



**HAL**  
open science

# Recherche et évaluation des parasitoïdes oophages indigènes de la punaise invasive *Halyomorpha halys*

Nicolas Bonetti

► **To cite this version:**

Nicolas Bonetti. Recherche et évaluation des parasitoïdes oophages indigènes de la punaise invasive *Halyomorpha halys*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02361099

**HAL Id: dumas-02361099**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02361099>**

Submitted on 13 Nov 2019

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année universitaire : 2018-2019

Spécialité/Mention :

Horticulture

Spécialisation/Parcours :

Protection des Plantes et de  
l'Environnement en Horticulture

### Mémoire de fin d'études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

# Recherche et évaluation des parasitoïdes oophages indigènes de la punaise invasive *Halyomorpha halys*

Par : Nicolas BONETTI



**Soutenu à Anger le 05/09/2019**

**Devant le jury composé de :**

Président : M. JALOUX Bruno

Maître de stage : M. BOUT Alexandre

Enseignant référent : M. TRICAULT Yann

Autres membres du jury (Nom, Qualité) :

M. GINEZ Anthony

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST*

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation

«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»

disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



# Remerciement

Je voudrais commencer par remercier le mon tuteur, Alexandre BOUT, pour ce stage très enrichissant. Merci pour tes conseils et le sacrifice d'une partie de tes vacances pour la relecture de ce mémoire.

Merci à Isabelle Le Goff pour avoir été un parfait binôme de terrain et à l'élevage pendant ces 6 mois. J'ai beaucoup appris à ton contact.

Merci à Lily Cesari pour sa bonne tes conseils, ta bonne humeur et de longues heures passés seul à l'élevage pour me permettre d'écrire ce mémoire.

Merci à Claire Caravel pour son soutien et ses encouragements

Merci à Nicolas Ris, le chef d'équipe, pour m'avoir accueilli à RDLB durant ces 6 mois.

Merci à toute l'équipe RDLB pour la meilleure des ambiances de travail que l'on puisse rêver. Merci à Sylvie Warot et Mathilda Idier pour leur temps passer à m'aider sur la partie BM et à Gabby, Nico Boro, Marcel, Géraldine, Nadine et Camille pour nos échanges toujours enrichissants.

Pour finir je voudrais remercier le GIS fruit qui a financé mon stage, merci pour cette belle opportunité.

## Table des illustrations

Figure 1 *H. halys* adulte, J.C. Streito INRA

Figure 2 *H. halys* premier stade larvaire, T. Haye CABI

Figure 3 Cycle de developpement des punaises Pentatomidae, Ephytia

Figure 4 Dégâts de nutrition d'*H. halys* sur pomme, Morrison et al 2018

Figure 5 Déformation d'une poire suite à une attaque de précoce d'*H. halys*, Basarelli et al 2016

Figure 6 *Trissolcus basalis* émergent d'œufs de *Nezra viridula*, A Bout

Figure 7 *Trissolcus basalis* palpant des œufs de *Nezara viridula*, A Bout

Figure 8 *Trissolcus japonicus*, femelle vue de dessus, Yang et al 2009

Figure 9 Figure 9 Languette d'œufs sentinelles prédaté par un acarien, photo personnelle

Figure 10 Site d'exposition de la vallée de la Siagne, photo personnelle.

Figure 11 Stockage des ooplaques exposées en chambre climatique, photo personnelle

Figure 12 Stockage des ooplaques exposées en chambre climatique, photo personnelle

Figure 13 Carte des sites d'exposition de la campagne 2019

Figure 14 Genre des parasitoïdes émergés d'œufs d'*H. halys* viable

Figure 15 Index de parasitisme obtenu avec les expositions d'œufs d'*H. halys* viable. Hhf correspond aux œufs non stérilisés

Figure 16 Genre des parasitoïdes émergés d'œufs d'*H. halys* congelés

Figure 17 Index de parasitisme obtenu avec les expositions d'œufs d'*H. halys* stériles

Figure 18 Index de parasitisme obtenu avec des œufs de *N. viridula*

Figure 19 Arbre phylogénétique

Tableau 1 Bilan des expositions

# Sommaire

|   |    |
|---|----|
| Introduction .....  | 1  |
| Contexte .....  | 1  |
| Introduction d' <i>Halyomorpha halys</i> en Europe .....                    | 1  |
| Biologie d' <i>Halyomorpha halys</i> en Europe .....                        | 2  |
| Cycle d' <i>Halyomorpha halys</i> .....                                     | 2  |
| Durée de développement .....  | 3  |
| Symptômes et nuisibilité .....  | 4  |
| Méthode de lutte .....  | 5  |
| Lutte chimique .....  | 6  |
| La lutte biologique .....   | 7  |
| Parasitoïdes oophages indigènes .....                                       | 8  |
| Parasitoïdes oophages exotiques .....                                       | 9  |
| Bilan et Objectif du stage .....  | 10 |
| Matériel et méthode .....   | 11 |
| Elevage d' <i>Halyomorpha halys</i> au laboratoire .....                    | 11 |
| Exposition d'œufs sentinelles d' <i>Halyomorpha halys</i> .....             | 11 |
| Réseau local d'exposition .....   | 11 |
| Réseau national d'exposition .....  | 12 |
| Gestion des émergences de parasitoïdes .....                                | 12 |
| Variables calculées .....   | 12 |
| Caractérisation de la diversité via la démarche de type DNA-Barcoding ..... | 13 |
| Analyse moléculaire .....   | 13 |
| Recherche de nouveaux haplotypes .....                                      | 14 |
| Création de l'arbre phylogénétique .....                                    | 14 |
| Identification morphologique .....  | 14 |
| Remarque .....  | 14 |
| Résultats .....   | 15 |
| Exposition d'œufs non stérilisés .....                                      | 16 |
| Exposition d'œufs congelés .....  | 17 |
| Exposition d'œuf de <i>Nezara viridula</i> .....                            | 18 |
| Arbre phylogénétique .....  | 19 |
| Discussion .....  | 20 |
| Régulation naturelle d' <i>Halyomorpha halys</i> .....                      | 20 |
| Diversité des parasitoïdes oophages .....                                   | 22 |
| Dynamique spatiale et temporelle .....                                      | 26 |
| Conclusion .....  | 27 |
| Bibliographie .....   | 28 |



# Introduction

## Contexte

Le nombre d'espèces exotiques installées sur de nouveaux territoires a beaucoup augmenté depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle (Hulme et al., 2009). Les signalements de nouvelles espèces sont ainsi passés de 200 en 1900 à 585 en 1996. En particulier, environ 140 descriptions d'espèces exotiques d'insectes ont été recensées en 2000 (Seebens et al., 2017). La principale cause de ces migrations est le transport de marchandises et de personnes. Les invertébrés sont le plus souvent transportés de manière non volontaire via des contaminations de matériel végétal (Hulme et al., 2008). Ces espèces exotiques ont des influences variables sur les écosystèmes hôtes. Dans certains cas, les caractéristiques intrinsèques de l'espèce (mode reproduction, exploitation du milieu) et l'absence de prédateurs et de parasitoïdes lui permettent de s'établir et de s'étendre rapidement sur le nouveau territoire. L'espèce devient alors une espèce exotique envahissante pouvant avoir des impacts sur la santé humaine, la biodiversité et les activités humaines. Les agrosystèmes sont particulièrement sensibles aux espèces invasives car les itinéraires techniques ne sont pas adaptés à ces nouveaux organismes. L'absence de moyens de lutte peut entraîner de très fortes diminutions de rendement. Récemment en Europe, l'espèce *Drosophila suzukii* est un bon exemple de la conséquence de l'introduction d'une espèce exotique en Europe (Cini et al., 2012). Une autre invasion en cours est celle de *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) (Hemiptera : Pentatomidae).

## Introduction d'*Halyomorpha halys* en Europe

Le genre *Halyomorpha* est originaire d'Afrique et d'Asie, il compte 37 espèces. *Halyomorpha halys* est native de Chine, du Japon et de Corée (figure 1 et 2). C'est la seule punaise du genre à être installée en dehors de son aire d'origine (Fried et al., 2014). Elle est présente en Amérique du nord depuis la fin des années 90. En Europe le premier signalement date de 2007, pour la Suisse. L'introduction est probablement due à un transport passif non obligatoirement lié aux filières végétales. Le comportement de dissimulation et d'agrégation de l'insecte dans les marchandises rend sa détection difficile. De plus, cette punaise possède une capacité de dispersion active par le vol important : environ 2 km par jour (Lee et al., 2013b). Depuis la Suisse, *H. halys* a colonisé de nombreux pays européens comme l'Allemagne, l'Autriche, l'Italie, la Serbie, la Grèce et l'Espagne. En effet, la zone climatique favorable à *H. halys* correspond à la quasi-totalité de l'Europe (Zhu et al., 2012). En France, la colonisation a commencé en Alsace, où une première colonie a été détectée en 2012 à proximité du jardin botanique de Strasbourg, sans doute en provenance d'Allemagne (Callot and Brua, 2013). En 2013, de nombreux individus sont découverts au muséum d'histoire naturel de Paris (Garrouste et al., 2014). La provenance de cette population n'est pas connue mais il est probable que les punaises soient arrivées avec des marchandises par avion ou train. La population d'*H. halys* présente dans le sud de la France provient probablement d'Italie où la punaise était largement installée en 2014 (Haye et al., 2015b; Maurel et al., 2016)





FIGURE 1 *H. halys* adulte, J.C. Streito INRA

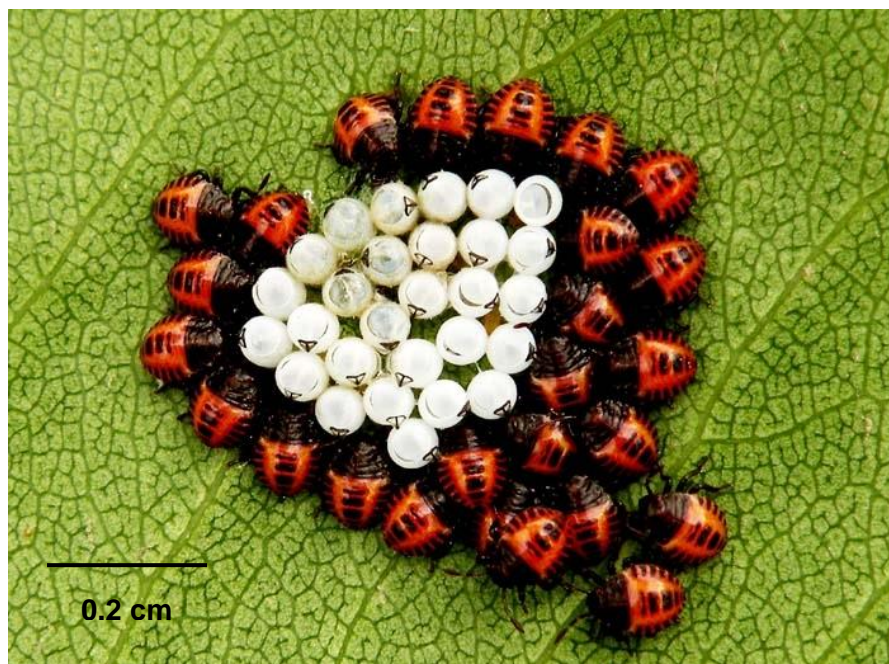


Figure 2 *H. halys* premier stade larvaire, T. Haye CABI



L'Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, dans son analyse de risque déclare qu'il y a une forte probabilité, avec une incertitude faible, qu'*Halyomorpha halys* s'installe sur la totalité du territoire national et représente une menace pour de nombreuses filières agricoles. Un outil de veille participatif qui permet de réaliser des signalements a en effet enregistré une très forte augmentation du nombre de punaises diaboliques à l'automne 2018 (Agiir, 2019).

## **Biologie d'*Halyomorpha halys* en Europe**

A la suite de l'introduction d'un nouveau ravageur, l'étude de sa biologie est souvent une condition sine qua non au développement de méthodes de gestion ou de contrôle. Plusieurs paramètres sont notamment importants : les durées de développement des différents stades, les formes de résistances hivernales, le spectre d'hôte.

### **Cycle d'*Halyomorpha halys***

Le développement d'*H. halys* est de type hétérométabole : il se fait en 5 stades larvaires suivis de l'adulte (figure 3). L'oviposition se fait sur la face inférieure des feuilles en groupes d'environ 27 à 28 œufs appelés ooplaque. Le nombre d'œufs pondus par les femelles dépend de la génération et des conditions abiotiques. Le premier stade larvaire est immobile, les individus restent autour des ooplaques. La punaise se déplace et commence à se nourrir en piquant les tissus végétaux à partir du second stade larvaire. Le développement de l'œuf à l'adulte nécessite un cumul de 588 degrés jour ce qui correspond à 33.2 jours à 30°C au laboratoire (Leskey and Nielsen, 2018). Les adultes peuvent vivre 75 jours à 20°C et 30 jours à 30°C. Les punaises passent l'hiver sous forme adulte en colonies sous les écorces des arbres, chênes et robiniers plus particulièrement, ou dans les fissures ou anfractuosités des bâtiments (Leskey and Nielsen, 2018). Il a été montré que certaines populations du nord des Etats Unis peuvent résister jusqu'à -17°C sous cette forme (Cira et al., 2016).

