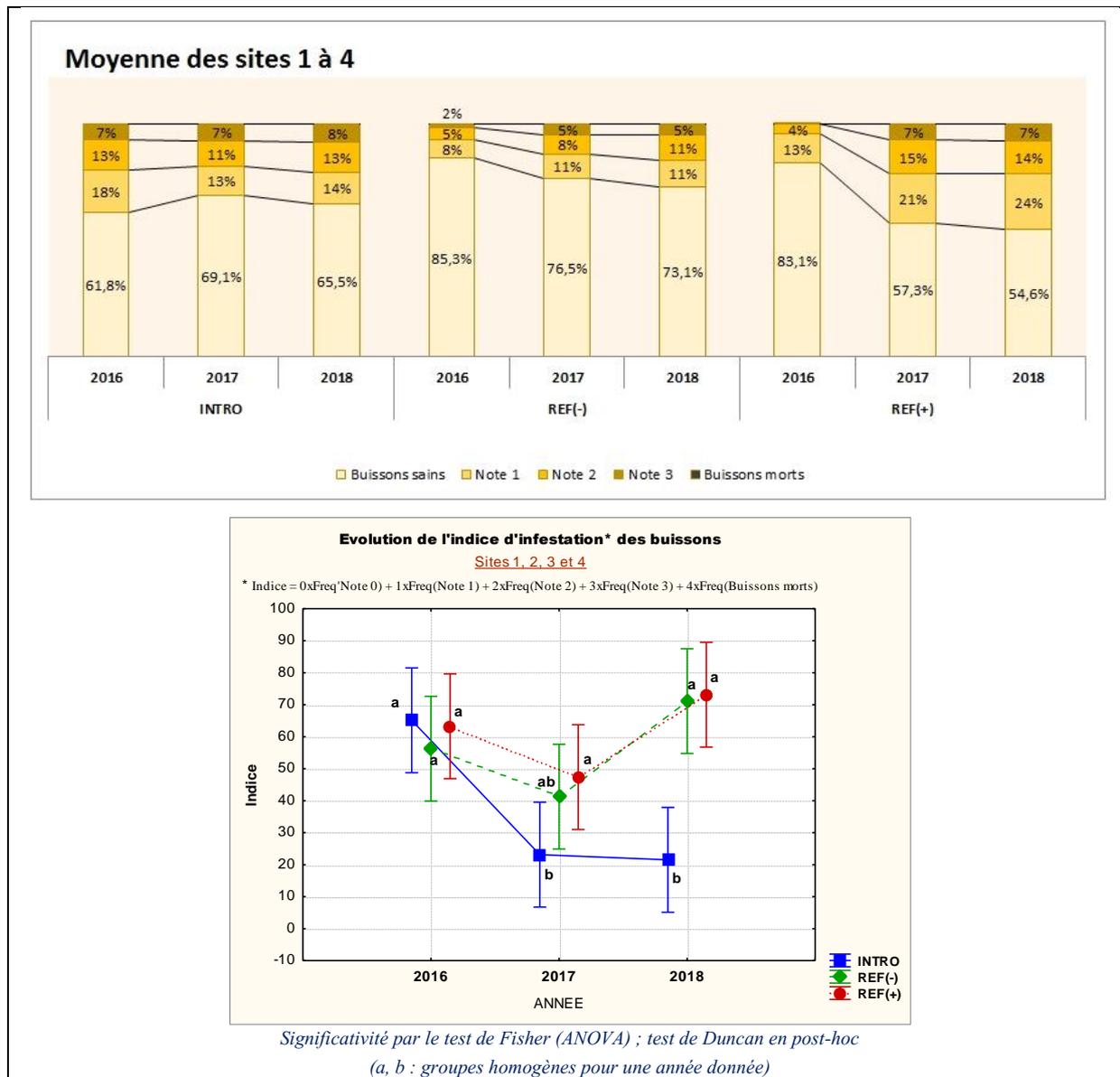
L'évolution des infestations appréciée selon cet indicateur est figurée pour chacun des sites en [Annexe](#).

Force est de constater que la parcelle d'introduction du site 5 – qui était déjà la plus fortement infestée en début d'expérience – a vu sa situation empirer de manière sévère, alors que la parcelle dite de « référence » (avec les biais dus aux traitements évoqués plus haut) s'est stabilisée, après une année 2 démarrée avec une très forte infestation. L'état observé en mars 2017 n'est d'ailleurs pas cohérent avec la densité de cochenilles dénombrées à cette même époque, qui avait considérablement régressé comme sur l'ensemble des sites.

Si on exclue le site 5, le traitement multisites des données d'infestation aux printemps 2016, 2017 et 2018, montre que la situation s'est, de manière générale, au pire stabilisée et au mieux nettement améliorée sur les parcelles de lâchers, et ceci de manière significative par rapport aux modalités REF(-) et REF(+), que l'analyse statistique classe dans le même groupe au dernier point d'observation de mars 2018 ([Graphique 3](#)). Ceci est du reste cohérent avec les données de l'indicateur « densité de cochenilles vivantes » à cette même date.

Il semble donc qu'on puisse conclure qu'après deux années de lâchers, la situation se soit plutôt assainie dans les parcelles d'introduction, en tout cas bien mieux que sous l'effet des traitements contre la cochenille. Toutefois, le projet s'étant achevé en fin 2018, **nous ne disposons pas de données d'infestation pour le printemps 2019, ce qui ne nous permet pas d'apprécier si cette situation s'est maintenue, voire améliorée, ou si elle s'est dégradée comme l'indiquerait le suivi des populations de cochenilles sur rameaux infestés.**

Graphique 3 : Evolution du degré d'infestation des buissons sur les sites 1 à 4 d'avril 2016 à mars 2018



- **Relation entre l'évolution de la pression de la cochenille et la mise en œuvre des lâchers de Rhizobius**

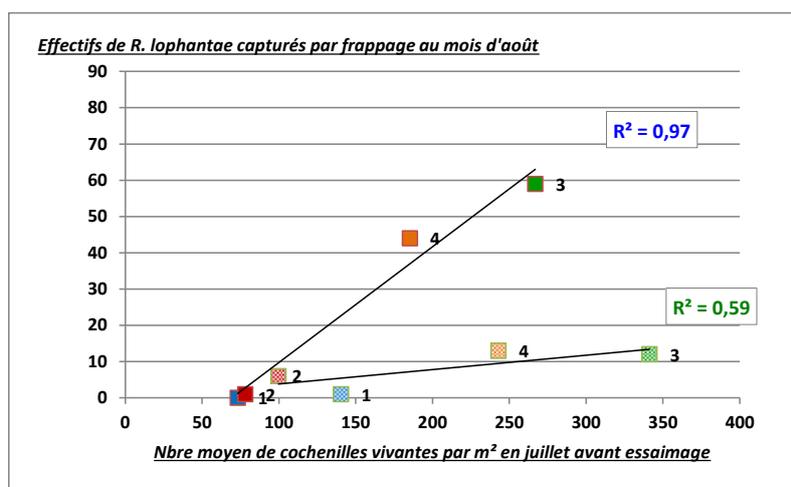
Devant les incertitudes qui accompagnent les résultats décrits plus haut, la question se pose d'établir le lien entre ces résultats et le fait d'avoir effectué des lâchers de coccinelles Rhizobius sur les sites d'introduction. En effet, sur ces sites, les populations de cochenilles auraient pu aussi évoluer en raison d'autres évènements, comme une abondance naturelle des parcelles en auxiliaires qui se serait trouvée préservée par le fait de ne pas y pratiquer d'interventions insecticides, ou par exemple un calendrier de traitements qui aurait été appliqué en dépit des consignes de départ.

Deux types de travaux ont été mis en œuvre dans l'objectif d'essayer d'établir ce lien : le suivi des populations de Rhizobius et leur caractérisation génétique.

Evolution des populations de Rhizobius

Fin 2016, alors que les résultats obtenus par l'indicateur « densité de cochenilles vivantes », quoi que nuancés, semblaient en faveur d'une efficacité de la méthode de protection par lâchers, un lien établi entre les suivis de Rhizobius et les dénombrements de cochenilles allait dans le sens d'une contribution effective des auxiliaires introduits à la régression des populations de cochenille constatée. En effet, les résultats mettaient alors en évidence une corrélation très nette entre les effectifs de Rhizobius capturés lors des frappages au mois d'août 2016 et la densité des cochenilles vivantes observée au cours du pic des populations de juillet, avec des courbes très nettement distinctes entre les parcelles d'introduction et celles de référence : l'explosion des populations de cochenilles semblait alors avoir favorisé l'expansion de celles des coccinelles, et ceci beaucoup plus fortement sur les parcelles où elles ont été introduites (**Graphique 4**).

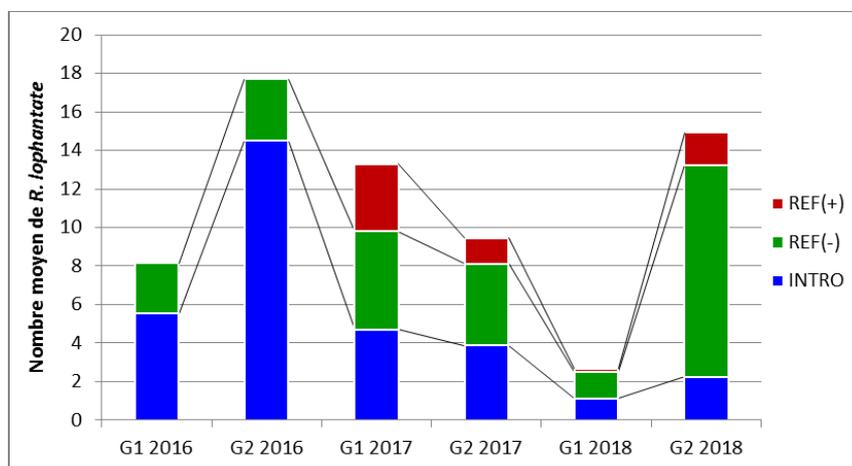
Graphique 4 : Corrélation entre les effectifs de Rhizobius lophantae capturés par frappeage au mois d'août 2016 et les effectifs de cochenilles dénombrés sur échantillons de rameaux en juillet



Cette relation, qui plaide alors en faveur d'une efficacité significative de la méthode de biocontrôle, ne s'est pas retrouvée les années suivantes avec la même netteté.

Ainsi, on ne retrouve plus en 2017, et encore moins en 2018, des niveaux de captures de Rhizobius plus importants sur les sites d'introduction après les lâchers. Il semble plutôt sur les années 2 et 3 que les coccinelles soient retrouvées là où les densités de cochenilles sont les plus élevées, indépendamment du fait des lâchers : ainsi en 2017 on collecte aussi bien des coccinelles Rhizobius sur les parcelles de référence que sur celles d'introduction, et en 2018 les coccinelles sont même retrouvées en nombre plus important sur les parcelles REF(-) (**Graphique 5**).

