



**HAL**  
open science

# Évaluation du potentiel d'une rhizobactérie bénéfique et d'un champignon endophyte à induire les défenses des plantes contre la punaise invasive *Halyomorpha halys*

Solène Trehou

## ► To cite this version:

Solène Trehou. Évaluation du potentiel d'une rhizobactérie bénéfique et d'un champignon endophyte à induire les défenses des plantes contre la punaise invasive *Halyomorpha halys*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. dumas-03784597

**HAL Id: dumas-03784597**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03784597>**

Submitted on 23 Sep 2022

**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.



L'Institut Agro Rennes-Angers  
 Site d'Angers  Site de Rennes

Année universitaire : 2021-2022

Spécialité : Horticulture

Spécialisation (et option éventuelle) :

Protection des Plantes et Environnement  
appliquée à l'Horticulture (PPEH)

### Mémoire de fin d'études

- d'ingénieur de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)
- de master de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)
- de l'Institut Agro Montpellier (étudiant arrivé en M2)
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

# Évaluation du potentiel d'une rhizobactérie bénéfique et d'un champignon endophyte à induire les défenses des plantes contre la punaise invasive *Halyomorpha halys*

Par : Solène TREHIOU



**Soutenu à Angers le 6 septembre 2022**

#### Devant le jury composé de :

Président : Vanessa SOUFFLET-FRESLON

Maître de stage : Lisa IANNELLO

Enseignant référent : Nicolas CHEN

Autres membres du jury (Nom, Qualité) :

Alain SARNIGUET, DR-INRAe

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle de l'Institut Agro Rennes-Angers

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation «Patrimoine-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France» disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



## Remerciements

En préambule à ce travail, je souhaite adresser mes remerciements aux personnes qui ont participé au bon déroulement de ce stage de fin d'études (ou TFE comme on le dit en Belgique !).

Tout d'abord, je remercie le Professeur Frédéric Francis, doyen de la faculté et directeur de l'unité d'Entomologie fonctionnelle et évolutive de Gembloux Agro-Bio Tech pour m'avoir permis de réaliser mon stage au sein de son unité.

Je tiens vivement à témoigner ma reconnaissance à Lisa Iannello qui m'a encadrée durant ces six mois. Merci à elle pour sa disponibilité, sa qualité d'écoute et de relecture ainsi que sa positivité et son sourire à toutes épreuves !

Je souhaite remercier Ibtissem Ben Fekih pour m'avoir partagé ses connaissances sur l'art de la culture et de la manipulation des champignons.

J'aimerais également remercier Louise Vilain, stagiaire en Chimie pour ses explications sur la chromatographie et sa motivation pour le développement en duo de la méthode de quantification des phytohormones. Je remercie aussi Romain Thomas du Terra pour sa disponibilité quant à l'utilisation de l'appareil UPLC-MS ainsi que pour sa bonne humeur permanente et nos riches échanges sur des passions communes.

Merci à Kenza pour nos papotages de fin de journée et pour l'entraide que nous avons pu développer toutes les deux.

Un merci à toutes les personnes de l'unité d'entomologie, je pense notamment à Frédéric et ses conseils sur la culture de *V. faba*, Émilie et sa bienveillance. Merci à Joachim et Didier pour le prêt de matériel qui ont permis le bon déroulement de mes expérimentations.

Je remercie également l'ensemble du corps enseignant de la spécialisation PPEH pour nous avoir permis d'avoir toutes les clés en main afin de mener à bien ce stage et l'écriture de ce rapport.

Pour finir, je remercie ma famille et plus particulièrement ma maman pour m'avoir encouragée et soutenue tout au long de ce stage, particulièrement dans les moments difficiles. Merci d'avoir supporté mes histoires de plantes et de punaises à chacun de nos appels !



## Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des annexes

<b>I. Contextualisation de l'étude</b> .....	<b>p.1</b>
I.1. <i>Halyomorpha halys</i> , un insecte ravageur préoccupant .....	p.1
I.1.1. Généralités .....	p.1
I.1.2. Morphologie et cycle de développement .....	p.2
I.1.3. Moyens de lutte .....	p.3
I.2. Les défenses des plantes, un concept envisagé dans la lutte contre les bioagresseurs .....	p.5
I.2.1. Les défenses des plantes face à un insecte herbivore .....	p.5
I.2.2. Utilisation des micro-organismes non pathogènes pour induire les défenses des plantes .....	p.7
I.2.2.1. La résistance systémique induite (ISR) .....	p.7
I.2.2.2. Induction de l'ISR par les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) .....	p.7
I.2.2.3. Induction de l'ISR par les champignons endophytes .....	p.8
I.3. Cadre et objectifs de l'étude .....	p.9
<b>II. Matériels et méthodes</b> .....	<b>p.10</b>
II.1. Élevage de <i>Halyomorpha halys</i> .....	p.10
II.2. Culture et préparation de l'inoculum de <i>Bacillus velezensis</i> FZB42 .....	p.10
II.3. Culture et préparation de l'inoculum de <i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF 4556 .....	p.11
II.4. Matériel végétal .....	p.11
II.5. Étude de la réponse biologique de <i>Halyomorpha halys</i> .....	p.12
II.6. Étude de l'induction des défenses de <i>Vicia faba</i> .....	p.13
II.6.1. Préparation des solutions de calibration et des échantillons .....	p.13
II.6.2. Méthode UPLC-MS .....	p.13
II.7. Étude de la réponse comportementale de <i>Halyomorpha halys</i> .....	p.14
II.8. Analyses statistiques .....	p.15
<b>III. Résultats</b> .....	<b>p.15</b>
III.1. Inoculation de <i>Vicia faba</i> par les deux micro-organismes étudiés .....	p.15
III.2. Étude de la réponse biologique de <i>Halyomorpha halys</i> .....	p.16
III.3. Étude de l'induction des défenses de <i>Vicia faba</i> .....	p.16
III.4. Étude de la réponse comportementale de <i>Halyomorpha halys</i> .....	p.17
<b>IV. Discussion et perspectives</b> .....	<b>p.17</b>
IV.1. Étude de la réponse biologique de <i>Halyomorpha halys</i> .....	p.17
IV.2. Étude de l'induction des défenses de <i>Vicia faba</i> .....	p.19
IV.3. Étude de la réponse comportementale de <i>Halyomorpha halys</i> .....	p.21
<b>V. Conclusion</b> .....	<b>p.22</b>

Références

Annexes



## Liste des abréviations

ABA : acide abscissique  
CA : acide cinnamique  
CAd : acide cinnamique deutéré  
COV : composés organiques volatiles  
DAMPs : damage-associated molecular patterns (motifs moléculaires associés aux dégâts)  
ET : éthylène  
GLMM : generalized linear model (modèle linéaire généralisé)  
GLM : generalized linear mixed model (modèle linéaire généralisé mixte)  
HAMPs : herbivore-associated molecular patterns (motifs moléculaires associés aux herbivores)  
IAA : acide indole 3-acétique  
ISR : induced systemic resistance (résistance systémique induite)  
JA : acide jasmonique  
L1 : 1<sup>er</sup> stade larvaire  
L2 : 2<sup>ème</sup> stade larvaire  
L3 : 3<sup>ème</sup> stade larvaire  
L4 : 4<sup>ème</sup> stade larvaire  
L5 : 5<sup>ème</sup> stade larvaire  
MAMPs : microbe-associated molecular patterns (motifs moléculaires associés aux microbes)  
OPDA : acide 12-oxo-phytodiénoïque  
PAMPs : pathogen-associated molecular patterns (motifs moléculaires associés aux pathogènes)  
PGPR : plant growth promoting rhizobacteria (rhizobactéries favorisant la croissance des plantes)  
PR : pathogenesis-related protein (protéines liées à la pathogenèse)  
PRRs : pattern recognition receptors (récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires)  
Q-TOF LC/MS : quadrupole time of flight liquid chromatography with mass spectrometry (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse quadripolaire à temps de vol)  
ROS : reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)  
SA : acide salicylique  
SI : standard interne  
SDA : Sabouraud dextrose agar  
UFC : unité formant colonie  
UPLC-MS : ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (chromatographie liquide à ultra performance en tandem avec un spectromètre de masse)





## Liste des figures

**Figure 1** : Distribution mondiale de *Halyomorpha halys* ([1])

**Figure 2** : Dégâts occasionnés par *Halyomorpha halys* sur (A) feuilles de *Vicia faba* (© Solène Trehieu), (B) pomme (© Tracy Leskey dans Rice *et al.*, 2014) et (C) maïs après alimentation à travers les spathes (© Galen Dively dans Rice *et al.*, 2014)

**Figure 3** : Critères morphologiques permettant la reconnaissance de *Halyomorpha halys* adulte (© INRAE Marguerite Chartois, [2])

**Figure 4** : Cycle de développement de *Halyomorpha halys* (Photographies © INRAE Marguerite Chartois, [3]). Les valeurs correspondent au temps de développement moyen de chacun des stades élevés en conditions de laboratoire ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 16L :8D, 65-75% d'humidité relative) et sur haricots verts, arachides espagnoles et maïs (Nielsen *et al.*, 2008).

**Figure 5** : Représentation simplifiée de la réaction de défense des plantes à une attaque d'insectes phytophages (adaptée du schéma de Thierry Heitz, [4])

Abréviations : ABA : acide abscissique ; COV : composés organiques volatiles ; DAMPs : motifs moléculaires associés aux dégâts ; ET : éthylène ; FTa : facteur de transcription activé ; FTna : facteur de transcription non activé ; HAMPs : motifs moléculaires associés aux herbivores ; IAA : acide indole 3-acétique ; JA : acide jasmonique ; Mb : membrane plasmique ; PAMPs : motifs moléculaires associés aux pathogènes ; PRRs : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; SA : acide salicylique

**Figure 6** : Cage utilisée pour l'élevage de *Halyomorpha halys*, maintenue sur plants de *Vicia faba* avec des graines de tournesol *Helianthus annuus* pour compléter l'alimentation (© Solène Trehieu).

**Figure 7** : Apparence morphologique des colonies bactériennes et structures fongiques. (A) *Bacillus velezensis* FZB42 cultivé sur milieu LBA après 24 heures ; *Metarhizium brunneum* ARSEF 4556 cultivé sur milieu SDA après 5 jours (B) et 13 jours (C) (© Solène Trehieu).

**Figure 8** : Photographie du dispositif expérimental pour les expérimentations sur biologie de *H. halys* et les défenses de *V. faba* (© Solène Trehieu).

**Figure 9** : Chromatogrammes obtenus par méthode UPLC-MS pour la vérification de la colonisation de la rhizosphère par *Bacillus velezensis* FZB42. (A) : profil de FZB42 pure ; (B) : profil d'une bactérie retrouvée dans les plants traités ; (C) profil d'une bactérie retrouvée dans les plants traités et contrôles

**Figure 10** : Observation macroscopique de sections de tige provenant de *Vicia faba* traitée avec *Metarhizium brunneum* ARSEF 4556, quatorze jours après la mise en culture des organes sur SDA dans des boîtes de Petri. Le cercle rouge indique la présence de ce dernier.



**Figure 11** : Résultats des essais sur larves de deuxième stade de *Halyomorpha halys* sur plants de *Vicia faba* traités avec *Bacillus velezensis* FZB42 (« B ») et plants contrôles (« NB »). (A) Pourcentage de mortalité (GLMM binomial), les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards ; (B) Délai avant la mue (GLMM gamma) ; (C) Gain de masse (ANOVA mixte). « \* » et « ns » indiquent respectivement une différence significative et non significative au seuil de 5%. Les croix rouges représentent les moyennes.

**Figure 12** : Résultats des essais sur larves de deuxième stade de *Halyomorpha halys* sur plants de *Vicia faba* traités avec *Metarhizium brunneum* ARSEF 4556 (« M ») et plants contrôles (« NM »). (A) Pourcentage de mortalité (GLMM binomial), les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards ; (B) Délai avant la mue (GLMM gamma) ; (C) Gain de masse (ANOVA mixte). « ns » indique une différence non significative au seuil de 5% et les croix rouges représentent les moyennes.

**Figure 13** : Concentration en acide 12-oxo-phytyldiénoïque (OPDA) dans les feuilles en fonction du traitement des plantes (avec (« B ») et sans (« NB ») *Bacillus velezensis* FZB42) et du temps après ajout des larves (t=0 signifie que les plantes utilisées n'ont pas subi d'attaque d'insectes). « ns » indique une différence significative au seuil de 5% entre les différents temps (ANOVA à deux facteurs). « \* » indique une différence significative au seuil de 5% de t=48h avec t=0 et t=10j. Les croix rouges représentent les moyennes.

**Figure 14** : Concentration en acide abscissique (ABA) dans les feuilles en fonction du traitement des plantes (avec (« B ») et sans (« NB ») *Bacillus velezensis* FZB42) dix jours après l'ajout de punaises. « ns » indique différence non significative au seuil de 5% entre les traitements (ANOVA à un facteur) et les croix rouges représentent les moyennes.

**Figure 15** : Temps passé par *Halyomorpha halys* adulte sur : (A) les plants traités « B » et non traités « NB » avec *Bacillus velezensis* FZB42 ; (B) les plants traités « M » et non traités « NM » avec *Metarhizium brunneum* ARSEF 4556 (GLM gamma). Les croix rouges représentent les moyennes et « ns » indique une différence non significative au seuil de 5%.



## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Masse des ions de quantification et temps de rétention des phytohormones étudiées ainsi que du standard interne utilisé

**Tableau 2** : Paramètres des droites de calibration et limites de détection et de quantification estimées de chacune des phytohormones étudiées



## **Liste des annexes**

Annexe I - Protocoles d'extraction de phytohormones testés

Annexe II - Gradient d'élution utilisé pour l'analyse UPLC-MS

Annexe III - Script de l'analyse de la mortalité des larves via un GLMM de loi binomiale

Annexe IV - Script de l'analyse du gain de masse des larves via une ANOVA mixte

Annexe V - Script de l'analyse de la durée du stade larvaire via un GLMM de loi gamma

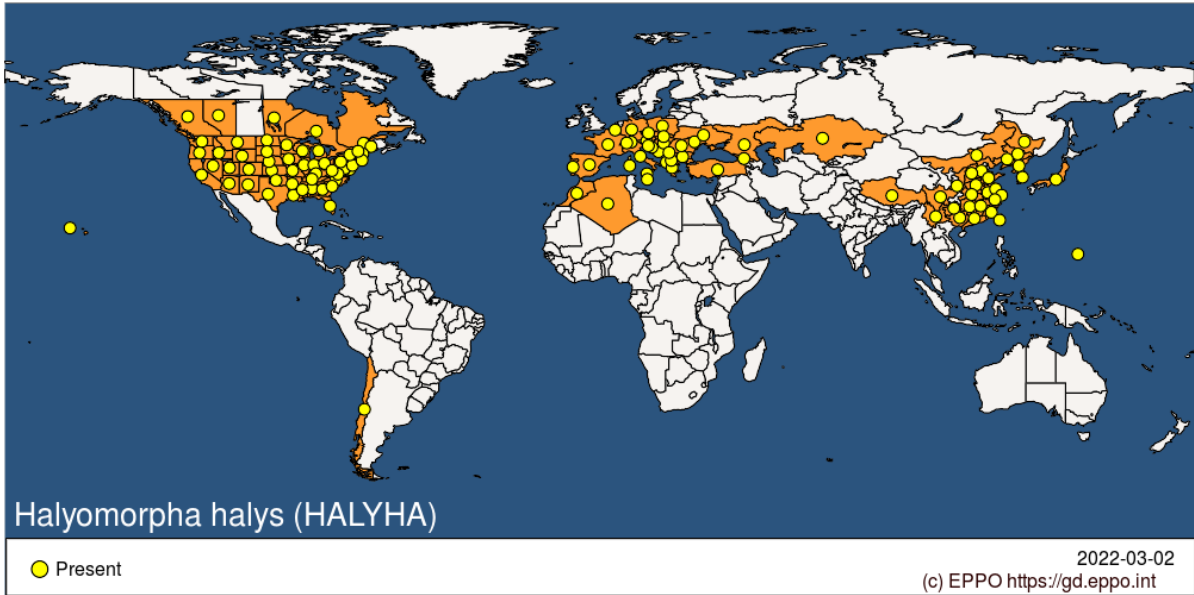
Annexe VI - Script de l'analyse des concentrations en phytohormones des échantillons via une ANOVA à un (A) ou deux facteurs (B)

Annexe VII - Script de l'analyse du temps passé sur les plantes via un GLMM de loi gamma

Annexe VIII - Script du test de choix des punaises via un test du  $\chi^2$

Annexe IX - Droites de calibration des différents standards de phytohormones





**Figure 1** : Distribution mondiale de *Halyomorpha halys* ([1])



**Figure 2** : Dégâts occasionnés par *Halyomorpha halys* sur (A) feuilles de *Vicia faba* (© Solène Trehieu), (B) pomme (© Tracy Leskey dans Rice *et al.*, 2014) et (C) maïs après alimentation à travers les spathes (© Galen Dively dans Rice *et al.*, 2014)

# I. Contextualisation de l'étude

## I.1. *Halyomorpha halys*, un insecte ravageur préoccupant

### I.1.1. Généralités

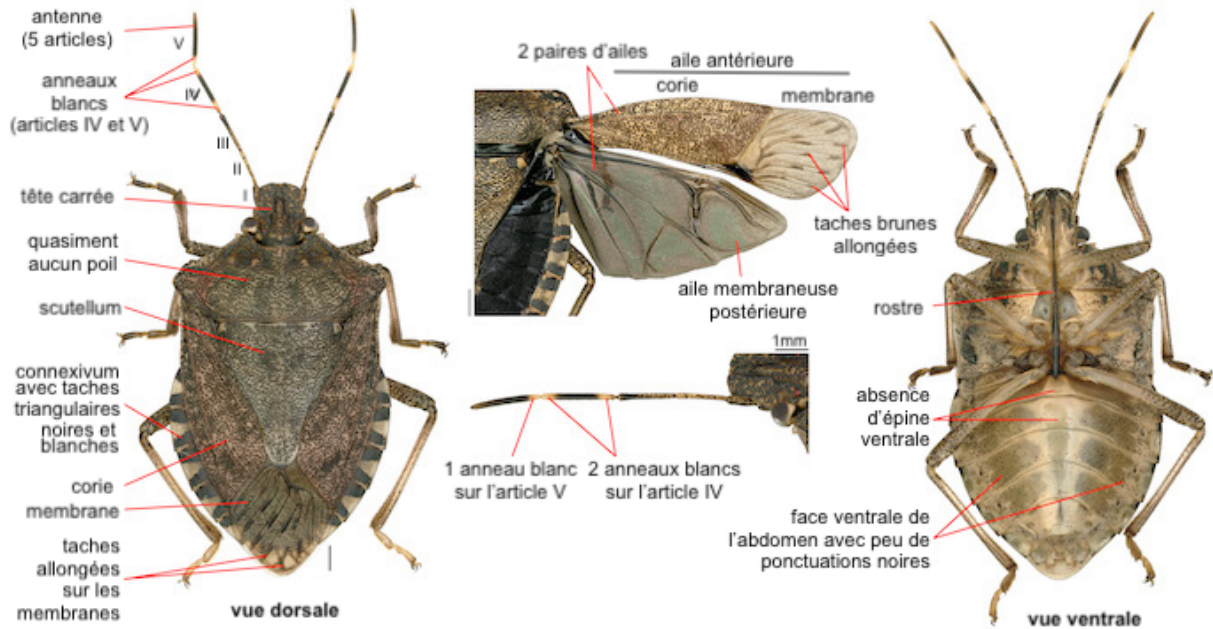
*Halyomorpha halys* (Stål, 1885), connue sous le nom de « punaise diabolique » ou « punaise marbrée » en français et « Brown Marmorated Stink Bug » en anglais, est un hémiptère appartenant à la famille des Pentatomidae. Cette punaise est un ravageur invasif originaire de l'Extrême-Orient (Chine, Japon, Corée et Taïwan) (Hoebeke et Carter, 2003). Après son introduction accidentelle en Amérique du Nord au milieu des années 90 (Rice *et al.*, 2014), *H. halys* a largement étendu son aire de distribution (Figure 1). Celle-ci a été collectée pour la première fois en Europe en 2004, au Liechtenstein mais n'a été identifiée qu'en 2007 en Suisse (Wermelinger *et al.*, 2008 ; Arnold, 2009). En France, le premier spécimen a été découvert en Alsace en 2012 (Callot et Brua, 2013) et *H. halys* est aujourd'hui bien répandue sur le territoire français [1]. En Belgique, la capture du premier individu a été observé en 2011 (Claerebout *et al.*, 2018), mais à ce jour peu d'occurrences du ravageur y sont recensées [1].

La punaise diabolique est un insecte piqueur-suceur hautement polyphage puisqu'il s'attaque à une large gamme d'hôtes comprenant plus de 170 plantes (Leskey et Nielsen, 2018). Ces dernières sont très diverses et incluent des espèces sauvages ainsi que des espèces fruitières, légumières, ornementales, de grandes cultures, dont nombreuses sont d'importance économique majeure. Ainsi, *H. halys* représente une sérieuse menace pour les plantations de pommiers, poiriers, pêchers, tomates, poivrons, maïs doux, soja, rhododendrons, chrysanthèmes, frênes, ... (Kuhar *et al.*, 2012 ; Leskey et Nielsen, 2018 ; Zakharchenko *et al.*, 2020). L'insecte attaque les bourgeons, feuilles, tiges, fleurs, et principalement des fruits, gousses et semences en piquant les tissus végétaux (Haye *et al.*, 2015b ; Zobel *et al.*, 2016, Blaauw *et al.*, 2019). La punaise extrait les nutriments de ses plantes hôtes en perçant la surface des tissus à l'aide de ses stylets. Ceci entraîne des déformations, cicatrices et décolorations (Figure 2) mais provoque également l'avortement des boutons floraux et jeunes organes fructifères, induisant alors une perte de rendement des cultures (Rice *et al.*, 2014 ; Leskey et Nielsen, 2018). Par exemple, une densité élevée de punaises a causé jusqu'à 100% de pertes de récolte aux États-Unis dans certains vergers de pommiers et de pêchers en 2010 (Leskey *et al.*, 2012) ainsi que dans les cultures de maïs doux en 2011 (Kuhar *et al.*, 2012).