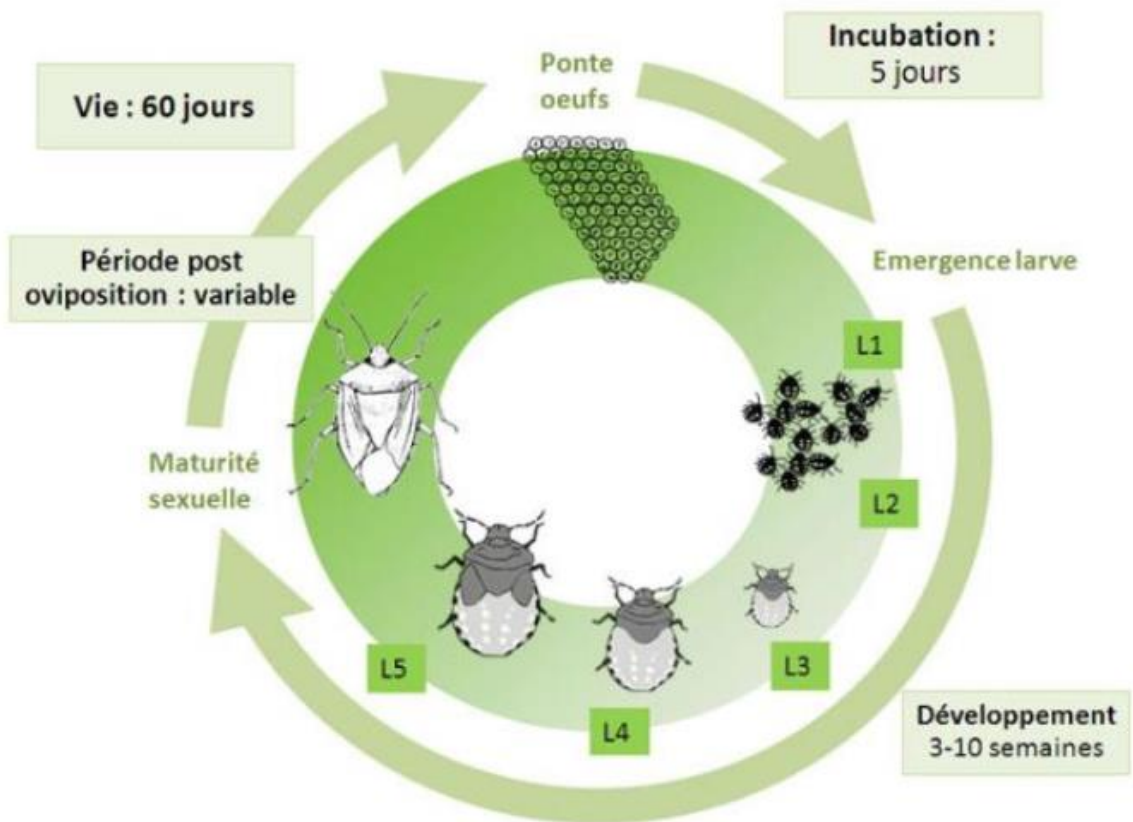


Figure 3 Cycle de développement des punaises Pentatomidae, Ephytia

## Durée de développement

La durée du cycle d'*H. halys* en Europe a été étudié par deux équipes de recherche en Suisse et en Italie (Haye et al., 2014; Costi et al., 2017). Les deux équipes ont mené des expérimentations en extérieur avec des conditions climatiques différentes. En Italie, les températures moyennes lors de l'étude étaient entre 15 et 30°C et en Suisse entre 5 et 25°C. Cela permet de comparer le comportement de la punaise dans différentes conditions afin d'évaluer le risque pour différentes zones climatiques. La sortie de diapause hivernale est observée à peu près au même moment dans les deux pays, à partir de début avril pour la Suisse et du 27 mars pour l'Italie. Ces dates correspondent à 14°C et une photopériode de 13h. La première différence est la date de la première oviposition qui est observée le 4 mai en Italie et le 10 juin en Suisse. Cela s'explique par le fait qu'il faille à la punaise hivernante 148° jour après sa sortie de diapause avant de pondre. La principale conséquence de cette disparité est l'apparition en Italie d'une seconde génération. En effet, les femelles émergentes des œufs pondus par la génération hivernante ont le temps de se reproduire et produisent des individus jusqu'à début septembre. En Suisse, la température n'est pas assez élevée pour que les femelles issues des œufs puissent se reproduire. La deuxième génération est capable de pondre de début juillet à début septembre avec une fécondité légèrement moindre que la première (214 contre 285 œufs par femelle). Les deux équipes ont observé 70 à 85%, des pontes entre juin et juillet. La fécondité est cependant plus forte en Italie avec plus de 200 œufs par femelle en moyenne contre seulement 80 en Suisse. L'émergence des larves a lieu 3 à 6 jours après la ponte. Les taux de survie jusqu'à l'âge adulte sont aussi variables. Si l'on considère la période juin-juillet 12 à 25% des œufs atteignent l'âge adulte en Suisse contre 50 à 80% en Italie.

Ces résultats confirment le fait qu'*H. halys* est bien adaptée au climat européen, c'est en particulier vrai dans le sud de l'Europe où des printemps doux et des températures élevées permettent à la punaise diabolique de réaliser plusieurs générations et donc possiblement plus de dégâts.

## Plantes hôtes

*H. halys* est une espèce polyphage qui possède plus d'une centaine de plantes hôtes dans son aire d'origine (Wermelinger et al., 2008). La majorité sont des plantes sauvages ou d'ornement, une étude récente a mis en évidence 88 arbres et arbustes commercialisés pouvant accueillir la punaise (Bergmann et al., 2016). Les plantes cultivées les plus susceptibles d'être attaquées sont les rosacées (genres *Malus*, *Prunus*, *Pyrus*...), les solanacées (genre *Solanum*) le soja et le maïs (EPPO, 2003; Costi et al., 2017) De plus, *H. halys* peut aussi piquer des plantes qui ne sont pas hôtes. Ces plantes ne permettent pas à la punaise de réaliser la totalité de son cycle mais sont exploitées comme source de nourriture ponctuelle en cas de manque de ressources. Cette grande diversité d'hôtes rend la lutte contre le ravageur difficile. Les stratégies de lutte mises en place uniquement sur la parcelle peuvent être rendues inefficaces par la présence de plantes hôtes sauvages qui peuvent servir de refuge. *H. halys* peut ainsi réaliser son cycle dans la nature et venir uniquement sur les parcelles pour se nourrir.



## Symptômes et nuisibilité

*H. halys* est un insecte piqueur suceur, les dégâts sont dus à l'insertion du stylet dans le végétal lors de la prise de nourriture. Les organes les plus touchés sont les fruits, car ils représentent une source abondante et nutritive pour la punaise. Tous les stades de la punaise hormis le premier attaquent le végétal. La piqûre peut provoquer de la simple marque à la nécrose en passant par la déformation des fruits (figure 4 et 5). Le type de symptôme va dépendre de l'âge physiologique du fruit lors de l'attaque, une piqûre précoce va provoquer des déformations alors qu'une tardive plutôt des nécroses ou des pourritures à la conservation (Leskey et al., 2012b). Une des difficultés est la détection des fruits piqués, il faut parfois plusieurs semaines pour que les dégâts apparaissent.

*H. halys* n'est pas un ravageur important en Asie, dans son aire géographique d'origine. Plusieurs études relèvent des dégâts ponctuels en verger de pêcher, de mandarinier, de plaqueminier et sur quelques cultures légumières (Funayama, 2002; Lee et al., 2013a).

Au contraire, aux Etats Unis, cette punaise pose des problèmes importants pour la protection des plantes. Environ 10 ans après son introduction, en 2011 le suivi de quatre vergers de pommiers et de pêchers montre des dégâts allant de 20 à 80% des fruits à la récolte avec des conséquences économiques graves (Leskey et al., 2012b). Il n'existe pas pour le moment de seuil nuisibilité établi. Il a cependant été observé en arboriculture fruitière qu'une faible population, 2 à 3 individus par arbre peut occasionner des dégâts sur 25% des fruits (Nielsen and Hamilton, 2009).

En Europe, les premiers dommages sont signalés dans le nord de l'Italie en 2015 (Bariselli et al., 2016). Les parcelles touchées sont là aussi des vergers de pommiers et de pêchers. Le rendement de certaines variétés est diminué à plus de 50% par la punaise. Aucun dégât n'est pour le moment signalé sur les cultures françaises.

L'étude de la biologie, de la nuisibilité et les exemples précédant laissent penser qu'elle pourrait devenir un ravageur préoccupant pour de nombreuses filières agricoles françaises. Il est donc nécessaire de se questionner sur l'existence de moyens de lutte.



**Figure 4** Dégâts de nutrition d'*H. halys* sur pomme comprenant : A décoloration de l'épiderme, B déformation, C subérification interne et D trace de pénétration du stylet (Morrison et al 2018)



**FIGURE 5** Déformation d'une poire suite à une attaque de précoce d'*H. halys* (Basarelli et al 2016)

## Méthode de lutte

En Amérique du nord où *H. halys* pose problème depuis une dizaine d'année des programmes de lutte ont été mis en place pour protéger les cultures. Elles ont souvent été mise en place dans l'urgence avec peu de connaissances préalables sur le ravageur et font donc, le plus souvent appel à des produits phytosanitaires de synthèse non spécifiques. La stratégie la plus basique consiste en des traitements systématiques hebdomadaires dès la détection du ravageur. Cette stratégie donne des résultats variables selon les années et les exploitations, d'importantes pertes restent assez courantes (Leskey et al., 2012b). L'accumulation progressive de connaissances sur la punaise diabolique a permis de développer la recherche de stratégies plus efficaces et moins consommatrices en pesticide.

### Lutte chimique

L'utilisation de méthode de monitoring a d'abord été associée avec de la lutte chimique. Le principe du monitoring consiste à détecter la présence puis de suivre la dynamique spatiale et démographique d'une population de ravageurs sur une parcelle. L'objectif est d'adapter les pratiques culturales à la pression du ravageur. Il faut pour cela développer des outils qui sont souvent spécifiques à chaque ravageur.

Dans le cas *H. halys* un piège à phéromone en forme de pyramide noire a été mis au point (Leskey et al., 2012c). Le piège utilise une phéromone d'agrégation découverte en 2014 qui est efficace sur les mâles, les femelles et les larves (Khrimian et al., 2014). Il est possible d'utiliser les pièges pour détecter les premiers vols d'*H. halys* au printemps car les adultes sortant de diapause sont plus faciles à tuer en utilisant des insecticides que les générations suivantes (Leskey et al., 2014). De plus, une bonne gestion de la génération sortant de diapause permet de limiter fortement les nuisances pour le reste de la saison. Il est aussi possible d'utiliser les pièges à phéromones comme outil d'aide à la décision. Il s'agit de déclencher un traitement uniquement si un seuil en ravageur est franchi.

Trois seuils de traitement ont été testés, 1, 10 et 20 *H. halys* capturés par piège. Les parcelles tests sont comparées avec des parcelles traitées systématiquement et des parcelles non traitées sur toute une saison (Short et al., 2017). Les résultats ne montrent pas de différences significatives au niveau des dégâts entre la modalité traitement systématique et la modalité traitement après 10 captures. Cette technique pourrait permettre une réduction de pesticides de 40% par rapport à un traitement systématique.

La stratégie « attract and kill » consiste à attirer l'organisme nuisible au moyen d'une plante attractive ou de phéromones pour ensuite la tuer le plus souvent à l'aide de produits chimiques. C'est une méthode de lutte utilisée couramment contre les espèces invasives. L'objectif est à la fois de réduire les dégâts sur la parcelle en attirant les bioagresseurs sur des plantes qui ne présentent pas d'intérêt économique mais cela permet aussi de diminuer les risques liés aux insecticides car les applications se font uniquement dans la zone piège (El-Sayed et al., 2009). Ce type de lutte est possible grâce à la mise au point d'un mélange phéromonal efficace tout au long de la saison sur les adultes et tous les stades larvaires.





Une expérimentation a été menée sur 10 vergers de pommiers en Amérique du nord (Morrison et al., 2018b). La punaise diabolique provoque principalement des dégâts sur le bord des parcelles car elle envahit les zones cultivées depuis des hôtes sauvages (Blaauw et al., 2016). Les zones pièges ont donc été placées sur les bords des parcelles dans le but d'intercepter la punaise avant qu'elle ne rentre dans le verger. Une zone piège est constituée d'un arbre et de diffuseurs de phéromones. Les zones pièges sont traitées toutes les semaines. Afin d'évaluer l'efficacité de la stratégie des pièges à phéromones en pyramide sont placés à divers endroits du verger pour évaluer la concentration en punaise. Des prélèvements sont faits sur les fruits pour évaluer la proportion de fruits endommagés et la sévérité des dégâts. Les parcelles témoins sont protégées à l'aide de programmes de lutte chimique classiquement recommandés.

Les résultats montrent que la stratégie « attract and kill » diminue la proportion de fruits touchés de 0 à 50% et la sévérité de 50% à 65% en particulier au centre de la parcelle. Cependant l'augmentation de produits commercialisables ne parvient dans aucun cas à compenser le coût de la stratégie expérimentée qui est en moyenne 8 fois plus chère que les gestions classiques des arboriculteurs qui appliquent entre 10 et 20 traitements spécifiques à la punaise diabolique par an. (Leskey et al., 2012b) (Morrison et al., 2018b).

Ces stratégies sont possibles uniquement si les agriculteurs ont à disposition des insecticides efficaces. Il existe 10 substances actives avec une mortalité de plus de 75% (le diméthoate, le malathion, le bifenthrin, le methidathion, l'endosulfan, le methomyl et le chlorpyrifos, l'acephate, la fenpropathrin et le permethrin) pour la dose homologuée administrée en laboratoire (Leskey et al., 2012a). Aucune de ces substances n'est cependant autorisée en France en arboriculture (Anses, 2019). Des produits à base de Lambda-Cyhalothrin, de Deltaméthrine, de Tau-Fluvalinate et de la famille des pyréthrinoïdes sont utilisables (Anses, 2019). La Lambda-Cyhalothrin est la substance la plus efficace des trois mais elle présente un profil écotoxicologique mauvais, en particulier pour les organismes aquatiques. De plus, c'est un produit phytosanitaire très peu sélectif qui va donc avoir un impact important sur la diversité d'insectes présente sur la parcelle.

Pour les exploitations en agriculture biologique la problématique est encore plus grande car les insecticides classiquement utilisés en verger comme l'huile de neem, les huiles essentielles de plantes et les alcaloïdes naturels sont peu efficaces au champ. Cela malgré des études au laboratoire montrant une mortalité assez forte sur les stades larvaires (supérieure à 60%) (Bergmann and Raupp, 2014).

Il existe donc actuellement peu de solutions chimiques efficaces à la disposition des agriculteurs français pour lutter contre *H. halys*. De plus les stratégies uniquement curatives basées sur les pesticides ne sont pas compatibles avec les objectifs de réduction de l'utilisation et des impacts des produits phytosanitaires (Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt, 2015). La mise au point de programmes de protection peu consommateurs en produits de synthèse passe par l'association de plusieurs méthodes. On peut par exemple citer en amont de l'itinéraire technique la sélection variétale et la prophylaxie, qui a pour but de rendre résistantes les plantes ou d'empêcher les bioagresseurs de s'installer. Plus en aval l'utilisation de méthodes alternatives de régulation telle que la lutte biologique est possible.