Graphique 5 : Effectifs moyens de Rhizobius lophantae collectés par frappeage selon les modalités



Les données sont basées sur les effectifs collectés sur les sites 1 à 5. Elles sont exprimées en nombre moyen de Rhizobius capturés par site et par frappeage, sur la première ou la deuxième génération de la cochenille

Si globalement cette évolution est assez en phase avec celle de l'indicateur « densité de cochenilles vivantes » décrite plus haut, cette relation est souvent moins évidente à l'échelle des sites (aucune coccinelle *Rhizobius* n'est par exemple retrouvée en 2018 sur le site 3, qui semble pourtant avoir un niveau d'infestation du même ordre que les autres) – voir le [graphique 9](#) et la [figure 3 en Annexe](#).

Ceci nous a poussé à nous pencher sur les calendriers de traitement appliqués, qui diffèrent selon la nature des produits utilisés (huile de paraffine, pyréthriinoïdes ou insecticides ciblant la cochenille – chlorpyrifos-méthyl, thiaclopride ou spirotétramate) et le nombre d'applications réalisées. Il est possible de définir 3 variables pour qualifier chacun des sites vis à vis de cette pression phytosanitaire (« nombre d'applications sur chaque génération » pour chacune des catégories de produits) et de les intégrer dans une analyse par régression multiple, au côté de l'indicateur « densité de cochenilles vivantes en pré-essaimage », pour essayer d'expliquer les effectifs de *Rhizobius* collectés. Cette analyse fait ressortir l'indicateur « densité de cochenilles » comme facteur explicatif prépondérant, avec une corrélation positive assez faible ($R^2 : 0,33$) mais significative à 5%, alors que les pyréthriinoïdes et les insecticides ciblant la cochenille ne viennent qu'après, avec une corrélation négative de même niveau pour ces deux indicateurs, peu intense ($R^2 : -0,16$) et non significative. Ceci est bien illustré par le cas de la parcelle REF(-) du site 4, où seront retrouvés en 2018 les effectifs de *Rhizobius* les plus élevés (jusqu'à 42 individus pour une seule date de frappe sur le 1^{er} essaimage) alors que 3 applications de lambda-cyhalotrine, réputée toxique pour les coccinelles, se sont succédées sur cette 1^{ère} génération. Le [graphique 10 en Annexe](#) donne une indication de la pression phytosanitaire sur les sites d'étude sur la durée du projet.

Quoi qu'il en soit, rien ne nous permet à ce stade d'affirmer si les *Rhizobius* capturés proviennent des lâchers de l'année, ou d'une colonisation des parcelles de référence par les individus introduits en 2016 (année où l'efficacité des lâchers semble avoir été la plus effective), ce qui est plausible d'après ce que l'on sait des capacités de mobilité de cette espèce, ou alors simplement des populations naturalisées établies (ce qui expliquerait qu'elles soient réparties sur quasiment toutes les parcelles).

Caractérisation génétique des *Rhizobius* capturés

Près de 135 individus apparentés a priori à l'espèce *Rhizobius lophantae* ont été traités par analyse génétique au cours des trois années du projet. L'étude a consisté à séquencer le gène mitochondrial du cytochrome oxydase extrait d'individus capturés sur les sites d'introduction ou de référence (soit au cours de l'étude, soit avant les premiers lâchers), mais aussi d'individus collectés antérieurement lors des essais préliminaires réalisés dans le Val-de-Loire (les introductions avaient alors été effectuées à partir d'auxiliaires de l'élevage de l'AREFLEC), ou encore d'individus provenant des élevages d'Entocare, fournisseur de KOPPERT.

Tous ces individus ont pu être identifiés a posteriori comme étant bien rattachés à l'espèce *Rhizobius lophantae* et une sous-structuration en deux clusters a été observée au sein de l'espèce : un cluster majoritaire, incluant 96 % des individus collectés sur le terrain et 100 % des individus provenant des élevages d'Entocare, et un cluster minoritaire, incluant 4 % des individus issus du terrain et 100 % de ceux de l'élevage de l'AREFLEC (alors qu'aucun lâcher de *Rhizobius* provenant de l'AREFLEC n'a été effectué par le passé sur les parcelles d'essai).

Ainsi, si globalement divers haplotypes semblent exister, une grande majorité des individus capturés sont génétiquement proches de ceux de l'élevage d'Entocare, et ceci, qu'ils proviennent des sites d'introduction ou de référence, ou qu'ils aient été collectés au cours de l'étude ou antérieurement à celle-ci, donc avant les premiers lâchers.

Contrairement aux attentes, **aucune conclusion ne peut être formulée à l'issue de ces travaux de caractérisation, concernant la contribution effective des lâchers aux populations collectées sur les sites du projet** : les individus capturés sont-ils issus des lâchers effectués avant les dates de capture ? ceux retrouvés sur les sites de référence proviennent-ils d'une migration des adultes introduits à plus de 500 m ou de celle de leur descendance ? quelle est la contribution des individus introduits par rapport à celle des populations de *Rhizobius* établies ?

Les analyses génétiques effectuées en année 3 ont tenté de lever ces questionnements en s'attachant spécifiquement à enrichir l'arbre phylogénétique à partir d'individus prélevés en Val-de-Loire mais que l'on savait indépendants de tout protocole de lâcher récent (collectes effectuées dans les années précédant l'étude). Ces efforts n'ont pas donné les résultats escomptés : **il semble impossible, en se basant sur le gène mitochondrial COI, de classer les coccinelles Rhizobius d'élevage et celles présentes naturellement dans les parcelles en deux clusters génétiques bien délimités, et rien ne permet donc de les distinguer.** Il est ainsi probable que la souche utilisée pour l'élevage d'Entocare et les Rhizobius naturalisés font partie d'une seule et même métapopulation. La [figure 2 en Annexe](#) présente quelques extraits de l'arbre phylogénétique enrichi au cours de l'étude.

Outre les Rhizobius, plus d'une centaine d'autres auxiliaires, rattachés aux ordres des Coléoptères et des Hyménoptères, ont été caractérisés au cours de l'étude : sept espèces de coccinelles, incluant trois espèces coccidiphages (*Chilocorus renipustulatus*, *Coccinella septempunctata* et *Harmonia axyridis*) et parmi les hyménoptères, deux espèces de parasitoïdes primaires (*Aphytis proclia* et *Encarsia berleseii*) et deux hyperparasitoïdes du genre *Ablerus*. D'une façon générale, ces résultats montrent, d'un point de vue seulement qualitatif, la diversité des autres ennemis naturels de *Pseudaulacaspis pentagona* présents dans l'environnement des parcelles, et ce, globalement, assez indifféremment des traitements phytosanitaires appliqués.

- [Capacités de survie hivernale de *Rhizobius lophantae*](#)

Les capacités de survie hivernale des Rhizobius introduits sont appréciées par deux types d'observations : la recherche de pontes hivernales de l'auxiliaire et l'évaluation de leur capacité à éclore d'une part, et le piégeage d'adultes dans des abris d'hivernation d'autre part.

Capacité de survie à l'hiver des pontes de *Rhizobius lophantae*

Pour apprécier la capacité de survie de l'auxiliaire sous forme d'œufs, une expérience simple a été conduite : des rameaux infestés par la cochenille sont prélevés sur les sites d'introduction en période hivernale, puis placés en éclosiers à 20°C afin d'observer le développement de larves de l'auxiliaire, issues de pontes éventuelles dissimulées sous les carapaces. Cette expérience s'est soldée par un échec, puisqu'aucune émergence n'a été constatée au cours du projet. Par ailleurs, **le sondage de carapaces de cochenilles observées au hasard sur les rameaux issus des parcelles d'introduction n'a jamais non plus révélé la présence de pontes de Rhizobius et ce, quelle que soit la saison.**

Survie en abris d'hivernation

L'objectif de l'expérience est ici à la fois d'apprécier la capacité de survie des Rhizobius sous forme d'adultes dans les conditions du Val-de-Loire et de la Bourgogne, et de mesurer l'intérêt de la mise à disposition d'abris sur les parcelles pour faciliter leur hivernation.

Avec deux séries d'observations (sorties d'hiver 2017 et 2018), les résultats vont dans le sens d'une survie possible sous forme d'adultes, puisque des individus vivants sont bien retrouvés. Mais avec un total de 114 individus dénombrés sur les abris des 5 sites, dont 87 sur les bandes cartonnées et 27 dans les fagots de bambou (sur un total de 420 abris installés), les effectifs collectés dans les « pièges » sont très faibles au cours du premier hiver, puis ils chutent quasiment à 0 lors de l'hiver 2017/18, qui est aussi celui qui a suivi une année de très faible pression de la cochenille. La colonisation des abris par *Rhizobius lophantae* est très inégale, sans lien avec les sites d'introduction (52 coccinelles retrouvées sur les sites REF(-) contre 42 dans les parcelles INTRO – voir [Graphique 11 en Annexe](#)), et sans que la moindre corrélation ne se dégage entre ces effectifs et les cochenilles dénombrées ou les captures de Rhizobius réalisées par ailleurs en sortie d'hiver. Une mortalité est en outre constatée dans les pièges (plus du tiers des individus en moyenne) sans que rien ne permette de l'attribuer aux conditions climatiques. La colonisation des abris par une variété d'animaux (limaces, araignées) et notamment par d'autres insectes prédateurs (forficules, *Harmonia axyridis*) laisse supposer que ces abris deviennent aussi des lieux de prédation potentiels, qui pourraient en partie expliquer ces mortalités.

En conclusion, *Rhizobius lophantae* est une espèce capable de survivre sous forme d'adultes aux hivers des climats du Val-de-Loire et de la Bourgogne, ce que du reste nous savions déjà puisqu'il s'agit d'une espèce reconnue pour être établie dans ces régions depuis des années ; mais à nouveau, rien ne nous permet de dire si les individus récemment introduits lors des lâchers effectués dans le projet ont montré cette capacité à se pérenniser.

Les pièges proposés ne semblent pas suffisamment pertinents pour encourager la survie de l'auxiliaire, leur faible fréquentation laissant supposer que les *Rhizobius*, qu'ils soient acclimatés ou introduits, trouvent probablement aussi bien refuge (voire mieux) dans des abris naturels comme les anfractuosités des écorces des cassissiers ou celles d'autres espèces ligneuses en bordure des parcelles, voire même sur des ligneux distants des sites d'essai. A noter que l'acclimatation de cette espèce, qui a conduit aux populations aujourd'hui établies, peut avoir été le fait d'une sélection naturelle qui n'aurait permis la survie que d'une faible proportion d'individus et qu'elle ne démontre donc pas en soi la capacité des individus d'élevage à se pérenniser massivement d'une année sur l'autre. A l'issue de ces observations, rien ne nous permet donc d'imaginer pouvoir effectuer les lâchers à une fréquence moindre que celle de lâchers renouvelés chaque année.