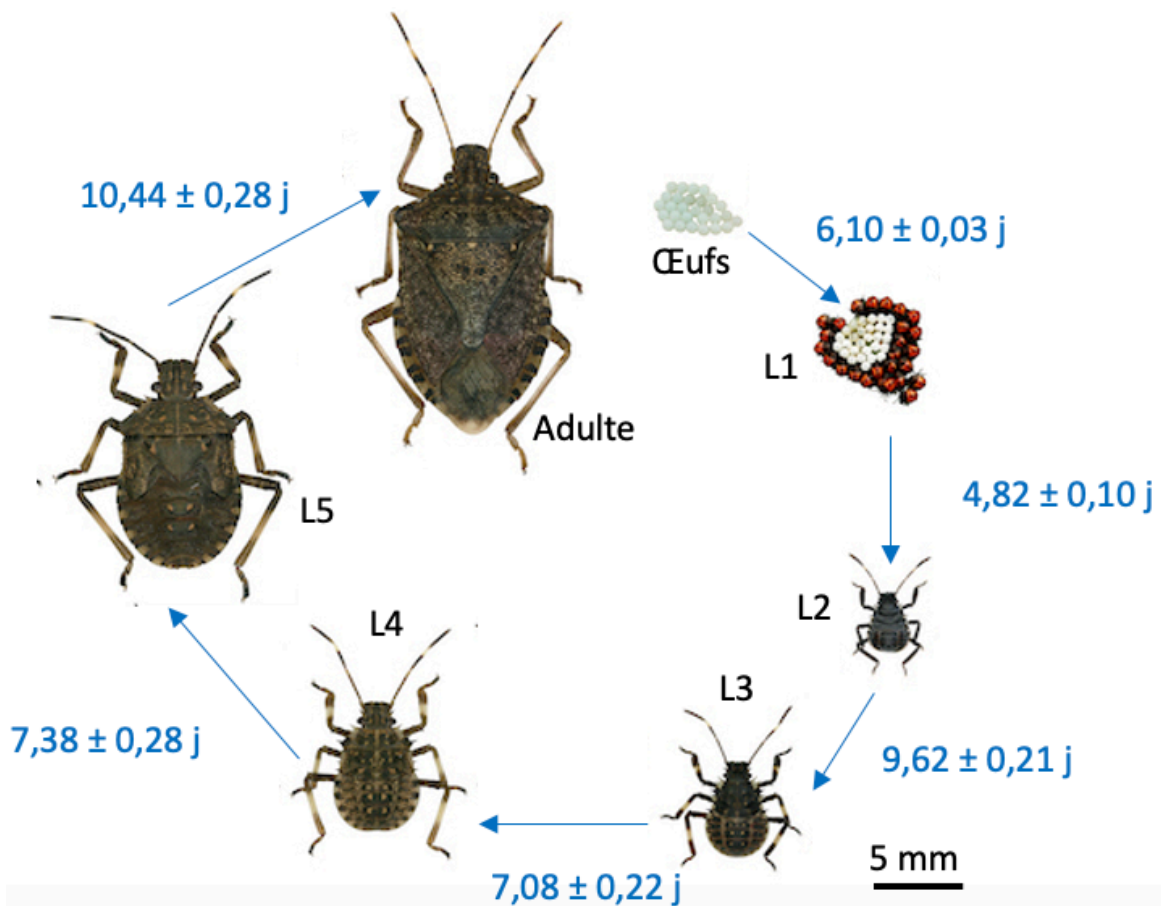
De plus, les adultes mâles et femelles tout comme les larves de *H. halys*, libèrent une phéromone d'alarme odorante : le (E)-2-décénal lorsqu'ils sont stressés (Harris *et al.*, 2015). Ce composé altère notamment la qualité du vin produit à partir de raisins contaminés par les sécrétions de punaises (Mohekar *et al.*, 2017).

Par son alimentation, *H. halys* peut également causer des dommages indirects en transmettant des agents pathogènes fongiques et bactériens comme la levure *Eremothecium coryli* (Rice *et al.*, 2014).

Ajouté à sa haute polyphagie, *H. halys* est un insecte doté d'une grande mobilité lui permettant de se répandre d'un hôte à un autre, de plantes cultivées à sauvages et inversement. En effet, les adultes sont capables de voler en moyenne 2,4 et 2,1 km pour les mâles et femelles respectivement (Lee et Leskey, 2015). Fait plus rare mais notable, la distance maximale parcourue en 24 heures a été enregistrée à 66,54 km pour un mâle et 75,12 km pour une femelle, lors d'expérimentations en laboratoire sans autorisation à se poser pour l'insecte (Wiman *et al.*, 2015). Quant aux larves, celles-ci ont une grande capacité de dispersion par la marche, qui s'accroît avec l'augmentation de la température (Lee *et al.*, 2014b). En outre, *H. halys* est un



**Figure 3 :** Critères morphologiques permettant la reconnaissance de *Halyomorpha halys* adulte (adapté de © INRAE Marguerite Chartois, [2])



**Figure 4 :** Cycle de développement de *Halyomorpha halys* (Photographies © INRAE Marguerite Chartois, [3]). Les valeurs correspondent au temps de développement moyen de chacun des stades élevés en conditions de laboratoire ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 16L :8D, 65-75% d'humidité relative) et sur haricots verts, arachides espagnoles et maïs (Nielsen *et al.*, 2008).

insecte qui a tendance à former des agrégations. Le mâle produit une phéromone d'agrégation identifiée comme un mélange de deux stéréoisomères (3S,6S,7R,10S)-10,11-époxy-1-bisabolène-3-ol et (3S,6S,7R,10R)-10,11-époxy-1-bisabolène-3-ol (Khrimian *et al.*, 2014). L'émission de cette phéromone peut attirer larves et adultes vers les zones ressources ou de repos (Rice *et al.*, 2014).

Enfin, en plus de la nuisance agronomique que représente *H. halys*, des signalements et plaintes de propriétaires ont été recensés dans les zones rurales et régions urbaines à la suite de l'installation de milliers de punaises sur les murs et dans les toits de résidences (Inkley, 2012). Cela est dû à la recherche d'abris par les adultes lors de la période d'hivernage (Lee *et al.*, 2014a ; Hancock *et al.*, 2019).

### I.1.2 Morphologie et cycle de développement

La morphologie de *H. halys* est décrite en détails par Hoebeke et Carter (2003). Les spécimens adultes mesurent entre 12 et 17 mm de long pour 7 à 10 mm de large. Il existe un dimorphisme sexuel chez la punaise diabolique : le mâle est généralement plus petit et léger et présente un sternum plus rouge que la femelle (Pajač Živković *et al.*, 2022), il est également doté d'un clasper au niveau du segment ventral terminal (Rice *et al.*, 2014). Cependant, l'allure générale de l'insecte est la même. Ses pattes sont brunes avec des bandes blanches et le nom « punaise marbrée » fait référence à sa coloration dorsale qui est généralement brune, grise ou ocre, accompagnée d'une ponctuation dense et sombre. L'environnement, par le biais de la photopériode et de la température, agit sur cette pigmentation (Niva et Takeda, 2003). En Europe, l'adulte est souvent confondu avec l'espèce *Rhaphigaster nebulosa* de taille et de morphologie semblables, mais certains caractères sont propres à *H. halys* (Figure 3). En effet, celle-ci présente des antennes brunes avec des anneaux de couleur plus claire au niveau de la base et de l'extrémité haute de l'article IV ainsi qu'à la base de l'article V. Le connexivum (bordure de l'abdomen) est orné de taches triangulaires claires et foncées en alternance. La membrane des ailes antérieures possède des taches brunes allongées. Enfin, elle ne présente pas d'épine médiane ventrale.

Bien qu'il ait été signalé que 4 à 5 générations par an peuvent avoir lieu dans les régions tropicales et semi-tropicales comme la Chine, il est généralement admis que *H. halys* réalise une à deux générations par an dans les régions tempérées (Nielsen *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2013). En Europe, la punaise diabolique semble univoltine, cependant deux générations sont possibles lorsque les années sont particulièrement chaudes (Costi *et al.*, 2017 ; Stoeckli *et al.*, 2020). Le cycle univoltin de *H. halys*, cycle le plus documenté sera décrit dans cet état de l'art.

Le cycle biologique de *H. halys* repose sur cinq stades larvaires séparés par des mues avant d'atteindre l'état adulte (Figure 4). Au printemps, après émergence de leurs sites d'hivernage, les adultes commencent à s'accoupler. Il semblerait que les femelles soient capables de reproduire lorsque la photopériode est d'au moins 14 heures et la température supérieure ou égale à 10°C (Lee *et al.*, 2013). Celles-ci déposent ensuite, sur la face inférieure des feuilles, des masses comprenant entre 20 et 30 œufs (Wermelinger *et al.*, 2008). À 25°C, au laboratoire, *H. halys* est capable de pondre jusqu'à 6 masses d'œufs au cours de sa vie d'après Haye *et al.* (2014) et en moyenne 8 masses d'après Nielsen *et al.* (2008).

Les larves de premier stade (L1) sont de forme elliptique non déprimée et mesurent environ 2,4 mm de long. Elles ont une tête de forme triangulaire et sont de couleur rouge et noire. Les L1 ne se déplacent pas et restent regroupées autour de la masse d'œufs jusqu'à leur première





mue. En se nourrissant des sécrétions maternelles laissées à la surface des œufs, elles hériteraient alors du symbiote intestinal *Candidatus pantoea carbekii*, une Gammaproteobactérie (Bansal *et al.*, 2014).

À partir du deuxième stade (L2), les larves commencent à se déplacer et à se nourrir en piquant les végétaux. Elles font environ 3,7 mm de long et sont ovoïdes plus ou moins déprimées. La couleur du corps et des pattes des larves prend des tons gris-noirs. Leur tête est de forme rectangulaire avec une paire d'épines devant les yeux. Leurs antennes sont de couleur foncée à l'exception de la partie apicale de l'article III qui est de couleur plus claire.

Le troisième stade (L3) est quant à lui caractérisé par des larves piriformes relativement déprimées mesurant en moyenne 5,5 mm. Celles-ci sont brunes et leurs pattes présentent des bandes blanches au niveau de la base du fémur et à au milieu du tibia.

Les larves du quatrième stade (L4) ont un corps similaire aux L3, mais elles font en moyenne 8,5 mm de long. Les antennes sont de couleur noire avec la partie apicale de l'article III et la base de l'article IV blanches.

Enfin, les larves du cinquième et dernier stade larvaire (L5) ressemblent aux L4, mais sont de taille plus importante puisqu'elles mesurent environ 12 mm.

Le nombre de jours nécessaires au développement complet de l'insecte varie selon les conditions environnementales. Des essais au laboratoire ont montré que cette durée vaut entre 42,3 (Haye *et al.*, 2014) et 44,9 (Nielsen *et al.*, 2008) jours à 25°C contre 60 à 131 jours en conditions extérieures fluctuantes en Suisse (Haye *et al.*, 2014). Des cinq stades larvaires émerge un imago doté d'ailes qui acquiert sa maturité sexuelle après environ 14 jours en laboratoire ou deux semaines après l'hivernation pour une population univoltine (Hoebeke et Carter, 2003).

### I.1.3 Moyens de lutte

Plusieurs méthodes existent pour lutter contre *H. halys*. Tout d'abord, les stratégies de gestion chimiques : celles-ci reposent essentiellement sur l'utilisation d'insecticides neurotoxiques. Les plus couramment utilisés aux États-Unis pour leur efficacité sont les pyréthrinoides, les néonicotinoïdes, les carbamates, les organophosphates et l'endosulfan (un organochloré) (Kuhar et Kamminga, 2017). Néanmoins, ces produits présentent une courte activité résiduelle. Ceci rend donc nécessaire la répétition des traitements et implique leur utilisation excessive (Leskey *et al.*, 2014). De plus, ce sont des insecticides à large spectre, qui peuvent se révéler néfastes pour l'entomofaune non-cible tels que les pollinisateurs et les agents de contrôle biologique de *H. halys* et autres ravageurs.

Néanmoins, dans une logique de diminution des produits phytopharmaceutiques et de développement de systèmes de cultures plus durables, les solutions alternatives sont de plus en plus étudiées. Par exemple, de nouveaux insecticides verts sont mis en place à base de polyphénols (Živković *et al.*, 2020). *H. halys* semble sensible aux extraits de feuilles de stevia, riches en composés phénoliques et efficaces contre les stades larvaires après contact et ingestion. L'utilisation d'huiles essentielles est également une piste étudiée et fait l'objet d'une attention croissante en raison du potentiel insecticide de celles-ci (Bulgarini *et al.*, 2021 ; Gokturk, 2021).

De plus, l'usage de substances attractives pour l'insecte est adopté depuis quelques années. En effet, avant 2012, l'emploi du MDT (methyl (E,E,Z)-2,4,6-decatrienoate), phéromone d'agrégation de la punaise *Plautia tali* était le seul composé signalé permettant d'attirer les populations de *H. halys* lorsqu'il était disposé dans des pièges (Adachi *et al.*, 2007). Puis, la combinaison du MDT avec la phéromone d'agrégation de *H. halys* dans les pièges pyramidaux



a permis une meilleure capture et surveillance du ravageur puisque larves et adultes répondent à ces stimuli (Weber *et al.*, 2014 ; Leskey *et al.*, 2015). La méthode de lutte intégrée « Attract-and-kill » utilise ces phéromones afin d'attirer la punaise dans une zone précise pour ensuite l'éliminer à l'aide d'un insecticide. Par conséquent, cette approche permet de réduire la quantité d'insecticide employée en appliquant le produit sur un espace limité. Ainsi, lors d'expérimentations aux États-Unis, cela a permis une réduction de 97% des surfaces de vergers de pommes traitées (Morrison *et al.*, 2019).

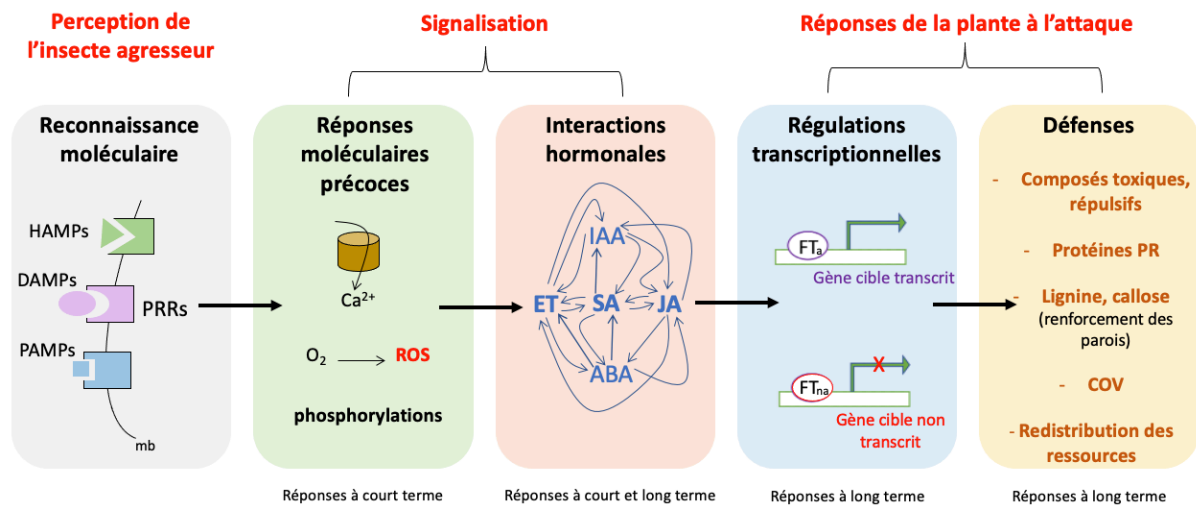
La détection des phéromones est donc un phénomène important chez *H. halys* auquel Finetti *et al.* (2021) se sont intéressés. Ils ont découvert qu'un dérèglement au niveau des récepteurs contrôlant l'olfaction des punaises, notamment le récepteur TAR1 capable de reconnaître la phéromone d'alarme, entraîne une baisse de sensibilité à la phéromone. Ceci ouvre la voie au développement de nouveaux outils de lutte, tels que des biopesticides ou composés volatils répulsifs, ciblant ce récepteur.

D'autre part, les méthodes de lutte biologique avec l'utilisation de macro et micro-organismes sont largement étudiées. En ce qui concerne l'utilisation de macro-organismes, les populations de *H. halys* sont relativement bien régulées dans leur aire d'origine par des ennemis naturels dont certains parasitoïdes d'œufs des genres *Trissolcus* et *Anastatus*, *Trissolcus japonicus* étant l'espèce la plus largement représentée (Yang *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2017). Cependant, l'introduction d'agents de lutte biologique exotiques en Europe est limitée et des tests de spécificité d'hôte sont en cours. L'emploi d'espèces indigènes est alors privilégié, *Anastatus bifasciatus* est un candidat prometteur en Europe puisqu'il est capable de parasiter et de réaliser son cycle de développement au sein des œufs de *H. halys* (Haye *et al.*, 2015a ; Stahl *et al.*, 2019), mais sa gamme d'hôte est large ce qui représente un potentiel risque lors de lâchers massifs. De nouvelles espèces indigènes d'Europe sont en cours d'étude (Stahl, 2018 ; Giovannini *et al.*, 2021).

Le potentiel des prédateurs naturels de *H. halys* est également approfondi. L'analyse du contenu intestinal de différents arthropodes en Italie a prouvé que des taxons d'insectes de l'ordre des dermaptères, coléoptères, hémiptères et des orthoptères ainsi des taxons d'arachnides, consomment *H. halys* (Bulgarini *et al.*, 2022). Des essais en laboratoire ont également montré la capacité prédatrice de trois espèces de fourmis (Kamiyama *et al.*, 2021). D'autres macro-organismes comme les nématodes *Heterorhabditis bacteriophora* et *Steinernema borjomiense* sont des agents de biocontrôle prometteurs (Burjanadze *et al.*, 2020). Cependant, cela ne représente qu'une lutte biologique complémentaire pour contribuer à la lutte contre la punaise diabolique.

Enfin, l'usage de microorganismes entomopathogènes est une méthode qui retient l'attention. *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* sont les champignons entomopathogènes les plus performants testés sur *H. halys*. Au laboratoire, ils provoquent 100% de mortalité chez les adultes (Gouli *et al.*, 2012) et les larves L2 (Parker *et al.*, 2015) 12 jours après application de la solution sur l'insecte. Tozlu *et al.* (2019) ont obtenu 100% de mortalité des larves L3 et L4 de *H. halys* avec les souches bactériennes *Bacillus cereus* FD 63, *Bacillus thuringiensis* kurstaki FD 16 et *Pantoea agglomerans* FD 68. Ces solutions semblent donc prometteuses pour une utilisation au champ.





**Figure 5** : Représentation simplifiée de la réaction de défense des plantes à une attaque d'insectes phytophages (adaptée du schéma de Thierry Heitz, [4])

Abréviations : ABA : acide abscissique ; COV : composés organiques volatiles ; DAMPs : motifs moléculaires associés aux dégâts ; ET : éthylène ; FTa : facteur de transcription activé ; FTna : facteur de transcription non activé ; HAMPs : motifs moléculaires associés aux herbivores ; IAA : acide indole 3-acétique ; JA : acide jasmonique ; Mb : membrane plasmique ; PAMPs : motifs moléculaires associés aux pathogènes ; PRRs : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; SA : acide salicylique

## **I.2. Les défenses des plantes, un concept envisagé dans la lutte contre les bioagresseurs**

### **I.2.1. Les défenses des plantes face à un insecte herbivore**

Les plantes sont des êtres immobiles vivant dans un environnement où elles sont continuellement menacées par un large éventail de bioagresseurs dont de nombreux insectes phytophages. La course aux armements évolutive entre les plantes et leurs ennemis a doté les plantes d'un système de protection élaboré. Les végétaux possèdent une première ligne de défense, appelée résistance constitutive. Cette dernière est présente de manière innée, c'est-à-dire qu'elle ne nécessite pas une exposition préalable à l'agresseur pour être déclenchée. De plus, les végétaux sont capables de reconnaître une agression et de réagir en activant des défenses dirigées contre l'assaillant : ce sont les réponses immunitaires induites. Des mécanismes de défense locaux et/ou systémiques sont alors mis en place afin de protéger les tissus et organes distants non touchés (Belete, 2018 ; War *et al.*, 2020).

L'établissement des défenses végétales induites par la présence d'un insecte phytophage se réalise en trois grandes étapes (Figure 5) (Bonaventure, 2012 ; Erb et Reymond, 2019 ; Checker et Sharma, 2021).

Tout d'abord, les plantes sont capables de détecter l'attaque via des récepteurs spécifiques appelés récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs). Ceux-ci reconnaissent les motifs moléculaires associés aux insectes herbivores (HAMPs) qui sont les éliciteurs présents dans les sécrétions des insectes (phéromones, salive, ponte, fèces) ainsi que les molécules issues de la plante elle-même à la suite de dommages causés par l'agresseur (DAMPs). Cette phase de reconnaissance peut également être associée à la perception des motifs moléculaires associés aux micro-organismes pathogènes (PAMPs) pouvant être libérés dans les fluides des insectes. *H. halys* peut par exemple transmettre lors de son alimentation la levure *Eremothecium coryli* responsable de la stigmatomycose (Rice *et al.*, 2014), qui pourrait donc également jouer un rôle dans l'induction des défenses des plantes.

La perception de ces différents signaux initie la deuxième phase : la phase de signalisation. Dans un premier temps, il y a une activation des réponses à court terme au niveau de la membrane plasmique des cellules végétales adjacentes au lieu de l'attaque. Les premiers événements cellulaires déclenchés en quelques secondes et minutes sont une dépolarisation du potentiel de la membrane plasmique, la génération d'influx entrant de calcium ( $Ca^{2+}$ ), la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que des phénomènes de phosphorylation par des protéines kinases sensibles au calcium.

Après l'alerte précoce s'en suit la synthèse de phytohormones. L'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA) et l'éthylène (ET) sont les trois principales phytohormones impliquées dans les voies de signalisation lors d'un stress biotique. Selon les espèces végétales, les phytohormones peuvent s'accumuler plus ou moins rapidement dans les tissus blessés. Cela dépend également du comportement alimentaire de l'insecte bioagresseur, des éliciteurs perçus par la plante. Il semblerait qu'en général, les attaques d'insectes broyeur causant d'importants dommages mécaniques activent la voie de signalisation du JA alors que celles d'insectes piqueurs-suceurs causant des dommages plus minimes, induisent soit la voie médiée par SA soit celle médiée par JA (Thaler *et al.*, 2012). Giacometti *et al.* (2016) ont montré que l'attaque de punaises impliquent les deux voies de signalisation chez les graines de soja. Jacobi *et al.* (2021) ont quant à eux observé une augmentation de la concentration en JA et une diminution de la concentration en SA chez le maïs à la suite d'une exposition des plantes aux punaises.



D'autres phytohormones comme l'acide abscissique (ABA) ou encore l'acide indole 3-acétique (IAA), généralement associées à la croissance et au développement des plantes, interviennent dans la réaction de défense des plantes. Des études sur *Nicotiana tabacum* et *Arabidopsis thaliana* ont notamment révélé que JA induit la production des récepteurs à ABA, ce qui régule alors la reprogrammation métabolique de la plante et équilibre le compromis croissance/défense (Lackman *et al.*, 2011 ; Yang *et al.*, 2019). Dans le même esprit, JA induit l'expression du gène de l'auxine synthase et donc la production d'IAA (Yang *et al.*, 2019). Le réseau hormonal est donc complexe, avec des interactions synergiques ou antagonistes qui peuvent avoir lieu entre ces différentes voies de signalisation.

Cette phase de signalisation aboutit à la mise en place de la troisième étape de l'induction des défenses de la plante qui est la phase de réponses de la plante face au ravageur. Des facteurs de transcription régulant l'expression des composés de défense sont alors activés. Ces composés peuvent avoir une action directe ou indirecte sur l'insecte (War *et al.*, 2012 ; Belete, 2018 ; Checker et Sharma, 2021). Dans le cas des défenses directes, celles-ci affectent la physiologie et/ou le comportement du bioagresseur ciblé. Cela implique notamment des barrières physiques avec la production de lignine, de callose intervenant dans l'épaississement des parois cellulaires ou encore la sécrétion de cire à la surface du végétal. Cela comprend également des barrières biochimiques avec la raréfaction des ressources disponibles pour le bioagresseur et la production de composés toxiques, répulsifs voire biocides. Parmi ceux-ci, il y a notamment les protéines PR liées à la pathogénèse comme les inhibiteurs de protéase responsables du blocage de l'activité protéolytique de l'insecte affectant alors sa digestion, les enzymes oxydatives telles que les lipoxygénases et polyphénol oxydase à l'origine de la production de molécules toxiques ou inhibant la digestion, les flavonoïdes, phytoalexines, tannins... ayant un effet de dissuasion alimentaire. Quant aux mécanismes de défense indirects induits, ceux-ci n'ont pas d'impact significatif immédiat sur l'insecte. Ils comprennent la production et la libération de composés organiques volatiles COV ou de nectar extra-floral attracteurs des ennemis naturels de l'insecte ravageur.