## La lutte biologique

Dans le domaine de la protection des plantes la lutte biologique est l'utilisation d'organismes vivants antagonistes ou de leurs produits pour lutter contre les bioagresseurs des cultures (Jourdeuil et al., 1991). Le principe est d'exploiter les mécanismes de régulation naturels, les organismes de lutte doivent maintenir la population de bioagresseurs sous un seuil de nuisibilité et ainsi permettre de limiter les pertes lors de la récolte. Les définitions de ce concept peuvent cependant varier d'un pays à l'autre, certaines publications limitent par exemple le terme lutte biologique aux organismes vivants (Eilenberg et al., 2001). Il existe différents types de lutte biologique : par acclimatation, par augmentation et par conservation : cette dernière ne sera pas traitée ici.

La lutte par acclimatation consiste à introduire dans une zone envahie un auxiliaire de la zone d'origine du ravageur pour qu'il s'établisse de manière pérenne et qu'il induise un contrôle durable (Eilenberg et al., 2001). La procédure d'introduction est réglementée et assez longue car il faut évaluer chez les candidats l'adaptation au milieu et sa spécificité vis-à-vis de la cible afin de ne pas lâcher dans l'environnement une nouvelle espèce invasive. Cependant en cas de succès la régulation est d'un niveau élevé et stable dans le temps. La lutte biologique la plus utilisée est celle par augmentation. Les parcelles sont inoculées avec des individus plus ou moins nombreux achetés dans le commerce. Selon le nombre d'individus et la date de lâcher les stratégies peuvent être préventives ou curatives (Suty, 2010). Dans le cadre de la lutte par augmentation la réglementation n'impose aucune preuve d'efficacité avant la mise sur le marché.

Quelle que soit la stratégie choisie l'étape cruciale est le choix du prédateur ou du parasitoïde. L'organisme doit, pour une bonne efficacité, répondre au mieux aux critères suivants : une capacité de reproduction élevée, une durée de vie la plus longue possible, un bon synchronisme avec l'organisme à contrôler, une capacité de dispersion bonne à courte distance, un taux de prédation ou de parasitisme élevé, un élevage de masse facile. En lutte biologique il est possible d'utiliser des prédateurs ou des parasitoïdes. Ces derniers sont des insectes qui se développent sur ou dans un organisme unique (hôte) qui lui sert de ressource (figure 6 et 7). L'hôte meurt des suites directes ou indirectes du développement (Eggleton P. and Belshaw Robert, 1992). Il existe des parasitoïdes qui s'attaquent à tous les stades de développement des insectes. La recherche de candidats pour la lutte biologique contre *H. halys* s'est concentrée sur les parasitoïdes oophages. Ces derniers sont les principaux régulateurs des punaises pentatomidées indigènes d'Europe et d'Amérique du nord (Lee et al., 2013a). De plus s'attaquer à l'œuf assure qu'il n'y aura aucun dégât. Les femelles parasitoïdes oophages injectent lors du parasitisme des substances qui neutralisent le système immunitaire de l'embryon et permet la croissance de leurs larves. Ces substances sont souvent spécifiques et déterminent le spectre d'hôte exploitable par l'espèce (Asgari and Rivers, 2011). Il existe également des parasitoïdes qui s'attaquent aux adultes en exploitant la phéromone d'agrégation de la punaise pour localiser les colonies (Lara et al., 2016) Mais cela ne semble pas être la solution la plus efficace en effet, une étude menée aux USA a montré que sur 25000 *H. halys* adultes collectés, 1 à 2% présentés des œufs dans leur corps. Une émergence au laboratoire a été observée dans moins de 0.0001% des cas, soit une seule fois avec l'espèce *Trichopoda pennipes* (Fabricius, 1781) (Abram et al., 2017).

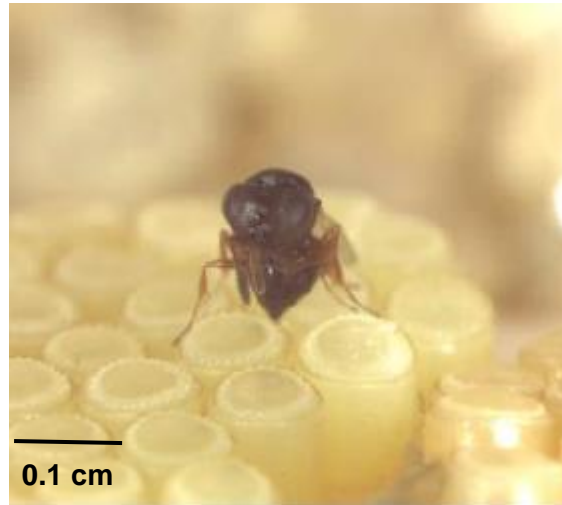


Figure 6 *Trissolcus basalis* palpant des œufs de *Nezara viridula*, A. Bout



Figure 7 *Trissolcus basalis* émergent d'œufs de *Nezra viridula*, A. Bout

## Parasitoïdes oophages indigènes

De nombreuses études nord-américaines et européennes ont cherché à savoir si les parasitoïdes indigènes de leurs zones d'étude respectives pouvaient utiliser la punaise diabolique comme hôte. Pour cela les équipes de recherche ont réalisé des expositions dans l'environnement d'œufs frais ou stérilisés d'*Halyomorpha halys*. La stérilisation est effectuée par un bref passage à -80°C des ooplaques. La plupart des études placent entre 15 et 30 ooplaques par site et par exposition, le nombre de sites varie entre 3 et 26. Les œufs sont placés sur la face inférieure des feuilles. La diversité des plantes hôtes d'*Halyomorpha halys* permet de placer des ooplaques dans des environnements très divers, des champs cultivés (grandes cultures, verger, pépinières), des parcs urbains et des milieux naturels forestiers. Le choix des lieux d'exposition varie beaucoup entre les études. Au bout de 2 à 5 jours les ooplaques sont placés dans des boîtes de pétri ou des tubes individuels à environ 25°C, 60% d'humidité relative et 16/8 heures de soleil et d'obscurité. (Jones et al., 2014; Haye et al., 2015a; Cornelius et al., 2016; Ogburn et al., 2016; Costi et al., 2017; Dieckhoff et al., 2017; Morrison et al., 2018a; Stahl et al., 2018).

Les résultats de ces études montrent qu'il existe 12 espèces appartenant à 5 genres, *Anastatus* (Motschulsky, 1859), *Gryon* (Haliday 1833), *Ooencyrtus* (Ashmead 1900), *Telenomus* (Haliday 1833) et *Trissolcus* (Ashmead 1893) capables d'utiliser les œufs d'*H. halys* en Amérique du nord (Lara et al., 2016). Les taux de parasitisme sont très variables (de 0 à 59%). Les œufs présents naturellement dans l'environnement sont parasités en moyenne dans  $12.4 \pm 4.8\%$  des cas contre  $1.1 \pm 0.2\%$  pour les œufs sentinelles. Cette différence s'explique peut-être par la génération lors de la ponte de signaux sémio-chimiques qui guident les parasitoïdes (Conti and Colazza, 2012). Pour ce qui est du taux d'émergence au laboratoire, il est de moins de 5% dans 87% des cas, ce qui montre que les parasitoïdes nord-américains pondent dans les œufs mais le plus souvent ne complètent pas leur développement (Abram et al., 2017).

Les nombreuses études aux Etats Unis ont de plus permis de faire le lien entre l'environnement et les espèces de parasitoïdes obtenus. Les résultats montrent que l'abondance relative d'une même espèce de parasitoïdes varie en fonction du milieu de capture. Certains ne sont pas présents dans tous les environnements. Si l'on veut choisir un organisme pour une lutte biologique il faut donc, pour une efficacité maximale, prendre un organisme adapté aux différents milieux agricoles. Il n'existe pas pour le moment d'étude similaire appliquée à l'Europe en raison d'un nombre d'études trop faible (Abram et al., 2017). Cependant certaines espèces sont communes entre les deux continents ce qui peut aider à orienter le lieu des expositions si l'on cherche à obtenir un parasitoïde particulier.

En Europe, seuls 2 parasitoïdes ont été identifiés suite à une émergence d'œufs frais, *Anastatus bifasciatus* (Geoffroy 1785) et *Ooencyrtus telenomicida* (Vassiliev, 1904) (Haye et al., 2015a; Roversi et al., 2016; Costi et al., 2018). Les taux de parasitisme sont bas de 0.5 à 4.4%. À la suite des expositions, l'équipe de Haye en Suisse a effectué des tests de non-choix pour évaluer dans quelle mesure les œufs d'*H. halys* sont adaptés au développement des parasitoïdes capturés.





Les individus sont placés dans une boîte avec une ooplaque d'*H. halys* fraîche ou congelée pendant 24h, le nombre d'œufs parasités et d'émergence est ensuite comptabilisé (Haye et al., 2015a; Roversi et al., 2016). Seul *A. bifasciatus* et *O. telenomicida* montrent un développement complet sur œufs viables d'*H. halys* avec respectivement entre 20 et 35% d'émergence. Les autres espèces de parasitoïdes avortent car les substances injectées lors du parasitisme ne suffisent pas à arrêter le développement des embryons de punaise. On observe d'ailleurs un bon développement de ces espèces de parasitoïdes quand les œufs d'*H. halys* sont préalablement congelés. De plus on observe que même si le parasitisme ne fonctionne pas, 15 à 25% des œufs de punaise n'émergent pas. La régulation apportée par les parasitoïdes est donc sûrement plus importante que celle estimée uniquement en comptant les individus émergents. C'est la théorie qui est développée par Abram et son équipe en 2016, qui avance que les femelles lors de l'oviposition endommagent une partie des œufs en provoquant des blessures à l'embryon ou en diminuant la turgescence (Abram et al., 2016).

## Parasitoïdes oophages exotiques

En Asie au moins 5 espèces de parasitoïdes du genre *Trissolcus* sont connues pour parasiter *H. halys* (Lee et al., 2013a). En particulier l'espèce *Trissolcus japonicus* (Ashmead 1904, Hymenoptera: Scelionidae) (figure 8) semble être un régulateur très efficace avec des taux de parasitisme d'environ 70% mesurés en Chine (figure 6) (Yang et al., 2009). Il s'agit d'une petite guêpe solitaire d'un à 2 mm de long qui présente une bonne synchronicité temporelle avec *H. halys*. En effet comme son hôte, elle passe l'hiver en diapause sous forme adulte, sa gamme de température de développement est de 12 à 34°C avec un optimal entre 27 et 30°C. De plus *T. japonicus* est capable de résister à de basses températures jusqu'à -18°C (Avila and Charles, 2018). Son cycle de développement est rapide 10,5 jours à 25°C, le sexe ratio est de 5.5 femelles pour 1 mâle et chaque femelle pond en moyenne 42 œufs (Yang et al., 2009).

D'autre part des travaux de modélisation ont montré que les conditions climatiques en Europe sont de modérées à favorables pour son installation (Avila and Charles, 2018). Toutes ses caractéristiques en font un bon candidat pour de la lutte biologique par acclimatation. Cependant la spécificité de *T. japonicus* pour *H. halys* est encore à l'étude. Des tests de non-choix au laboratoire ont montré que ce parasitoïde est capable de se développer sur 11 genres de Pentatomidae. En situation de choix le taux de parasitisme est plus élevé pour *H. halys* qui permet de produire de plus grosses femelles (Botch and Delfosse, 2018). De plus l'hôte de développement de la femelle influence son choix lors de la ponte. Lorsque l'hôte initial est *H. halys* les résultats montrent environ 45% de parasitisme sur *H. halys* et seulement 15 à 25 lorsque la femelle parasitoïde émerge d'une autre espèce (Botch and Delfosse, 2018).

Tout d'abord étudié pour la lutte biologique par acclimatation, *T. japonicus* a été identifié à divers endroits aux Etats Unis (Hedstrom et al., 2017), au Canada (Abram et al., 2019) et en Europe (Stahl et al., 2018). L'introduction de cet auxiliaire s'est probablement faite en même temps qu'*H. halys*, via les activités humaines. En France, il n'a pas encore été détecté, mais sa capture permettrait d'envisager son utilisation en tant qu'auxiliaire indigène pour des programmes de lutte biologique.



**Figure 8** *Trissolcus japonicus*, femelle vue de dessus, Yang et al 2009

## Bilan et objectif du stage

Il apparaît donc que la *H. halys* est bien implantée sur le territoire français et s'adapte bien aux conditions climatiques. Sa biologie et l'historique de ses invasions en Amérique du nord et plus proche de nous, en Italie et en Suisse, fait craindre l'émergence d'une importante problématique pour l'arboriculture fruitière. Le groupement d'intérêt scientifique fruits (GIS fruit) s'est donc mobilisé sur cette thématique. Un séminaire a d'ailleurs été organisé en février 2019 sur le sujet (référence page web gis) et a permis la proposition d'une bourse de stage sur le sujet.

Par ailleurs, l'équipe Recherche et Développement en Lutte Biologique (RDLB) de l'Institut Sophia Agrobiotech (ISA) s'est engagée dans le projet CasDar/Ecophyto IMPULsE (2014-2020) : « Développement et Intégration de Méthodes innovantes pour la maîtrise des PUnaises en cultures LEgumières ». Ce projet, financé par l'Agence Française de la Biodiversité (AFB) (Financement ECOPHYTO) et le CasDar Innovation et Partenariat, est piloté par le Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL). L'objectif de ce projet est de développer de nouvelles solutions de contrôle des principales punaises phytophages en cultures légumières et de proposer des stratégies de protection innovantes, fiables, rentables et pouvant répondre aux objectifs du plan Ecophyto II. IMPULSE comprends plusieurs actions, et notamment la recherche de nouvelles solutions de biocontrôle (produits de biocontrôle, plantes pièges ou plantes relais ou encore auxiliaires indigènes).