Tableau 4 : Effectifs de *Rhizobius lophantae* retrouvés au cours des hivers 2016/17 et 2017/18 sur les abris installés sur les sites d'essai Les données présentées sont les moyennes (ou maxima) du cumul des effectifs dénombrés sur 20 (bandes cartonnées) ou 10 abris (fagots de bambou)

Type de piège	Nombre moyen d'individus sur 20 pièges	Ecart-type	N maxi sur 20 pièges	Vivants	Morts
Bandes cartonnées	3,7	6,04	23	69%	31%
2017	6,2	7,35	23	62%	38%
INTRO	5,6	7,96	17	35%	65%
REF(-)	8,2	9,68	23	64%	36%
REF(+)	4,5	3,70	8	76%	24%
2018	0,7	0,98	3	83%	17%
INTRO	0,0	0,00	0	–	–
REF(-)	1,0	0,82	2	83%	17%
REF(+)	1,0	1,41	3	83%	17%
Fagots de bambous	1,0	3,27	13	63%	37%
2017	1,9	4,32	13	63%	37%
INTRO	2,8	5,72	13	54%	46%
REF(-)	2,2	4,92	11	45%	55%
REF(+)	0,5	1,00	2	100%	0%
2018	0,0	0,00	0	–	–
INTRO	0,0	0,00	0	–	–
REF(-)	0,0	0,00	0	–	–
REF(+)	0,0	0,00	0	–	–

- **Optimisation de la mise en œuvre des lâchers de *Rhizobius lophantae***

Les aspects « *packaging des Rhizobius livrées* » et « *modalités d'apport sur les parcelles* » ont très vite été calés dans le projet : la solution consistant à réceptionner les auxiliaires sous forme de sachets de 200 individus, prêts à être déposés au pied des buissons, puis de procéder avec des points de lâchers répartis sur la parcelle à raison de 15 points par zone de 0,5 ha, est une avancée certaine par rapport à ce qui a pu être testé dans les essais préliminaires menés par La Morinière avant le projet. Ceci est indéniable du point de vue pratique, puisqu'aucune manipulation des auxiliaires n'est désormais nécessaire, contrairement à la situation précédente qui demandait un reconditionnement des coccinelles à réception, avec dénombrement, et redistribution dans des contenants « artisanaux » (filtres à café) ; **avec le système de lâchers par points de 200 individus, la méthode d'apport devient techniquement réalisable du point de vue du temps de main d'œuvre**, puisqu'elle

n'a demandé qu'une trentaine de minutes sur chacun des sites d'essai (en incluant les nécessités de l'expérimentation : repérage des buissons, etc.). Si rien ne nous permet de dire si cette nouvelle façon de procéder a amélioré la réussite de la méthode, elle ne semble pas non plus l'avoir desservie, si bien qu'on peut avancer qu'elle représente un compromis tout à fait acceptable en termes de praticité.

Face aux interrogations suscitées par certaines observations – comme les faibles effectifs de *Rhizobius* capturés ou le fait de n'avoir jamais observé de ponte de l'auxiliaire – renforcées par le caractère parfois contradictoire des résultats, de nombreuses questions se sont posées quant à la qualité des lots d'auxiliaires livrés.

Le **respect de la dose annoncée** a été le premier point de questionnement : un défaut d'ensachage lors de la première commande de *Rhizobius*, qui avait conduit à des sachets dont certains contenaient moins des 200 individus annoncés, a vite été réglé par le partenaire KOPPERT et son fournisseur Entocare. **Une vérification des lots à réception lors des commandes suivantes permettra de vérifier que le respect de la dose est aujourd'hui assuré.**

La question de la **viabilité des *Rhizobius* et de leur capacité à se reproduire** s'est aussi posée. Pour tenter de clarifier ces points, deux types de manipulations ont été réalisées : l'observation anatomique des individus à réception avec détermination de leur sex-ratio, et le maintien d'un échantillon d'individus des deux sexes en boîtes d'élevage.

Sur 53 individus pris au hasard dans plusieurs des sachets livrés, un sex-ratio de 51 % de femelles pour 49 % de mâles a pu être quantifié, ce qui lève les doutes sur une anomalie à ce niveau. L'observation en boîte d'élevage a été moins rassurante, puisque, malgré les soins apportés (boîtes aérées, maintenues à température ambiante, munies d'un abreuvoir et regarnies quotidiennement avec des rameaux infestés de cochenilles), non seulement aucune ponte n'a été observée, mais un taux de mortalité de 96 % a été enregistré à 17 jours, alors qu'une capacité de survie d'au moins 63 jours en captivité est annoncée pour cette espèce dans la littérature. Il faut noter du reste que toutes les tentatives de maintien en captivité réalisées à la Morinière préalablement au projet s'étaient aussi soldées par un échec, ce qui suggère que le support fourni (rameaux de cassissiers excisés) n'est probablement pas le plus propice à l'élevage de la coccinelle en conditions de captivité, et **ne nous autorise pas à conclure à une effective incapacité à produire une descendance des auxiliaires livrés par le fournisseur.**

Il n'en reste pas moins qu'avec 84 000 individus introduits sur la durée du projet, tous sites confondus, et seulement 749 individus collectés par frappage (soit 0,89 % – dont 333 sur les sites d'introduction, soit 0,40 %) et 122 individus retrouvés dans les abris hivernaux (soit 0,15 %), **les doutes quant aux capacités d'installation des auxiliaires ou leur intérêt à rester dans les parcelles de cassissiers ne sont pas pour autant levés.**

D. Discussion et conclusion

Pour conclure sur les résultats de l'étude, il convient de revenir sur les deux objectifs fixés au départ du projet et de se demander s'ils ont été atteints. Le premier était d'être en mesure de proposer aux producteurs de cassis une méthode de protection contre la cochenille blanche basée sur des lâchers annuels de coccinelles *Rhizobius lophantae* ; le second celui de proposer, sur cette base, les ébauches d'un moyen de protection pour d'autres espèces fruitières concernées par les cochenilles diaspinées, mais aussi une méthodologie d'étude spécifiquement adaptée pour les filières qui souhaiteraient les expérimenter. Devant les nombreuses questions qui restent posées à l'issue de ces trois années de travaux, force est de constater qu'aucun de ces objectifs n'est aujourd'hui rempli, même si sur les différents points évoqués, certains acquis nouveaux peuvent être formulés et quelques orientations peuvent être avancées.

- Une efficacité partielle, aléatoire, ne permettant pas de proposer une méthode de lutte

A l'issue des travaux il est possible d'affirmer que **la méthode des lâchers est largement insuffisante dans le cas d'une parcelle sévèrement infestée**, comme le démontre le cas du site de Merceuil qui a dû être arraché.

Dans les situations d'infestation moins sévère, si une certaine cohérence entre plusieurs résultats, obtenus par des indicateurs différents (cochenilles dénombrées sur rameaux, taux d'infestation des buissons, captures de *Rhizobius*) suggère que les lâchers de *Rhizobius* ont bien été capables de réguler les populations de cochenilles, de manière tout à fait intéressante et parfois même plus significative que les programmes de traitement phytosanitaires ciblant spécifiquement le ravageur, **le caractère aléatoire de ces résultats suggère pour le moins que les facteurs de succès de la méthode sont encore loin d'être maîtrisés.**

Trois pistes ont pu être creusées pour tenter d'expliquer ce caractère aléatoire.

⊕ Comme on l'a vu plus haut, celle d'une mauvaise qualité des lots d'auxiliaires est en grande partie écartée : les coccinelles livrées arrivent bien en dose adéquate, elles sont viables à leur arrivée et semblent peu affectées par le transport.

⊕ La piste des calendriers de traitements appliqués, qui auraient pu biaiser certaines observations, apporte quant à elle quelques éléments d'explication à certains comportements atypiques (site 2 sur la 1^{ère} année, site 5 sur la 2^{nde}) mais elle ne suffit pas non plus à expliquer l'inversion de tendances observée en 2018.

Deux observations sont toutefois intéressantes à retenir :

- 1) **Les traitements phytosanitaires appliqués contre la cochenille (chlorpyrifos-méthyl notamment) ont rarement montré une efficacité ;**
- 2) A l'exception des abris d'hivernation, les *Rhizobius* ont été retrouvées aussi bien sur les parcelles traitées aux insecticides que sur les parcelles « non traitées » ; elles sont donc moins affectées par les pyréthrinoides et le chlorpyrifos-méthyl que ce que suggère la littérature, ou du moins l'impact de ces pesticides sur les populations de l'auxiliaire n'est pas durable dans le temps et permet leur retour en saison. Si ceci n'encouragerait toutefois pas à réaliser les lâchers en conjugaison avec ces programmes, **il semble probable que les populations établies de *Rhizobius lophantae* soient en mesure de se maintenir sur des parcelles conduites en conventionnel ou dans leurs abords** et probablement d'y exercer un certain degré de régulation sur le ravageur.

⊕ La piste climatique a été évoquée pour expliquer, d'une part, la forte régression des populations de cochenilles sur l'ensemble des sites du Val-de-Loire en 2017, et d'autre part, les faibles effectifs de *Rhizobius* capturés après les périodes de lâchers. Concernant le premier point, la température n'est pas un facteur explicatif suffisant, puisque, si *Pseudaulacaspis pentagona* est citée comme résistant mal aux températures inférieures à -5°C et qu'un bref épisode à -7°C a effectivement eu lieu en février 2017, des températures encore plus froides (-9°C) ont été enregistrées en mars 2018 alors qu'on assiste à une forte remontée des populations du ravageur. Concernant le 2nd point, l'installation des coccinelles, issues d'un élevage conduit aux alentours de 20°C, pourrait être négativement affectée par des températures basses, des épisodes de gel ou des périodes pluvieuses, qui sont des conditions courantes dans les zones du Val-de-Loire et de la Bourgogne sur la 1^{ère} période d'essaimage. Et en effet, la zone géographique où *R. lophantae* s'est avérée efficace comme agent de lutte biologique est jusqu'ici cantonnée à des pays aux climats plus doux et moins humides (Californie, Bermudes, Italie, Grèce, Argentine, Algérie, Tunisie, Maroc, Géorgie). La viabilité des lots d'auxiliaires constatée à leur réception ne présage donc pas de leur taux de survie une fois placés dans les conditions climatiques des parcelles.

Une bonne efficacité de la méthode des lâchers est toutefois bel et bien constatée sur la première année du projet, qui est celle où on observe à la fois une forte régression des populations de cochenilles, une réduction des taux d'infestation des buissons et, dans le mois suivant les lâchers, un

pic de captures de *Rhizobius*, et ceci uniquement sur les parcelles d'introduction par opposition à celles où aucun auxiliaire n'a été introduit. Pourquoi la méthode a-t-elle fonctionné en 2016 et pas en 2018, année de pression cochenille du même ordre et de conditions climatiques globalement similaires ? Que sont devenues les 6 000 *Rhizobius* lâchées sur chacune des parcelles ? N'ont-elles pas survécu ? Ont-elles migré sur un hôte végétal plus intéressant aux abords des parcelles ? Une proportion de survivantes se sont-elles déplacées vers les parcelles de références, plus infestées, comme cela a pu être évoqué ? Ou alors les individus retrouvés sur ces parcelles de référence en année 3 seraient-ils plutôt des descendants des coccinelles introduites en 2016 qui auraient commencé à coloniser la zone ? Toutes ces questions restent posées à l'issue du projet et seule une analyse beaucoup plus fine aurait peut-être permis d'y répondre (conditions climatiques mesurées à l'intérieur même des parcelles, inventaire des espèces végétales présentes dans l'environnement proche ou plus lointain, et notamment des hôtes potentiels de cochenilles diaspines, description de l'agencement des structures du paysage aux abords des zones de lâchers, etc.).