En ce qui concerne les études menées sur *H. halys*, celles-ci ont montré que la salive de *H. halys* élicite les défenses de plants de tomates en induisant notamment les gènes codant pour des inhibiteurs de protéases dépendants du JA (Peiffer et Felton, 2014). De plus, *Vicia faba* réagit à l'oviposition de *H. halys* en surexprimant les gènes codant pour des inhibiteurs de protéases dépendants du JA et d'autres sensibles à SA (Rondoni *et al.*, 2018).

Ces trois étapes se réalisent donc localement au niveau du site de l'attaque, mais également dans les organes distaux via différentes signalisations de longue distance. La signalisation électrique est réalisée par la propagation rapide des potentiels d'action de cellule en cellule (Huber et Bauerle, 2016). La signalisation chimique comprend la libération de COV, ou encore la circulation du  $Ca^{2+}$  vers des cellules voisines via les plasmodesmes ou comme les phytohormones via les tissus vasculaires (Lacombe et Achard, 2016 ; Toyota *et al.*, 2018). Les plantes reconnaissent également la signalisation hydraulique avec des changements de pression de turgescence prenant naissance dans les vaisseaux et se propageant dans les cellules environnantes (Huber et Bauerle, 2016).

Ainsi, les végétaux possèdent une panoplie de mécanismes pour se défendre face à des attaques d'insectes phytophages, cependant ceux-ci ne se révèlent pas toujours victorieux. En effet, les sécrétions de certains insectes phytophages contiennent des effecteurs, produits par l'insecte ou provenant des micro-organismes transmis par l'insecte, qui perturbent la réaction de défense voire l'inhibent (Stuart, 2015 ; Chen et Mao, 2020).



## I.2.2. Utilisation de micro-organismes non pathogènes pour induire les défenses des plantes

### I.2.2.1. La résistance systémique induite (ISR)

Les réponses de défense des plantes peuvent être « boostées » via l'action de micro-organismes non pathogènes, on parle de résistance systémique induite (ISR). La colonisation de la plante par ces micro-organismes induit un état physiologique particulier chez la plante appelé « amorçage » ou « priming », permettant à celle-ci de se préparer à une future agression et d'y répondre plus rapidement et efficacement (Conrath *et al.*, 2006, Yu *et al.*, 2022). Les éliciteurs associés à aux micro-organismes capables d'induire l'ISR sont reconnus comme des MAMPs (motifs moléculaires associés aux microbes) par des protéines PRRs (Pršić et Ongena, 2020 ; Yu *et al.*, 2020). Ceci entraîne une cascade d'évènements cellulaires vus précédemment (cf I.2.1.) en vue d'affecter négativement les performances du ravageur. Néanmoins, des études ont révélé que de l'inoculation des plantes par certains de ces micro-organismes peut avoir des effets neutres (Clement *et al.*, 2005 ; Dean *et al.*, 2014) voire positifs (Pineda *et al.*, 2012 ; Shavit *et al.*, 2013) sur le ravageur.

### I.2.2.2. Induction de l'ISR par les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) sont des bactéries colonisant la rhizosphère des plantes et ayant une action bénéfique sur la croissance de celles-ci. Les PGPR sont aujourd'hui couramment utilisées comme alternative aux engrais chimiques en agriculture. Ces bactéries peuvent également jouer un rôle dans la santé des plantes en entrant en compétition avec les agents pathogènes de la rhizosphère et/ou en activant la résistance systémique induite des plantes. Les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* sont les plus étudiés pour l'induction de l'ISR (Kloepper *et al.*, 2004 ; Bakker *et al.*, 2007 ; Kumar *et al.*, 2018). Des études ont révélé que les PGPR sont médiateurs de l'ISR contre certains insectes ravageurs : par exemple, *P. fluorescens* (souche SS101) renforce les défenses de *Arabidopsis thaliana* contre *Spodoptera exigua* (Van de Mortel *et al.*, 2012) ou encore *B. subtilis* (souche BEB-DN) contre *Besimia tabaci* sur tomate (Valenzuela-Soto *et al.*, 2010).

*Bacillus velezensis* FZB42, de son ancien nom *Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum* FZB42, est utilisée dans cette étude. Il s'agit d'une souche PGPR modèle pour les rhizobactéries à Gram positif (Fan *et al.*, 2018), elle est notamment commercialisée comme produit fertilisant sous le nom RhizoVital® 42 (Fayalo *et al.*, 2016). De plus, FZB42 est largement reconnue pour sa production de composés bioactifs agissant directement sur divers phytopathogènes (Han *et al.*, 2021 ; Wu *et al.*, 2015). Elle synthétise des lipopeptides (surfactine, fengycine, iturine, bacillomycine-D), des polycétides (macrolactine, difficidine, bacillaène), de la bacillibactine (un sidérophore) ainsi que d'autres composés aux propriétés anti-microbiennes (bacilysine, plantazolicine, amylocyclicine) (Chen *et al.*, 2009 ; Scholz *et al.*, 2011 ; Scholz *et al.*, 2014). Certains métabolites ont également des propriétés insecticides où une application directe entraîne la mort des larves chez le moustique *Aedes aegypti* (Falqueto *et al.*, 2021).

En plus de leur action directe sur les organismes, ces métabolites secondaires ainsi que les composés volatils ou encore les composés de surface cellulaire (lipopolysaccharides, flagelline, ...) de la bactérie jouent un rôle dans l'élicitation de l'ISR des plantes (Ongena *et al.*, 2007 ; Borriss *et al.*, 2019). Chowdhury *et al.* (2015) ont par exemple montré qu'en présence de FZB42, l'infection de l'agent pathogène fongique *Rhizoctonia solani* est réduite et l'expression du gène de la défensine végétale est significativement augmentée, suggérant une activation



accrue de la voie de signalisation JA/ET. Wu et al. (2018) ont quant à eux montré que la colonisation de la rhizosphère par FZB42 limite la réouverture des stomates du tabac par *Phytophthora nicotianae* et donc l'infection, via la surexpression de gènes codant pour des protéines PR et enzymes de défense ainsi qu'à l'accumulation de SA, JA et ET dans les feuilles.

Cependant, il n'existe que peu de références attestant des répercussions de l'élicitation de l'ISR par *B. velezensis* FZB42 sur les insectes. Serteyn *et al.* (2020) ont montré que les teneurs en JA et SA sont plus élevées dans les plants de *V. faba* traités avec FZB42 en présence de pucerons. Parallèlement à cela, les comportements alimentaires des pucerons ont été affectés, étant plus courts sur les plants traités, et la reproduction de l'un des clones de pucerons a été réduite. De plus, Serteyn *et al.* (2021) se sont aperçus que certaines protéines sont surexprimées dans les glandes salivaires de larves L5 de *H. halys* lorsque celles-ci s'alimentent sur plants ayant été inoculés par FZB42, cette réaction de l'insecte pourrait être reliée au fait que le micro-organisme ait induit plus fortement les défenses des plantes.

En ce qui concerne d'autres souches de l'espèce *Bacillus velezensis*, YC7010 est capable d'activer l'ISR du riz contre la cicadelle brune (*Nilaparvata lugens*) via la hausse de l'expression de gènes contrôlant la synthèse de JA et SA, ce qui a pour action de réguler positivement la production de terpénoïdes, lignine et cellulose (Harun-Or-Rashid *et al.*, 2018). Des mélanges constitués de souches de *Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum* inoculés sur plants de coton induisent une baisse du poids de la chenille *Spodoptera exigua* et du taux de nymphose ainsi qu'une hausse du taux de mortalité par rapport aux plants non traités (Zebelo *et al.*, 2016). Ceci est en relation avec l'augmentation de gossypol, un polyphénol toxique pouvant être corrélé à l'augmentation de la concentration de JA au sein des plantes.

### I.2.2.3. Induction de l'ISR par les champignons endophytes

Traditionnellement l'ISR est connue pour être déclenchée par les PGPR, mais les micro-organismes fongiques comme les champignons mycorrhiziens, promoteurs de croissance des plantes et endophytes peuvent également l'initier (Shoresh *et al.*, 2010 ; Cameron *et al.*, 2013). Ce sont à ces derniers que nous allons nous intéresser.

Sont couramment désignés par endophytes les microorganismes capables de coloniser l'intérieur des tissus végétaux sans provoquer de symptômes (Schulz et Boyle, 2006). L'aptitude des endophytes à participer à la protection de leur plante hôte est attribuée à la production de métabolites bioactifs au sein de la plante colonisée. Ces composés peuvent, s'ils se retrouvent en contact avec l'agresseur agir directement sur celui-ci ou agir de façon indirecte en induisant les défenses de la plante.

Les champignons endophytes les plus connus pour induire l'ISR des plantes sont ceux du genre *Trichoderma* (Shoresh *et al.*, 2010 ; Gupta et Bar, 2020 ; Sharma *et al.*, 2022). Les champignons entomopathogènes non obligatoires capables de se développer dans les tissus végétaux, sont également étudiés pour cette capacité à induire les défenses des plantes. Les travaux pionniers ont été menés avec *Beauveria bassiana* contre les agents pathogènes fongiques et bactériens (Jaber et Ownley, 2018 ; Pappas *et al.*, 2020) et certains insectes phytophages comme la teigne de la pomme de terre (Zhang *et al.*, 2022), le puceron vert du pêcher (Tomilova *et al.*, 2022) ou encore le psylle asiatique des agrumes (Ramos Aguila *et al.*, 2022).

*Metarhizium brunneum* ARSEF 4556 est étudié dans le cadre de ce travail. La souche a été complètement séquencée (Kortsinoglou *et al.*, 2020) et est en cours d'étude pour la commercialisation. Il s'agit d'un champignon faisant partie de la division des Ascomycota et de l'ordre des Hypocreales. Les différentes souches de *M. brunneum* sont principalement réputées pour leur capacité à infecter et à tuer de nombreux arthropodes. Cela est notamment





dû au fait qu'elles sécrètent des destruxines, des toxines à action insecticide. Ainsi, la souche ARSEF 4556 a montré une forte virulence pour les œufs, larves et adultes de *Euschistus heros* et *Dichelops furcatus*, deux punaises phytophages (Resquín-Romero *et al.*, 2020).

Cependant, les éliciteurs impliqués dans l'ISR initiée par les endophytes ne sont pas aussi bien caractérisés que ceux des PGPR (Zhai *et al.*, 2017 ; Pappas *et al.*, 2020).

*Metarhizium* a une bonne capacité d'endophytisme (Moonjely et Bidochka, 2019) et semble être candidat pour l'induction des défenses des plantes. En ce qui concerne les éliciteurs qui pourraient être impliqués, Sevim *et al.* (2012) ont rapporté que la souche KTU-60 de *M. brunneum* produit des hydrophobines. Chez *Trichoderma*, ces molécules ont été reconnues comme élicitrices de l'ISR du maïs et associées à la stimulation des voies de signalisation des de JA et ET favorisant la résistance de la plante contre *Botrytis cinerea* (Yu *et al.*, 2020). Il est également probable que *M. brunneum* produise des sidérophores puisque le champignon augmente la disponibilité en fer du substrat (Raya-Díaz *et al.*, 2017) et la ferricrocin, un sidérophore libéré par *Trichoderma* dans les tissus des plantes joue un rôle dans l'ISR des plants de maïs contre un pathogène foliaire nécrotrophe (Mukherjee *et al.*, 2018).

De récents travaux amorcent les recherches sur l'utilisation de *M. brunneum* en tant que champignon endophyte favorisant l'immunité des plantes contre des agresseurs. Gupta *et al.* (2022) ont montré que l'isolat Mb7 de *M. brunneum* permet l'augmentation de l'expression des gènes de défenses de la tomate et la production de certaines protéines PR sensibles aux voies de signalisation de JA/ET mais également celles de SA, après application de xylanase (molécule souvent utilisée pour provoquer une réaction de défense des plants de tomates). Ils ont associé cela à la corrélation positive entre la gravité de développement d'une maladie et l'expression des gènes de défenses étudiée dans d'autres travaux. Jaber et Araj (2018) ont quant à eux montré que l'endophyte *M. brunneum* BIPESCO5 induit un temps de développement plus long, une reproduction retardée ainsi qu'un taux de natalité réduit du puceron *Myzus persicae* sur plants de poivrons. Cependant l'équipe n'a pas mis en relation cet effet à la stimulation des défenses des plantes par l'endophyte.

### I.3. Cadre et objectifs de l'étude

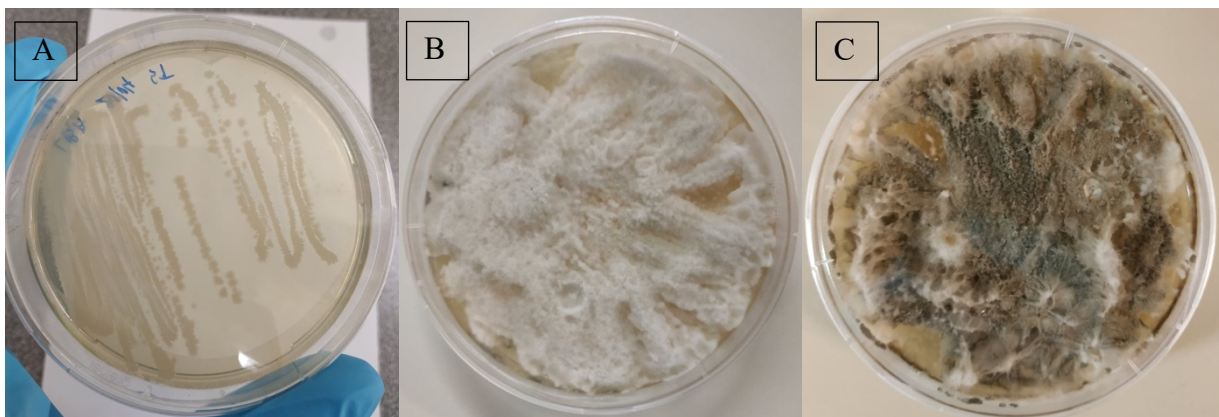
La haute polyphagie de *Halyomorpha halys* fait d'elle un ravageur préoccupant. De plus, dans un scénario de réchauffement climatique, il est probable que la punaise diabolique devienne un problème encore plus important en raison de l'effet positif de la température sur la dispersion et le cycle de développement de l'insecte (Stoeckli *et al.*, 2020). Les stratégies de gestion de *H. halys* reposent essentiellement sur l'utilisation d'insecticides à large spectre. Ceux-ci ont une bonne efficacité, néanmoins dans une logique de diminution des produits phytosanitaires conventionnels, les solutions alternatives sont de plus en plus étudiées. Les recherches actuelles s'orientent essentiellement sur des méthodes de lutte biologique avec l'utilisation d'insectes parasitoïdes ou de micro-organismes entomopathogènes. Les micro-organismes non pathogènes sont quant à eux amplement utilisés en agriculture pour leur capacité à promouvoir la croissance des plantes et à protéger les plantes contre des agents microbiens pathogènes. Cependant, encore peu d'études s'intéressent à leur implication dans le renforcement des défenses des plantes contre les insectes.

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer la capacité de la PGPR *Bacillus velezensis* FZB42 et du champignon endophyte *Metarhizium brunneum* 4556 à induire les défenses de *Vicia faba*, et par conséquent à engendrer des perturbations chez *Halyomorpha halys*.

Pour répondre à cette question de recherche, trois axes sont définis. Dans un premier temps, les expérimentations menées consisteront à étudier l'impact de l'inoculation de *V. faba* par ces



**Figure 6** : Cage utilisée pour l'élevage de *Halyomorpha halys*, maintenue sur plants de *Vicia faba* avec des graines de tournesol *Helianthus annuus* pour compléter l'alimentation (© Solène Trehieu).



**Figure 7** : Apparence morphologique des colonies bactériennes et structures fongiques. (A) *Bacillus velezensis* FZB42 cultivé sur milieu LBA après 24 heures ; *Metarhizium brunneum* ARSEF 4556 cultivé sur milieu SDA après 5 jours (B) et 13 jours (C) (© Solène Trehieu).

micro-organismes sur la biologie de l'insecte. Celui-ci sera évalué en observant la mortalité, la durée du stade larvaire ainsi que le gain de masse entre deux mues. Ensuite, des expérimentations permettront de valider ou non l'effet priming induit par les micro-organismes étudiés et à comprendre les voies de signalisation préférentiellement induites. Pour cela, les phytohormones, acteurs centraux dans l'induction des défenses des plantes, seront quantifiées par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. Enfin, l'évaluation de l'impact du traitement des plantes par les micro-organismes sur le comportement *H. halys* sera réalisé en effectuant des tests de choix.

## II. Matériels et méthodes

### II.1. Élevage de *Halyomorpha halys*

Les punaises *Halyomorpha halys*, élevées depuis 2015 en chambre de quarantaine au laboratoire d'Entomologie Fonctionnelle et Évolutive de Gembloux Agro-Bio Tech, sont originaires de l'Académie chinoise des sciences agricoles (CAAS) située à Beijing. Elles sont maintenues dans des cages cubiques de 47,5 cm de côté (BugDorm-4D, Royaume-Unis) (Figure 6) à  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sous une photopériode de 16:8 heures (L:D) et une humidité relative située entre 50 et 60 %. Elles sont élevées sur plants de *Vicia faba* et leur alimentation est complétée par des graines de tournesol *Helianthus annuus*.

Un passage est réalisé dans les élevages tous les deux jours afin de contrôler l'état du matériel végétal : lorsque les plantes sont fortement nécrosées et les graines altérées, celles-ci sont changées. Les feuilles présentant des masses d'œufs sont également prélevées et placées sur papier absorbant humide à l'intérieur d'une boîte plastique aérée. Cette manipulation est nécessaire pour optimiser l'élevage à cause du comportement cannibale des larves de *H. halys* envers les œufs (Iverson *et al.*, 2016). Après éclosion, les larves sont replacées dans les cages d'élevage.

### II.2. Culture et préparation de l'inoculum de *Bacillus velezensis* FZB42

La rhizobactérie *Bacillus velezensis* FZB42 provient du département Microbial, food and biobased technologies de Gembloux Agro-Bio Tech et est cryoconservée à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans du glycérol à 30%.

La rhizobactérie est d'abord étalée sur boîte de Petri contenant le milieu LBA qui est un mélange de bouillon lysogène (LB) (Sigma-Aldrich) à  $20\text{g.L}^{-1}$  et d'agar-agar à  $12\text{g.L}^{-1}$ , puis incubée à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures. Les colonies de bactéries (Figure 7A) sont ensuite mises en suspension dans un milieu LB liquide et placées dans un agitateur-incubateur pendant 24 heures à 115 tours par minute et à  $37^{\circ}\text{C}$ . Puis, la suspension bactérienne est centrifugée durant 10 minutes à  $5\,000\text{ tr.min}^{-1}$ . Le surnageant est alors éliminé et le culot remis en suspension à l'aide d'eau isotonique autoclavée ( $\text{NaCl}$  à  $8,5\text{g.L}^{-1}$ ). Une seconde centrifugation est réalisée avec les mêmes paramètres, le surnageant est à nouveau éliminé et le culot mis en suspension avec de l'eau isotonique autoclavée. Enfin, la densité optique de la solution bactérienne est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Biochrom WPA, modèle : Biowave DNA ; Cambridge, UK) à 600 nm et la concentration ajustée à  $5 \times 10^8\text{ UFC.mL}^{-1}$ .



### II.3. Culture et préparation de l'inoculum de *Metarhizium brunneum* ARSEF 4556

La souche ARSEF 4556 de *M. brunneum* provient du département de l'agriculture des États-Unis (USDA) et est conservée à - 80 °C dans du glycérol. La souche est cultivée sur milieu Sabouraud dextrose agar (SDA) (Sigma-Aldrich) à 25°C. Après 10 à 14 jours, le champignon produit des structures de reproduction par sporulation (Figure 7B et C), permettant alors de réaliser la solution sporale. Ainsi, 5 mL de Tween 80 à 0,03% sont ajoutés dans les boîtes de Petri et la surface de la boîte est raclée à l'aide d'un râteau. La solution alors obtenue est filtrée sur tissu afin d'éliminer le mycélium et d'acquérir une suspension composée uniquement de conidies. La concentration de la suspension sporale est estimée à l'aide d'un hémocytomètre Neubauer et ajustée à  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> en ajoutant le volume de Tween 80 à 0,03% nécessaire.

La viabilité des spores est vérifiée en étalant 100 µl de la solution à  $1 \times 10^5$  conidies.mL<sup>-1</sup> sur boîte de Petri contenant du SDA et en l'incubant à 25°C à l'obscurité. Après 24 heures, trois morceaux cubiques sont découpés dans le milieu. Les conidies germées et celles non germées sont dénombrées en observant au microscope optique 100 conidies pour chacun des morceaux. Un taux de plus de 90% de germination est nécessaire afin d'utiliser la solution sporale pour les expérimentations.

### II.4. Matériel végétal

La fève des marais, *Vicia faba* L. 'Grosse Ordinaire' est utilisée pour notre étude. Il s'agit d'une légumineuse cultivée pour ses graines pour l'alimentation humaine et animale. Au laboratoire, *V. faba* est considérée comme une plante modèle simple et rapide à cultiver, largement utilisée pour l'élevage d'insectes et les expérimentations.

#### Inoculation de *V. faba* avec *B. velezensis* FZB42

Le protocole d'inoculation a été adapté de celui de Lourme (2019) et Iannello (2020). Ainsi, les graines de *V. faba* sont semées dans des bacs contenant du terreau universel La Plaine Chassart. Une semaine après le semis, au stade « paires de feuilles d'écaillés visibles » (stade 10 de l'échelle BBCH), les plants sont repotés individuellement dans des pots plastiques 6 x 6 x 6 cm. Deux jours après le repotage, 15 mL de solution bactérienne à  $5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> fraîchement préparée ou d'eau isotonique pour les plants contrôles, sont ajoutés au niveau de la base du plant. Enfin, 5 jours après inoculation, les plants ayant 3 feuilles étalées sont utilisés pour les expérimentations (stade 13 de l'échelle BBCH).

La colonisation de la rhizosphère par la PGPR est vérifiée cinq jours après l'inoculation. Pour ce faire, les racines de plants traités et de plants contrôles sont délicatement rincées à l'eau distillée autoclavée puis introduites dans des tubes Falcon® contenant des microbilles en verre. De l'eau isotonique additionnée de Tween 0,01% est ajoutée dans les tubes, puis le tout est vortexé. La solution de départ subit alors des dilutions en cascade (de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup>) qui sont étalées sur milieu LBA en boîte de Petri. Une boîte de Petri est également réalisée avec *B. velezensis* pure. Après 24 heures à 30°C, les boîtes des dilutions permettant de visualiser des colonies bactériennes isolées sont sélectionnées. Chacune des colonies bactériennes présentant un phénotype différent est mise à incuber dans du LB liquide à 115 tr.min<sup>-1</sup> à 37°C durant 24 heures avant d'être centrifugée à 10 000 tr.min<sup>-1</sup> pendant 10 min. Le surnageant est ensuite filtré (filtres PTFE, 0,2 µm) et mis en vial pour une analyse UPLC-MS (colonne C18 AQUITY UPLC BEH C18 ; 2,1 x 50mm ; 1,7 µm ; Waters).



**Figure 8** : Photographie du dispositif expérimental pour les expérimentations sur biologie de *H. halys* et les défenses de *V. faba* (© Solène Trehou).



La surfactine, la fengycine et l'iturine sont les trois métabolites produits par *B. velezensis* FZB42 recherchés par cette analyse, permettant de confirmer la présence de la rhizobactérie.

#### Inoculation des semences de *V. faba* avec *M. brunneum* ARSEF 4556

Le protocole d'inoculation des graines de *V. faba* est inspiré de celui de Jaber et Enkerli (2016). Les graines sont d'abord désinfectées en surface en les immergeant 2 minutes dans de l'hypochlorite de sodium à 2%, puis 2 minutes dans de l'éthanol à 70% suivi de 5 rinçages à l'eau distillée autoclavée. Afin de vérifier l'efficacité de la stérilisation, 100 µl de l'eau du dernier rinçage sont étalés sur boîte de Petri contenant du SDA. Les graines sont ensuite trempées dans la solution sporale à  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> ou dans du Tween 80 à 0,03% pour les plants contrôles durant 24 heures à 25°C et à l'obscurité.