Les deux thèmes étant étroitement liés, une bourse de stage a été soumise par l'équipe RDLB au GIS Fruit concernant la : "Recherches et évaluation des parasitoïdes oophages indigènes de la punaise invasive *Halyomorpha halys*", et évaluée favorablement. En effet, l'équipe RDLB est particulièrement qualifiée ce type de sujet car elle réalise aussi bien le développement de stratégies de lutte biologique par augmentation, que par acclimatation et cette thématique du contrôle des punaises phytophages et d'*Halyomorpha halys* apparaît comme prioritaire aujourd'hui. C'est donc dans ce contexte que j'ai pu réaliser ce stage.

L'objectif de l'expérimentation est double. Premièrement il s'agira de compléter les études européennes sur le parasitoïde d'*H. halys* afin d'orienter les futurs programmes de lutte biologique. Pour cela plusieurs questions se posent : Existe-t-il en France des espèces indigènes capables de parasiter *H. halys* ? Si oui sont-elles les mêmes que dans les autres pays européens ? Le parasitoïde *Trissolcus japonicus* est-il présent en France ? Si sa présence est confirmée cela mettra à disposition pour de futures études un bon candidat à évaluer. Au contraire, son absence impliquerait l'utilisation d'espèces indigènes ou plus probablement une procédure d'introduction. Deuxièmement la recherche de parasitoïdes d'*H. halys* sera l'occasion d'évaluer plus largement la diversité de parasitoïdes oophages de punaise Pentatomidae sur tout le territoire.



## Matériel et méthode

Afin de répondre aux objectifs de stage la méthode des œufs sentinelles a été choisie. Elle consiste à placer dans l'environnement des pontes pendant plusieurs jours puis de les récolter dans l'espoir que certaines soit parasitées. C'est la méthode la plus employée dans la bibliographie décrite ci-dessus. Lors de cette étude deux types de ponte d'*H. halys* vont être utilisés : des œufs frais, qui vont servir à estimer la régulation de la punaise diabolique en France et des œufs congelés qui seront notre outil d'évaluation de la diversité en parasitoïdes oophages de punaises Pentatomidae sur territoire français. La congélation (-80°C, 3min30) permet de tuer l'embryon de punaise et donc de neutraliser son système immunitaire ce qui permet à des parasitoïdes non adaptés à *H. halys* de se développer dans les œufs.

### **Elevage d'*Halyomorpha halys* au laboratoire**

Les adultes sont maintenus dans des cages (25cm\*25cm\*25cm) à 22°C et avec une alternance jour nuit de 16h/8h. La population est d'environ 100 individus par cages. Les punaises sont nourries avec des haricots (*Phaseolus vulgaris* L) et des graines de tournesol biologiques (*Helianthus annuus*) qui sont remplacés respectivement 2 et 1 fois par semaine. Des tubes d'eau fermés par du coton permettent l'hydratation des insectes. Deux papiers filtres par cages font office de support pour les pontes. Les larves sont élevées jusqu'à l'âge adulte dans des boîtes en plastiques avec les mêmes sources de nourriture que les adultes. La qualité des élevages est contrôlée à l'aide du nombre de pontes déposées par jour dans les cages. Ce dernier est de plus de 100 afin de répondre au besoin de l'expérimentation.

### **Exposition d'œufs sentinelles d'*Halyomorpha halys***

Les ooplaques utilisées pour les expositions locales datent de moins de 24h, elles sont récoltées le matin à l'élevage, collées sur des bandelettes de papier canson blanche de 5cm de long et 1 cm de large. Sur chaque site d'exposition 10 points sont choisis préférentiellement au niveau de haies sauvages multi spécifiques dans une zone sans traitement chimique. Sur chaque point les bandelettes viables sont fixées à l'aide d'agrafes sur la face inférieure de plantes très diverse (figure 9 et 10). Les bandelettes sont laissées 48h sur le terrain avant d'être récoltées.

#### Réseau local d'exposition

Sur les sites des Alpes Maritimes, sur chaque point 2 ooplaques sont placés, une fraîche et une congelée pour un totale de 20 pontes par site et par semaine. En 2018, 3 sites ont été utilisés, un jardin partagé, une exploitation agricole biologique de la vallée de la Siagne et la zone naturelle de la croix des gardes. Les expositions se sont déroulées toutes les semaines de début juillet à fin septembre. En 2019 5 sites ont été utilisés : un jardin partagé, une exploitation agricole biologique de la vallée de la Siagne, le jardin botanique du musée international de la parfumerie, la zone naturelle du parc de la Brague et le parc de l'INRA. Les expositions se sont déroulées toutes les semaines du mois de fin avril à fin septembre. En 2018 des ooplaques de *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) ont été exposées de la même façon.



**Figure 9** Languelette d'œufs sentinelles prédaté par un acarien, photo personnelle.



**Figure 10** Site d'exposition de la vallée de la Siagne avec exemple de hais multi-spécifique, photo personnelle.

## Réseau national d'exposition

Les expositions locales réalisées par l'équipe RDLB ont été complétées en 2019 par un réseau de partenaires répartis sur tout le territoire français. Ces derniers sont de natures diverses, centres d'expérimentations, exploitations agricoles, particuliers. Chaque partenaire choisi lui-même les 10 points qu'il va utiliser pour les expositions. Pour ces sites les ooplaques utilisées sont toutes congelées et envoyées dans des enveloppes. L'utilisation d'ooplaques fraîches était impossible car le délai entre la récolte au laboratoire des œufs et la mise sur le terrain était variable en fonction des services de la poste et de la disponibilité des partenaires, il y avait donc une possibilité d'éclosion des punaises et de contamination des sites. Il est possible de diviser les sites du réseau national en deux catégories, les lieux d'exposition réguliers et les lieux d'exposition ponctuels. Ces derniers sont des sites opportunistes utilisés lors de déplacement d'un des membres de l'équipe dans une zone d'intérêt.

### Gestion des ooplaques au laboratoire

Au laboratoire le nombre d'œufs par ooplaque est comptabilisé, puis chaque languette est placée dans des tubes à hémolyse référencés comportant un fin trait de miel. Les tubes sont ensuite conservés à 22°C et 70% HR (figure 11 et 12). L'émergence de parasitoïde est vérifiée 3 fois par semaine.

### Gestion des émergences de parasitoïdes

Les parasitoïdes émergés sont maintenus vivants dans les tubes à hémolyse régulièrement miellé. Ils sont conservés dans une enceinte phytotronique ayant les conditions suivantes : 22°C, 60% Hg et 16h/8h de cycle jour/nuit (figure 11 et 12). Toutes les souches sont repiquées, étape consistant à faire parasiter les adultes sur de nouvelles ooplaques pour constituer une nouvelle génération. Les parents sont mis en contact pendant 24h avec des pontes congelées (3min30, -80°C). Les ooplaques parasitées sont ensuite retirées et placées dans un nouveau tube miellé. Une fois plusieurs repiquages effectués pour augmenter les chances de survie de la souche les parasitoïdes exposés sur le terrain sont placés dans l'alcool et conservés à -20°C. Le nombre d'œufs parasités, le nombre de parasitoïdes et le nombre d'œufs avortés sont comptabilisés.

### Variables calculées

Plusieurs variables ont été calculées pour estimer le comportement des parasitoïdes oophages français face aux ooplaques de la punaise diabolique (Conti and Colazza, 2012; Costi et al., 2018). Le premier index correspond à la capacité de détection des ooplaques ainsi qu'à l'intérêt que leur portent les parasitoïdes : nombre d'ooplaques parasités/nombre d'ooplaques exposés (Index 1). Le deuxième index correspond à la capacité des parasitoïdes à exploiter l'ooplaque : nombre d'œuf parasité sur une ooplaque/nombre d'œufs totale dans l'ooplaque (Index 2). Le troisième index correspond à la capacité des parasitoïdes à effectuer son cycle sur *H. halys* : nombre de parasitoïdes émergents/nombre d'œufs parasités (Index 3). Le dernier index correspond à la capacité des parasitoïdes à réguler la population d'*H. halys* : le nombre d'œufs parasités/le nombre d'œufs exposés.





**Figure 11** Stockage des ooplaques exposées en chambre climatique, photo personnelle.



**Figure 12** Stockage des ooplaques exposées en chambre climatique, photo personnelle.

# Caractérisation de la diversité via la démarche de type DNA-Barcoding

## Analyse moléculaire

Pour chaque souche de parasitoïdes obtenue 3 individus sont sélectionnés au hasard pour être analysés. Les extractions d'ADN sont réalisées à l'aide de kit d'extraction ZYGEM PREPGEM® (VWR, Radnor, Pennsylvanie, USA). Ce kit permet une extraction d'ADN à partir d'insectes entiers sans destruction de ceux-ci. Ces derniers sont placés individuellement dans 15µL de mélange réactionnel, contenant 10X buffer, de l'enzyme et de l'eau. S'en suit une incubation au thermocycleur de 3 heures à 75°C, puis de 5 minutes à 95°C. Cette extraction permet par la suite de récupérer l'exosquelette intact de l'insecte – nous y ferons ci-dessous référence sous le terme de « voucher » -, et de le conserver dans l'alcool avant de l'étudier morphologiquement. Une région génétique principale a été amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reactions) : le gène mitochondrial Cytochrome oxydase 1 (COI) avec le couple d'amorces LCO (5' GTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3') et HCO (5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA 3') (27). « COI » est un gène universel, assez variable pour différencier les espèces entre elles tout en permettant de définir des amorces relativement « universelles » et donc d'amplifier des séquences comparables chez des taxons même relativement éloignés (familles voire ordres). Les PCR ont été réalisées à l'aide du QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, dans un volume final total de 25 µL (24 µL de mix + 1 µL d'extrait d'ADN pur). La présence et la taille des produits de PCR ont été analysés en utilisant un kit Qiaxcel DNA Fast analysis (QIAGEN S.A.S) sur le système Qiaxcel Advanced (QIAGEN S.A.S). Les produits de PCR obtenus sont ensuite envoyés à séquencer avec l'amorce HCO uniquement en utilisant la méthode de Sanger par la société GENEWIZ.

## Analyse des séquences

Toutes les séquences ont été éditées, traitées et corrigées manuellement avec le logiciel Geneious (10.2.3). Les séquences de mauvaises qualités, c'est-à-dire dont le chromatogramme est peu clair ou dont la longueur est trop courte, ont été supprimées. Les séquences conservées sont ensuite alignées grâce à l'algorithme ClustalW toujours via le logiciel Geneious (10.2.3). Le locus COI correspondant à une séquence codante pour une protéine, la traduction en acides aminés est donc possible de corriger et d'éliminer les séquences contenant d'éventuelles erreurs (erreur de lecture des chromatogrammes impliquant une mauvaise assignation du nucléotide et/ou l'apparition de codons stop en milieu de séquence). Pour cela il faut au préalable choisir le bon cadre de lecture c'est-à-dire la bonne façon de lire les enchainements de triplets de nucléotides.



## Recherche de nouveaux haplotypes

Les séquences corrigées ont été chargées sur la plateforme de bio-informatique Galaxy et blastées sur une bibliothèque d'haplotype de parasitoïdes oophages de punaises Pentatomidae constituée lors de travaux précédents par l'équipe RDLB. Les nouvelles séquences identifiées par Galaxy ont été considérées comme de potentiels haplotypes uniquement si elles ont une taille suffisante pour être totalement alignée avec les haplotypes de références. Les séquences trop courtes sont donc éliminées. Une exception a été faite pour le genre *Anastatus* dont les séquences sont toute d'une taille réduite avec notre protocole. Ces dernières ne constituent pas des haplotypes mais seront conservées pour la suite de l'analyse. Les potentiels haplotypes sont ensuite traités par le logiciel DnaSP version 5.10.01 qui permet de regrouper celles qui sont identiques.

## Création de l'arbre phylogénétique

En plus des séquences précédentes l'arbre phylogénétique a été construit à partir d'haplotypes de parasitoïdes oophages de punaises Pentatomidae déjà obtenu par l'équipe RDLB, et de séquences de référence issues de GenBank. L'arbre a été construit pas le logiciel MEGA version 7.0.26 en utilisant la méthode du Neighbor-joining avec le modèle Kimura à 2 paramètres en Pairwise deletion. La robustesse des embranchements a été estimée grâce à la méthode du bootstraps avec une itération de 500. Un cluster supposé représenter une espèce a été défini comme un clade supporté par un bootstrap au moins supérieur à 90%. L'arbre obtenu a été annoté avec le logiciel FigTree.

## Identification morphologique

Les « vouchers » correspondant à des clades distincts sont triés morphologiquement (au genre voire à l'espèce dans le cas de *T. basalis*) au laboratoire par Alexandre Bout et envoyés à Elijah Talamas, spécialiste reconnu de la taxonomie des *Scelionidae* en général et des *Trissolcus* en particulier pour identification. Tous les vouchers sont immédiatement référencés et les déterminations réalisées sous loupe binoculaire. Les identifications sont réalisées à l'aide de la clé taxonomique des *Trissolcus* paleartique (Talamas et al., 2017) et d'autres clés intermédiaires des genres fournies par E. Talamas. Les individus ainsi déterminés morphologiquement sont montés en collection de référence et conservés à terme dans le laboratoire INRA du site de Sophia-Antipolis.

## Remarque

Le mémoire ne contient pas toutes les données de la campagne d'exposition 2019. Les données issues du terrain s'arrêtent fin juillet. Outre les données du mois d'août qui sont non négligeables, le plus fort pic de parasitisme est attendu en septembre. De plus pour des questions de temps seule une petite partie des parasitoïdes obtenus ont pu être passés en barcode. Il faut en effet compter environ 1 mois entre l'émergence d'un parasitoïde et l'obtention d'une séquence utilisable entre le repiquage, l'extraction, la PCR, le séquençage qui prend une semaine et la correction des séquences. Pour finir une partie de l'identification morphologique est en cours de réalisation par Elijah Talamas (Etats Unis).



## Résultats

Au cours des deux ans d'études 2018 et 2019, 38879 œufs ont été exposés sur 18 sites différents (tableau 1 et figure 13). Le nombre d'œufs exposés par site est très variable. Cette variabilité dépend surtout de la disponibilité des partenaires qui réalisent ces expositions pour nous. De plus, il n'a pas toujours été possible d'envoyer des œufs chaque semaine du fait des aléas de la production. Les contraintes sont d'autant plus fortes que la distance du point d'exposition est grande : en effet, l'exposition d'œufs sentinelles issues de punaises Pentatomidae nécessite d'exposer des ooplaques les plus fraîches possibles, or parfois les délais de livraison des ooplaques augmentaient significativement avec la distance.