A ces inconnues, qui ne permettent pas aujourd'hui de proposer les clés de succès de la méthode, s'ajoutent deux contraintes de taille, qui sont celles de son coût et de la difficulté pour les fournisseurs d'auxiliaires à assurer une production de masse de *Rhizobius*, ces deux points étant du reste liés. En effet, avec un coût de 0,20 € par adulte de *Rhizobius*, la méthode testée dans le projet coûterait 2 400 € d'intrants à l'hectare et environ 25 € de main d'œuvre (pour 2 lâchers), soit 20 à 45 % du produit brut, ce qui est bien évidemment totalement prohibitif, d'autant qu'une parcelle de cassissiers ne dure qu'une dizaine d'années, et que parmi celles-ci seules 4 à 5 années sont des années de « pleine production ». Si la méthode s'était avérée transférable, le fournisseur et partenaire du projet (KOPPERT) aurait pu envisager d'atteindre à terme un coût de production des *Rhizobius* réduit de moitié, ce qui serait resté toutefois prohibitif si les lâchers avaient dû être renouvelés chaque année.

- **Des imperfections méthodologiques, qui restent difficiles à lever**

Si la méthode ne peut être transférée vers d'autres cultures fruitières à l'issue du projet, il est bon de retenir quelques points méthodologiques pour éviter des erreurs lors d'expérimentations futures.

Dispositif expérimental

Le dispositif consistant à utiliser des parcelles d'introduction éloignées de plus de 500 m des parcelles de référence semble performant et peut donc être retenu.

Pertinence des mesures

Le projet RhizoDia met en lumière la difficulté à faire la preuve de concept de l'efficacité d'une méthode de biocontrôle basée sur un macroorganisme en milieu ouvert, et qui plus est sur un ravageur comme la cochenille diaspine, caractérisée par sa propension à former des encroûtements de carapaces et à se développer en foyers. Ainsi, la très grande variabilité des effectifs de cochenilles dénombrés sur les rameaux, l'incertitude sur la pertinence des indicateurs pris en compte (cochenilles vivantes, mais quid des boucliers vides ? et pourquoi pas la somme des boucliers par unité de surface ?), le fait que les boucliers anciens restent sur place (même si ce biais a été minimisé en essayant de choisir des rameaux jeunes), l'incertitude sur la significativité des échantillons observés (dont le choix n'est pas aléatoire), le caractère destructif de la méthode de dénombrement des cochenilles, sont tout autant de facteurs qui obligent à la prudence quant à l'interprétation des résultats.

Certaines de ces limites pourraient en théorie être levées, par exemple en augmentant le nombre de répétitions concernant les pools de rameaux observés et en faisant le choix de les repérer de manière aléatoire plutôt que ciblée, mais ceci n'est, d'une part pas envisageable dans la pratique (dénombrements très chronophages) et, d'autre part pas même peut-être souhaitable, car cela reviendrait à extraire une part de l'inoculum présent sur les parcelles et à introduire un biais supplémentaire dans l'évolution des infestations. L'idéal pour s'éviter ces biais et obtenir des

résultats vraiment robustes serait de **pouvoir disposer d'une méthode non destructive de détection de la présence de cochenilles actives** ; quelques pistes de techniques potentiellement exploitables sont aujourd'hui dans les cartons, soit au stade de la recherche (mesures multi-spectrales) soit encore uniquement au stade d'idées (capteurs de composés volatiles émis par les cochenilles ou par leurs hôtes en réponse aux infestations, ce qui suppose d'abord de savoir s'il y a bien émission de composés volatiles) et quoi qu'il en soit encore bien loin d'un développement possible.

Toutefois, une certaine cohérence est observée sur les 3 années du projet entre les deux indicateurs de présence de la cochenille utilisés ici, qui sont la densité de cochenilles vivantes par unité de surface et le taux d'infestation des buissons, combinant présence et sévérité des symptômes. Ceci renforce l'intérêt de les utiliser, faute de mieux, de manière complémentaire. Si la taille des échantillons ne peut être que difficilement augmentée dans le cas du premier indicateur, ceci est moins vrai dans le cas du second, qui a l'avantage d'être non destructif et de se réaliser assez aisément. La notation visuelle de l'infestation des buissons pourrait ainsi utilement s'étendre à l'ensemble des buissons (ou des arbres) des parcelles¹, notamment celles d'introduction, ce qui permettrait de renforcer la représentativité des mesures mais aussi de **cartographier l'évolution des infestations, en y ajoutant ainsi une dimension spatiale** fort utile pour tenter de comprendre les interactions entre le ravageur et les auxiliaires introduits.

Dans ce même ordre d'idées, **le protocole utilisé dans le projet RhizoDia pêche par son absence de prise en compte de l'environnement des parcelles, or on sait combien la dimension paysagère peut représenter un facteur important dans la faculté d'un auxiliaire à se déplacer, à s'y nourrir ou à y trouver refuge**. Une cartographie des espèces présentes, notamment des hôtes potentiels de cochenilles diaspines, mais aussi la pose de bandes cartonnées sur ces éléments du paysage, voire de dispositifs de capture, pourraient utilement compléter le panel de mesures nécessaires au traitement de ce type d'étude.

Il faut enfin insister sur l'intérêt d'**acquérir des données précises sur tout facteur potentiellement pertinent pour la compréhension des résultats, comme les calendriers de traitements appliqués, les données météo au sein même de la parcelle** et si possible sur différents étages de la strate arbustive (des petits capteurs de températures et hygrométrie, mobiles, permettent aujourd'hui de multiplier ce type de mesures sans que le coût ne soit exorbitant ; pluviomètres), certaines interventions culturales, etc. Ce n'est en effet qu'au prix qu'une caractérisation fine des sites étudiés, qu'une expérimentation multisites peut exprimer son potentiel de robustesse.

Caractérisation génétique des *Rhizobius*

Si la méthode de séquençage de la portion du génome mitochondrial COI est aujourd'hui de plus en plus utilisée pour caractériser la diversité génétique des populations d'insectes et a pu être notamment utilisée avec succès pour suivre l'extension de lignées d'insectes à l'échelle d'un territoire, force est de constater qu'elle n'est pas suffisamment discriminante dans le cas de *Rhizobius lophantae*. Les expérimentateurs qui souhaiteraient tester cet auxiliaire contre d'autres cochenilles diaspines, doivent donc se tourner vers d'autres méthodes de caractérisation génétique, soit en testant l'ajout dans l'analyse d'autres portions du génome, soit en se tournant vers d'autres techniques, peut-être plus anciennes (ITS ?).

4. CONTRIBUTION AU PLAN ECOPHYTO ET A L'AGROECOLOGIE

Le projet RhizoDia illustre bien la difficulté à transposer sur le terrain une méthode de biocontrôle qui apparaît prometteuse dans les conditions du laboratoire. Si *Rhizobius lophantae* semblait un

¹ Ou 1 buisson ou 1 arbre sur n, selon la densité de plantation

excellent candidat pour le contrôle des cochenilles diaspines, son potentiel d'utilisation en milieu ouvert dans les conditions du Val-de-Loire et de la Bourgogne (et à plus forte raison dans des régions plus septentrionales) n'est aujourd'hui pas acquis : si une efficacité semble possible, les conditions de succès de lâchers de *Rhizobius* dans les parcelles de cassissiers sont loin d'être maîtrisées, ce qui ne permet pas aujourd'hui de proposer cette méthode biologique aux producteurs de cassis, d'autant que le coût de ces auxiliaires est actuellement totalement prohibitif pour des lâchers à l'échelle de parcelles entières.

Le livrable annoncé en début du projet – à savoir un guide méthodologique pour la préconisation de la méthode de biocontrôle auprès des producteurs de cassis et pour son transfert vers d'autres filières – n'a donc pas été produit puisque beaucoup trop prématuré.

Les enseignements de cette étude, concernant notamment les limites des indicateurs utilisés et la trame des développements méthodologiques suggérés, seront toutefois portés à la connaissance des professionnels et notamment des expérimentateurs, via plusieurs publications dans la presse spécialisée et notamment dans le magazine Infos Ctifl (à forte diffusion chez les professionnels du secteur fruits et légumes), afin qu'ils puissent être mis à profit dans les expérimentations futures menées en cultures pérennes sur les problématiques de protection contre les cochenilles.

Les professionnels de la filière cassis, appuyés par l'AFIDEM, restent très demandeurs d'une solution de biocontrôle pour réguler les dégâts de la cochenille, qui sont toujours d'actualité notamment dans le bassin de production du Val-de-Loire. Malgré le progrès seulement en demi-teinte du projet RhizoDia, les producteurs, responsables professionnels et techniciens impliqués dans son comité de pilotage n'ont pas souhaité abandonner la piste d'une lutte biologique par les coccinelles *Rhizobius*, sans en avoir épuisé toutes les possibilités. Une suite sera donc donnée à cette étude, en s'intéressant cette fois au traitement précoce de jeunes parcelles de cassissiers, l'idée étant d'effectuer les lâchers dès le début d'apparition des foyers, avec des introductions ciblant le 2^{ème} essaimage du ravageur. Outre le fait que ceci devrait donner plus de chances aux auxiliaires introduits de s'acclimater rapidement à l'environnement des parcelles, ceci laissera aussi la possibilité d'effectuer les interventions phytosanitaires préconisées au printemps contre les pucerons et les cécidomyies, qui sont également des ravageurs capables de dégâts importants sur cassis. Cette suite donnée au projet sera aussi l'occasion de tester les apports de *Rhizobius* sous forme de larves plutôt que d'adultes, cette forme ayant l'intérêt d'être la plus vorace sur les formes mobiles de la cochenille, mais aussi d'être plus rapide à produire et donc potentiellement moins onéreuse. En ciblant directement les zones de début d'infestation, l'objectif final sera donc d'empêcher l'installation de foyers importants et leur extension sur les parcelles, mais aussi de réduire les coûts de la méthode qui ne consisterait alors qu'à « traiter » par lâchers des surfaces limitées. En cassant ainsi le cycle d'installation du ravageur dans les jeunes plantations, on peut espérer, si la méthode fonctionne, pouvoir ensuite se dispenser de toute application phytosanitaire contre la cochenille en parcelle adulte.