Le caractère endophyte de *M. brunneum* pour *V. faba* a déjà été démontré par Jaber et Enkerli (2016). Pour nos expérimentations l'endophytisme a été vérifié en suivant le protocole établi par Jaber et Enkerli (2016). Au stade 3 feuilles, un plant traité avec *M. brunneum* et un plant contrôle ont été choisis au hasard et les feuilles, tiges et racines ont été sectionnées. La surface des sections des différents organes est désinfectée par une immersion de 2 minutes dans de l'hypochlorite de sodium à 2%, puis 2 minutes dans de l'éthanol à 70%, suivi de trois rinçages dans de l'eau distillée autoclavée. Le matériel végétal est ensuite séché sur papier filtre puis plusieurs morceaux sont coupés dans chacune des sections à l'aide d'un scalpel stérile. En moyenne, 6 carrés foliaires (1cm<sup>2</sup>), 6 sections de tiges et racines (1 cm de long) sont réalisés et disposés sur des boîtes de Petri contenant un milieu SDA couplé à des antibiotiques (streptomycine, tetracycline, cyclohexamide). Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C à l'obscurité et observées quotidiennement afin de noter la présence ou l'absence du champignon ainsi que l'avancement de sa croissance. L'eau du dernier rinçage est également étalée pour vérifier l'efficacité du protocole de la désinfection de surface. L'identification du champignon est réalisée sur la base de l'observation macroscopique des structures fongiques ainsi que sur l'étude microscopique de la morphologie des conidies.

Dans ce mémoire, les plantes inoculées avec *B. velezensis* FZB42 seront nommées « B » et celles inoculées avec *M. brunneum* ARSEF 4556 « M ». Quant aux plantes non traitées avec ces micro-organismes, elles seront identifiées par « NB » et « NM ».

### **II.5. Étude de la réponse biologique de *Halyomorpha halys***

Afin d'identifier si le traitement de *V. faba* par *B. velezensis* et par *M. brunneum* a une influence sur la biologie de l'insecte, différents paramètres biologiques des larves L2 comme le taux mortalité, la durée du stade et le gain de masse entre les deux stades ont été étudiés.

Le dispositif mis en place se compose d'une enceinte fermée contenant une plante de stade 3 feuilles étalées sur laquelle sont déposées 8 larves L2 (Figure 8). Pour se faire, du carton plume est découpé et doté d'une fente permettant d'y introduire la tige de la plante. Celui-ci est placé sur le pot du plant et un tube de plastique transparent de 35 cm de hauteur vient entourer la partie aérienne de la plante. L'extrémité supérieure de ce tube est recouverte avec un carré de tulle fixé à l'aide d'un élastique. De plus, les L2 étant petites et la surface inférieure des tubes laissant des espaces vides entre le carton et le plastique, du coton est ajouté entre les deux parois afin d'éviter la fuite des insectes. Des graines de tournesol sont également ajoutées à la base des plants. En effet, les expérimentations de Lourme (2019) et Iannello (2020) ont révélé un fort taux de mortalité des larves L5 pour ce même type d'expérimentation. Des prétests sur plants non traités ont donc été effectués et ont révélé que l'ajout de graines de tournesol





permettait de limiter la mortalité des L2. Les larves utilisées sont synchronisées par rapport à leur âge. Pour cela les punaises de stade L1 ayant émergé des masses d'œufs isolées sont placées sur papier absorbant humide dans des contenants jusqu'à leur mue. Celles-ci sont surveillées chaque jour et les larves ayant mué le jour de l'expérimentation sont utilisées. La masse de chaque individu est mesurée avant qu'il ne soit placé dans le dispositif et après leur mue. La mortalité et le développement des larves sont suivis toutes les 24 heures jusqu'à la mue.

Les systèmes expérimentaux (tube-plante-insectes) sont placés aléatoirement dans des cages d'élevage. Neuf répliques pour chacune des modalités (« B », « NB », « M », « NM ») sont étudiés, pour un total de 72 insectes par modalité.

## II.6. Étude de l'induction des défenses de *Vicia faba*

Afin de déterminer si le traitement de *V. faba* avec *B. velezensis* ou avec *M. brunneum* a un effet sur l'induction des défenses de la plante, différentes phytohormones sont quantifiées.

Pour cela, le même dispositif expérimental que pour l'observation des données biologiques de la punaise est utilisé (Figure 8). À 24 heures, 48 heures et 10 jours après l'ajout des punaises, la feuille basale de chaque plant est détachée et broyée sous azote liquide puis conservée à -80°C. La même manipulation est également réalisée pour des plants n'ayant pas reçu d'insectes au début de l'expérimentation (à « 0 heure »).

Au total, 5 répliques pour chacune des modalités (« B », « NB ») et pour chaque pas de temps sont étudiés.

### II.1.1. Préparation solutions de calibration et des échantillons

Les phytohormones étudiées sont l'acide jasmonique, l'acide salicylique, l'acide abscissique, l'acide indole 3-acétique ainsi que l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), l'acide cinnamique (CA) et l'acide 12-oxo-phytyldiényl (OPDA) qui sont respectivement des précurseurs de ET, SA et JA. Pour réaliser les droites de calibrage, neuf solutions contenant un mélange de tous les standards de phytohormones sont préparées aux concentrations de 2 000 ; 1 000 ; 250 ; 125 ; 62 ; 15 ; 4 ; 2 et 1 ng.mL<sup>-1</sup>. Le standard interne (SI) utilisé est l'acide cinnamique deutéré (CAd) (Sigma Aldrich).

Plusieurs protocoles d'extraction des phytohormones à partir de feuilles ont été testés (Salem *et al.*, 2020 ; Loba *et al.*, 2017 ; Glauser et Wolfender, 2013). Le protocole retenu, inspiré de celui de Loba (2017) est détaillé ci-après, les autres sont décrits en Annexe I.

Ainsi, 100 milligrammes des échantillons broyés et conservés à -80°C sont transférés dans un tube Eppendorf de 2mL auxquels sont ajoutés 760 µL de méthanol et 40 µL de SI à 40 µg.mL<sup>-1</sup>. Les mélanges sont alors vortexés puis incubés pendant 3 minutes à 60°C avec agitation et vortexés une nouvelle fois. Ils sont ensuite placés pendant une heure dans un thermomix à température ambiante sous une agitation de 300 tours.min<sup>-1</sup> avant d'être sonifiés sur bain de glace durant 15 minutes. Enfin, les échantillons subissent une centrifugation à 14 000g et 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est filtré (filtres PTFE, 0,2 µm) et 200 µL sont transférés dans des vials et conservés à -80°C pour analyse en chromatographie.

### II.6.2. Méthode UPLC-MS

La méthode de quantification des phytohormones a été développée sur deux appareils différents : l'un utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse quadripolaire à temps de vol (Q-TOF LC/MS) et l'autre la chromatographie liquide à ultra

**Tableau 1** : Masse des ions de quantification et temps de rétention des phytohormones étudiées ainsi que du standard interne utilisé

<b>Phytohormones et SI</b>	<b>Masse des ions de quantification (m/z)</b>	<b>Temps de rétention (min)</b>
SA	137	2,6
IAA	174	2,6
ABA	263	3,4
CAd	153	3,6
JA	209	4,2
OPDA	291	7,2

performance en tandem avec un spectromètre de masse (UPLC-MS). La méthode d'analyse par UPLC-MS a été retenue. Le chromatographe Acquity H-Class est équipé d'une colonne C18 (AQUITY UPLC BEH C18 ; 2,1 x 50mm ; 1,7  $\mu\text{m}$  ; Waters) et est couplé à un détecteur simple quadropôle Acquity (Waters) comme spectromètre de masse. La détection des molécules par spectrométrie est réalisée par électrospray.

La phase mobile, constituée d'eau contenant 0,1% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique (solvant B), suit un gradient d'élution de 15 minutes précisé en Annexe II. Le flux de phase mobile est de 0,4 mL.min<sup>-1</sup>, la température de la colonne est de 40°C et le volume d'injection des échantillons est fixé à 20  $\mu\text{L}$ .

Les conditions de travail d'ionisation du spectromètre de masse ont été ajustées en injectant une solution mix de phytohormones pures afin d'optimiser la qualité des signaux obtenus. Le débit et la température du gaz de désolvatation, la température de la source et le voltage de cône ont respectivement été fixés à 800 L.h<sup>-1</sup>, 450°C, 150°C et - 40V. La tension du capillaire est de 3kV. Afin de maximiser les performances de l'appareil, le travail a été réalisé avec le mode « selected ion recording » SIR, c'est-à-dire que seules les masses des phytohormones ciblées ont été recherchées spécifiquement.

L'identification des phytohormones est réalisée en fonction de la masse de l'ion de quantification de chacune d'entre elles ainsi que de son temps de rétention (Tableau 1). Un pré-test a révélé que le CA et l'ACC étaient peu visibles sur les chromatogrammes lorsque celles-ci n'étaient pas fortement concentrées, c'est pourquoi ces deux phytohormones n'ont finalement pas été étudiées dans la suite de ce travail.

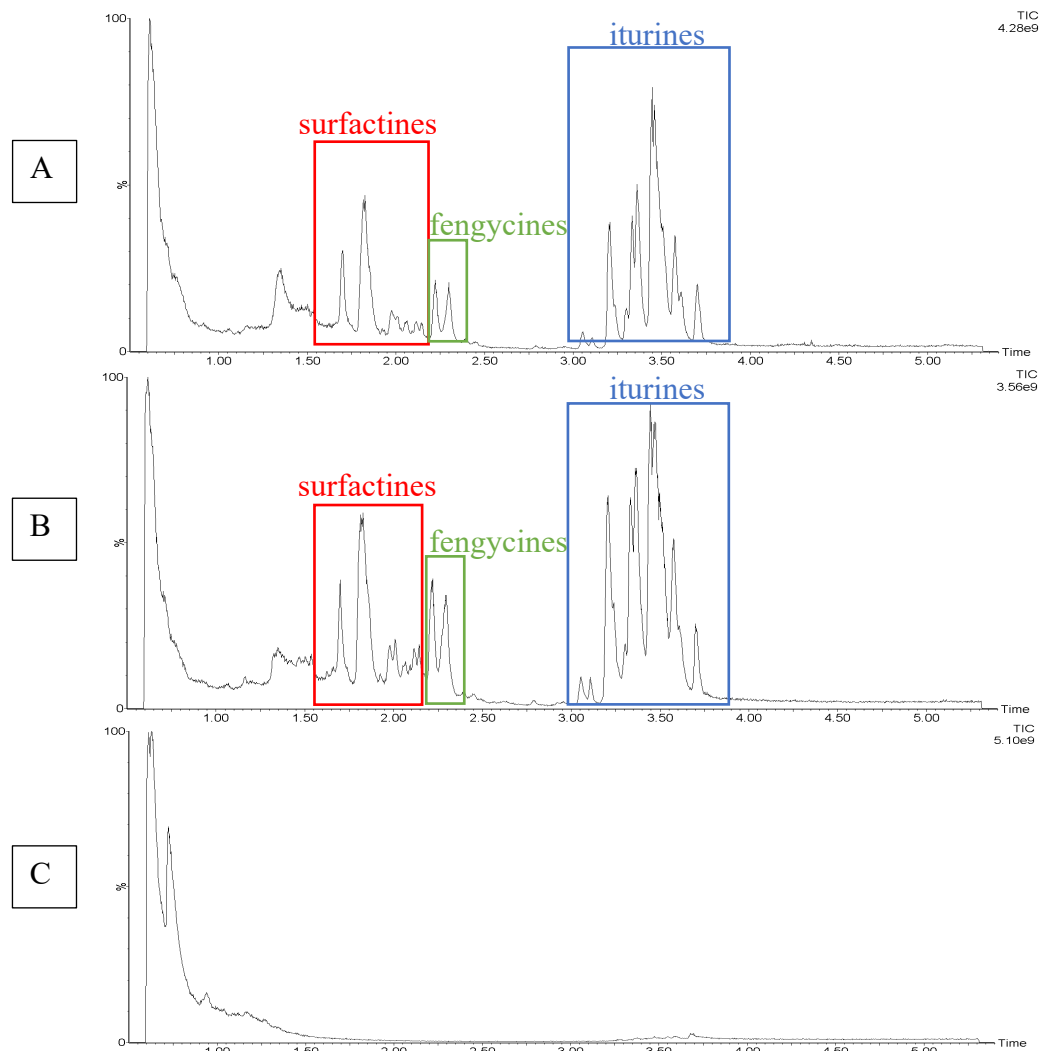
La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) correspondent aux plus petites concentrations pouvant être détectées et quantifiées respectivement de manière fiable par l'appareil. Pour chaque concentration de la droite de calibration, la hauteur du signal de chacune des phytohormones ainsi que la hauteur des signaux du bruit de fond de part et d'autre de ce signal ont été enregistrées. En divisant la hauteur relative au signal de la phytohormone par la moyenne des hauteurs du bruit de fond, il est possible d'estimer la LOD et la LOQ. En effet, lorsque ce rapport vaut 3 et 10, la LOD et la LOQ sont respectivement atteintes.

## II.7. Étude de la réponse comportementale de *Halyomorpha halys*

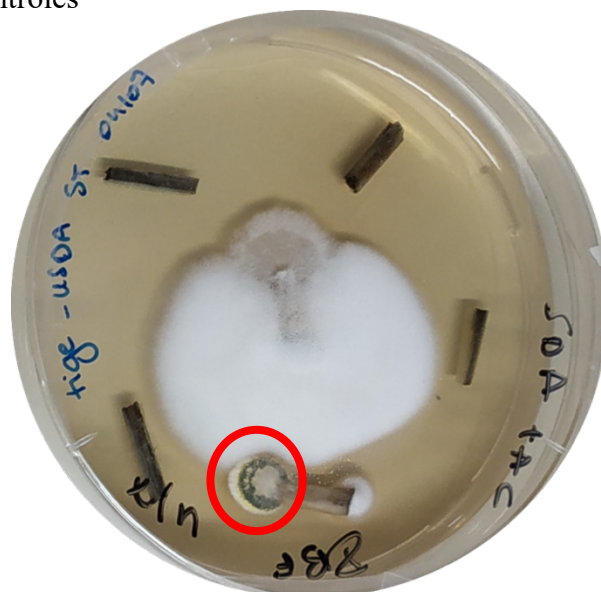
Afin de déterminer si le traitement de *V. faba* par *B. velezensis* FZB42 et *M. brunneum* ARSEF 4556 affecte ou non la préférence de *H. halys*, des tests de choix binaires ont été menés.

Le protocole suivi pour étudier le comportement de *H. halys* s'inspire de celui effectué par Thaler *et al.* (2015) sur la punaise *Podisus maculiventris*. Le système d'expérimentation est constitué de cages cubiques de côté 30 cm (BugDorm-4F3030) dans lesquelles sont disposées deux plantes (« B » et « NB » ou « M » et « NM ») distantes d'environ 12 cm. Celles-ci sont mises par paire en fonction de leur ressemblance morphologique. Des plants de *V. faba* de stade 3 à 4 feuilles sont utilisés. Les punaises adultes préalablement sélectionnées au hasard dans les cages d'élevage et affamées durant 24 heures sont placées individuellement sur le sol de la cage, au centre des deux pots. La présence ou l'absence de la punaise sur les plantes est ensuite enregistrée toutes les 10 minutes pendant 4 heures. Le sexe de chaque punaise est également relevé.

Les plantes sont remplacées à chaque changement d'insecte. Des pré-tests avec des plants contrôles ont permis de s'assurer qu'aucun biais n'orientait la préférence des punaises pour les plantes situées vers la plante de droite ou celle de gauche.



**Figure 9 :** Chromatogrammes obtenus par méthode UPLC-MS pour la vérification de la colonisation de la rhizosphère par *Bacillus velezensis* FZB42. (A) : profil de FZB42 pure ; (B) : profil d'une bactérie retrouvée dans les plants traités ; (C) profil d'une bactérie retrouvée dans les plants traités et contrôles



**Figure 10 :** Observation macroscopique de sections de tige provenant de *Vicia faba* traitée avec *Metarhizium brunneum* ARSEF 4556, quatorze jours après la mise en culture des organes sur SDA dans des boîtes de Petri. Le cercle rouge indique la présence de ce dernier.

## I.1. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec la version 2022.02.1 Build 461 de RStudio et les scripts relatifs aux différentes analyses statistiques sont présentés en annexes.

Les données relatives à la biologie de l'insecte ont ainsi été analysées via des modèles mixtes. L'effet fixe considéré est le traitement (B, NB et M, NM) et les effets aléatoires sont la plante sur laquelle se sont développés les lots de 8 punaises, ainsi que le lot de provenance des œufs.

La mortalité des punaises a été analysée en utilisant un modèle linéaire généralisé mixte (GLMM) de distribution binomiale et la fonction de lien logit (Annexe III). Les individus morts ont ainsi été codés par un 1 et les individus vivants par un 0.

Le gain de masse a été analysé à l'aide d'une ANOVA mixte. La transformation des données par la fonction logarithmique a permis de vérifier la normalité et l'homoscédasticité des résidus du modèle (Annexe IV).

La durée du stade larvaire a été analysée à l'aide d'un GLMM de loi gamma avec la fonction de lien identity (Annexe V).

En ce qui concerne l'analyse des concentrations en phytohormones dans les plantes, celle-ci est réalisée au moyen d'une ANOVA à deux facteurs : le temps et le traitement. Une transformation des données par la fonction racine carrée a été réalisée quand la normalité et l'homoscédasticité n'étaient pas été vérifiées. Lorsque le facteur temps est significatif, alors une comparaison deux à deux est réalisée avec « ls-mean » et lorsque les phytohormones ne sont quantifiables que pour un seul pas de temps donné, une ANOVA sur le facteur traitement est réalisée (Annexe VI).

Les données se rapportant au choix de la plante hôte ont été analysées de deux façons. Tout d'abord, le premier et dernier choix des insectes a été analysé à l'aide d'un test du chi carré (Annexe VII). Puis, afin d'étudier si les punaises allouent un temps égal ou non à chaque plante, le temps passé sur chacune d'elle a été analysé à l'aide d'un modèle linéaire généralisé (GLM) de loi gamma avec la fonction de lien identity et le traitement de la plante comme facteur fixe (Annexe VIII).

## III. Résultats

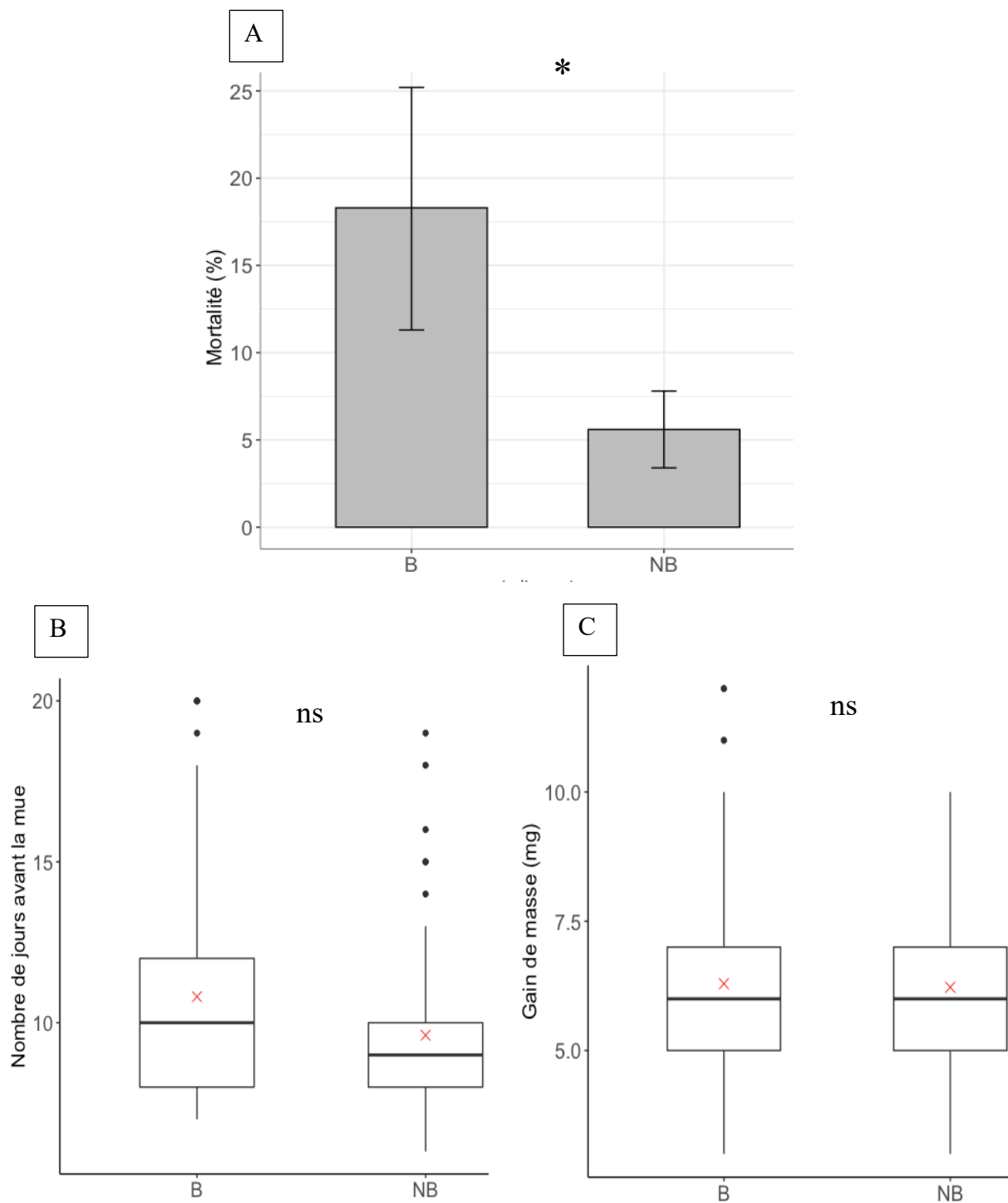
### III.1. Inoculation de *Vicia faba* par les deux micro-organismes étudiés

#### Colonisation de la rhizosphère des plantes par *Bacillus velezensis* FZB42

Les chromatogrammes obtenus à la suite de l'analyse UPLC-MS des différentes colonies de bactéries isolées des extraits racinaires montrent que FZB42 est présente au niveau des racines des plants traités par cette même bactérie (Figure 9). Il y a donc bien colonisation de la rhizosphère par la bactérie 5 jours après inoculation. De plus, les bactéries isolées des racines des plants contrôles ne présentent pas le même profil en métabolites que FZB42, confirmant ainsi l'absence de la souche dans les plants témoins.

#### Vérification du caractère endophyte de *Metarhizium brunneum* ARSEF 4556

*Metarhizium brunneum* ARSEF 4556 s'est développé sur une section de tige de la modalité qui a subi l'inoculation par le champignon (Figure 10). Ceci a été confirmé par observation microscopique des conidies. *M. brunneum* ne s'est cependant pas développé sur racines et feuilles de cette même modalité. De plus, il n'a été observé sur aucun tissu végétal



**Figure 11** : Résultats des essais menés sur les larves de deuxième stade de *Halyomorpha halys* sur plants de *Vicia faba* traités avec *Bacillus velezensis* FZB42 (« B ») et plants contrôles (« NB »). (A) Pourcentage de mortalité (GLMM binomial), les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards ; (B) Délai avant la mue (GLMM gamma) ; (C) Gain de masse (ANOVA mixte). « \* » et « ns » indiquent respectivement une différence significative et non significative au seuil de 5%. Les croix rouges représentent les moyennes.

de la modalité témoin. Le protocole adopté pour l'inoculation des semences semble donc bien permettre la pénétration du champignon dans les tissus végétaux.