TABLEAU 1 TABLEAU RECAPITULATIF DES CAMPAGNES D'EXPOSITION 2018 ET 2019

| Année           | Location                         | Type                    | Nb d'œufs exposés | Nb d'œufs parasité | Nb de parasitoïdes | Nb d'œufs avortés |
|-----------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| 2018            | Grasse jardin de la madeleine    | Jardin partagé          | 4076              | 744                | 558                | 208               |
| 2018            | INRA - Parcelle                  | Zone naturelle          | 2599              | 19                 | 3                  | 16                |
| 2018            | Jardin de la Vallée de la Siagne | Exploitation maraichère | 5062              | 302                | 184                | 118               |
| 2018            | La Croix des Gardes              | Zone naturelle          | 3912              | 74                 | 3                  | 71                |
| <b>Tot 2018</b> |                                  |                         | <b>15649</b>      | <b>1139</b>        | <b>748</b>         | <b>413</b>        |
| 2019            | Grasse jardin de la madeleine    | Jardin partagé          | 1930              | 403                | 177                | 226               |
| 2019            | INRA - Parcelle                  | Zone naturelle          | 1568              | 299                | 131                | 168               |
| 2019            | Jardin de la Vallée de la Siagne | Zone naturelle          | 5306              | 483                | 152                | 372               |
| 2019            | Jardin du MIP                    | Exploitation maraichère | 4498              | 254                | 11                 | 243               |
| 2019            | Biot                             | Zone naturelle          | 1810              | 106                | 2                  | 104               |
| 2019            | Brague                           | Zone naturelle          | 435               | 4                  | 0                  | 4                 |
| 2019            | Jardin NB                        | Jardin particulier      | 242               | 33                 | 0                  | 33                |
| 2019            | Le Rheu                          | Jardin particulier      | 308               | 0                  | 0                  | 0                 |
| 2019            | Les Rives                        | Jardin particulier      | 138               | 1                  | 0                  | 1                 |
| 2019            | Nevers                           | Jardin particulier      | 742               | 33                 | 9                  | 24                |
| 2019            | Thonon                           | Zone naturelle          | 452               | 46                 | 11                 | 35                |
| 2019            | Unicoque                         | Verge de noisettes      | 568               | 483                | 9                  | 474               |
| 2019            | Valensole                        | Exploitation maraichère | 1353              | 1                  | 0                  | 1                 |
| 2019            | Claret                           | Exploitation maraichère | 1455              | 161                | 74                 | 87                |
| 2019            | Areflec                          | Zone naturelle          | 1061              | 175                | 42                 | 133               |
| 2019            | Corbeil-Essonne                  | Jardin particulier      | 656               | 5                  | 1                  | 4                 |
| 2019            | Essay                            | Jardin particulier      | 708               | 28                 | 0                  | 28                |
| <b>Tot 2019</b> |                                  |                         | <b>23230</b>      | <b>2515</b>        | <b>619</b>         | <b>1937</b>       |
| <b>Total</b>    |                                  |                         | <b>38879</b>      | <b>3654</b>        | <b>1367</b>        | <b>2350</b>       |

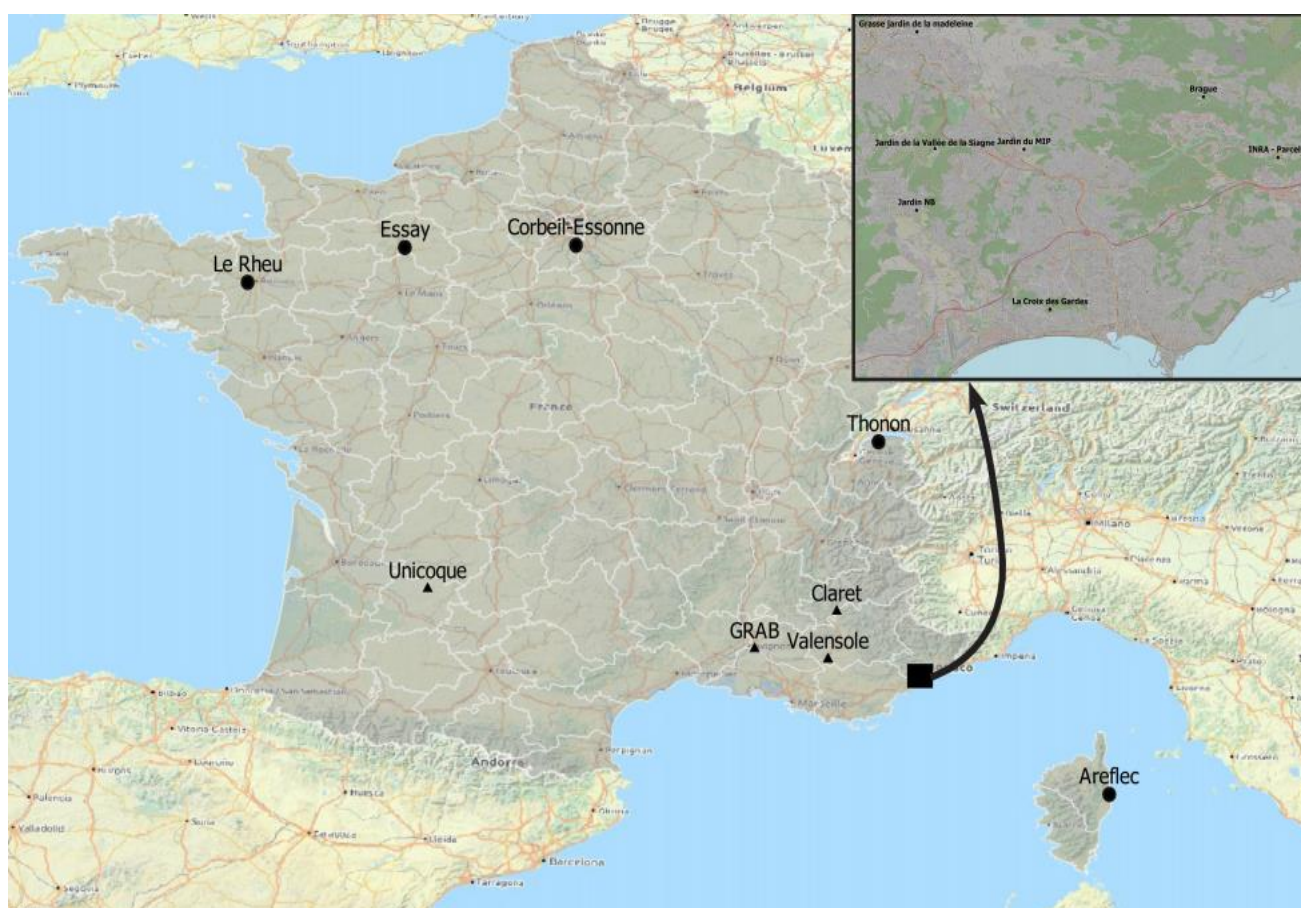


Figure 13 Carte des sites d'exposition de la campagne 2019

## Exposition d'œufs non stérilisés

Durant les deux années d'études 683 ooplaques d'œufs frais ont été exposées dans le département des Alpes-Maritimes pour un total de 13224 œufs. Parmi ces ooplaques 121 ont été parasitées mais seulement 27 d'entre-elles ont donné naissance à 182 parasitoïdes. Ces derniers appartiennent aux 3 genres suivants : le genre *Anastatus* qui représentent la grande majorité 89%, le genre *Trissolcus*, 7% et le genre *Ooencyrtus* 4%. (Figure 14).

Le calcul des index de parasitisme montre qu'environ 17% des ooplaques exposées sont exploitées par les parasitoïdes. Ces derniers parasites entre 4 et 6% des œufs des ooplaques qu'ils utilisent. Le taux d'émergence des parasitoïdes est variable entre les deux années. En 2018, seuls 11.4% des œufs parasités émergent contre 31.8% en 2019. Le taux de contrôle de la population est aussi plus élevé en 2019 avec plus de 6% des œufs parasités contre 3.9% en 2018 (Figure 15). Dans les deux cas c'est un pourcentage de régulation très faible.



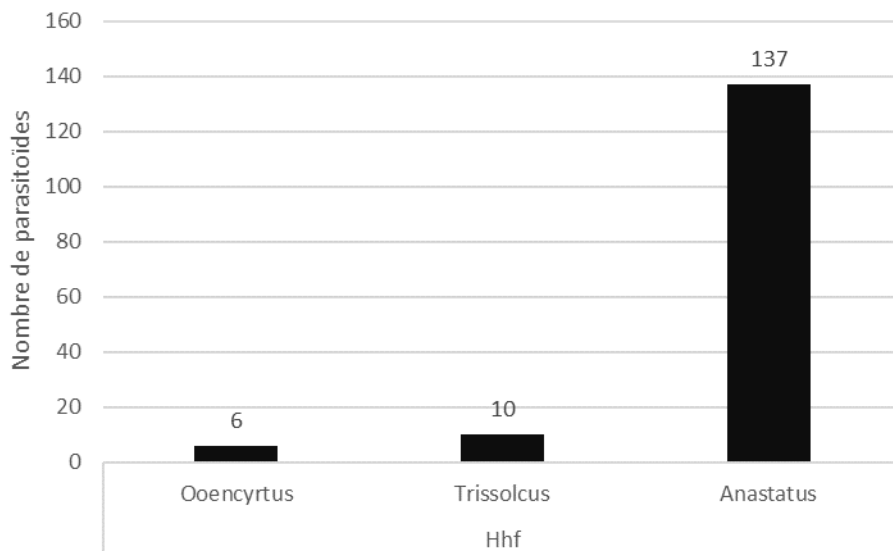


Figure 14 Genre des parasitoïdes émergents d'œufs d'*H. halys* frais

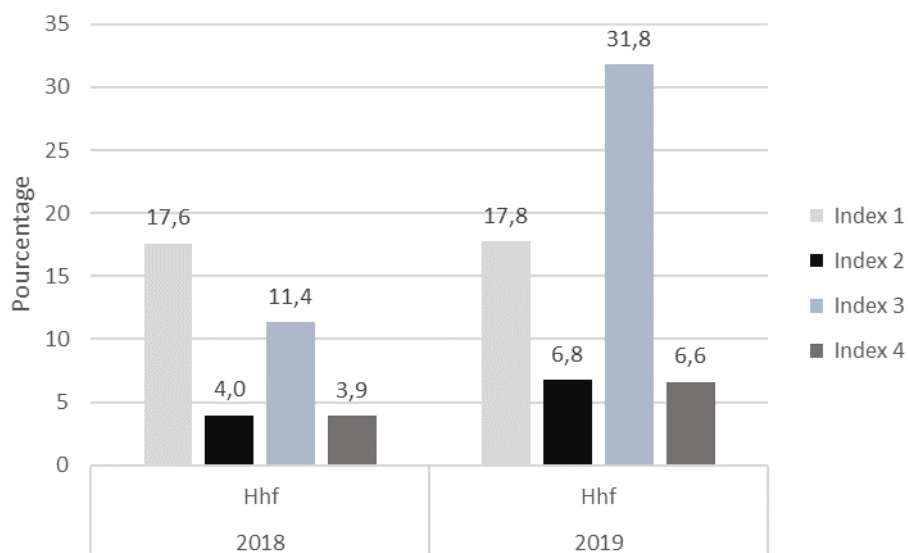


Figure 15 Index de parasitisme obtenu avec les expositions d'œufs d'*H. halys* viable. Hhf correspond aux œufs non stérilisés. Les différents index correspondent à : Index 1 le pourcentage d'ooplake parasité ; Index 2 la proportion moyenne d'œufs parasités par ooplake (si au moins un œuf est parasité) ; Index 3 la proportion moyenne d'émergence des œufs parasités ; Index 4 la proportion d'œufs parasités.

## Exposition d'œufs congelés

Durant les deux années d'études 1602 ooplaques d'œufs congelés ont été exposées dans toute la France pour un total de 27560 œufs. Parmi ces ooplaques, 233 ont été parasitées mais seulement 86 d'entre elles ont donné naissance à 838 parasitoïdes. Ces derniers appartiennent à 4 genres : les genres *Anastatus*, *Trissolcus*, et *Ooencyrtus* comme précédemment, mais également le genre *Telenomus* (Figure 16).

Le calcul des index de parasitisme montre que 13 à 15% des ooplaques exposées sont exploitées par les parasitoïdes. Le taux d'utilisation de ces ooplaques (Index 2) est légèrement plus élevé en 2019 avec 8.5% des œufs parasités par ooplaque contre 4% en 2018. Il en est de même pour le taux de parasitisme qui passe ainsi de 6.3 à 10.3% entre les deux années. En revanche, le taux d'émergence des parasitoïdes (Index 3) est beaucoup plus faible en 2019, 22.8% contre 80% l'année précédente (Figure 17).