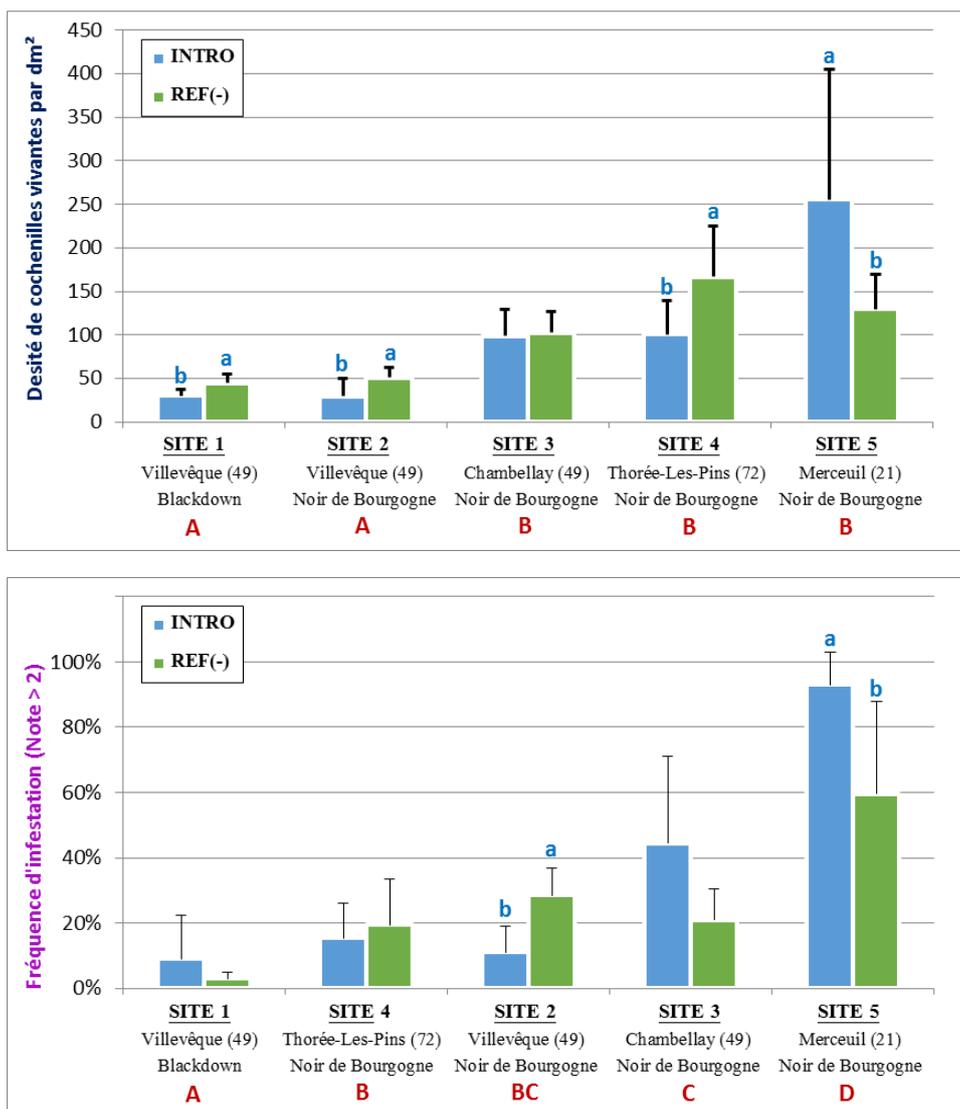
5. RAPPORT FINANCIER

Voir les documents joints par ailleurs

ANNEXES

Graphiques 6 : Etat initial des parcelles évalué par les indicateurs « densité de cochenille vivante par dm ² » et « degré d'infestation des buissons »	2
Graphique 7 : Evolution de l'indicateur « densité de cochenilles vivantes par dm ² » pour chacun des sites d'étude	3
Graphique 8 : Evolution du degré d'infestation des buissons par notation visuelle (échelle de gravité de 0 à 3)	5
Figure 2 : Extraits de l'arbre phylogénétique établi sur la base d'individus collectés en Val-de-Loire avant et après introduction, de souches d'élevage et de souches de référence	6
Graphique 9 : Evolution du nombre de Rhizobius capturés par frappage selon les modalités. Mise en parallèle avec la pression de la cochenille qualifiée par l'indicateur « densité de cochenilles vivantes par dm ² »	7
Figure 3 : Répartition par site des captures de Rhizobius sur les parcelles d'introduction ou de référence (REF(-) et REF(+)). Evolution sur les 1 ^{ères} et 2 ^{èmes} générations du ravageur de 2016 à 2018	7
Graphique 10 : Pression phytosanitaire dans les parcelles d'introduction et de référence des sites d'essai	8
Graphique 11 : Effectifs de Rhizobius retrouvés dans les pièges d'hivernation	8
FICHE DE SYNTHÈSE	9

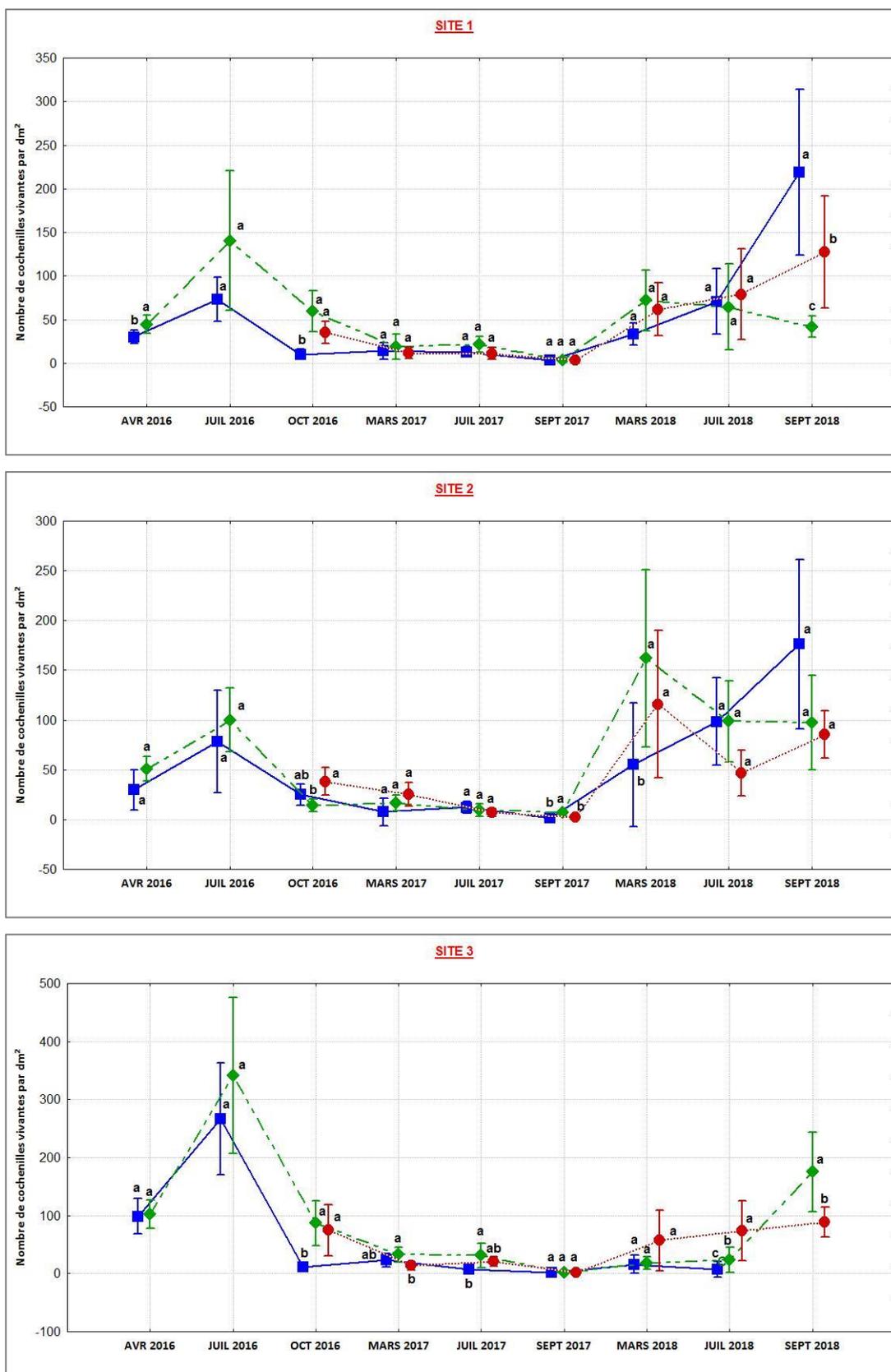
Graphiques 6 : Etat initial des parcelles évalué par les indicateurs « densité de cochenille vivante par dm² » et « degré d'infestation des buissons »



La densité de cochenilles vivantes est établie par dénombrement sur un échantillon de rameaux prélevé sur des buissons infestés. Le degré d'infestation des buissons est évalué par notation visuelle sur un bloc de buissons qui sera constant tout au long de l'essai. Il est exprimé ici par la fréquence de buissons ayant une note d'infestation supérieure à 2.

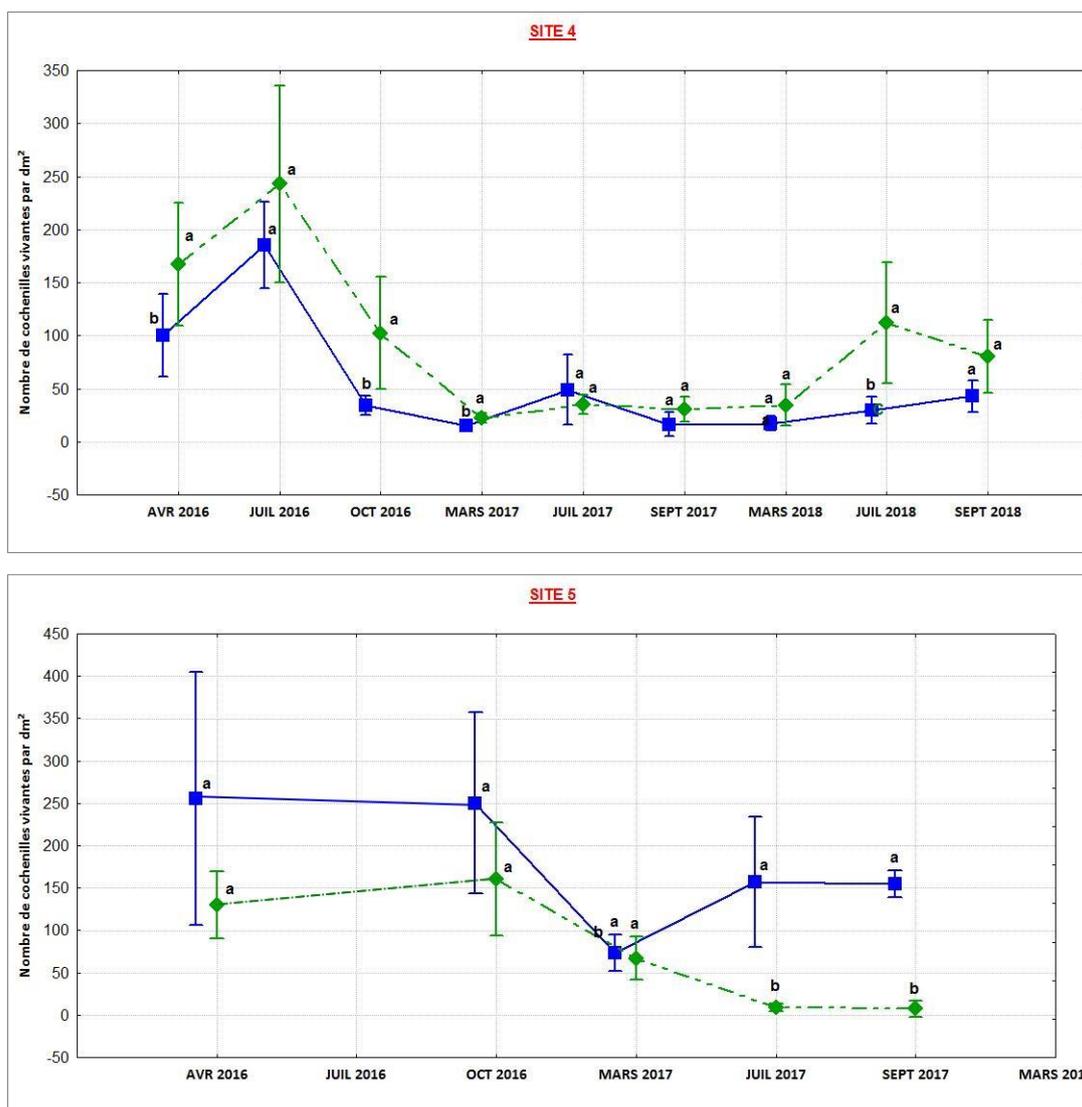
Les données sont traitées par le GZLM pour le 1^{er} indicateur et par l'ANOVA pour le 2nd. Les lettres minuscules représentent la significativité des différences entre parcelles d'introduction et de référence pour un site donné ; les lettres majuscules en rouge représentent le classement des sites en groupes statistiques homogènes toutes parcelles confondues. Le test post-hoc utilisé est le test de Kruskal-Wallis, $\alpha=5\%$