### III.2. Étude de la réponse biologique de *Halyomorpha halys*

Le traitement de *V. faba* par *B. velezensis* FZB42 a un effet significatif sur la survie des larves de *H. halys* (Figure 11A). En effet, la mortalité de celles-ci est significativement plus élevée pour les larves se nourrissant sur les plants traités que celles sur plants contrôles ( $P = 0,033$ ). Ainsi,  $18,3 \pm 6,9$  % contre  $5,6 \pm 2,2$ % des larves sont décédées avant de pouvoir réaliser leur mue respectivement pour les modalités B et NB.

En revanche, le traitement de *V. faba* par la rhizobactérie ne semble pas avoir d'effet sur le développement des larves survivantes. Celles de la modalité NB ont tendance à mettre moins de temps pour passer au stade L3 que celles de la modalité B, avec en moyenne une durée du stade L2 de  $9,6 \pm 0,3$  et  $11,1 \pm 0,4$  jours respectivement (Figure 11B). Néanmoins, cette différence n'est pas significative ( $P = 0,28$ ). En ce qui concerne le gain de masse des larves, celui-ci est similaire pour les deux modalités avec un gain moyen de  $6,4 \pm 0,2$  mg pour les larves de la modalité B et de  $6,2 \pm 0,2$  mg pour celles de la modalité NB ( $P = 0,94$ ) (Figure 11C).

Le traitement de *V. faba* par *M. brunneum* ARSEF 4556 n'a pas d'effet significatif sur la biologie des larves de *H. halys*. La mortalité des larves sur plants traités est 2,5 fois plus élevée que sur plants non traités avec un pourcentage de mortalité respectif de  $6,9 \pm 2,2$ % et  $17,2 \pm 5,5$ %, cette différence n'est cependant pas significative ( $P = 0,14$ ) (Figure 12A). Le traitement par *M. brunneum* n'a également pas d'effet sur le développement des larves survivantes puisqu'en moyenne  $9,9 \pm 0,2$  et  $9,9 \pm 0,3$  jours sont nécessaires pour les larves des modalités NM et M pour atteindre le troisième stade ( $P = 0,90$ ) (Figure 12B). De plus, le gain de masse entre le deuxième et le troisième stade est semblable pour les larves des modalités NM et M, avec respectivement un gain moyen de  $6,8 \pm 0,2$  et  $6,5 \pm 0,2$  mg ( $P = 0,65$ ) (Figure 12C).

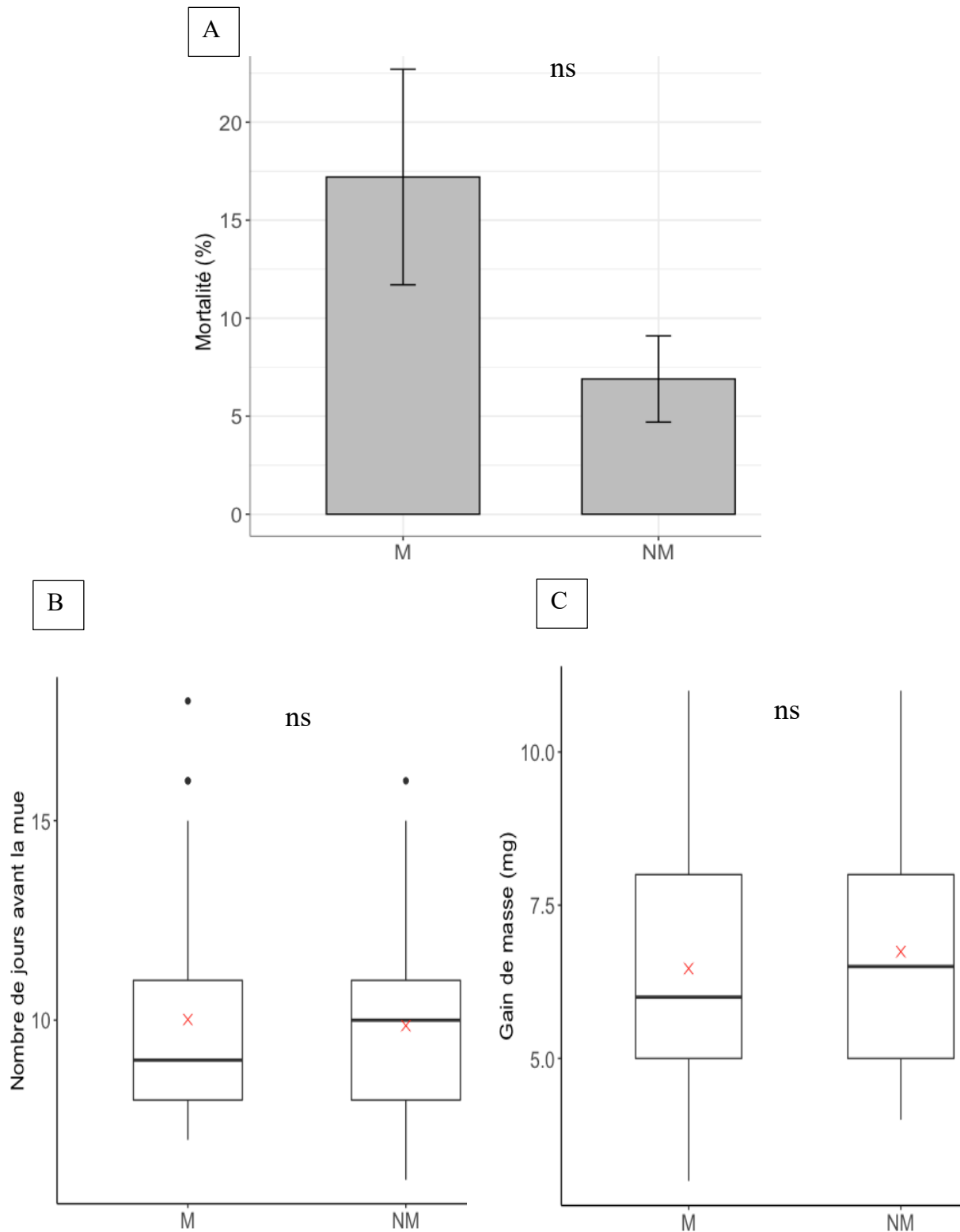
### III.3. Étude de l'induction des défenses de *Vicia faba*

L'expérimentation a été menée uniquement pour l'étude du traitement de *V. faba* avec *B. velezensis* FZB42. Les solutions contenant un mix de standards de phytohormones pures à différentes concentrations ont permis de tracer des droites de calibration présentées en Annexe IX. Les équations de ces droites sont reprises dans le Tableau 2 ainsi que les estimations des limites de détection et de quantification de l'appareil pour chaque phytohormone.

L'extraction de phytohormones et la méthode UPLC-MS mise au point ont permis de quantifier l'OPDA pour tous les pas de temps étudiés et l'ABA 10 jours après l'ajout de punaises. Certains échantillons présentent une concentration en ABA supérieure à la LOD mais non supérieure à la LOQ donc non quantifiable pour les autres pas de temps. Les autres phytohormones ciblées n'ont pas pu être détectées dans les échantillons.

L'inoculation de *B. velezensis* FZB42 n'a pas affecté significativement la concentration en OPDA dans les feuilles par rapport à celle des plants contrôles pour chacun des temps étudiés ( $P = 0,10$ ) (Figure 13). Néanmoins, une tendance est globalement observée 24 et 48 heures après l'ajout de punaises avec une concentration en OPDA plus élevée dans les feuilles des plants traités par la rhizobactérie. Ainsi, à  $t=0$  sans insecte la concentration moyenne en OPDA est de  $75 \pm 25$  ng.g<sup>-1</sup> de feuille fraîche pour les plants NB et de  $100 \pm 39$  ng.g<sup>-1</sup> pour B contre  $278 \pm 70$  ng.g<sup>-1</sup> de feuille fraîche pour les plants NB et  $508 \pm 126$  ng.g<sup>-1</sup> pour B après 48 heures. En revanche, le facteur temps présente une significativité ( $P = 0,0036$ ). La comparaison deux à deux des différents temps a révélé que la concentration en OPDA 48 heures après l'ajout des





**Figure 12** : Résultats des essais sur les larves de deuxième stade de *Halyomorpha halys* sur plants de *Vicia faba* traités avec *Metarhizium brunneum* ARSEF 4556 (« M ») et plants contrôles (« NM »). (A) Pourcentage de mortalité (GLMM binomial), les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards ; (B) Délai avant la mue (GLMM gamma) ; (C) Gain de masse (ANOVA mixte). « ns » indique une différence non significative au seuil de 5% et les croix rouges représentent les moyennes.

punaises est significativement différente de celle sans punaise et de celle après 10 jours. Ainsi, 48 heures après l'ajout de punaise, il y a un pic de production de l'OPDA (multiplication par 3 environ de la concentration initiale), pour redescendre jusqu'aux concentrations de départ après 10 jours.

En ce qui concerne l'ABA, la phytohormone a été quantifiable uniquement dans les échantillons broyés 10 jours après l'ajout de punaises. Sa concentration ne diffère pas pour les feuilles des plants traités et non traités ( $P = 0,42$ ) : la concentration moyenne dans les feuilles B et NB sont respectivement égales à  $160 \pm 30 \text{ ng.g}^{-1}$  de feuille fraîche et  $184 \pm 10 \text{ ng.g}^{-1}$ . De plus, la concentration en ABA a dépassé la LOD mais n'a donc pas pu être quantifiée pour 4 et 3 échantillons à  $t=0$  et pour 2 et 1 échantillon à  $t=48$  heures, respectivement pour les feuilles issues des modalités NB et B.

### III.4. Étude de la réponse comportementale de *Halyomorpha halys*

L'étude comportementale a été menée sur 54 et 52 individus respectivement pour les expérimentations avec *B. velezensis* et *M. brunneum* et 100% des punaises sont qualifiées de répondantes, c'est-à-dire qu'elles ont choisi au moins l'une des deux plantes.

Les punaises ne réalisent pas de choix préférentiel entre les plants traités avec la PGPR et les plants contrôles ( $P = 0,28$ ). Effectivement, 42,5% des punaises se sont dirigées en premier lieu sur le plant traité contre 57,5% sur le plant non traité. Il en est de même pour les punaises ayant dû faire un choix entre les plants ayant été traité avec le champignon endophyte puisque 50% des punaises se sont dirigées vers l'une et l'autre des modalités. En ce qui concerne le dernier choix enregistré, 50% des punaises ont été observées sur les plants traités (PGPR et champignon).

En outre, les punaises semblent passer moins de temps sur la modalité traitée par *B. velezensis*, même si cette tendance n'est pas significative. En moyenne une punaise passe  $74 \pm 11$  minutes sur les plants de la modalité B contre  $91 \pm 12$  minutes sur ceux de la modalité NB ( $P = 0,33$ ) (Figure 15A). De plus, *H. halys* reste en moyenne  $72 \pm 12$  minutes sur les plants traités avec *M. brunneum* et  $78 \pm 12$  minutes sur ceux non traités ( $P = 0,76$ ) (Figure 15B). Enfin, le sexe de la punaise n'a pas d'impact sur le temps passé sur les plantes ( $P = 0,26$  et  $0,17$  pour les expérimentations avec la PGPR et le champignon endophyte respectivement).

## IV. Discussion et perspectives

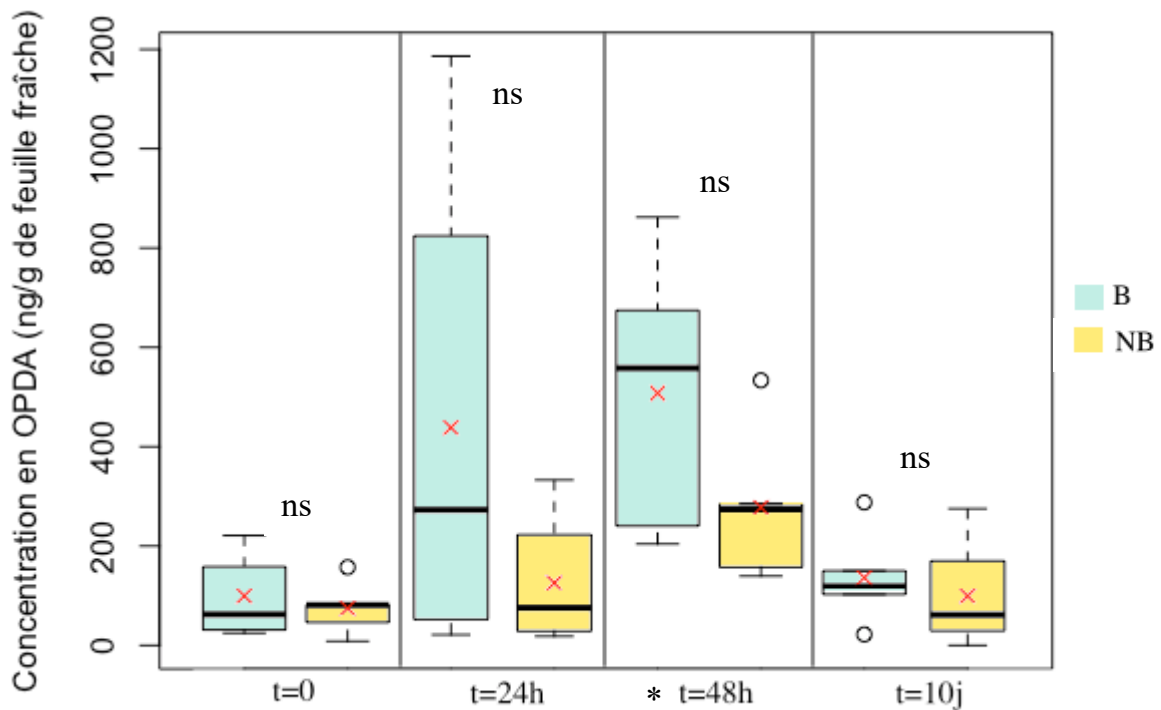
### IV.1. Étude de la réponse biologique de *Halyomorpha halys*

Ce travail a permis de mettre en évidence un impact négatif de l'inoculation de *V. faba* par *B. velezensis* FZB42 sur la survie des larves de deuxième stade de *H. halys*, avec une mortalité de 18,3% pour les insectes se nourrissant sur plants traités, contre 5,6% sur plants témoins. Le taux de mortalité des L2 sur plants témoins est proche de ceux observés par Haye *et al.* (2014) et Nielsen *et al.* (2008) lors de l'étude du cycle de développement de la punaise dans les mêmes conditions de photopériode et de température. Une différence significative de la mortalité des larves a également été observée chez les larves de noctuelle exiguë *Spodoptera exigua* s'alimentant sur plants de coton traités avec des PGPR (*Bacillus* spp. dont *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*) (Zebelo *et al.*, 2016).

En revanche, le développement des larves de *H. halys* n'a pas été significativement affecté par le traitement rhizobactérien, leur durée de développement larvaire et gain de masse étant significativement non différents des punaises sur plants non traités. En ce qui concerne le temps

**Tableau 2** : Paramètres des droites de calibration et limites de détection et de quantification estimées de chacune des phytohormones étudiées

Phytohormones	Équation de la droite de calibration	R <sup>2</sup> de la droite de calibration	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
SA	$y = 166,19x$	0,9886	<1	[15 ; 62]
IAA	$y = 2,5289x$	0,9964	[62 ; 125]	[250 ; 1000]
ABA	$y = 135,31x$	0,9981	[2 ; 4]	[4 ; 15]
JA	$y = 117,33x$	0,997	~ 4	~ 15
OPDA	$y = 176,1x$	0,9974	~ 2	~ 4



**Figure 13** : Concentration en acide 12-oxo-phytyldiénoïque (OPDA) dans les feuilles en fonction du traitement des plantes (avec « B » et sans « NB » *Bacillus velezensis* FZB42) et du temps après ajout des larves (t=0 signifie que les plantes utilisées n'ont pas subi d'attaque d'insectes). « ns » indique une différence significative au seuil de 5% entre les différents temps (ANOVA à deux facteurs). « \* » indique une différence significative au seuil de 5% de t=48h avec t=0 et t=10j. Les croix rouges représentent les moyennes.

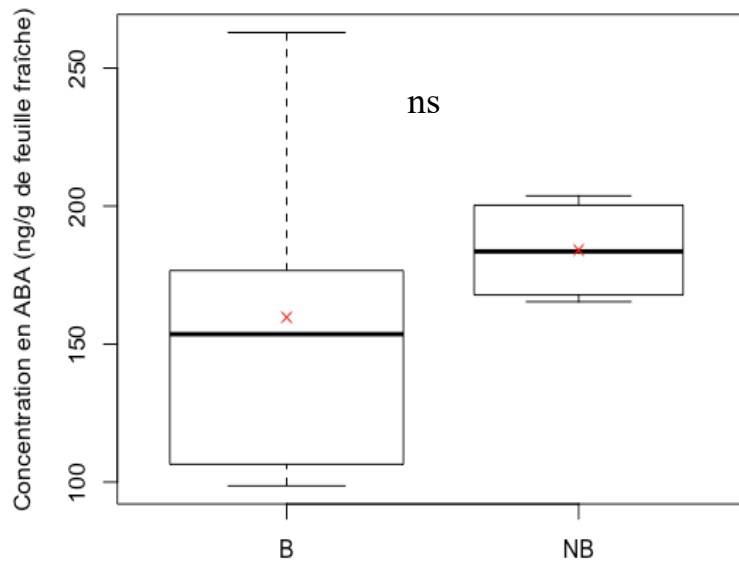
de développement des larves, un écart est néanmoins observable entre les deux modalités. La durée du stade L2 pour les larves se développant sur les plants témoins est identique à celle observée par Nielsen *et al.* (2008) ( $9,62 \pm 0,2$  jours) pour les mêmes conditions de photopériode et de température, mais pour celles s'alimentant sur plants traités en moyenne 1,5 jours de plus sont nécessaires afin d'atteindre le troisième stade. Valenzuela-Soto *et al.* (2010) ont remarqué que l'inoculation de plants de tomates avec une PGPR du genre *Bacillus* a retardé le développement des larves de l'aleurode du tabac (*Bemisia tabac*) traduit par un nombre significativement réduit de pupes se développant en adultes par rapport à la modalité témoin. Il s'avèrerait intéressant de poursuivre l'expérimentation pour les larves survivantes afin d'établir si cette différence se creuse jusqu'à la mue imaginale. Il pourrait de même être judicieux de débiter l'expérimentation dès l'oviposition de *H. halys* puisque *V. faba* entame des réactions de défense lors de la perception de cet événement (Rondoni *et al.*, 2018). À noter que Serteyn *et al.* (2021) ont montré que les larves L5 de *H. halys* sont capables d'adapter les composés protéiques de leur salive en réponse à une alimentation sur plants traités avec FZB42, ce qui pourrait détourner l'effet potentiel du traitement sur la biologie de l'insecte. Ils n'ont cependant pas montré si ces modifications salivaires permettaient par la suite un développement normal de l'insecte. Il serait donc intéressant de savoir si les larves sont capables de réaliser cette adaptation dès le stade L2, et là aussi d'étudier le développement de l'insecte jusqu'à la mue imaginale.

En outre, ce manque d'efficacité contre *H. halys* du traitement avec la rhizobactérie *B. velezensis* FZB42 pourrait être amélioré en utilisant des associations de plusieurs PGPR. Par exemple, l'association de 3 bactéries du genre *Pseudomonas* a engendré un meilleur taux de mortalité, une perte de poids des larves ainsi qu'une apparition plus élevée d'adultes mal-formés pour la tordeuse du riz *Cnaphalocrocis medinalis* (Radja Commare *et al.*, 2002 ; Saravanakumar *et al.*, 2007).

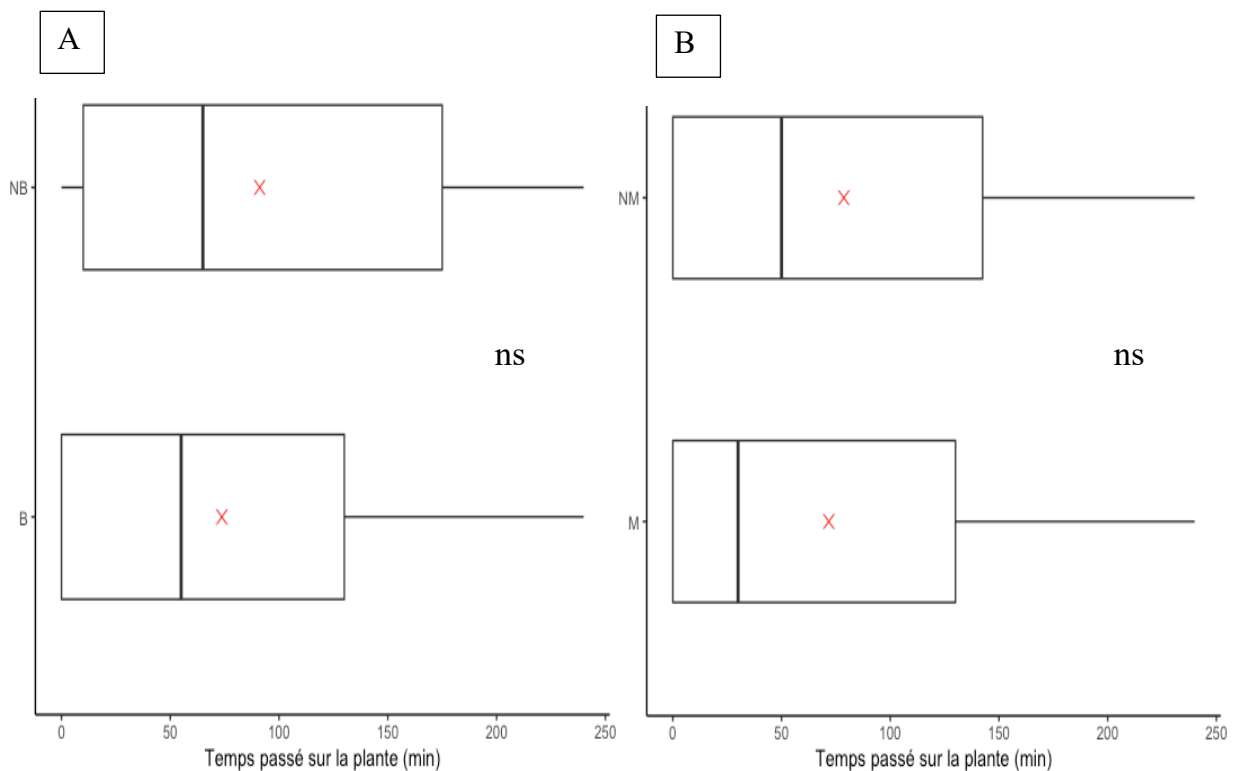
De plus, l'ajout de graines de tournesol à la diète des insectes pourrait représenter un biais dans nos expérimentations. En effet, cela a permis de résoudre le problème quant à la mortalité naturelle de *H. halys* observée dans les expérimentations de Iannello (2020) mais a peut-être diminué l'impact attendu de la PGPR sur la biologie de l'insecte. En effet, il se peut que les graines aient permis aux punaises de compenser un éventuel moins bon apport nutritif des plants traités. Serteyn *et al.* (2020) ont effectivement montré un temps plus long entre le début de la recherche alimentaire et la première ingestion du phloème ainsi une durée d'alimentation au niveau du xylème plus courte lorsque les pucerons sont sur plants inoculés avec FZB42. Nous aurions donc pu supposer un impact négatif sur les paramètres de développement. Ainsi, il serait intéressant de réaliser cette expérimentation avec des plants fructifiés de *V. faba* afin de s'affranchir des graines de tournesol.

Le traitement des plantes par le champignon endophyte *M. brunneum* ARSEF 4556 n'a quant à lui eu aucun impact significatif sur les paramètres biologiques des larves de *H. halys*. Ainsi, la survie des larves n'a pas été affectée par le traitement fongique.