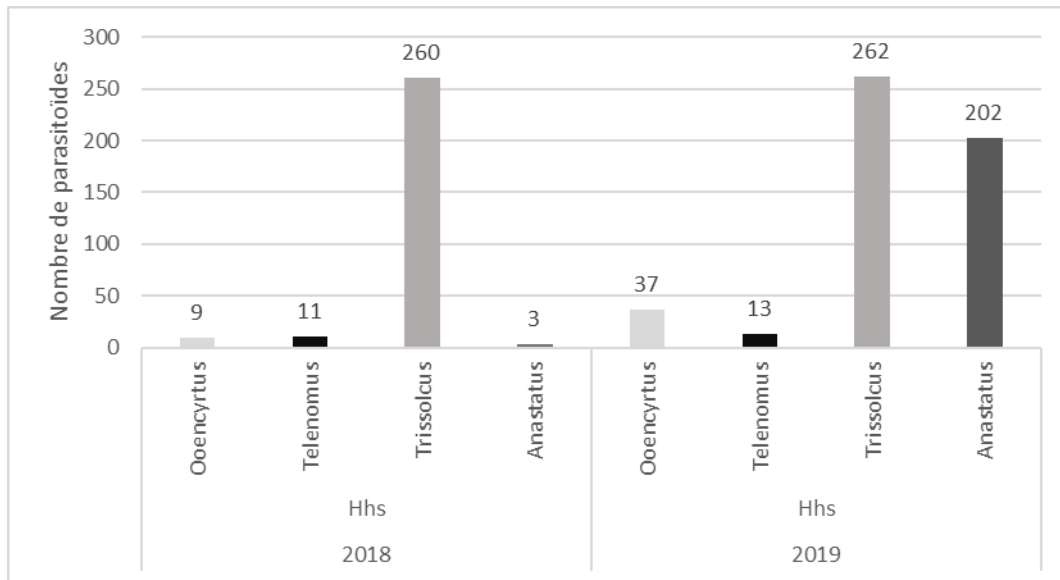


Figure 16 Genre des parasitoïdes émergés d'œufs d'*H. halys* congelés

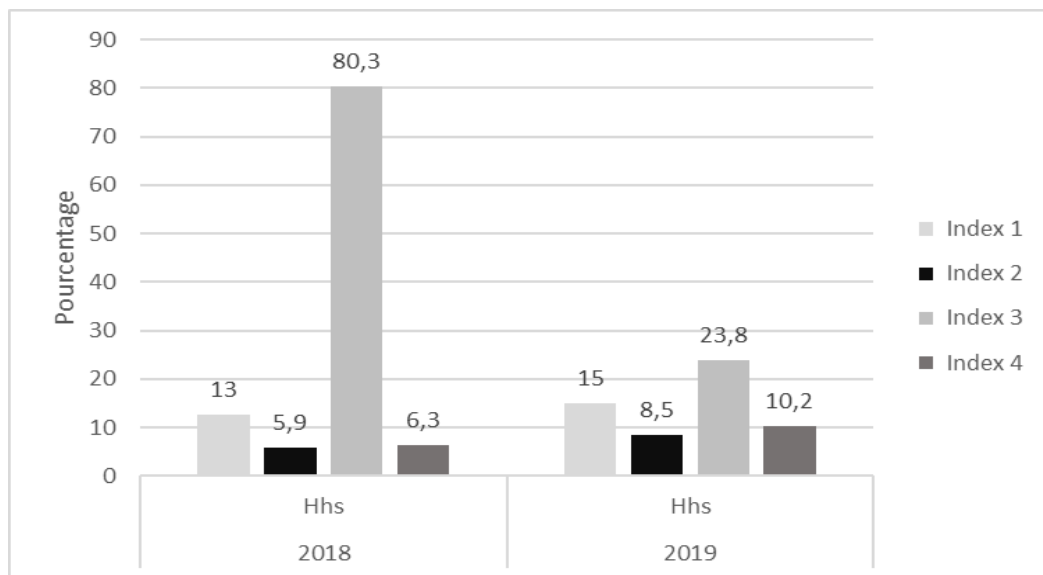
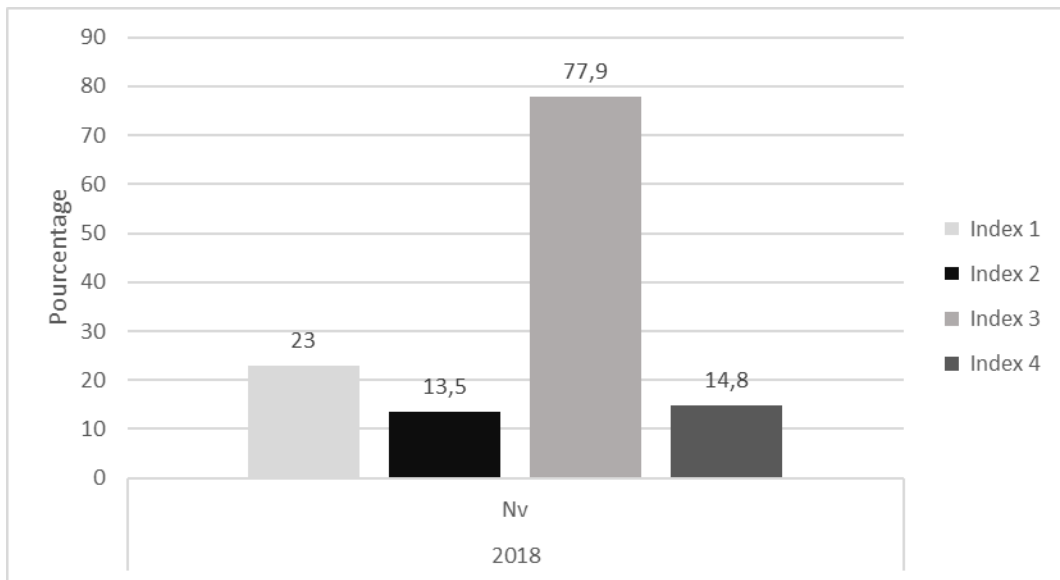


Figure 17 Index de parasitisme obtenu avec les expositions d'œufs d'*H. halys* stériles. Hhs correspond aux œufs stérilisés. Les différents index correspondent à : Index 1 le pourcentage d'ooplaque parasité ; Index 2 la proportion moyenne d'œufs parasités par ooplaque (si au moins un œuf est parasité) ; Index 3 la proportion moyenne d'émergence des œufs parasités ; Index 4 la proportion d'œufs parasités.

## Exposition d'œuf de *Nezara viridula*

En 2018, 61 ooplaques de *Nezara viridula* ont été exposées dans les Alpes-Maritimes pour un total de 3454 œufs. Parmi ces ooplaques, 14 ont été parasitées mais seulement 8 ont donné naissance à 399 parasitoïdes. Ces derniers appartiennent à un seul genre : celui des *Trissolcus*.

Les index de parasitisme montrent que les ooplaques de *Nezara viridula* sont mieux exploitées que celle d'*H. halys*. En effet, 23% des ooplaques ont été utilisées par les parasitoïdes avec en moyenne 13.5% des œufs parasités par ooplaque. Le taux d'émergence des parasitoïdes est d'environ 78% et presque 15% des œufs exposés ont été parasités (Figure 18). Cependant la diversité des parasitoïdes obtenue grâce aux œufs de *N. viridula* semble plus faible car ils appartiennent tous au même genre : le genre *Trissolcus*.



**Figure 18** Index de parasitisme obtenu avec des œufs de *N. viridula*. Les différents index correspondent à : Index 1 le pourcentage d'ooplaque parasité ; Index 2 la proportion moyenne d'œufs parasités par ooplaque (si au moins un œuf est parasité) ; Index 3 la proportion moyenne d'émergence des œufs parasités ; Index 4 La proportion d'œufs parasités.

## Arbre phylogénétique

L'arbre phylogénétique (Figure 19) a été construit comme outil d'aide à l'évaluation de la diversité : il n'est donc pas pertinent de l'utiliser pour inférer l'histoire évolutive des différents parasitoïdes. Pour une lecture plus facile les clusters identifiés ont été numérotés de haut en bas de 1 à 20 sur la figure 19. Cet arbre est divisé en 4 familles principales : les Epelmidae, les Eulophidae, les Encyrtidae et les Scelionidae.

Les Epelmidae sont uniquement représentés par le genre *Anastatus* qui est répartie dans un seul cluster (cluster 20). Il s'agit d'*Anastatus bifasciatus*.

De la même façon, les Eulophidae sont uniquement représentés par une espèce de *Terastichinae* (cluster 20). Ce groupe de parasitoïdes n'est pas connu pour utiliser les punaises Pentatomidae comme hôte, sa présence dans l'arbre est sûrement due à une contamination. Il ne sera donc pas pris en compte dans la suite.

La diversité est plus grande chez les Encyrtidae avec 4 clusters différents qui appartiennent tous au genre *Ooencyrtus*. Les haplotypes retrouvés lors des expositions (Haplotype 45, 54 et 60) appartiennent à deux clusters différents (16 et 17). Les deux autres clusters correspondent à des individus collectés précédemment. Les clusters 16 et 17 sont proches, sans identification morphologique il n'est pas possible de déterminer si ce sont deux espèces différentes ou deux sous populations.

Pour finir, la famille des Scelionidae est la plus diversifiée. Toutes les séquences appartiennent à deux genres les *Telenomus* d'une part et les *Trissolcus* d'autre part. L'utilisation des amorces amplifiant un fragment de CO1 ne permet pas de séparer ces derniers en deux groupes distincts, ils apparaissent comme paraphylétiques. Les *Telenomus* sont réparties en 6 clusters. Un septième cluster est présent sur l'arbre supporté uniquement par l'haplotype 27, mais celui-ci est orphelin. C'est-à-dire qu'un seul parasitoïde est associé à cette séquence. De plus la séquence montre des variations avec le reste du genre qui suggèrent un pseudo-gène ou un artefact. Cet haplotype est donc invalidé. Les parasitoïdes issus des expositions appartiennent à 3 clusters (4, 12 et 14) qui sont assez éloignés pour être considéré comme 3 espèces différentes. Deux d'entre elles ne sont pas identifiées au-delà du genre par correspondance moléculaire car aucune séquence de GenBank ne blast positivement avec celles-ci. Le dernier cluster, uniquement représenté par l'haplotype 28, est proche à la fois de la séquence de *Telenomus turesis* (Walker 1836) et *Telenomus chloropus* (Thomson 1861). Une confirmation de morphologie sera nécessaire. Pour finir, les 9 clusters restant appartiennent au genre *Trissolcus*. Un cluster (15) est identifié de manière formelle (moléculaire et morphologique) : il s'agit de *Trissolcus basalis* (Wollaston, 1858). Trois haplotypes différents (haplotypes 18, 66 et 65) de cette espèce ont été rencontrés sur le terrain. Le cluster 2 est identifié comme *Trissolcus cultratus* (Mayr, 1879). Les clusters 16 et 17 n'ont pas été retrouvés lors des expositions mais sont identifiés comme des *Trissolcus semistriatus* (Nees von Esenbeck, 1834). On peut d'ailleurs noter que cette identification est en contradiction avec la séquence de référence GenBank. Le cluster 1 est invalidé car les deux haplotypes qui le supportent sont attribués à des pseudo-gènes ou des artefacts techniques. Les deux derniers clusters (8 et 9) contenant des individus des expositions restent pour le moment sans identification.

- Genre *Trissolcus*
- Genre *Telenomus*
- Genre *Ooencyrtus*
- Genre *Tetrastichinae*
- Genre *Anastatus*
- \* Haplotype orphelin
- \*! Artefacte technique/ Pseudogène
- Haplotype retrouvé lors des expositions



Figure 19 Arbre phylogénétique. Les noms d'espèce suivies d'un signe validé ont été identifiés morphologiquement

## Discussion

### Régulation naturelle d'*Halyomorpha halys*

Cette étude menée sur deux ans a permis d'obtenir les premières données françaises sur la potentielle régulation naturelle d'*H.halys* par des parasitoïdes oophages indigènes. Lors de l'utilisation d'œufs sentinelles frais, les taux de parasitismes (index 4) sont de 3.9% en 2018 et 6.6% en 2019. Ces taux sont assez élevés par rapport à ceux obtenus lors d'études similaires. Par exemple en Italie entre 1.3 et 3% de parasitisme avait été observé et 2.7% en Suisse (Haye et al., 2015a; Costi et al., 2018). Abram et al 2017 présente un travail de compilation de 40 études du même type en Amérique du Nord et en Europe : le taux de parasitisme moyen lors d'expositions d'œufs viables est de  $1.1 \pm 0.2\%$ . Les taux d'émergence de parasitoïdes sur des œufs sentinelles non stériles obtenus lors de cette étude sont alors de 0.4% en 2018 et 2% en 2019. Ces valeurs correspondent à la grande majorité à des études antérieures. Dans celles-ci, le taux d'émergence est de moins de 5% dans 87% des cas (Abram et al., 2017).

Nos résultats sont également à comparer avec ceux obtenus en utilisant des ooplaques de *N. viridula*, une punaise indigène d'Europe. L'exposition d'ooplaques de punaise Pentatomidae européenne nous permet d'avoir un point de référence par rapport à des espèces exotiques. Cette dernière présente un taux de parasitisme des œufs de 15% et un taux d'avortement de seulement de 22%. Nous pouvons noter que la différence de détection (index 1) n'est pas très différente entre *N. viridula* et *H. halys*. Or on s'attendrait à ce que les ooplaques de punaises européennes soit beaucoup plus attractives. Cela peut s'expliquer car notre méthode d'exposition ne permet pas d'étudier précisément la détection des ooplaques par les parasitoïdes. En effet les composés chimiques volatils souvent impliqués dans cette détection sont, soit perturbés par l'odeur de la colle soit absents car émis par la plante lors de la prise de nourriture ou l'oviposition des punaises (Holopainen and Gershenzon, 2010)





Le taux de parasitisme élevé observé lors de l'étude dans les Alpes-Maritimes peut s'expliquer par le fait que 3 genres de parasitoïdes ont été retrouvés (*Anastatus*, *Ooencyrtus* et *Trissolcus*) sur œufs frais. Alors qu'on en compte seulement 2 en Suisse et en Italie, *Anastatus bifasciatus* et *Ooencyrtus telenomicida*. Si plus d'espèces exploitent les œufs frais alors nous pouvons nous attendre à un plus fort taux de parasitisme. Il faut cependant rester prudent car la capacité des parasitoïdes à exploiter l'ooïde (Index2) est faible : 4 à 6.8% en moyenne en France. Cela peut indiquer que certains parasitoïdes profitent d'avortement d'œufs dû aux conditions abiotiques ou à des prédateurs pour se développer. Par exemple la population de *Trissolcus* issue d'œufs viables fait partie de l'haplotype 18, cluster 15 qui est attribuée à l'espèce *T. basalis*. Or cette espèce ne se développe pas habituellement sur *H. halys* non congelé. Il faudrait réaliser des tests de parasitisme sur cette souche mais il s'agit très probablement d'un « faux positif » non utilisable pour la lutte biologique.