Graphique 7 : Evolution de l'indicateur « densité de cochenilles vivantes par dm² » pour chacun des sites d'étude



Significativité par la statistique de Wald (analyse GZLM). Test de Kruskal Wallis en post-hoc (a, b, c : groupes homogènes pour une date donnée)

Graphique 7 : Evolution de l'indicateur « densité de cochenilles vivantes par dm² » pour chacun des sites d'étude (suite)



Significativité par la statistique de Wald (analyse GZLM). Test de Kruskal Wallis en post-hoc (a, b, c : groupes homogènes pour une date donnée)

Graphique 8 : Evolution du degré d'infestation des buissons par notation visuelle (échelle de gravité de 0 à 3)

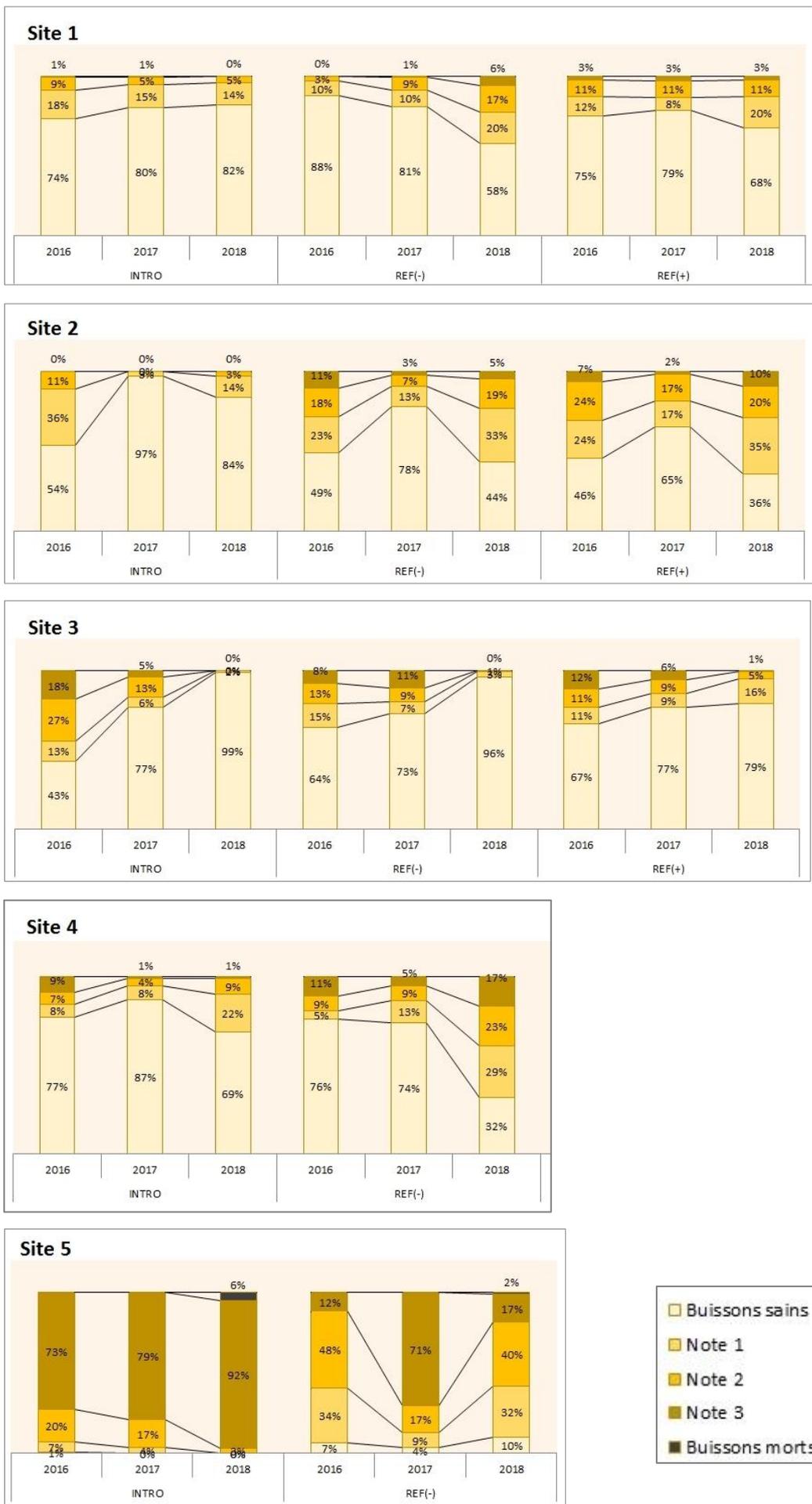
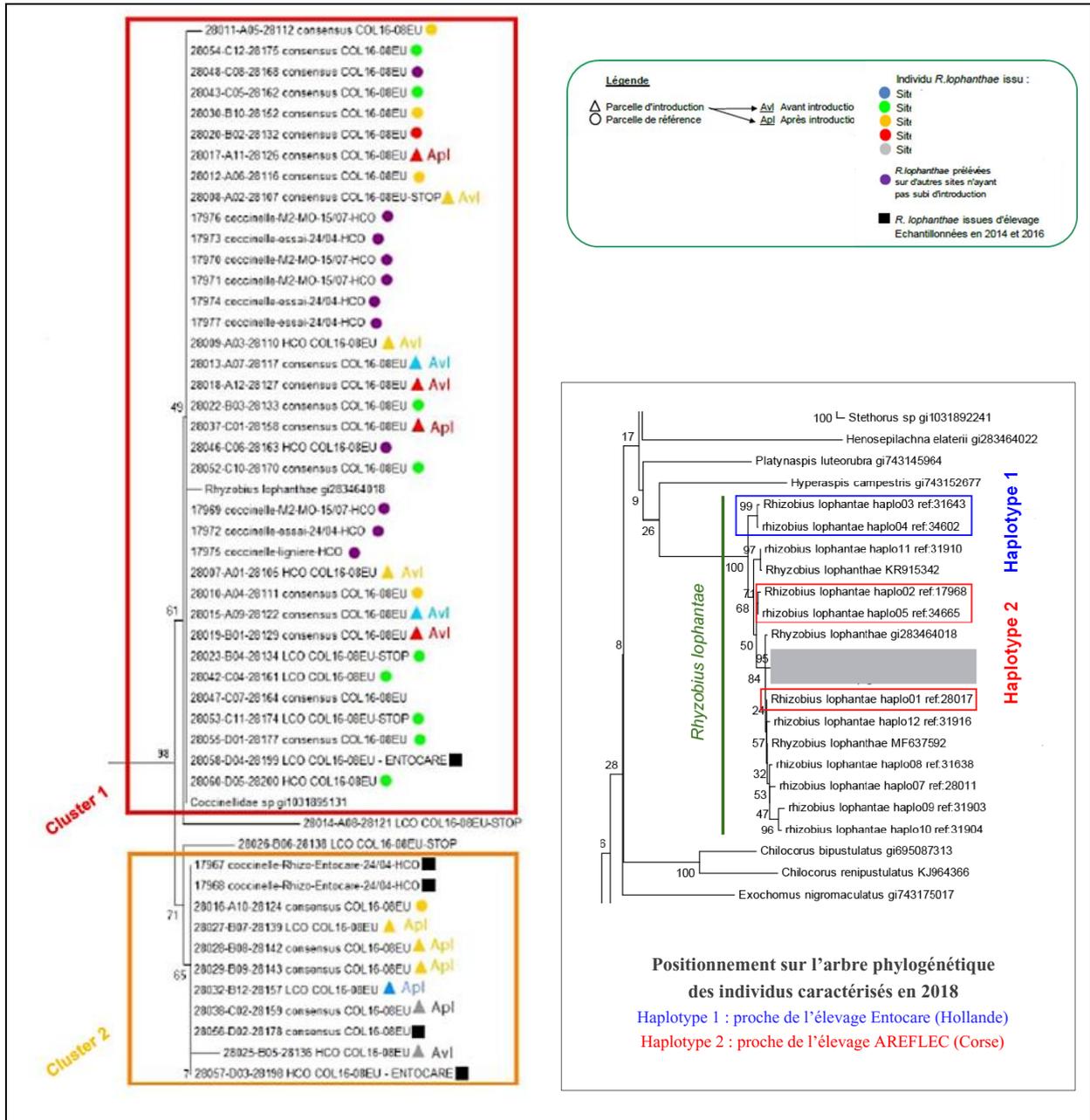


Figure 2 : Extraits de l'arbre phylogénétique établi sur la base d'individus collectés en Val-de-Loire avant et après introduction, de souches d'élevage et de souches de référence



Graphique 9 : Evolution du nombre de Rhizobius capturés par frappage selon les modalités. Mise en parallèle avec la pression de la cochenille qualifiée par l'indicateur « densité de cochenilles vivantes par dm² »