Au vu de la forte virulence de la souche ARSEF 4556 pour les larves des punaises *Euschistus heros* et *Dichelops furcatus* par application directe (Resquín-Romero *et al.*, 2020), *H. halys* ne semble donc pas avoir été en contact avec le champignon endophyte lors de son alimentation sur plants traités. L'absence de sporulation des cadavres mis à incuber à 25°C sur papier filtre humide à l'obscurité après désinfection (Dalla Nora *et al.*, 2021) va également dans ce sens. De plus, le gain de masse et la durée du stade larvaire n'ayant pas été impactés, les métabolites secondaires potentiellement produits par *M. brunneum* ARSEF 4556 au sein de la plante ne semblent pas participer à la dissuasion alimentaire et à l'antibiose envers *H. halys*. De même, si le micro-organisme a induit les réponses défensives de la plante, celles-ci ne semblent pas avoir perturbé l'insecte. Pour confirmer cette hypothèse, il aurait été



**Figure 14** : Concentration en acide abscissique (ABA) dans les feuilles en fonction du traitement des plantes (avec « B » et sans « NB » *Bacillus velezensis* FZB42) dix jours après l'ajout de punaises. « ns » indique différence non significative au seuil de 5% entre les traitements (ANOVA à un facteur) et les croix rouges représentent les moyennes.



**Figure 15** : Temps passé par *Halyomorpha halys* adulte sur : (A) les plants traités « B » et non traités « NB » avec *Bacillus velezensis* FZB42 ; (B) les plants traités « M » et non traités « NM » avec *Metarhizium brunneum* ARSEF 4556 (GLM gamma). Les croix rouges représentent les moyennes et « ns » indique une différence non significative au seuil de 5%.

intéressant ici de quantifier les phytohormones de défense. Cela peut, tout comme le traitement avec la PGPR, s'expliquer par une éventuelle compensation des larves grâce à l'alimentation sur graines de tournesol ou un contournement de l'ISR par une adaptation des glandes salivaires de l'insecte. Gupta et al. (2020) ont montré que le traitement de pieds de tomate par *M. brunneum* BIPESCO5 induit une réduction du nombre d'aleurodes du tabac et de tétranyques tisserands ainsi qu'une réduction des dommages tissulaires associés. Cependant, dans leurs expérimentations, les plantes ont été traitées par pulvérisation et les essais réalisés 3 jours après le traitement. Les auteurs concluent à une action endophyte de *M. brunneum* mais il serait intéressant d'étudier la persistance de *M. brunneum* à la surface du végétal après application foliaire. Jaber et Araj (2018) ont quant à eux montré que l'endophyte *M. brunneum* BIPESCO5 induit un temps de développement plus long et une mortalité plus élevée de *Myzus persicae* sur plants de poivron. La mortalité des pucerons était accompagnée de la sporulation de 60% des cadavres issus des modalités traitées avec le champignon et *M. brunneum* a été retrouvé dans les racines et tiges de poivron mais très peu au sein des feuilles. Nous pourrions donc supposer, au vu du même type d'alimentation des pucerons et punaises, que les punaises se sont moins alimentées sur tiges de *V. faba* que sur feuilles (dans lesquelles nous n'avons pas montré la présence du champignon, et organes pour lesquels *M. brunneum* s'établit le moins chez *V. faba* (Jaber et Enkerli, 2016)) et ont donc eu moins de probabilité d'entrer en contact avec le champignon.

De plus, il a été montré que lorsque la salive de deux mammifères herbivores est appliquée sur la féтуque rouge, celle-ci induit une réduction de la croissance du champignon endophyte et inhibe la production d'alcaloïdes en raison de la présence de molécules spéciales aux propriétés anti-fongiques (Tanentzap *et al.*, 2014). Par ailleurs, certaines punaises possèdent des bactéries endosymbiontes capables de détoxifier les molécules toxiques libérées par les plantes (Nikoh *et al.*, 2011). Nous pourrions imaginer qu'en se nourrissant, la salive de *H. halys* inhibe l'action du champignon. Il a d'ailleurs déjà été démontré que la phéromone défensive (E)-2-décénal sécrétée par les punaises, dont *H. halys* est efficace contre certains champignons entomopathogènes dont *M. anisopliae*, inhibant leur croissance (Sosa-Gomez *et al.*, 1997). Il serait donc intéressant de suivre de plus près du caractère endophyte de *M. brunneum* afin de voir si le champignon se maintient et continue de se développer au sein de *V. faba* après l'ajout de punaises sur la plante et d'analyser les métabolites contenus dans la salive de l'insecte.

#### IV.2. Étude de l'induction des défenses de *Vicia faba*

Dans notre étude, nous avons pu quantifier deux phytohormones impliquées dans les voies de défense : l'OPDA et l'ABA à partir des échantillons de feuille de *V. faba*. Les autres phytohormones étudiées n'ont pas pu être détectées et quantifiées.

Ainsi, l'attaque de *H. halys* entraîne une augmentation significative de la concentration en OPDA 48 heures après l'infestation. L'OPDA, précurseur de l'acide jasmonique est un des acteurs de la voie de défense des jasmonates, mais il a également été rapporté que celui-ci est un composé pouvant entraîner des processus de défense, encore à élucider, indépendamment de sa transformation en JA (Wasternack et Strnad, 2016). Cette hausse de la concentration en OPDA est en accord avec les observations de Jacobi *et al.* (2021) qui ont montré que l'alimentation de la punaise *Dichelops furcatus* sur jeunes plants de maïs induit une surexpression de l'OPDA deux heures après l'attaque.

Dans nos conditions, nous aurions également pu nous attendre à observer une augmentation des concentrations en JA, ABA et IAA et une baisse de la concentration en SA comme pour les



expérimentations de Jacobi *et al.* (2021). Cependant, JA, SA et IAA n'ont pas pu être quantifiés et pour l'ABA, le dépassement de la limite de détection pour 2 et 1 échantillon sur 5 (pour NB et B respectivement) après 48 heures contre 4 et 3 échantillons sur 5 pour ceux n'ayant pas subi d'attaque de l'insecte laisserait penser que l'ABA ait été régulé à la baisse après l'ajout de punaises. Une baisse de la concentration en ABA a notamment été observée chez *V. faba* après avoir été mise en contact 24 heures avec la punaise *Nezara viridula* (Ederli *et al.*, 2017). Ederli *et al.* (2017) ont associé cette baisse de concentration en ABA à une inhibition de la synthèse de JA en raison de l'interaction positive entre JA et ABA. Dans notre étude cela ne peut pas être confirmé par la quantification de JA. Néanmoins, la hausse de la concentration en OPDA, précurseur direct du JA, laisserait penser que ce n'est pas le cas, sauf si sa conversion en JA est inhibée.

De plus, 10 jours après l'infestation par *H. halys*, nous remarquons que l'ABA est fortement induit puisque la phytohormone est quantifiable. Cette hausse de la production en ABA a également été observée dans les feuilles de poivron attaquées par la punaise prédatrice phytophage *Macrolophus pygmaeus* après 3 et 6 jours d'infestation mais n'a pas été observée après 48 heures (Zhang N.X. *et al.*, 2018). Nous pourrions supposer que cette hausse en ABA après 10 jours permettrait à la plante de remobiliser ses défenses pour répondre à une attaque ultérieure. En effet, il a été montré que chez la punaise verte fétide *Acrosternum hilare*, les larves ne s'alimentent plus 1 à 2 jours avant leur mue (Simmons et Yeorgan, 1988) pouvant alors simuler un arrêt de l'attaque. Par ailleurs, chez *Arabidopsis*, l'ABA joue un rôle important dans les défenses induites par les herbivores en activant les défenses régulées par le JA lors d'une attaque secondaire d'herbivores (Vos *et al.*, 2013). La baisse de la concentration en OPDA après 10 jours pourrait également être expliquée par une diminution de la réponse défensive des plantes à la suite d'une baisse du comportement alimentaire des punaises avant l'évènement de mue. Il serait donc intéressant d'observer si la concentration en OPDA réaugmente à la suite de cette surproduction en ABA et après la mue des insectes. Ceci concorderait avec la diminution progressive de l'activité de l'enzyme à l'origine la formation d'OPDA (AOS) après l'attaque. En effet, Gao *et al.* (2022) ont montré que la hausse de l'activité de l'AOS, enzyme transformant le composé 13-HPOT en OPDA, chez la vigne a lieu au cours des premiers stades d'infestation par la punaise *Apolygus lucorum* (après 1, 3 et 4 jours) mais que celle-ci était revue à la baisse au-delà de 4 jours. Zhang P.-J. *et al.* (2018) ont également remarqué une diminution de l'activité de des enzymes LOX, enzymes intervenant avant l'AOS dans la cascade de signalisation de JA, et ont conclu que les adultes de *Bemisia tabaci* sont capables de supprimer les défenses liées au JA après de longues périodes d'infestation (ils n'ont cependant pas remarqué cela chez les larves). À propos de *H. halys*, Serteyn *et al.* (2021) ont montré la capacité des L5 à adapter leurs composés salivaires lorsque les plants présentent une résistance à l'attaque. Ceci pourrait éventuellement être à l'origine d'une neutralisation des défenses des plantes. L'hypothèse selon laquelle les L2 seraient également capables de réaliser cette performance, pourrait aller dans le sens d'une diminution de la concentration en OPDA après certain temps d'infestation.

En ce qui concerne le phénomène de priming des défenses des plantes induit par l'inoculation de *V. faba* avec la rhizobactérie *B. velezensis* FZB42, il n'a cependant pas pu être mis en évidence. La concentration moyenne en OPDA plus élevée chez les plants traités par rapport aux plants témoins 24 et 48 heures après l'infestation peut être soulignée, mais n'est pas significative. Une multiplication des répliques pour cette expérimentation serait intéressante afin de limiter la variabilité des résultats et de confirmer cette tendance. Harun-Or-Rashid *et al.* (2018) ont notamment montré une surexpression des gènes de lipoxygénase après infestation de la cicadelle brune dans les plants de maïs traités avec *B. velezensis* YC7010 par rapport aux





plants témoins. Ils ont alors suggéré le traitement avec la PGPR pourrait induire plus fortement la biosynthèse de l'OPDA et renforcer les réponses de défense de la plante contre la cicadelle. De plus, l'inoculation de *V. faba* par la rhizobactérie n'a pas entraîné une dépense énergétique additionnelle du végétal en l'absence d'attaque.

Ainsi, la voie relative au JA semble donc avoir été induite chez *V. faba* après l'attaque de *H. halys* mais il aurait été opportun de pouvoir quantifier chacune des phytohormones étudiées pour mieux comprendre les voies de défenses impliquées par la phytophagie de punaise. Ce travail n'a donc pas permis de quantifier toutes les phytohormones escomptées et les résultats obtenus sont à prendre avec précaution au vu de leur forte variabilité. Les phytohormones quantifiables avec l'appareil utilisé (OPDA et ABA) étant celles avec les LOQ les plus basses (Tableau 2). Pour remédier à cela, il faudrait continuer la mise au point du protocole d'extraction afin de pouvoir augmenter la concentration des phytohormones des échantillons injectés. Le protocole utilisé ici ayant permis à Sertheyn *et al.* (2020) de quantifier JA, SA et IAA dans les feuilles de *V. faba* et à Ramos *et al.* (2018) de quantifier JA, SA, IAA et ABA. La méthode d'analyse des échantillons doit également être ajustée. L'appareil utilisé se révèle être plus performant pour donner une idée relative des concentrations qu'une concentration fiable (observation réalisée suite à la non-répétabilité de la mesure pour un même échantillon). Ainsi, les échantillons conservés à -80°C seront réinjectés pour être analysés avec la méthode Q-TOF LC/MS qui semblait prometteuse. Il pourrait également être envisageable de quantifier les phytohormones par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), méthode qui a notamment été utilisée par Loba *et al.* (2017), Ramos *et al.* (2018), Salazar *et al.* (2019) et Sertheyn *et al.* (2020) pour le même protocole d'extraction des phytohormones.

### IV.3. Étude de la réponse comportementale de *Halyomorpha halys*

Dans ce travail, le traitement des plantes avec *B. velezensis* FZB42 ainsi que *M. brunneum* ARSEF 4556 n'a pas induit une préférence dans le choix de la plante hôte chez l'adulte de *Halyomorpha halys*. La plupart des réponses comportementales chez les insectes, dont la sélection de leurs plantes hôtes sont influencées par des signaux chimiques olfactifs émis par d'autres insectes et/ou par les végétaux (Xu et Turlings, 2018). En outre, les composés volatiles libérés par les plantes peuvent être modifiés par le traitement de celles-ci avec des micro-organismes et entraîner une modification du comportement des insectes (Qawasmeh *et al.*, 2015 ; Rostás *et al.*, 2015 ; Murphey Coy *et al.*, 2017)

Ainsi, les deux micro-organismes bénéfiques étudiés ne semblent pas induire un changement dans l'émission des COV par *V. faba* de telle sorte que ce changement influencerait la sélection de l'hôte par la punaise. Un choix préférentiel était attendu puisque le travail de fin d'études de Iannello (2020) a fait ressortir une préférence de *H. halys* (L5) pour des disques de feuilles issus de plants traités avec *B. velezensis* FZB42 après 15 minutes avant inversion progressive de ce choix durant 2 heures. Sword *et al.* (2017) ont quant à eux montré que les punaises *Lygus hesperus* et *Nezara virida* préfèrent les boutons floraux et fruits issus de plantes témoins à ceux issus de plantes colonisées par le champignon endophyte *Beauveria bassiana*. Pour ces deux expérimentations des organes détachés des plants ont été utilisés et la coupe des organes représente un stress mécanique qui pourrait induire une modification du volatilome des plantes. Par exemple, la coupe de la luzerne entraîne une augmentation significative de l'émission de COV dans les parties coupées pendant 3 jours (Warneke, 2002). Dans la mesure où certains COV sont émis à la suite d'un stress, il pourrait être intéressant de recommencer les expérimentations avec des plants préalablement exposés à *H. halys*. Peterson *et al.* (2022) ont observé un changement dans le mélange et la quantité de COV émis par deux espèces d'arbres



à la suite de l'alimentation et la ponte de *H. halys*. De plus, dans notre étude il a été montré par l'intermédiaire de la quantification de l'OPDA que la voie de défense relative au JA est induite à la suite de l'attaque de *H. halys* et Thaler *et al.* (2015) ont remarqué que les punaises *Podisus maculiventris* effectuent un choix préférentiel pour les plants à faible résistance par rapport aux plants à forte résistance. Dans l'hypothèse où les micro-organismes bénéfiques à la plante utilisés ici induiraient une plus forte réponse défensive des plantes à la suite d'une attaque, il serait intéressant d'étudier si la non-préférence de *H. halys* est la même lorsque les plants qui lui sont présentés ont subi une infestation préalable et donc un réponse défensive préalable.

Les stimuli gustatifs ont également leur importance dans la recherche de plante hôte et donc de nourriture de *H. halys* (Morrison *et al.*, 2018). *H. halys* est un insecte qui adopte un comportement régulier de « sondage » des végétaux (Wiman *et al.*, 2014). Le temps passé sur chacune des plantes durant les 4 heures d'observation ainsi que le dernier choix réalisé par *H. halys* ne révèle pas de différence significative entre la modalité traitée et celle non traitée pour les expérimentations avec les deux micro-organismes. Ceci suggère une non-différence des stimuli gustatifs des plantes hôtes.

## V. Conclusion

La volonté de réduire l'usage de produits chimique dans le domaine de l'agriculture amène à rechercher de nouvelles méthodes alternatives afin d'améliorer la santé des plantes. L'utilisation de micro-organismes bénéfiques pour renforcer les défenses des plantes est une piste de plus en plus étudiée contre les pathogènes et ravageurs de culture. Ainsi, ce projet de fin d'étude avait pour objectif d'étudier deux possibilités de lutte alternative contre *H. halys* en caractérisant l'impact de l'inoculation de *Vicia faba* avec la PGPR *Bacillus velezensis* FZB42 et avec le champignon endophyte *Metarhizium brunneum* ARSEF 4556 sur la réaction de défense induite des plantes et l'impact que cela pouvait avoir sur la biologie et le comportement de *H. halys*.

Dans un premier temps, l'observation des paramètres biologiques des larves de *H. halys* a révélé que la PGPR a négativement impacté la survie des larves de *H. halys*, mais n'a pas eu d'effet sur le développement des larves survivantes. En ce qui concerne le traitement des plantes avec le champignon endophyte, il n'a révélé aucune conséquence sur la biologie de la punaise. Ce constat ne semble, pour le moment pas assez efficace pour envisager une méthode de lutte biologique contre *H. halys* avec *B. velezensis* FZB42 et non-efficace pour l'utilisation de *M. brunneum* ARSEF 4556. Cependant, au vu de la significativité de la mortalité avec *B. velezensis* FZB42, il serait intéressant de poursuivre l'expérimentation jusqu'à l'âge adulte des larves afin d'observer si un taux de mortalité supérieur peut être obtenu avec une exposition plus longue des insectes aux plantes traitées.

Dans un second temps, l'impact de l'inoculation de *V. faba* sur les défenses induites a été évalué. Les expérimentations se sont finalement conduites uniquement avec les modalités relatives au traitement avec FZB42. Nous n'avons pas pu quantifier toutes les phytohormones attendues, néanmoins nous avons montré que l'OPDA est régulé à la hausse 48 heures après l'ajout de *H. halys* et l'ABA 10 jours après l'infestation. Concernant l'effet de la PGPR sur le priming des défenses du végétal, la variabilité des résultats ne permet pas de tirer des conclusions claires sur un éventuel renforcement des défenses. Nous pouvons néanmoins noter que l'inoculation de *V. faba* par la rhizobactérie n'a pas entraîné une dépense énergétique additionnelle du végétal en l'absence d'attaque. Il serait opportun, afin de mieux comprendre les voies de défenses induites par l'attaque de punaises et de confirmer ou d'infirmer la tendance observée à la surexpression de l'OPDA induite par le traitement bactérien, de poursuivre le



développement de la méthode d'extraction des phytohormones et/ou d'utiliser un appareil plus sensible pour ainsi quantifier les principales phytohormones impliquées.

Enfin, nous avons voulu étudier l'effet de l'inoculation des deux micro-organismes sur le comportement de *H. halys*. Ceux-ci n'ont induit aucun comportement d'évitement ou d'attraction des punaises.

Actuellement, l'utilisation seule de ces deux micro-organismes pour renforcer l'immunité des plantes ne semble pas efficace comme méthode de lutte contre *H. halys*. Néanmoins, ces méthodes de lutte alternatives restent encore à explorer et les perspectives d'amélioration envisagées dans la discussion permettraient d'approfondir la compréhension des mécanismes d'interactions plante/micro-organismes/insecte.

## Références Bibliographie

- ADACHI I., UCHINO K. et MOCHIZUKI F., 2007. Development of a pyramidal trap for monitoring fruit-piercing stink bugs baited with *Plautia crossota stali* (Hemiptera: Pentatomidae) aggregation pheromone. *Applied Entomology and Zoology*. 2007. Vol. 42, n° 3, pp. 425-431. DOI [10.1303/aez.2007.425](https://doi.org/10.1303/aez.2007.425).
- ALINÇ T., CUSUMANO A., PERI E., TORTA L. et COLAZZA S., 2021. Trichoderma harzianum Strain T22 Modulates Direct Defense of Tomato Plants in Response to Nezara viridula Feeding Activity. *Journal of Chemical Ecology*. mai 2021. Vol. 47, n° 4-5, pp. 455-462. DOI [10.1007/s10886-021-01260-3](https://doi.org/10.1007/s10886-021-01260-3).
- ARNOLD K., 2009. Halyomorpha halys (Stål, 1855), eine für die europäische fauna neu nachgewiesene wanzenart (Insecta: Heteroptera: Pentatomidae: Cappaeini). *Mitt Thüringer Entomol.* 2009. Vol. 16, pp. 19.
- BABENKO L.M., SHCHERBATIUK M.M., SKATERNA T.D. et KOSAKIVSKA I.V., 2017. Lipxygenases and their metabolites in formation of plant stress tolerance. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 21 février 2017. Vol. 89, n° 1, pp. 5-21. DOI [10.15407/ubj89.01.005](https://doi.org/10.15407/ubj89.01.005).
- BAKKER P.A.H.M., PIETERSE C.M.J. et VAN LOON L.C., 2007. Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*®. février 2007. Vol. 97, n° 2, pp. 239-243. DOI [10.1094/PHYTO-97-2-0239](https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0239).
- BANSAL R., MICHEL A.P. et SABREE Z. L., 2014. The Crypt-Dwelling Primary Bacterial Symbiont of the Polyphagous Pentatomid Pest *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology*. 1 juin 2014. Vol. 43, n° 3, pp. 617-625. DOI [10.1603/EN13341](https://doi.org/10.1603/EN13341).
- BARI R. et JONES J.D.G., 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*. mars 2009. Vol. 69, n° 4, pp. 473-488. DOI [10.1007/s11103-008-9435-0](https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0).
- BLAAUW B.R., HAMILTON G., RODRIGUEZ-SAONA C. et NIELSEN A.L., 2019. Plant Stimuli and Their Impact on Brown Marmorated Stink Bug Dispersal and Host Selection. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 12 novembre 2019. Vol. 7, pp. 414. DOI [10.3389/fevo.2019.00414](https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00414).
- BONAVENTURE G., 2012. Perception of insect feeding by plants: Perception of insect feeding. *Plant Biology*. novembre 2012. Vol. 14, n° 6, pp. 872-880. DOI [10.1111/j.1438-8677.2012.00650.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00650.x).
- BORRIS R., WU H. et GAO X., 2019. Secondary Metabolites of the Plant Growth Promoting Model Rhizobacterium Bacillus velezensis FZB42 Are Involved in Direct Suppression of Plant Pathogens and in Stimulation of Plant-Induced Systemic Resistance. In : SINGH, Harikesh Bahadur, KESWANI, Chetan, REDDY, M. S., SANSINENEA, Estibaliz et GARCÍA-ESTRADA, Carlos (éd.), *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms*. [en ligne]. Singapore : Springer Singapore. pp. 147-168. [Consulté le 9 avril 2022]. ISBN 9789811358616.
- BULGARINI G., BORTOLINI S. et MAISTRELLO L., 2021. Repellent activity of essential oils on adults of *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae) in different physiological-behavioural phases. *Journal of Applied Entomology*. juillet 2021. Vol. 145, n° 6, pp. 575-586. DOI [10.1111/jen.12872](https://doi.org/10.1111/jen.12872).

BULGARINI G., PIEMONTESE L., GUIDETTI R., CESARI M., BELLA E. et MAISTRELLO L., 2022. Identification of predatory arthropods of the invasive *Halyomorpha halys* through molecular gut content analysis. *Agricultural and Forest Entomology*. 19 janvier 2022. pp. afe.12485. DOI [10.1111/afe.12485](https://doi.org/10.1111/afe.12485).

BURJANADZE M., GORGADZE O., DE LUCA F., TROCCOLI A., LORTKIPANIDZE M., KHARABADZE N., ARJEVANIDZE M., FANELLI E. et TARASCO E., 2020. Potential of native entomopathogenic nematodes for the control of brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* in Georgia. *Biocontrol Science and Technology*. 1 septembre 2020. Vol. 30, n° 9, pp. 962-974. DOI [10.1080/09583157.2020.1776217](https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1776217).

CALLOT H. et BRUA C., 2013. *Halyomorpha halys* (Stål, 1855), la Punaise diabolique, nouvelle espèce pour la faune de France (Heteroptera Pentatomidae). *L'Entomologiste*. 2013. Vol. 69, n° 2, pp. 69-71.