Les *Ooencyrtus* et les *Anastatus*, sont eux plus intéressants. La première étape serait de les identifier afin de savoir si ce sont les mêmes espèces que celles retrouvées en Italie et en Suisse. C'est bien le cas d'*Anastatus bifasciatus* mais il semble cependant peu probable au vu des blasts effectués sur GenBank que les *Ooencyrtus* trouvés sur le terrain soient des *O. telenomicida*. Il y a dans les données non analysées des populations *Ooencyrtus* provenant de plusieurs sites il faut donc attendre pour être formel. Ces deux espèces ont déjà fait l'objet d'une évaluation au laboratoire en 2016 (Roversi et al., 2016). Les tests de non-choix montrent que *O. telenomicida* présente les meilleures caractéristiques : 35% des œufs d'*H. halys* qui lui sont proposés sont parasités et 22% donnent de nouveaux adultes. Il n'existe pas à ce jour d'étude européenne incluant des tests de choix sur cette espèce. Il est probable que *O. telenomicida* exploite de manière préférentielle les ooïdes des punaises indigènes et de Lépidoptères, ce qui peut entraîner une diminution importante de la régulation d'*H. halys* et un impact sur des organismes non-cibles. C'est ce qui a été découvert dans le cas d'*Anastatus bifasciatus* lors d'expériences de lâchers en verger. L'objectif était de mesurer l'impact du parasitoïde sur des ooïdes sentinelles d'*H. halys* et de Lépidoptères d'intérêts. Les résultats montrent un taux de mortalité induit par les parasitoïdes de 15% pour *H. halys*, ce qui est encourageant mais pas suffisant pour réguler la population et 8% de parasitisme pour les Lépidoptères (Stahl et al., 2019). Des lâchers massifs pourraient avoir un impact important sur les populations de Lépidoptères. L'utilisation d'espèce généraliste comme *A. bifasciatus* ou *O. telenomicida* pose donc un important problème de spécificité.



## Diversité des parasitoïdes oophages

Les expositions d'œufs congelés avaient pour objectif l'évaluation de la biodiversité des parasitoïdes de punaises Pentatomidae. Notre protocole a été pensé pour maximiser l'échantillonnage. Le réseau national est constitué, en plus des points situés dans les Alpes-Maritimes, de 9 points répartis sur le territoire. Les différents sites sont situés dans différents types de climat : océanique, continental, et méditerranéen. De plus, la Corse présente une faune et une flore assez différente de la zone continentale : ce qui peut permettre de récupérer des espèces rares voir endémiques de l'île. Le nombre d'œufs exposés, 27660, est supérieur à ce qui a été fait en Suisse, 20000 œufs et en Italie 12841 œufs (Haye et al., 2015a; Costi et al., 2018). L'utilisation des œufs stériles avait pour objectif d'augmenter le parasitisme et l'émergence de parasitoïde. Or les résultats montrent des taux de 6.3% et 10.2% d'œufs parasités qui sont comparables aux niveaux trouvés en utilisant des ooplaques de punaises indigènes (Haye et al., 2015a). Cependant le pourcentage de survie lors du développement des parasitoïdes est assez faible en 2019, avec seulement 23.8% des œufs parasités qui donnent des adultes. Sur la totalité des œufs exposés : seuls 3% ont donné des émergences qui sont les seules données actuellement exploitables pour la démarche barcoding. Les ooplaques contenant des parasitoïdes avortés sont conservés dans l'alcool. L'objectif est de trouver un protocole d'extraction et d'amplification Les œufs frais ont donné des adultes dans 1.4% des cas : la stratégie de la congélation augmente donc bien la diversité échantillonnée. Le taux d'avortement avec des punaises indigènes comme *N. viridula* est bien plus faible, mais la méthode d'élevage d'*H. halys* est bien maîtrisée par l'équipe RDLB. Il est possible de produire des ooplaques en masse en investissant un temps raisonnable dans l'élevage ce qui permet de gérer des réseaux d'échantillonnages plus important en nombre de sites. De plus le taux d'avortement de 76.8% observé en 2019 (Index 3, Figure 15) est probablement surestimé car les œufs congelés prennent parfois une couleur noire en vieillissant comme les œufs parasités : il est alors difficile de les distinguer sans dissection. Dans le but d'augmenter l'efficacité de la méthode d'échantillonnage les ooplaques contenant des parasitoïdes avortés sont conservés dans l'alcool. L'objectif est de trouver un protocole d'extraction et d'amplification qui permette de d'isoler l'ADN du parasitoïde.



La première chose que nous montre les résultats est que l'abondance des parasitoïdes n'est pas la même pour tous les genres. Les deux genres les plus abondants sont les *Trissolcus* et les *Anastatus* qui représentent respectivement 69 et 25% des individus obtenus. Ces résultats ne sont pas cohérents avec beaucoup d'études antérieures qui relèvent une grande majorité d'*Anastatus* (Cornelius et al., 2016; Dieckhoff et al., 2017; Costi et al., 2018). Les comparaisons sont néanmoins difficiles car il n'existe pas d'étude d'ampleur comparable utilisant des œufs congelés d'*H. halys*. Il est cependant probable que ces différences s'expliquent par les conditions pédoclimatiques. Abram et al 2017 a réalisé une méta-analyse sur le lien entre paysage et espèce de parasitoïdes retrouvé lors d'exposition d'œufs d'*H. Halys*. Les *Anastatus* seraient retrouvés en particulier dans les zones urbaines ou naturelles arborées et les *Trissolcus* en milieu ouvert. Ces résultats obtenus en Amérique du Nord ne semblent pas être cohérent avec les notre. La majorité des parasitoïdes contenus dans les données pour le moment proviennent de sites urbains et/ou arborés et la majorité sont des *Trissolcus*.

Du point de vue de la diversité, il est difficile d'aller plus loin dans l'interprétation pour les genres *Ooencyrtus*, *Telenomus* sans identification morphologiques. L'équipe RDLB ne possède pas en interne une expertise suffisante sur ces genres pour obtenir une identification morphologique fiable. Il est donc nécessaire de faire appel à des experts. Dans le cas des *Anastatus* les identifications morphologiques donnent bien une seule espèce, *Anastatus bifasciatus*. Des ambiguïtés sont pourtant soupçonnées entre les populations corses (que nous avons obtenues mais pas encore analysées) et continentales. Il est possible qu'il y ait deux espèces différentes. Afin de trancher sur la question l'aide de Lucian FUSU un taxonomiste de l'Université Alexandru Ioan Cuza en Roumanie pourrait être très utile. Il peut en effet fournir à l'équipe des séquences de référence d'une bonne qualité ce qui affinerait nos résultats.

Pour ce qui est du genre *Trissolcus*, l'arbre montre que les échantillons passés en barcode contenaient entre 3 et 4 espèces sur les 14 présentes en Europe (Talamas et al., 2017). Si l'on tient compte du nombre d'échantillons qu'il reste à analyser on peut s'attendre à avoir capté une partie importante de la diversité présente en France. Trois espèces sont identifiées, *Trissolcus basalis*, *Trissolcus cultratus* et *Trissolcus telenomicida*. Les autres clusters sont non identifiés pour le moment mais il est certain que *T. japonicus* n'a pas été trouvé pour le moment.



## Dynamique spatiale et temporelle

Les résultats montrent une grande variabilité au niveau du taux de parasitisme entre les zones géographiques. Quatre sites d'expositions n'ont donné aucun parasitoïde malgré un nombre d'œufs exposés important, 1353 pour Valensole (tableau 1). Pour les autres sites le taux de parasitoïdes sortant des œufs varie de 0.1 à 8,3%. On peut faire l'hypothèse que ces variations sont dues à deux paramètres. Premièrement l'organisation du paysage autour de la zone d'exposition, présence de cours d'eau ou de réserves mellifères par exemple. Deuxièmement le niveau d'infestation en punaise Pentatomidae indigène peut faire varier l'abondance des parasitoïdes. Plus il y a d'hôtes présents sur un site plus les parasitoïdes ont une chance de se reproduire. Pour ce qui de la répartition des genres en fonction des zones géographiques, il est pour le moment difficile de tirer des conclusions. Des tendances sont tout de même observables : certains sites d'exposition semblent habités très majoritairement voire même exclusivement par un seul genre de parasitoïdes. Tous les parasitoïdes du site de Claret sont des *Trissolcus*, 80% des parasitoïdes du site de l'Inra sont des *Anastatus* et 70% des parasitoïdes du GRAB sont des *Ooencyrtus*. Au contraire d'autres lieux abritent les 4 genres de parasitoïdes comme la vallée de la Siagne. Le genre le mieux réparti est celui des *Trissolcus* qui sont présent dans 75% de sites. Si ces tendances se confirment, car il n'est pas impossible que ce soit uniquement un effet de l'échantillonnage, il serait intéressant d'étudier les raisons de ces répartitions.

La dynamique temporelle des populations de parasitoïdes est intéressante car un ravageur n'est pas obligatoirement régulé par la même espèce tout au long de la saison. Cela s'explique par les variations des conditions abiotiques (température, humidité) et biotiques (espèces végétales présentes, hôte présents) (Elizalde et al., 2018). Dans le cadre de mise en place de stratégie de lutte biologique si l'on veut réguler le ravageur pendant une période particulière il est important de choisir les candidats parasitoïdes les plus actifs à ce moment. Les campagnes d'exposition dans les Alpes –Maritimes de 2018 (juillet-septembre) et les données actuelles de 2019 (mai-juillet) permettent de se faire une idée sur l'abondance des parasitoïdes au cours de temps. Il y a cependant beaucoup d'incertitude car le nombre d'émergence de parasitoïdes divisés par le nombre d'œuf exposé est un indicateur qui n'est pas uniquement lié à l'abondance de parasitoïdes. La dynamique semble avoir la forme d'un double pic. Le premier pic est en juin puis la population diminue en juillet avant d'augmenter de nouveau pour atteindre un maximal en septembre. Il est probable que les conditions très sèches des régions méditerranéennes en juillet aout soient responsables de la chute de la population. Avec les données disponibles aucune dynamique temporelle ne se dégage au niveau des genres. On peut cependant dire que le genre *Trissolcus* est le seul à avoir été capturé pendant toute la période des expositions





## Conclusion

Les deux campagnes d'expositions d'œufs sentinelles en 2018 et 2019 ont permis d'obtenir les premières données sur la régulation naturelle d'*H. halys* en France. Premièrement il existe bien des espèces capables de se développer sur des œufs viables. Une espèce est en commun avec les résultats Italien et Suisse, *Anastatus bifasciatus*. Cette espèce a montré des capacités de contrôle de l'ordre de 15% de la population en *H. halys* d'une parcelle ce qui est encourageant. Elle présente cependant des défauts : c'est un parasitoïde très généraliste ce qui peut entraîner des réductions de population non-cible notamment sur les Lépidoptères. C'est une espèce assez difficile à élever et dont le cycle est long. De manière plus générale nos résultats montrent que la répartition des *Anastatus* n'est pas homogène dans l'espace et dans le temps. En 2018 très peu d'individus ont été capturés. Avec les données dont on dispose l'utilisation de l'espèce *T. japonicus* semble plus adaptée. Ce dernier est assez spécifique d'*H. halys* dans son aire d'origine, le cycle des *Trissolcus* est plus court et ils sont plus facile à élever. Cependant *T. japonicus* n'a pas encore été retrouvé en France pour le moment. Il est probable qu'il s'installe sur le territoire d'ici peu. Afin de prendre de l'avance une procédure d'introduction va être lancée dans les prochains mois.



# Bibliographie

- Abram PK, Brodeur J, Burte V, Boivin G** (2016) Parasitoid-induced host egg abortion: An underappreciated component of biological control services provided by egg parasitoids. *Biol Control* **98**: 52–60
- Abram PK, Hoelmer KA, Acebes-Doria A, Andrews H, Beers EH, Bergh JC, Bessin R, Biddinger D, Botch P, Buffington ML, et al** (2017) Indigenous arthropod natural enemies of the invasive brown marmorated stink bug in North America and Europe. *J Pest Sci* **90**: 1009–1020
- Abram PK, Talamas EJ, Acheampong S, Mason PG, Gariepy TD** (2019) First detection of the samurai wasp, *Trissolcus japonicus* (Ashmead) (Hymenoptera, Scelionidae), in Canada. *J Hymenopt Res* **68**: 29–36
- Asgari S, Rivers DB** (2011) Venom Proteins from Endoparasitoid Wasps and Their Role in Host-Parasite Interactions. *Annu Rev Entomol* **56**: 313–335
- Avila GA, Charles JG** (2018) Modelling the potential geographic distribution of *Trissolcus japonicus*: a biological control agent of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*. *BioControl* **63**: 505–518
- Bariselli M, Bugiani R, Maistrello L** (2016) Distribution and damage caused by *Halyomorpha halys* in Italy. *EPPO Bull* **46**: 332–334
- Bergmann EJ, Raupp MJ** (2014) Efficacies of Common Ready to Use Insecticides Against *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Fla Entomol* **97**: 791–800
- Bergmann EJ, Venugopal PD, Martinson HM, Raupp MJ, Shrewsbury PM** (2016) Host Plant Use by the Invasive *Halyomorpha halys* (Stål) on Woody Ornamental Trees and Shrubs. *PLOS ONE* **11**: e0149975
- Blaauw BR, Jones VP, Nielsen AL** (2016) Utilizing immunomarking techniques to track *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) movement and distribution within a peach orchard. *PeerJ* **4**: e1997
- Botch PS, Delfosse ES** (2018) Host-Acceptance Behavior of *Trissolcus japonicus* (Hymenoptera: Scelionidae) Reared on the Invasive *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae) and Nontarget Species. *Environ Entomol* **47**: 403–411
- Callot H, Brua C** (2013) *Halyomorpha halys* (Stål, 1855), la Punaise diabolique, nouvelle espèce pour la faune de France (Heteroptera Pentatomidae). 3
- Cini A, Ioriatti C, Anfora G** (2012) A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *Bull Insectology* **65**: 12
- Cira TM, Venette RC, Aigner J, Kuhar T, Mullins DE, Gabbert SE, Hutchison WD** (2016) Cold Tolerance of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) Across Geographic

and Temporal Scales. *Environ Entomol* **45**: 484–491

**Conti E, Colazza S** (2012) Chemical Ecology of Egg Parasitoids Associated with True Bugs. *Psyche J Entomol*. doi: 10.1155/2012/651015

**Cornelius ML, Dieckhoff C, Vinyard BT, Hoelmer KA** (2016) Parasitism and Predation on Sentinel Egg Masses of the Brown Marmorated Stink Bug (Hemiptera: Pentatomidae) in Three Vegetable Crops: Importance of Dissections for Evaluating the Impact of Native Parasitoids on an Exotic Pest. *Environ Entomol* **45**: 1536–1542