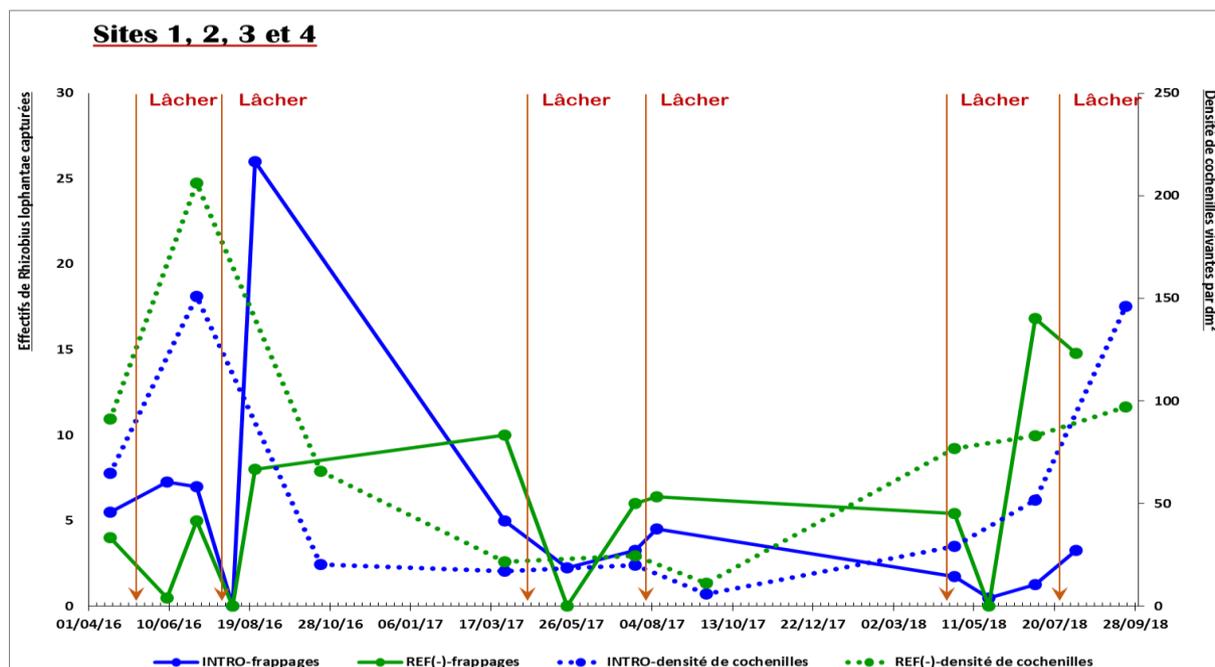


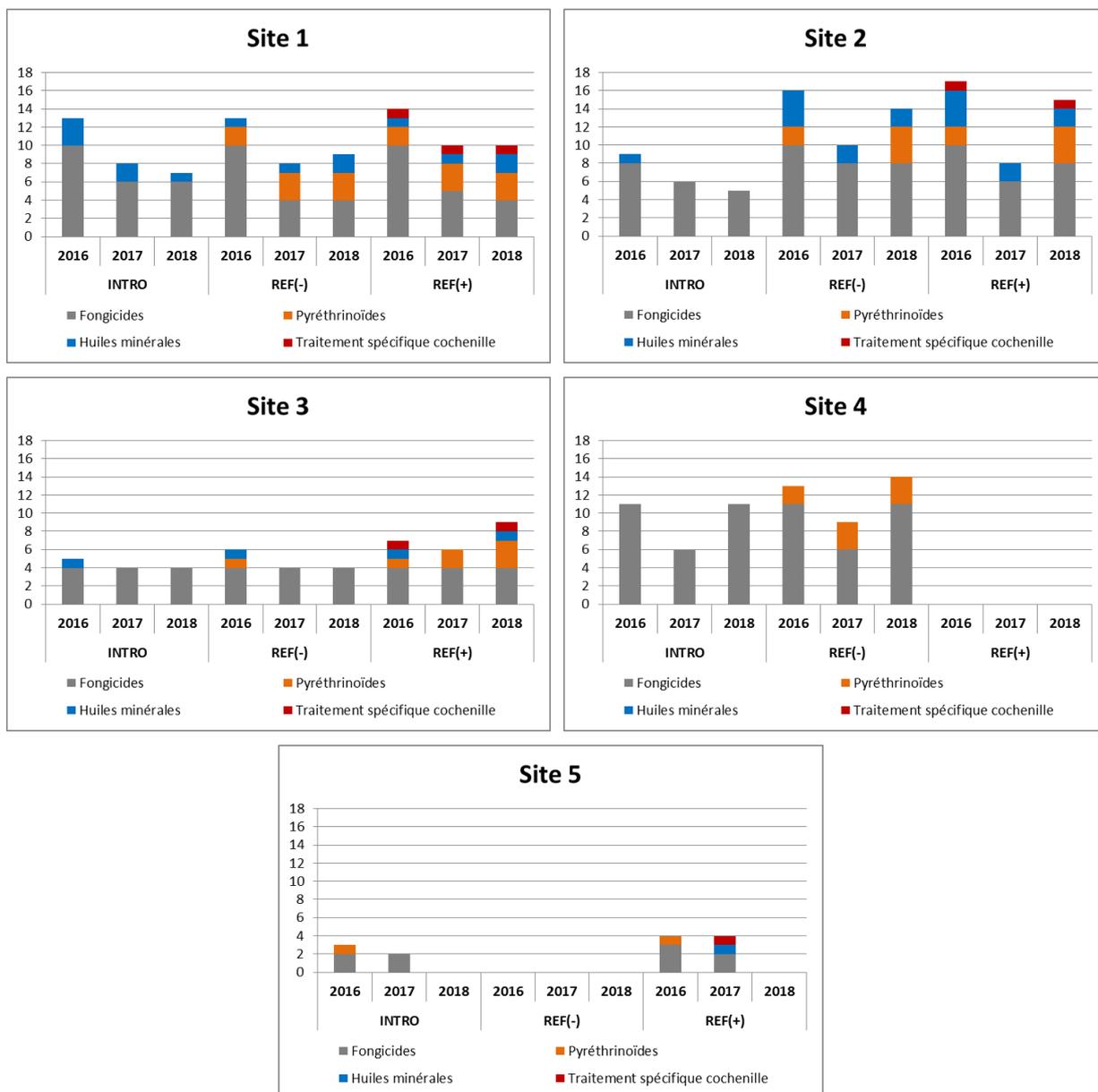
Figure 3 : Répartition par site des captures de Rhizobius sur les parcelles d'introduction ou de référence (REF(-) et REF(+)). Evolution sur les 1^{ères} et 2^{èmes} générations du ravageur de 2016 à 2018

		Site 1			Site 2			Site 3			Site 4		Site 5	
		INTR0	REF(-)	REF(+)	INTR0	REF(-)	REF(+)	INTR0	REF(-)	REF(+)	INTR0	REF(-)	INTR0	REF(-)
2016	G1	1	3		3	4		14	1		8	4	1	0,3
		<i>30</i>	<i>44</i>		<i>30</i>	<i>50</i>		<i>99</i>	<i>102</i>		<i>101</i>	<i>167</i>	<i>256</i>	<i>130</i>
2016	G2	0	1		1	3		30	6		22	7	21	0
		<i>73</i>	<i>140</i>		<i>78</i>	<i>100</i>		<i>267</i>	<i>341</i>		<i>185</i>	<i>243</i>	-	-
2017	G1	0	0	0	1	0	2	9	15	8	5	5	9	6
		<i>14</i>	<i>19</i>	<i>11</i>	<i>8</i>	<i>17</i>	<i>25</i>	<i>23</i>	<i>33</i>	<i>14</i>	<i>16</i>	<i>22</i>	<i>73</i>	<i>67</i>
2017	G2	2	0	0	0	0	1	5	5	4	10	12		
		<i>13</i>	<i>22</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	<i>10</i>	<i>7</i>	<i>7</i>	<i>31</i>	<i>21</i>	<i>49</i>	<i>35</i>	<i>157</i>	<i>9</i>
2018	G1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	4	4	4	4
		<i>33</i>	<i>72</i>	<i>62</i>	<i>55</i>	<i>162</i>	<i>116</i>	<i>16</i>	<i>18</i>	<i>57</i>	<i>17</i>	<i>35</i>	<i>35</i>	<i>35</i>
2018	G2	3	1	1	2	8	4	0	0	0	5	35	0	0
		<i>71</i>	<i>64</i>	<i>79</i>	<i>99</i>	<i>99</i>	<i>47</i>	<i>7</i>	<i>24</i>	<i>74</i>	<i>30</i>	<i>112</i>		

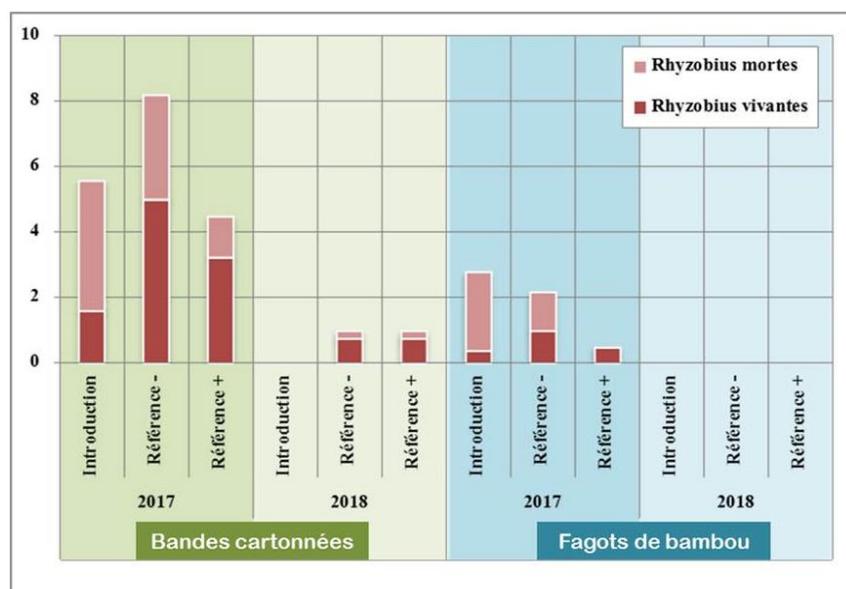
G1, G2 : 1^{ère} et 2^{ème} générations de la cochenille.

Les chiffres en gras (en haut et à gauche des cases) correspondent aux effectifs moyens de Rhizobius capturés par frappage sur la génération donnée. Les chiffres en italique (en bas et à droite des cases) donnent la densité de cochenilles vivantes par dm² dénombrée au démarrage de la génération correspondante. L'intensité des couleurs est proportionnelle aux effectifs de Rhizobius.

Graphique 10 : Pression phytosanitaire dans les parcelles d'introduction et de référence des sites d'essai



Graphique 11 : Effectifs de Rhizobius retrouvés dans les pièges d'hivernation



Fiche de synthèse

(à diffusion publique)

Nom du projet : RhizoDia

Titre du projet : Régulation des populations de cochenilles diaspines en culture de cassis par des lâchers de la coccinelle coccidiphage *Rhizobius lophantae* - Transposition à d'autres cultures fruitières

Année de démarrage : 21 janvier 2016

Année de fin : 21 janvier 2019

Responsable scientifique : Maria-Martha FERNANDEZ, CTIFL

Partenaires : Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Station d'Expérimentation La Morinière, Chambre Départementale d'Agriculture de Côte d'Or, Inra PACA, KOPPERT

Financements : AFB, AFIDEM, GIS Fruits, fonds propres

Mot clés : cochenille diaspine, lutte biologique augmentative, coccinelle coccidiphage, *Rhizobius lophantae*, *Pseudaulacaspis pentagona*, cassis, lâchers d'auxiliaires, cultures pérennes, cultures fruitières, expérimentation multisites

En quelques mots :

Protégée par son bouclier cireux, la cochenille blanche du mûrier met en échec la lutte chimique. Par son développement en foyers et sa faible mobilité elle est un candidat idéal pour la lutte biologique par l'introduction d'auxiliaires. Une méthode de protection par des lâchers de *Rhizobius lophantae* en milieu ouvert est expérimentée sur cassis, production lourdement affectée par ce ravageur. Si une action positive contre la cochenille est observée, les facteurs de succès de la méthode restent à maîtriser, ce qui ne permet pas son déploiement aujourd'hui. A partir des conclusions obtenues sur ce pathosystème particulier, une démarche méthodologique est proposée aux expérimentateurs confrontés à ce type d'étude.