CAMERON D.D., NEAL A.L., VAN WEES S.C.M. et TON J., 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends in Plant Science*. octobre 2013. Vol. 18, n° 10, pp. 539-545. DOI [10.1016/j.tplants.2013.06.004](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.004).

CAWOY H., BETTIOL W., FICKERS P. et ONGE M., 2011. Bacillus-Based Biological Control of Plant Diseases. In : STOYTICHEVA, Margarita (éd.), *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management*. [en ligne]. InTech. [Consulté le 28 mars 2022]. ISBN 978-953-307-459-7.

CHEN X.H., KOUMOUTSI A., SCHOLZ R., SCHNEIDER K., VATER J., SÜSSMUTH R., PIEL J. et BORRIS R., 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*. mars 2009. Vol. 140, n° 1-2, pp. 27-37. DOI [10.1016/j.jbiotec.2008.10.011](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.011).

CHEN C.-Y. et MAO Y.-B., 2020. Research advances in plant–insect molecular interaction. *F1000Research*. 19 mars 2020. Vol. 9, pp. 198. DOI [10.12688/f1000research.21502.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.21502.1).

CHECKER V.G. et SHARMA M., 2021. Signalling During Insect Plant Interaction. In : SINGH I.K. et SINGH A. (éd.), *Plant-Pest Interactions: From Molecular Mechanisms to Chemical Ecology*. [en ligne]. Singapore : Springer Singapore. pp. 193-214. [Consulté le 21 mai 2022]. ISBN 9789811524660.

CHOWDHURY S.P., UHL J., GROSCH R., ALQUÉRES S., PITTROFF S., DIETEL K., SCHMITT-KOPPLIN P., BORRIS R. et HARTMANN A., 2015. Cyclic Lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* Colonizing the Lettuce Rhizosphere Enhance Plant Defense Responses Toward the Bottom Rot Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®. septembre 2015. Vol. 28, n° 9, pp. 984-995. DOI [10.1094/MPMI-03-15-0066-R](https://doi.org/10.1094/MPMI-03-15-0066-R).

CLAEREBOUT S., HAYE T., ÓLAFSSON E., PANNIER E. et BULTOT J., 2019. Premières occurrences de *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) pour la Belgique et actualisation de sa répartition en Europe (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). *Bulletin de la Société royale belge d'Entomologie*. 2019. Vol. 154, pp. 205-227.

CLEMENT S.L., ELBERSON L.R., BOSQUE-PEREZ N.A. et SCHOTZKO D.J., 2005. Detrimental and neutral effects of wild barley-Neotyphodium fungal endophyte associations on insect survival. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. février 2005. Vol. 114, n° 2, pp. 119-125. DOI [10.1111/j.1570-7458.2005.00236.x](https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2005.00236.x).

CONRATH U., BECKERS G.J.M., FLORS V., GARCÍA-AGUSTÍN P., JAKAB G., MAUCH F., NEWMAN M.-A., PIETERSE C.M.J., POINSSOT B., POZO M.J., PUGIN A.,



SCHAFFRATH U., TON J., WENDEHENNE D., ZIMMERLI L. et MAUCH-MANI B., 2006. Priming: Getting Ready for Battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®. octobre 2006. Vol. 19, n° 10, pp. 1062-1071. DOI [10.1094/MPMI-19-1062](https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062).

COSTI E., HAYE T. et MAISTRELLO L., 2017. Biological parameters of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*, in southern Europe. *Journal of Pest Science*. septembre 2017. Vol. 90, n° 4, pp. 1059-1067. DOI [10.1007/s10340-017-0899-z](https://doi.org/10.1007/s10340-017-0899-z).

DING X., CAO Y., HUANG L., ZHAO J., XU C., LI X. et WANG S., 2008. Activation of the Indole-3-Acetic Acid–Amido Synthetase GH3-8 Suppresses Expansin Expression and Promotes Salicylate- and Jasmonate-Independent Basal Immunity in Rice. *The Plant Cell*. 26 février 2008. Vol. 20, n° 1, pp. 228-240. DOI [10.1105/tpc.107.055657](https://doi.org/10.1105/tpc.107.055657).

EDERLI L., BRUNETTI C., CENTRITTO M., COLAZZA S., FRATI F., LORETO F., MARINO G., SALERNO G. et PASQUALINI S., 2017. Infestation of Broad Bean (*Vicia faba*) by the Green Stink Bug (*Nezara viridula*) Decreases Shoot Abscisic Acid Contents under Well-Watered and Drought Conditions. *Frontiers in Plant Science*. 8 juin 2017. Vol. 8, pp. 959. DOI [10.3389/fpls.2017.00959](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00959).

ERB M. et REYMOND P., 2019. Molecular Interactions Between Plants and Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology*. 29 avril 2019. Vol. 70, n° 1, pp. 527-557. DOI [10.1146/annurev-arplant-050718-095910](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095910).

FALQUETO S.A., PITALUGA B.F., DE SOUSA J.R., TARGANSKI S. K., CAMPOS M.G., DE OLIVEIRA MENDES T.A., DA SILVA G.F., SILVA D.H.S. et SOARES M.A., 2021. *Bacillus* spp. metabolites are effective in eradicating *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae with low toxicity to non-target species. *Journal of Invertebrate Pathology*. février 2021. Vol. 179, pp. 107525. DOI [10.1016/j.jip.2020.107525](https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107525).

FAN B., WANG C., SONG X., DING X., WU L., WU H., GAO X. et BORRIS R., 2018. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. *Frontiers in Microbiology*. 16 octobre 2018. Vol. 9, pp. 2491. DOI [10.3389/fmicb.2018.02491](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491).

FAYALO G.D., AOUCO A. et ALAVO T.B.C., 2016. Dynamique des populations du puceron *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) sur le cotonnier en conditions de fertilisation minérale et rhizobactériologique. *Tropicicultura*. 2016. Vol. 34, n° 1, pp. 98-104.

FINETTI L., PEZZI M., CIVOLANI S., CALÒ G., SCAPOLI C. et BERNACCHIA G., 2021. Characterization of *Halyomorpha halys* TAR1 reveals its involvement in (E)-2-decenal pheromone perception. *Journal of Experimental Biology*. 15 avril 2021. Vol. 224, n° 8, pp. jeb238816. DOI [10.1242/jeb.238816](https://doi.org/10.1242/jeb.238816).

GAO S., ZHOU G., SUN T., LIU J., KONG W., WU H., GAO J., LU C. et GAO B., 2022. *Apolygus lucorum*-induced resistance in *Vitis vinifera* L. elicits changes at the phenotypic, physiological, and biochemical levels. *Scientia Horticulturae*. mai 2022. Vol. 298, pp. 110985. DOI [10.1016/j.scienta.2022.110985](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.110985).

GIACOMETTI R., BARNETO J., BARRIGA L.G., SARDOY P.M., BALESTRASSE K., ANDRADE A.M., PAGANO E.A., ALEMANO S.G. et ZAVALA J.A., 2016. Early perception of stink bug damage in developing seeds of field-grown soybean induces chemical defences and reduces bug attack: Defensive response of seeds against herbivores. *Pest Management Science*. août 2016. Vol. 72, n° 8, pp. 1585-1594. DOI [10.1002/ps.4192](https://doi.org/10.1002/ps.4192).

GIOVANNINI L., SABBATINI-PEVERIERI G., MARIANELLI L., RONDONI G., CONTI E. et ROVERSI P.F., 2021. Physiological Host Range of *Trissolcus Mitsukurii*, A Candidate

Biological Control Agent of *Halyomorpha Halys* [en ligne]. preprint. In Review. [Consulté le 26 mars 2022].

GOKTURK T., 2021. Chemical composition of *Satureja spicigera* essential oil and its insecticidal effectiveness on *Halyomorpha halys* nymphs and adults. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 25 novembre 2021. Vol. 76, n° 11-12, pp. 451-457. DOI [10.1515/znc-2021-0041](https://doi.org/10.1515/znc-2021-0041).

GOULI V., GOULI S., SKINNER M., HAMILTON G., KIM J.S. et PARKER B.L., 2012. Virulence of select entomopathogenic fungi to the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae): Virulence of entomopathogenic fungi to *H. halys*. *Pest Management Science*. février 2012. Vol. 68, n° 2, pp. 155-157. DOI [10.1002/ps.2310](https://doi.org/10.1002/ps.2310).

GUPTA R. et BAR M., 2020. Plant Immunity, Priming, and Systemic Resistance as Mechanisms for *Trichoderma* spp. Biocontrol. In : SHARMA, Anil K. et SHARMA, Pratibha (éd.), *Trichoderma*. [en ligne]. Singapore : Springer Singapore. pp. 81-110. Rhizosphere Biology. [Consulté le 20 avril 2022]. ISBN 9789811533204.

GUPTA R., KEPPANAN R., LEIBMAN-MARKUS M., RAV-DAVID D., ELAD Y., MENT D. et BAR M., 2022. The Entomopathogenic Fungi *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* Promote Systemic Immunity and Confer Resistance to a Broad Range of Pests and Pathogens in Tomato. *Phytopathology*®. avril 2022. Vol. 112, n° 4, pp. 784-793. DOI [10.1094/PHYTO-08-21-0343-R](https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-21-0343-R).

HAN X., SHEN D., XIONG Q., BAO B., ZHANG W., DAI T., ZHAO Y., BORRIS R. et FAN B., 2021. The Plant-Beneficial Rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 Controls the Soybean Pathogen *Phytophthora sojae* Due to Bacilysin Production. ALEXANDRE, Gladys (éd.), *Applied and Environmental Microbiology*. 10 novembre 2021. Vol. 87, n° 23, pp. e01601-21. DOI [10.1128/AEM.01601-21](https://doi.org/10.1128/AEM.01601-21).

HANCOCK T.J., LEE D-H, BERGH, J.C., MORRISON W.R. et LESKEY T.C., 2019. Presence of the invasive brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae) on home exteriors during the autumn dispersal period: Results generated by citizen scientists. *Agricultural and Forest Entomology*. février 2019. Vol. 21, n° 1, pp. 99-108. DOI [10.1111/afe.12312](https://doi.org/10.1111/afe.12312).

HARRIS C., ABUBEKER S., YU M., LESKEY T. et ZHANG A., 2015. Semiochemical Production and Laboratory Behavior Response of the Brown Marmorated Stink Bug, *Halyomorpha Halys*. RODRIGUEZ-SAONA, Cesar (éd.), *PLOS ONE*. 3 novembre 2015. Vol. 10, n° 11, pp. e0140876. DOI [10.1371/journal.pone.0140876](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140876).

HARUN-OR-RASHID Md., KIM H.-J., YEOM S-I, YU H.-A., MANIR Md M., MOON S.-S., KANG Y.J. et CHUNG Y.R., 2018. *Bacillus velezensis* YC7010 Enhances Plant Defenses Against Brown Planthopper Through Transcriptomic and Metabolic Changes in Rice. *Frontiers in Plant Science*. 21 décembre 2018. Vol. 9, pp. 1904. DOI [10.3389/fpls.2018.01904](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01904).

HAYE T., ABDALLAH S., GARIEPY T. et WYNIGER D., 2014. Phenology, life table analysis and temperature requirements of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*, in Europe. *Journal of Pest Science*. septembre 2014. Vol. 87, n° 3, pp. 407-418. DOI [10.1007/s10340-014-0560-z](https://doi.org/10.1007/s10340-014-0560-z).

HAYE T., FISCHER S., ZHANG J. et GARIEPY T., 2015a. Can native egg parasitoids adopt the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae), in Europe? *Journal of Pest Science*. décembre 2015. Vol. 88, n° 4, pp. 693-705. DOI [10.1007/s10340-015-0671-1](https://doi.org/10.1007/s10340-015-0671-1).

HAYE T., GARIEPY T., HOELMER K., ROSSI J.-P., STREITO J.-C., TASSUS X. et DESNEUX N., 2015b. Range expansion of the invasive brown marmorated stinkbug, *Halyomorpha halys*: an increasing threat to field, fruit and vegetable crops worldwide. *Journal of Pest Science*. décembre 2015. Vol. 88, n° 4, pp. 665-673. DOI [10.1007/s10340-015-0670-2](https://doi.org/10.1007/s10340-015-0670-2).

HOEBEKE E.R. et CARTER M.E., 2003. *Halyomorpha halys* (Stal)(Heteroptera: Pentatomidae): a polyphagous plant pest from Asia newly detected in North America. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 2003. Vol. 105, n° 1, pp. 225-237.

HUBER A.E. et BAUERLE T.L., 2016. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. *Journal of Experimental Botany*. mars 2016. Vol. 67, n° 7, pp. 2063-2079. DOI [10.1093/jxb/erw099](https://doi.org/10.1093/jxb/erw099).

IANNELLO L., 2020. Impact des défenses naturelles de la plante, induites par une rhizobactérie, sur la biologie de la punaise invasive *Halyomorpha halys*. Mémoire de fin d'études. Gembloux Agro-Bio Tech.

INKLEY D.B., 2012. Characteristics of Home Invasion by the Brown Marmorated Stink Bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Entomological Science*. avril 2012. Vol. 47, n° 2, pp. 125-130. DOI [10.18474/0749-8004-47.2.125](https://doi.org/10.18474/0749-8004-47.2.125).

IVERSON J.M., CIRA T.M., BURKNESS E.C. et HUTCHISON W.D., 2016. Cannibalistic Oophagy in *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) Laboratory Colonies. *Journal of Entomological Science*. avril 2016. Vol. 51, n° 2, pp. 122-128. DOI [10.18474/JES15-29.1](https://doi.org/10.18474/JES15-29.1).

JABER L.R. et ENKERLI J., 2016. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. *Biological Control*. décembre 2016. Vol. 103, pp. 187-195. DOI [10.1016/j.biocontrol.2016.09.008](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.008).

JABER L.R. et ARAJ S.-E., 2018. Interactions among endophytic fungal entomopathogens (Ascomycota: Hypocreales), the green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae), and the aphid endoparasitoid *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*. janvier 2018. Vol. 116, pp. 53-61. DOI [10.1016/j.biocontrol.2017.04.005](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.005).

JABER L.R. et OWNLEY B.H., 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*. janvier 2018. Vol. 116, pp. 36-45. DOI [10.1016/j.biocontrol.2017.01.018](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018).

JACOBI V.G., FERNANDEZ P.C., BARRIGA L.G., ALMEIDA-TRAPP M., MITHÖFER A. et ZAVALA J.A., 2021. Plant volatiles guide the new pest *Dichelops furcatus* to feed on corn seedlings. *Pest Management Science*. mai 2021. Vol. 77, n° 5, pp. 2444-2453. DOI [10.1002/ps.6273](https://doi.org/10.1002/ps.6273).

KAMIYAMA M.T., MATSUURA K., YOSHIMURA T. et YANG C.-C.S., 2021. Predation of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* by the Japanese acrobat ants, *Crematogaster matsumurai* and *Crematogaster osakensis*. *Biological Control*. juin 2021. Vol. 157, pp. 104570. DOI [10.1016/j.biocontrol.2021.104570](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104570).

KHRIMIAN A., ZHANG A., WEBER D.C., HO H.-Y., ALDRICH J.R., VERMILLION K.E., SIEGLER M.A., SHIRALI S., GUZMAN F. et LESKEY T.C., 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. *Journal of Natural Products*. 25 juillet 2014. Vol. 77, n° 7, pp. 1708-1717. DOI [10.1021/np5003753](https://doi.org/10.1021/np5003753).

KLOEPPER J.W., RYU C.-M. et ZHANG S., 2004. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*®. novembre 2004. Vol. 94, n° 11, pp. 1259-1266. DOI [10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259](https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259).

KORTSINOLOU A.M., SAUD Z., EASTWOOD D.C., BUTT T.M. et KOUVELIS V.N., 2020. The mitochondrial genome contribution to the phylogeny and identification of *Metarhizium* species and strains. *Fungal Biology*. octobre 2020. Vol. 124, n° 10, pp. 845-853. DOI [10.1016/j.funbio.2020.06.003](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.06.003).

KUHAR T.P. et KAMMINGA K., 2017. Review of the chemical control research on *Halyomorpha halys* in the USA. *Journal of Pest Science*. septembre 2017. Vol. 90, n° 4, pp. 1021-1031. DOI [10.1007/s10340-017-0859-7](https://doi.org/10.1007/s10340-017-0859-7).

KUHAR, T.P., KAMMINGA K.L., WHALEN J., DIVELY G.P., BRUST G., HOOKS C.R.R., HAMILTON G. et HERBERT D.A., 2012. The Pest Potential of Brown Marmorated Stink Bug on Vegetable Crops. *Plant Health Progress*. janvier 2012. Vol. 13, n° 1, pp. 41. DOI [10.1094/PHP-2012-0523-01-BR](https://doi.org/10.1094/PHP-2012-0523-01-BR).

KUMAR A., SINGH V.K., TRIPATHI V., SINGH P.P. et SINGH A.K., 2018. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Perspective in Agriculture Under Biotic and Abiotic Stress. In : *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*. [en ligne]. Elsevier. pp. 333-342. [Consulté le 28 mai 2022]. ISBN 978-0-444-63987-5.

LACKMAN P., GONZÁLEZ-GUZMÁN M., TILLEMANN S., CARQUEIJEIRO I., PÉREZ A.C., MOSES T., SEO M., KANNO Y., HÄKKINEN S.T., VAN MONTAGU M.C.E., THEVELEIN J.M., MAAHEIMO H., OKSMAN-CALDENTY K.-M., RODRIGUEZ P.L., RISCHER H. et GOOSSENS A., 2011. Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in *Arabidopsis* and tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 5 avril 2011. Vol. 108, n° 14, pp. 5891-5896. DOI [10.1073/pnas.1103010108](https://doi.org/10.1073/pnas.1103010108).

LACOMBE B. et ACHARD P., 2016. Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. *Current Opinion in Plant Biology*. décembre 2016. Vol. 34, pp. 1-8. DOI [10.1016/j.pbi.2016.06.007](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.007).

LEE D.-H. et LESKEY T.C., 2015. Flight behavior of foraging and overwintering brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Bulletin of Entomological Research*. octobre 2015. Vol. 105, n° 5, pp. 566-573. DOI [10.1017/S0007485315000462](https://doi.org/10.1017/S0007485315000462).

LEE D.-H., CULLUM J.P., ANDERSON J.L., DAUGHERTY J.L., BECKETT L.M. et LESKEY T.C., 2014a. Characterization of Overwintering Sites of the Invasive Brown Marmorated Stink Bug in Natural Landscapes Using Human Surveyors and Detector Canines. DOUCET, Daniel (éd.), *PLoS ONE*. 9 avril 2014. Vol. 9, n° 4, pp. e91575. DOI [10.1371/journal.pone.0091575](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091575).

GLAUSER G. et WOLFENDER J.-L., 2013. A Non-targeted Approach for Extended Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Profiling of Free and Esterified Jasmonates After Wounding. In : GOOSSENS A. et PAUWELS L. (éd.), *Jasmonate Signaling*. [en ligne]. Totowa, NJ: Humana Press. pp. 123-134. *Methods in Molecular Biology*. [Consulté le 7 juillet 2022]. ISBN 978-1-62703-413-5.

LEE, D.-H., NIELSEN A.L. et LESKEY T.C., 2014b. Dispersal Capacity and Behavior of Nymphal Stages of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) Evaluated Under Laboratory and Field Conditions. *Journal of Insect Behavior*. septembre 2014. Vol. 27, n° 5, pp. 639-651. DOI [10.1007/s10905-014-9456-2](https://doi.org/10.1007/s10905-014-9456-2).



LEE D.-H., SHORT B.D., JOSEPH S.V., BERGH J.C. et LESKEY T.C., 2013. Review of the Biology, Ecology, and Management of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in China, Japan, and the Republic of Korea. *Environmental Entomology*. 1 août 2013. Vol. 42, n° 4, pp. 627-641. DOI [10.1603/EN13006](https://doi.org/10.1603/EN13006).

LESKEY T.C., AGNELLO A., BERGH J.C., DIVELY G.P., HAMILTON G.C., JENTSCH P., KHRIMIAN A., KRAWCZYK G., KUCHAR T.P., LEE D.-H., MORRISON W.R., POLK D.F., RODRIGUEZ-SAONA C., SHEARER P.W., SHORT B.D., SHREWSBURY P.M., WALGENBACH J.F., WEBER D.C., WELTY C., WHALEN J., WIMAN N. et ZAMAN F., 2015. Attraction of the Invasive *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) to Traps Baited with Semiochemical Stimuli Across the United States. *Environmental Entomology*. 1 juin 2015. Vol. 44, n° 3, pp. 746-756. DOI [10.1093/ee/nvv049](https://doi.org/10.1093/ee/nvv049).

LESKEY T.C. et NIELSEN A.L., 2018. Impact of the Invasive Brown Marmorated Stink Bug in North America and Europe: History, Biology, Ecology, and Management. *Annual Review of Entomology*. 7 janvier 2018. Vol. 63, n° 1, pp. 599-618. DOI [10.1146/annurev-ento-020117-043226](https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043226).

LESKEY T.C., SHORT B.D., BUTLER B.R. et WRIGHT S.E., 2012. 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: A Journal of Entomology*. 2012. Vol. 2012, pp. 1-14. DOI [10.1155/2012/535062](https://doi.org/10.1155/2012/535062).

LESKEY T.C., SHORT B.D. et 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 Management Science*. juillet 2014. Vol. 70, n° 7, pp. 1097-1104. DOI [10.1002/ps.3653](https://doi.org/10.1002/ps.3653).

LOBA V.C., ALONSO M.-M.P. et POLLMANN S., 2017. Monitoring of Crosstalk Between Jasmonate and Auxin in the Framework of Plant Stress Responses of Roots. In : DANDEKAR T. et NASEEM M. (éd.), *Auxins and Cytokinins in Plant Biology*. [en ligne]. New York, NY : Springer New York. pp. 175-185. *Methods in Molecular Biology*. [Consulté le 7 juillet 2022]. ISBN 978-1-4939-6829-9.

LOURME O., 2019. Impact des défenses de *Vicia faba* induites par la rhizobactérie PGPR *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 sur le développement, la reproduction et l'alimentation de la punaise diabolique invasive *Halyomorpha halys*. Mémoire de fin d'études. Gembloux Agro-Bio Tech.

MEGALI L., GLAUSER G. et RASMANN S., 2014. Fertilization with beneficial microorganisms decreases tomato defenses against insect pests. *Agronomy for Sustainable Development*. juillet 2014. Vol. 34, n° 3, pp. 649-656. DOI [10.1007/s13593-013-0187-0](https://doi.org/10.1007/s13593-013-0187-0).

MIYAMOTO K., SHIMIZU T. et OKADA K., 2014. Transcriptional regulation of the biosynthesis of phytoalexin: A lesson from specialized metabolites in rice. *Plant Biotechnology*. 2014. Vol. 31, n° 5, pp. 377-388. DOI [10.5511/plantbiotechnology.14.0730a](https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.0730a).

MOHEKAR P., OSBORNE J., WIMAN N.G., WALTON V. et TOMASINO E., 2017. Influence of Winemaking Processing Steps on the Amounts of (E)-2-Decenal and Tridecane as Off-Odorants Caused by Brown Marmorated Stink Bug (*Halyomorpha halys*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1 février 2017. Vol. 65, n° 4, pp. 872-878. DOI [10.1021/acs.jafc.6b04268](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04268).

MOONJELY S. et BIDOCHKA M.J., 2019. Generalist and specialist *Metarhizium* insect pathogens retain ancestral ability to colonize plant roots. *Fungal Ecology*. octobre 2019. Vol. 41, pp. 209-217. DOI [10.1016/j.funeco.2019.06.004](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.06.004).

MORRISON W.R., ALLEN M.K. et LESKEY T.C., 2018. Behavioural response of the invasive *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) to host plant stimuli augmented with semiochemicals in the field: Response of *H. halys* to host stimuli and pheromone. *Agricultural and Forest Entomology*. février 2018. Vol. 20, n° 1, pp. 62-72. DOI [10.1111/afe.12229](https://doi.org/10.1111/afe.12229).