**Costi E, Haye T, Maistrello L** (2017) Biological parameters of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*, in southern Europe. *J Pest Sci* **90**: 1059–1067

**Costi E, Haye T, Maistrello L** (2018) Surveying native egg parasitoids and predators of the invasive *Halyomorpha halys* in Northern Italy. *J Appl Entomol*. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/jen.12590>

**Dieckhoff C, Tatman KM, Hoelmer KA** (2017) Natural biological control of *Halyomorpha halys* by native egg parasitoids: a multi-year survey in northern Delaware. *J Pest Sci* **90**: 1143–1158

**Eggleton P., Belshaw Robert** (1992) Insect parasitoids: an evolutionary overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **337**: 1–20

**Eilenberg J, Hajek A, Lomer C** (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* **46**: 387–400

**Elizalde L, Patrock RJW, Disney RHL, Folgarait PJ** (2018) Spatial and temporal variation in host–parasitoid interactions: leafcutter ant hosts and their phorid parasitoids. *Ecol Entomol* **43**: 114–125

**El-Sayed AM, Suckling DM, Byers JA, Jang EB, Wearing CH** (2009) Potential of “Lure and Kill” in Long-Term Pest Management and Eradication of Invasive Species. *J Econ Entomol* **102**: 815–835

**Ferron P** (2000) Bases écologiques de la protection des cultures : gestion des populations et aménagement de leurs habitats. *Courr Environ INRA* 33–41

**Fried G, Hoelmer K, Rossi J-P, Streito J-C, Tassus X, Haye T** (2014) Réalisation d’une analyse de risque phytosanitaire express portant sur *Halyomorpha halys* (la punaise diabolique). 90

**Funayama K** (2002) Comparison of the susceptibility to injury of apple cultivars by stink bugs. *Jpn J Appl Entomol Zool* **46**: 37–40

**Garrouste R, Haye T, Streito JC, Dioli P, Maistrello L** (2014) *Halyomorpha halys* (Hemiptera, Pentatomidae): ten years after in Europe. National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, pp 28–29

**Haye T, Abdallah S, Garipey T, Wyniger D** (2014) Phenology, life table analysis and temperature requirements of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*,

in Europe. *J Pest Sci* **87**: 407–418

**Haye T, Fischer S, Zhang J, Gariepy T** (2015a) Can native egg parasitoids adopt the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae), in Europe? *J Pest Sci* **88**: 693–705

**Haye T, Gariepy T, Hoelmer K, Rossi J-P, Streito J-C, Tassus X, Desneux N** (2015b) Range expansion of the invasive brown marmorated stinkbug, *Halyomorpha halys*: an increasing threat to field, fruit and vegetable crops worldwide. *J Pest Sci* **88**: 665–673

**Hedstrom C, Lowenstein D, Andrews H, Bai B, Wiman N** (2017) Pentatomid host suitability and the discovery of introduced populations of *Trissolcus japonicus* in Oregon. *J Pest Sci* **90**: 1169–1179

**Holopainen JK, Gershenson J** (2010) Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci* **15**: 176–184

**Hulme PE, Bacher S, Kenis M, Klotz S, Kühn I, Minchin D, Nentwig W, Olenin S, Panov V, Pergl J, et al** (2008) Grasping at the routes of biological invasions: a framework for integrating pathways into policy. *J Appl Ecol* **45**: 403–414

**Hulme PE, Pyšek P, Nentwig W, Vilà M** (2009) Will Threat of Biological Invasions Unite the European Union? *Science* **324**: 40–41

**Jones LJ, Jennings, Hooks, Shrewsbury** (2014) Sentinel eggs underestimate rates of parasitism of the exotic brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* | Elsevier Enhanced Reader. *Biol Control* **78**: 61–66

**Jourdheuil P, Grison P, FRAVAL A** (1991) La lutte biologique : un aperçu historique. *Courr Cell Environ INRA* **15**: 37–60

**Khrimian A, Zhang A, Weber DC, Ho H-Y, Aldrich JR, Vermillion KE, Siegler MA, Shirali S, Guzman F, Leskey TC** (2014) Discovery of the Aggregation Pheromone of the Brown Marmorated Stink Bug (*Halyomorpha halys*) through the Creation of Stereoisomeric Libraries of 1-Bisabolen-3-ols. *J Nat Prod* **77**: 1708–1717

**Lara J, Pickett C, Ingels C, Haviland D, Grafton-Cardwell E, Doll D, Bethke J, Faber B, Dara S, Hoddle M** (2016) Biological control program is being developed for brown marmorated stink bug. *Calif Agric* **70**: 15–23

**Lee D-H, Short BD, Joseph SV, Bergh JC, Leskey TC** (2013a) Review of the Biology, Ecology, and Management of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in China, Japan, and the Republic of Korea. *Environ Entomol* **42**: 627–641

**Lee D-H, Wright SE, Boiteau G, Vincent C, Leskey TC** (2013b) Effectiveness of Glues for Harmonic Radar Tag Attachment on *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) and Their Impact on Adult Survivorship and Mobility. *Environ Entomol* **42**: 515–523

**Leskey TC, Lee D-H, Short BD, Wright SE** (2012a) Impact of Insecticides on the Invasive *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae): Analysis of Insecticide Lethality. *J*

Econ Entomol **105**: 1726–1735

**Leskey TC, Nielsen AL** (2018) Impact of the Invasive Brown Marmorated Stink Bug in North America and Europe: History, Biology, Ecology, and Management. *Annu Rev Entomol* **63**: 599–618

**Leskey TC, Short BD, Butler BR, Wright SE** (2012b) Impact of the Invasive Brown Marmorated Stink Bug, *Halyomorpha halys* (Stål), in Mid-Atlantic Tree Fruit Orchards in the United States: Case Studies of Commercial Management. *Psyche J Entomol*. doi: 10.1155/2012/535062

**Leskey TC, Short BD, Lee D-H** (2014) Efficacy of insecticide residues on adult *Halyomorpha halys* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae) mortality and injury in apple and peach orchards: Residual insecticide efficacy on *Halyomorpha halys*. *Pest Manag Sci* **70**: 1097–1104

**Leskey TC, Wright SE, Short BD, Khrimian A** (2012c) Development of Behaviorally-Based Monitoring Tools for the Brown Marmorated Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae) in Commercial Tree Fruit Orchards. *J Entomol Sci* **47**: 76–85

**Maurel J-P, Blaye G, Valladares L, Roinel E, Cochard P-O** (2016) *Halyomorpha halys* (Stål, 1855), la punaise diabolique en France, à Toulouse (Heteroptera ; Pentatomidae). 6  
**Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt** (2015) Plan ECOPHYTO II. République française

**Morrison WR, Blaauw BR, Nielsen AL, Talamas E, Leskey TC** (2018a) Predation and parasitism by native and exotic natural enemies of *Halyomorpha halys* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae) eggs augmented with semiochemicals and differing host stimuli. *Biol Control* **121**: 140–150

**Morrison WR, Blaauw BR, Short BD, Nielsen AL, Bergh JC, Krawczyk G, Park Y-L, Butler B, Khrimian A, Leskey TC** (2018b) Successful management of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in commercial apple orchards with an attract-and-kill strategy. *Pest Manag Sci* **75**: 104–114

**Nielsen AL, Hamilton GC** (2009) Seasonal Occurrence and Impact of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in Tree Fruit. *J Econ Entomol* **102**: 1133–1140

**Ogburn EC, Bessin R, Dieckhoff C, Dobson R, Grieshop M, Hoelmer KA, Mathews C, Moore J, Nielsen AL, Poley K, et al** (2016) Natural enemy impact on eggs of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae), in organic agroecosystems: A regional assessment. *Biol Control* **101**: 39–51

**Roversi PF, Binazzi F, Marianelli L, Costi E, Maistrello L, Sabbatini PG** (2016) Searching for native egg-parasitoids of the invasive alien species *Halyomorpha halys* Stål (Heteroptera Pentatomidae) in Southern Europe. *Redia* **99**: 63–70

**Seebens H, Blackburn TM, Dyer EE, Genovesi P, Hulme PE, Jeschke JM, Pagad S, Pyšek P, Winter M, Arianoutsou M, et al** (2017) No saturation in the accumulation of alien

species worldwide. Nat Commun. doi: 10.1038/ncomms14435

**Short BD, Khrimian A, Leskey TC** (2017) Pheromone-based decision support tools for management of *Halyomorpha halys* in apple orchards: development of a trap-based treatment threshold. J Pest Sci **90**: 1191–1204

**Stahl J, Babendreier D, Marazzi C, Caruso S, Costi E, Maistrello L, Haye T** (2019) Can *Anastatus bifasciatus* Be Used for Augmentative Biological Control of the Brown Marmorated Stink Bug in Fruit Orchards? Insects. doi: 10.3390/insects10040108

**Stahl J, Tortorici F, Pontini M, Bon M-C, Hoelmer K, Marazzi C, Tavella L, Haye T** (2018) First discovery of adventive populations of *Trissolcus japonicus* in Europe. J Pest Sci. doi: 10.1007/s10340-018-1061-2

**Suty L** (2010) La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques. Editions Quae

**Talamas EJ, Buffington ML, Hoelmer K** (2017) Revision of Palearctic *Trissolcus* Ashmead (Hymenoptera, Scelionidae). J Hymenopt Res **56**: 3–185

**Wermelinger B, Wyniger D, Forster B** (2008) First records of an invasive bug in Europe: *Halyomorpha halys* Stål (Heteroptera: Pentatomidae), a new pest on woody ornamentals and fruit trees?

**Yang Z-Q, Yao Y-X, Qiu L-F, Li Z-X** (2009) A New Species of *Trissolcus* (Hymenoptera: Scelionidae) Parasitizing Eggs of *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae) in China with Comments on Its Biology. Ann Entomol Soc Am **102**: 39–47

**Zhu G, Bu W, Gao Y, Liu G** (2012) Potential Geographic Distribution of Brown Marmorated Stink Bug Invasion (*Halyomorpha halys*). PLOS ONE **7**: e31246


## Sitographie

**EPPO** (2003) *Halyomorpha halys* (HALYHA)[Host plants]. EPPO Glob. Database, <https://gd.eppo.int/taxon/HALYHA/hosts>

**Agriir** (2019) Cartographie *Halyomorpha halys*. Ephytia, <http://ephytia.inra.fr/fr/geoloc/view>

**Anses** (2019) ephy |. Cat. Prod. Phytopharm. Leurs Usages Matières Fertil. Supports Cult. Aut. En Fr., <https://ephy.anses.fr/>



|   |   |
|---|---|
|    | Diplôme : Ingénieur en Horticulture et Paysage<br>Spécialité : Horticulture<br>Spécialisation / option : Protection des Plante et de l'Environnement en Horticulture<br>Enseignant référent : Yann Tricault |
| Auteur(s) : Nicolas Bonetti<br><br>Date de naissance* : 28/03/1996  | Organisme d'accueil : INRA PACA<br>Adresse : 400 route de Chappes, 06903 Sophia Antipolis   |
| Nb pages : 24      Annexe(s) :  | Maître de stage : M Alexandre BOUT  |
| Année de soutenance : 2019  |   |
| Titre français : Recherches et évaluation des parasitoïdes oophages indigènes de la punaise invasive <i>Halyomorpha halys</i> .   |   |
| Titre anglais: Searching and evaluation of egg-parasitoids of the alien species <i>Halyomorpha halys</i>  |   |
| Résumé (1600 caractères maximum) :<br><br><i>Halyomorpha halys</i> (Heteroptera : Pentatomidae) est originaire de Chine, du Japon et de Corée. Elle est devenue depuis son introduction un ravageur majeur de nombreuses espèces cultivées en Amérique du Nord. Son installation en France depuis 2012 fait craindre le même scénario. La menace est d'autant plus forte qu'aucun produit phytosanitaire de synthèse efficace n'est homologué en France. Une des solutions envisagées est l'utilisation d'ennemies naturels européens d' <i>H. halys</i> avec en particuliers les parasitoïdes oophages. L'objectif du stage est double, compléter les études européennes sur le parasitoïde d' <i>H. halys</i> et évaluer la diversité en parasitoïdes oophages de punaises Pentatomidae présentes sur le territoire français. Pour cela deux campagnes d'exposition d'œufs sentinelles ont été menées en 2018 et 2019. Une démarche de bar-coding a été associée afin d'identifier les parasitoïdes récoltés. Les résultats montrent que très peu d'espèces européennes peuvent parasiter <i>H. halys</i> . Elles appartiennent au genre <i>Anastatus</i> et <i>Ooencyrtus</i> . De plus le parasitoïde <i>Trissolcus japonicus</i> , principale régulateur d' <i>H. halys</i> n'a pas été retrouvé pour le moment malgré des signalements en Suisse et en Italie. Les résultats actuels orientent plutôt le projet vers une démarche d'introduction de <i>T. japonicus</i> . |   |
| Abstract (1600 caractères maximum):<br><br><i>Halyomorpha halys</i> is an invasive pest native from South-Est Asia. Since its introduction in North America it has become a key pest of many crops. <i>H. halys</i> was accidentally introduced into France around 2012 and has spread all over the territory. This pest is a potential threat to French orchard especially as no efficient insecticide is allowed. Development of a sustainable management is necessary. One solution can be biological control with egg parasitoids. The goal of the training period is on the one hand, complete European study about <i>H. halys</i> egg parasitoids with French data and on the other evaluate biodiversity and species distributions of French egg parasitoids. For that a two-year field survey was conducted exposing <i>H. halys</i> egg masses in different types of habitats. Samples were identify using barcoding method. Result show that very few species can use <i>H. halys</i> as host. They belong to genius <i>Anastatus</i> and <i>Ooencyrtus</i> . In addition, <i>Trissolcus japonicus</i> the main Asian regulator of <i>H. halys</i> was not detected despite its presence in Italy and Swiss. Current results guide the project to <i>T. japonicus</i> introduction.  |   |
| Mots-clés : <i>Halyomorpha halys</i> , parasitoïdes oophages, œufs sentinelles, lutte biologique<br>Key Words: <i>Halyomorpha halys</i> , egg-parasitoids, sentinel eggs, biological control  |   |