Contexte et objectifs :

Culture mineure représentant peu d'enjeux pour les firmes phytosanitaires, le cassis représente pourtant une filière économique importante, positionnée sur des marchés à haute valeur ajoutée pour lesquels la production française est particulièrement recherchée (liquoristerie, parfumerie). Cette production est affectée depuis une 15^{aine} d'années par la cochenille blanche du mûrier (*Pseudaulacaspis pentagona*), introduite accidentellement en Italie au 19^{ème} siècle par la route de la soie et remontée depuis vers les zones les plus septentrionales de production du cassis français. Provoquant des dépérissements et l'arrachage de parcelles, ce ravageur mal contrôlé par la lutte chimique est aujourd'hui une problématique majeure pour la filière cassis. Par l'expérimentation multisites d'une protection basée sur des lâchers de la coccinelle *Rhizobius lophantae*, spécifique des Diaspididae, le projet RhizoDia se propose de démontrer l'efficacité d'une méthode de lutte biologique augmentative applicable par les producteurs de cassis. Au-delà du modèle étudié, il vise aussi le transfert de cette solution de biocontrôle et de sa méthodologie d'expérimentation à d'autres cultures fruitières confrontées aux cochenilles diaspines.

Principaux résultats et intérêts en lien avec le plan Écophyto :

L'expérimentation est menée en vergers de producteurs en système conventionnel, sur 5 sites du Val-de-Loire et un site en Côte d'Or reflétant une variété de situations quant à la pression du ravageur. Le dispositif expérimental utilisé fera ses preuves dans le projet et peut donc être proposé pour ce type d'étude : 2 plantations de la même variété et du même âge, situées dans la même zone géographique mais distantes d'au moins 500 m, sont choisies pour l'une comme site d'introduction des auxiliaires (0,5 ha) et pour l'autre comme site de référence. La parcelle de référence est menée

selon un calendrier de traitements phytosanitaires complet, avec au moins une intervention spécifique contre la cochenille sur le 2nd essaimage (REF(+)), sauf un bloc d'une 50^{aine} d'ares maintenu sans traitement cochenille pour valoir de témoin « non traité » (REF(-)). Les lâchers de *Rhizobius* sont effectués annuellement, sur chaque période d'essaimage, selon une méthode qui peut également être retenue pour sa praticité de mise en œuvre : les auxiliaires sont réceptionnés prêts à l'emploi, dans des sachets munis d'une bague permettant de les fixer à la base du végétal ; les sachets renferment chacun 200 individus adultes et sont distribués sur la parcelle à raison de 15 points de lâchers pour 0,5 ha, soit un temps de pose de 15 mn.

Pour évaluer l'efficacité de la méthode de protection par lâchers, 3 indicateurs sont utilisés : la densité de cochenilles vivantes par unité de surface, quantifiée sur des échantillons de rameaux infestés prélevés sur les buissons atteints, le degré d'infestation des buissons, mesuré selon une échelle visuelle intégrant présence et sévérité des symptômes, et le nombre de captures de *Rhizobius*, obtenu par frappage des buissons sur parapluie japonais. L'aptitude des auxiliaires introduits à se pérenniser est appréciée par leur capacité de survie hivernale, mesurée par une expérience en éclosoir pour observer la viabilité de pontes hivernales, et par la pose d'abris d'hivernation dont on détermine le taux d'occupation en sortie d'hiver, pour mesurer la survie sous forme d'adultes. Un protocole de caractérisation génétique par séquençage du gène COI est appliqué à plus de 135 coccinelles *Rhizobius* capturées avant ou après lâchers ou provenant d'élevage, pour tenter de vérifier la contribution des auxiliaires introduits et celle des populations établies.

En situation de pression modérée, les lâchers se sont montrés efficaces en 1^{ère} année du projet, avec un taux de régression de la cochenille de 48 % dans les parcelles d'introduction contre 14 % dans les parcelles de référence, un pic sensible de recaptures de *Rhizobius* après les lâchers, et des buissons visuellement assainis. Mais ceci ne s'est pas confirmé par la suite, puisqu'en fin d'année 3 la situation est aggravée de 54 % par rapport à l'état initial sur les sites d'introduction alors qu'elle a stagné sur les sites de référence. La pression phytosanitaire ou les évolutions climatiques globales ne permettent pas d'expliquer cet échec, si bien qu'on peut conclure que si les lâchers ont une efficacité, les facteurs de succès de la méthode ne sont pas maîtrisés à l'issue du projet. Des perfectionnements méthodologiques sont aussi proposés, notamment une caractérisation plus fine des parcelles, de leur environnement et des événements entourant les lâchers, afin d'enrichir le traitement statistique de l'expérimentation multisites pour dégager des facteurs explicatifs.

Lien avec le plan Ecophyto : L'issue du projet ne permet pas le déploiement escompté de la méthode de biocontrôle. Il confirme toutefois l'efficacité très aléatoire des traitements phytosanitaires sur le ravageur ciblé, plaidant ainsi pour poursuivre les efforts sur la voie des méthodes alternatives.

Perspective de transfert :

Les objectifs fixés au début du projet n'ayant pas été atteints, aucun transfert n'est aujourd'hui envisageable pour une application en production. Quelques aspects méthodologiques et surtout plusieurs points d'attention relevés dans le bilan du projet pourront être utiles aux expérimentateurs confrontés aux mêmes types de travaux.

Perspective de recherche :

Pour finir d'exploiter la piste d'utilisation de *Rhizobius lophantae* contre la cochenille sur cassis, une nouvelle étude testera la méthode sur jeune plantation, en ciblant les zones d'apparition des tout premiers foyers et en limitant les lâchers au 2nd essaimage d'été pour s'astreindre des contraintes climatiques ; l'objectif étant de casser précocement le cycle d'installation du ravageur mais aussi de baisser le coût de la protection qui se chiffre, dans les conditions du projet, à plus de 40 % du produit brut. Deux sujets de recherche sont aussi proposés : l'utilisation d'autres portions du génome ou d'autres techniques pour la caractérisation génétique de l'auxiliaire, la méthode utilisée s'étant montrée insuffisamment discriminante, et la recherche d'outils non destructifs de détection des cochenilles actives.

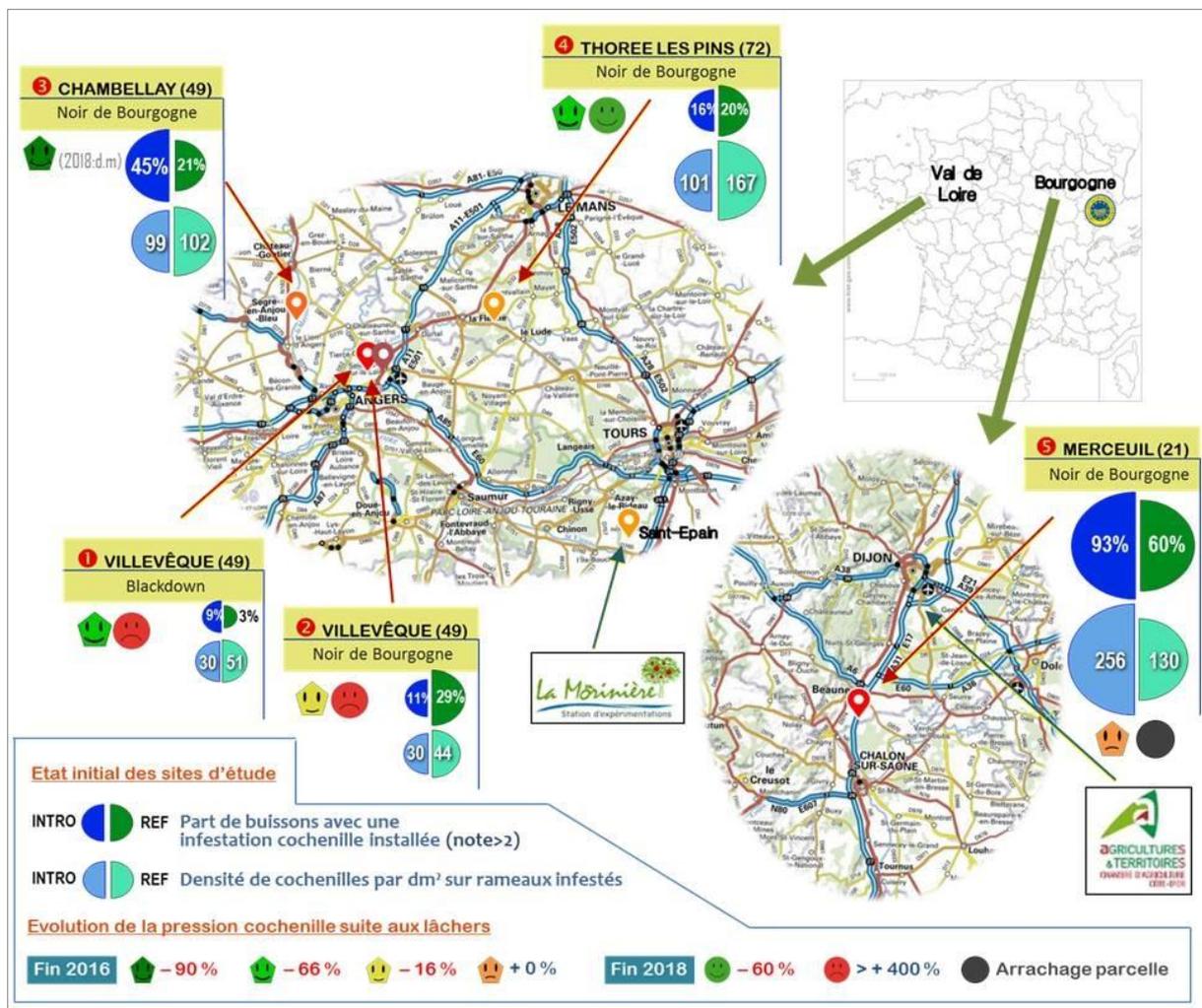
Publications scientifiques et autres valorisations du projet :

GOUVRION, J. 2016. La coccinelle *Rhizobius lophanthae*, agent de bio-contrôle pertinent dans la lutte contre la cochenille *Pseudaulacaspis pentagona* ? Rapport de stage GIS-Fruits 2016. <https://www.gis-fruits.org/content/download/3697/36570/file/RhizoDia-Gouvriion.pdf>

GUIGNEBAULT, P. 2018. Biological control of the White Peach Scale on blackcurrant: the RhizoDia project. Actes du 6^{ème} Congrès Mondial du Cassis, Angers 6-8 juin 2018. <https://www.blackcurrant-iba.com/event/wp-content/uploads/2018/07/5-Rhizodia-program.pdf>

GAY, A. 2017. Etude de la régulation de populations de cochenilles diaspiques en culture de cassis par des lâchers de coccinelles coccidiphages. Mémoire de fin d'études (non publié)

DAUFFUIS, S. 2018. Projet RhizoDia : essais en protection du cassis par *Rhizobius lophanthae* contre la cochenille blanche du mûrier. Rapport de stage GIS-Fruits 2018. https://www.gis-fruits.org/content/download/3876/38621/version/1/file/Simon_Dauffouis_RhizoDia2018.pdf



Etat initial des sites d'essai et évolution de la pression du ravageur dans les parcelles de lâchers



Abris d'hivernation utilisés dans le projet. A gauche : bandes cartonnées. A droite : fagots de bambou
Crédits photo : Station La Morinière



Sachets de 200 *Rhizobius* au pied d'un buisson de cassis infesté
Crédits photo : Station La Morinière