MORRISON W.R., BLAAUW B.R., SHORT B.D., NIELSEN A.L., BERGH J.C., KRAWCZYK G., PARK Y.-L., BUTLER B., KHRIMIAN A. et LESKEY T.C., 2019. Successful management of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in commercial apple orchards with an attract-and-kill strategy. *Pest Management Science*. janvier 2019. Vol. 75, n° 1, pp. 104-114. DOI [10.1002/ps.5156](https://doi.org/10.1002/ps.5156).

MUKHERJEE P.K., HURLEY J.F., TAYLOR J.T., PUCKHABER L., LEHNER S., DRUZHININA I., SCHUMACHER R. et KENERLEY C.M., 2018. Ferricrocin, the intracellular siderophore of *Trichoderma virens*, is involved in growth, conidiation, gliotoxin biosynthesis and induction of systemic resistance in maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. octobre 2018. Vol. 505, n° 2, pp. 606-611. DOI [10.1016/j.bbrc.2018.09.170](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.170).

MURPHEY COY R., HELD D.W. et KLOEPPER J.W., 2017. Bacterial Inoculant Treatment of Bermudagrass Alters Ovipositional Behavior, Larval and Pupal Weights of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*. août 2017. Vol. 46, n° 4, pp. 831-838. DOI [10.1093/ee/nvx102](https://doi.org/10.1093/ee/nvx102).

NIELSEN A.L., HAMILTON G.C. et MATADHA D., 2008. Developmental Rate Estimation and Life Table Analysis for *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology*. 1 avril 2008. Vol. 37, n° 2, pp. 348-355. DOI [10.1603/0046-225X\(2008\)37\[348:DREALT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2008)37[348:DREALT]2.0.CO;2).

NIKOH N., HOSOKAWA T., OSHIMA K., HATTORI M. et FUKATSU T., 2011. Reductive Evolution of Bacterial Genome in Insect Gut Environment. *Genome Biology and Evolution*. 1 janvier 2011. Vol. 3, pp. 702-714. DOI [10.1093/gbe/evr064](https://doi.org/10.1093/gbe/evr064).

NIVA C.C. et TAKEDA M., 2003. Effects of Photoperiod, Temperature and Melatonin on Nymphal Development, Polyphenism and Reproduction in *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae). *Zoological Science*. août 2003. Vol. 20, n° 8, pp. 963-970. DOI [10.2108/zsj.20.963](https://doi.org/10.2108/zsj.20.963).

ONGENA M., JOURDAN E., ADAM A., PAQUOT M., BRANS A., JORIS B., ARPIGNY J.-L. et THONART P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*. avril 2007. Vol. 9, n° 4, pp. 1084-1090. DOI [10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x).

PAJAČ ŽIVKOVIĆ I., MULAMEHMEDOVIĆ J., GÖLDEL B. et LEMIĆ D., 2022. Sexual dimorphism of brown marmorated stink bug. *Journal of Central European Agriculture*. 2022. Vol. 23, n° 1, pp. 62-68. DOI <https://doi.org/10.5513/JCEA01/23.1.3319>.

PAPPAS M.L., BAPTISTA P., BROUFAS G.D., DALAKOURAS A., DJOBBI W., FLORS V., GUERFALI M.M., KHAYI S., MENTAG R., PASTOR V., PEREIRA J.A., SÁNCHEZ-BEL P. et PAPAĐOPOULOU K., 2020. Biological and Molecular Control Tools in Plant Defense. In : MÉRILLON, Jean-Michel et RAMAWAT, Kishan Gopal (éd.), *Plant Defence: Biological Control*. [en ligne]. Cham : Springer International Publishing. pp. 3-43. Progress in Biological Control. [Consulté le 15 avril 2022]. ISBN 978-3-030-51033-6.

PARKER B., SKINNER M., GOULI S., GOULI V. et KIM J., 2015. Virulence of BotaniGard® to Second Instar Brown Marmorated Stink Bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae). *Insects*. 9 avril 2015. Vol. 6, n° 2, pp. 319-324. DOI [10.3390/insects6020319](https://doi.org/10.3390/insects6020319).

PEIFFER M. et FELTON G.W., 2014. Insights into the Saliva of the Brown Marmorated Stink Bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). MARION-POLL, Frederic (éd.), *PLoS ONE*. 26 février 2014. Vol. 9, n° 2, pp. e88483. DOI [10.1371/journal.pone.0088483](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088483).

PETERSON H.M., RAY S., ALI J.G. et KRAWCZYK G., 2022. Feeding and oviposition by the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) induce direct and systemic changes in volatile compound emissions from potted peach and tree of heaven. *Arthropod-Plant Interactions*. avril 2022. Vol. 16, n° 2, pp. 227-247. DOI [10.1007/s11829-022-09893-1](https://doi.org/10.1007/s11829-022-09893-1).

PIETERSE C.M.J., LEON-REYES A., VAN DER ENT S. et VAN WEES S.C.M., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. mai 2009. Vol. 5, n° 5, pp. 308-316. DOI [10.1038/nchembio.164](https://doi.org/10.1038/nchembio.164).

PRŠIĆ J. et ONGENA M., 2020. Elicitors of Plant Immunity Triggered by Beneficial Bacteria. *Frontiers in Plant Science*. 9 novembre 2020. Vol. 11, pp. 594530. DOI [10.3389/fpls.2020.594530](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.594530).

QAWASMEH A., RAMAN A. et WHEATLEY W., 2015. Volatiles in perennial ryegrass infected with strains of endophytic fungus: impact on African black beetle host selection. *Journal of Applied Entomology*. février 2015. Vol. 139, n° 1-2, pp. 94-104. DOI [10.1111/jen.12140](https://doi.org/10.1111/jen.12140).

RADJA COMMARE R., NANDAKUMAR R., KANDAN A., SURESH S., BHARATHI M., RAGUCHANDER T. et SAMIYAPPAN R., 2002. *Pseudomonas fluorescens* based bio-formulation for the management of sheath blight disease and leafhopper insect in rice. *Crop Protection*. septembre 2002. Vol. 21, n° 8, pp. 671-677. DOI [10.1016/S0261-2194\(02\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00020-0).

RAMOS P., RIVAS N., POLLMANN S., CASATI P. et MOLINA-MONTENEGRO M.A., 2018. Hormonal and physiological changes driven by fungal endophytes increase Antarctic plant performance under UV-B radiation. *Fungal Ecology*. août 2018. Vol. 34, pp. 76-82. DOI [10.1016/j.funeco.2018.05.006](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.05.006).

RAMOS AGUILA L.C., AKUTSE K.S., BAMISILE B.S., SÁNCHEZ MOREANO J.P., ASHRAF H.J., ZHOU C., LI X. et WANG L., 2022. Endophytically colonized *Citrus limon* seedlings by *Beauveria bassiana* hampered development, reproduction and progeny fitness of *Diaphorina citri*. *Journal of Applied Entomology*. avril 2022. Vol. 146, n° 3, pp. 229-242. DOI [10.1111/jen.12960](https://doi.org/10.1111/jen.12960).

RAYA-DÍAZ S., SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ A.R., SEGURA-FERNÁNDEZ J.M., DEL CAMPILLO M.d.C. et QUESADA-MORAGA E., 2017. Entomopathogenic fungi-based mechanisms for improved Fe nutrition in sorghum plants grown on calcareous substrates. KURAMAE, Eiko Eurya (éd.), *PLoS ONE*. 5 octobre 2017. Vol. 12, n° 10, pp. e0185903. DOI [10.1371/journal.pone.0185903](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185903).

RESQUÍN-ROMERO G., CABRAL-ANTÚNEZ C., SARUBBI-ORUE H., GARRIDO-JURADO I., VALVERDE-GARCÍA P., SCHADE M. et BUTT T.M., 2020. Virulence of *Metarhizium brunneum* (Ascomycota: Hypocreales) Strains Against Stinkbugs *Euschistus heros* and *Dichelops furcatus* (Hemiptera: Pentatomidae). BRUCK, Denny (éd.), *Journal of Economic Entomology*. 16 octobre 2020. Vol. 113, n° 5, pp. 2540-2545. DOI [10.1093/jee/toaa150](https://doi.org/10.1093/jee/toaa150).

RICE K.B., BERGH C.J., BERGMANN E.J., BIDDINGER D.J., DIECKHOFF C., DIVELY G., FRASER H., GARIPEY T., HAMILTON G., HAYE T., HERBERT A., HOELMER K., HOOKS C.R., JONES A., KRAWCZYK G., KUHAR T., MARTINSON H., MITCHELL W., NIELSEN A.L., PFEIFFER D.G., RAUPP M.J., RODRIGUEZ-SAONA C., SHEARER P., SHREWSBURY P., VENUGOPAL P.D., WHALEN J., WIMAN N.G., LESKEY T.C. et TOOKER J.F., 2014. Biology, Ecology, and Management of Brown Marmorated Stink Bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Integrated Pest Management*. 1 septembre 2014. Vol. 5, n° 3, pp. 1-13. DOI [10.1603/IPM14002](https://doi.org/10.1603/IPM14002).

RONDONI G., BERTOLDI V., MALEK R., DJELOUAH K., MORETTI C., BUONAURIO R. et CONTI E., 2018. Vicia faba plants respond to oviposition by invasive Halyomorpha halys activating direct defences against offspring. *Journal of Pest Science*. mars 2018. Vol. 91, n° 2, pp. 671-679. DOI [10.1007/s10340-018-0955-3](https://doi.org/10.1007/s10340-018-0955-3).

ROSTÁS M., CRIPPS M.G. et SILCOCK P., 2015. Aboveground endophyte affects root volatile emission and host plant selection of a belowground insect. *Oecologia*. février 2015. Vol. 177, n° 2, pp. 487-497. DOI [10.1007/s00442-014-3104-6](https://doi.org/10.1007/s00442-014-3104-6).

SALEM M.A., YOSHIDA T., PEREZ DE SOUZA L., ALSEEKH S., BAJDZIENKO K., FERNIE A.R. et GIAVALISCO P., 2020. An improved extraction method enables the comprehensive analysis of lipids, proteins, metabolites and phytohormones from a single sample of leaf tissue under water-deficit stress. *The Plant Journal*. août 2020. Vol. 103, n° 4, pp. 1614-1632. DOI [10.1111/tpj.14800](https://doi.org/10.1111/tpj.14800).

SALAZAR R., POLLMANN S., MORALES-QUINTANA L., HERRERA R., CAPARRÓS-RUIZ D. et RAMOS P., 2019. In seedlings of Pinus radiata, jasmonic acid and auxin are differentially distributed on opposite sides of tilted stems affecting lignin monomer biosynthesis and composition. *Plant Physiology and Biochemistry*. février 2019. Vol. 135, pp. 215-223. DOI [10.1016/j.plaphy.2018.12.008](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.12.008).

SARAVANAKUMAR D., MUTHUMEENA K., LAVANYA N., SURESH S., RAJENDRAN L., RAGUCHANDER T. et SAMIYAPPAN R., 2007. Pseudomonas-induced defence molecules in rice plants against leafhopper (Cnaphalocrocis medinalis) pest. *Pest Management Science*. juillet 2007. Vol. 63, n° 7, pp. 714-721. DOI [10.1002/ps.1381](https://doi.org/10.1002/ps.1381).

SCHOLZ R., MOLOHON K.J., NACHTIGALL J., VATER J., MARKLEY A.L., SÜSSMUTH R.D., MITCHELL D.A. et BORRISS R., 2011. Plantazolicin, a Novel Microcin B17/Streptolysin S-Like Natural Product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*. janvier 2011. Vol. 193, n° 1, pp. 215-224. DOI [10.1128/JB.00784-10](https://doi.org/10.1128/JB.00784-10).

SCHOLZ R., VATER J., BUDIHARJO A., WANG Z., HE Y., DIETEL K., SCHWECKE T., HERFORT S., LASCH P. et BORRISS R., 2014. Amylocyclicin, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*. 15 mai 2014. Vol. 196, n° 10, pp. 1842-1852. DOI [10.1128/JB.01474-14](https://doi.org/10.1128/JB.01474-14).

SCHULZ B. et BOYLE C., 2006. What are Endophytes? In : SCHULZ, Barbara J. E., BOYLE, Christine J. C. et SIEBER, Thomas N. (éd.), *Microbial Root Endophytes*. [en ligne]. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg. pp. 1-13. Soil Biology. [Consulté le 3 juin 2022]. ISBN 978-3-540-33525-2.

SERTEYN L., LOURME O., IANNELLO L., BAIWIR D., MAZZUCHELLI G., ONGENA M. et FRANCIS F., 2021. Up-Regulated Salivary Proteins of Brown Marmorated Stink Bug Halyomorpha halys on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Treated Plants. *Journal of Chemical Ecology*. septembre 2021. Vol. 47, n° 8-9, pp. 747-754. DOI [10.1007/s10886-021-01293-8](https://doi.org/10.1007/s10886-021-01293-8).



SERTEYN L., QUAGHEBEUR C., ONGENA M., CABRERA N., BARRERA A., MOLINA-MONTENEGRO M.A., FRANCIS F. et RAMÍREZ C.C., 2020. Induced Systemic Resistance by a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Impacts Development and Feeding Behavior of Aphids. *Insects*. 8 avril 2020. Vol. 11, n° 4, pp. 234. DOI [10.3390/insects11040234](https://doi.org/10.3390/insects11040234).

SEVIM A., DONZELLI B.G.G., WU D., DEMIRBAG Z., GIBSON D.M. et TURGEON B.G., 2012. Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. *Current Genetics*. avril 2012. Vol. 58, n° 2, pp. 79-92. DOI [10.1007/s00294-012-0366-6](https://doi.org/10.1007/s00294-012-0366-6).

SHARMA A., SALWAN R. et SHARMA V., 2022. Extracellular proteins of *Trichoderma* and their role in plant health. *South African Journal of Botany*. juillet 2022. Vol. 147, pp. 359-369. DOI [10.1016/j.sajb.2022.01.036](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.01.036).

SHAVIT R., OFEK-LALZAR M., BURDMAN S. et MORIN S., 2013. Inoculation of tomato plants with rhizobacteria enhances the performance of the phloem-feeding insect *Bemisia tabaci*. *Frontiers in Plant Science*. [en ligne]. 2013. Vol. 4. [Consulté le 31 mai 2022]. DOI [10.3389/fpls.2013.00306](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00306).

SHORESH M., HARMAN G.E. et MASTOURI F., 2010. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review of Phytopathology*. 1 juillet 2010. Vol. 48, n° 1, pp. 21-43. DOI [10.1146/annurev-phyto-073009-114450](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450).

SIMMONS A.M. et YEARGAN K.V., 1988. Feeding Frequency and Feeding Duration of the Green Stink Bug (Hemiptera: Pentatomidae) on Soybean. *Journal of Economic Entomology*. 1 juin 1988. Vol. 81, n° 3, pp. 812-815. DOI [10.1093/jee/81.3.812](https://doi.org/10.1093/jee/81.3.812).

SOSA-GOMEZ D.R., BOUCIAS D.G. et NATION J.L., 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green Stink Bug *Nezara viridula* Cuticle and Fungistatic Effect of Cuticular Lipids and Aldehydes. *Journal of Invertebrate Pathology*. janvier 1997. Vol. 69, n° 1, pp. 31-39. DOI [10.1006/jjpa.1996.4619](https://doi.org/10.1006/jjpa.1996.4619).

STAHL J.M., 2018. *Benefits and risks of using native parasitoids for augmentative biological control of the invasive pest *Halyomorpha halys* in Europe*. [en ligne]. University of Bremen : University of Bremen. [Consulté le 28 mars 2022]. Disponible à l'adresse: <https://media.suub.uni-bremen.de/bitstream/elib/1547/1/00106991-1.pdf>

STAHL J.M., BABENDREIER D., MARAZZI C., CARUSO S., COSTI E., MAISTRELLO L. et HAYE T., 2019. Can *Anastatus bifasciatus* Be Used for Augmentative Biological Control of the Brown Marmorated Stink Bug in Fruit Orchards? *Insects*. 15 avril 2019. Vol. 10, n° 4, pp. 108. DOI [10.3390/insects10040108](https://doi.org/10.3390/insects10040108).

STOECKLI S., FELBER R. et HAYE T., 2020. Current distribution and voltinism of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*, in Switzerland and its response to climate change using a high-resolution CLIMEX model. *International Journal of Biometeorology*. décembre 2020. Vol. 64, n° 12, pp. 2019-2032. DOI [10.1007/s00484-020-01992-z](https://doi.org/10.1007/s00484-020-01992-z).

STUART J., 2015. Insect effectors and gene-for-gene interactions with host plants. *Current Opinion in Insect Science*. juin 2015. Vol. 9, pp. 56-61. DOI [10.1016/j.cois.2015.02.010](https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.02.010).

SWORD G.A., TESSNOW A. et EK-RAMOS M.J., 2017. Endophytic fungi alter sucking bug responses to cotton reproductive structures. *Insect Science*. décembre 2017. Vol. 24, n° 6, pp. 1003-1014. DOI [10.1111/1744-7917.12461](https://doi.org/10.1111/1744-7917.12461).

TANENTZAP A.J., VICARI M. et BAZELY D.R., 2014. Ungulate saliva inhibits a grass–endophyte mutualism. *Biology Letters*. juillet 2014. Vol. 10, n° 7, pp. 20140460. DOI [10.1098/rsbl.2014.0460](https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0460).

THALER J.S., HUMPHREY P.T. et WHITEMAN N.K., 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*. mai 2012. Vol. 17, n° 5, pp. 260-270. DOI [10.1016/j.tplants.2012.02.010](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010).

THALER J.S., OLSEN E.L. et KAPLAN I., 2015. Jasmonate-induced plant defenses and prey availability impact the preference and performance of an omnivorous stink bug, *Podisus maculiventris*. *Arthropod-Plant Interactions*. avril 2015. Vol. 9, n° 2, pp. 141-148. DOI [10.1007/s11829-015-9357-0](https://doi.org/10.1007/s11829-015-9357-0).

TOMILOVA O., LEDNEY G., VOLKOVA N. et KOZLOVA E. (2022). Effect of the endophytic colonization of *Beauveria bassiana* on the population density of peach aphid (*Myzus persicae*) and the growth parameters of plants. *Plant Protection News*. Août 2022. Vol 105, n°2, pp. 94-99. DOI [10.31993/2308-6459-2022-105-2-15269](https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-2-15269).

TOYOTA M., SPENCER D., SAWAI-TOYOTA S., JIAQI W., ZHANG T., KOO A.J., HOWE G.A. et GILROY S., 2018. Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science*. 14 septembre 2018. Vol. 361, n° 6407, pp. 1112-1115. DOI [10.1126/science.aat7744](https://doi.org/10.1126/science.aat7744).

TOZLU E., SARUHAN I., TOZLU G., KOTAN R., DADAŞOĞLU F. et TEKINER N., 2019. Potentials of some entomopathogens against the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) (Hemiptera: Pentatomidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. décembre 2019. Vol. 29, n° 1, pp. 76. DOI [10.1186/s41938-019-0176-y](https://doi.org/10.1186/s41938-019-0176-y).

VALENZUELA-SOTO J.H., ESTRADA-HERNÁNDEZ M.G., IBARRA-LACLETTE E. et DÉLANO-FRIER J.P., 2010. Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growth-promoting *Bacillus subtilis* retards whitefly *Bemisia tabaci* development. *Planta*. janvier 2010. Vol. 231, n° 2, pp. 397-410. DOI [10.1007/s00425-009-1061-9](https://doi.org/10.1007/s00425-009-1061-9).

VAN DE MORTEL J.E., DE VOS R.C.H., DEKKERS E., PINEDA A., GUILLOD L., BOUWMEESTER K., VAN LOON J.J.A., DICKE M. et RAAIJMAKERS J.M., 2012. Metabolic and Transcriptomic Changes Induced in *Arabidopsis* by the Rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* SS101. *Plant Physiology*. décembre 2012. Vol. 160, n° 4, pp. 2173-2188. DOI [10.1104/pp.112.207324](https://doi.org/10.1104/pp.112.207324).

WAR A.R., BUHROO A.A., HUSSAIN B., AHMAD T., NAIR R.M. et SHARMA H.C., 2020. Plant Defense and Insect Adaptation with Reference to Secondary Metabolites. In : MÉRILLON, Jean-Michel et RAMAWAT, Kishan Gopal (éd.), *Co-Evolution of Secondary Metabolites*. [en ligne]. Cham : Springer International Publishing. pp. 795-822. Reference Series in Phytochemistry. [Consulté le 21 mai 2022]. ISBN 978-3-319-96396-9.

WAR A.R., PAULRAJ M.G., AHMAD T., BUHROO A.A., HUSSAIN B., IGNACIMUTHU S. et SHARMA H.C., 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*. octobre 2012. Vol. 7, n° 10, pp. 1306-1320. DOI [10.4161/psb.21663](https://doi.org/10.4161/psb.21663).

WASTERNAK C. et STRNAD M., 2016. Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. *New Biotechnology*. septembre 2016. Vol. 33, n° 5, pp. 604-613. DOI [10.1016/j.nbt.2015.11.001](https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.11.001).

WEBER D.C., LESKEY T.C., WALSH G.C. et KHRIMIAN A., 2014. Synergy of Aggregation Pheromone With Methyl (E,E,Z)-2,4,6-Decatrienoate in Attraction of *Halyomorpha*

*halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Economic Entomology*. 1 juin 2014. Vol. 107, n° 3, pp. 1061-1068. DOI [10.1603/EC13502](https://doi.org/10.1603/EC13502).

WERMELINGER B., FORSTER B. et WYNIGER D., 2008. First records of an invasive bug in Europe : *Halyomorpha halys* Stål (Heteroptera : Pentatomidae), a new pest on woody ornamentals and fruit trees? *Mitteilungen-Schweizerische Entomologische Gesellschaft*. 2008. Vol. 81, pp. 1-8. DOI [10.5169/SEALS-402954](https://doi.org/10.5169/SEALS-402954).

WIMAN N.G., WALTON V.M., SHEARER P.W. et RONDON S.I., 2014. Electronically Monitored Labial Dabbing and Stylet ‘Probing’ Behaviors of Brown Marmorated Stink Bug, *Halyomorpha halys*, in Simulated Environments. DICKENS, Joseph Clifton (éd.), *PLoS ONE*. 4 décembre 2014. Vol. 9, n° 12, pp. e113514. DOI [10.1371/journal.pone.0113514](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113514).

WIMAN N.G., WALTON V.M., SHEARER P.W., RONDON S.I. et LEE J.C., 2015. Factors affecting flight capacity of brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Pest Science*. mars 2015. Vol. 88, n° 1, pp. 37-47. DOI [10.1007/s10340-014-0582-6](https://doi.org/10.1007/s10340-014-0582-6).

WU L., HUANG Z., LI X., MA L., GU Q., WU H., LIU J., BORRIS R., WU Z. et GAO X., 2018. Stomatal Closure and SA-, JA/ET-Signaling Pathways Are Essential for *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 to Restrict Leaf Disease Caused by *Phytophthora nicotianae* in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Microbiology*. 27 avril 2018. Vol. 9, pp. 847. DOI [10.3389/fmicb.2018.00847](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00847).

WU L., WU H., CHEN L., YU X., BORRIS R. et GAO X., 2015. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports*. octobre 2015. Vol. 5, n° 1, pp. 12975. DOI [10.1038/srep12975](https://doi.org/10.1038/srep12975).

XU H. et TURLINGS T.C.J., 2018. Plant Volatiles as Mate-Finding Cues for Insects. *Trends in Plant Science*. février 2018. Vol. 23, n° 2, pp. 100-111. DOI [10.1016/j.tplants.2017.11.004](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.004).

YANG J., DUAN G., LI C., LIU L., HAN G., ZHANG Y. et WANG C., 2019. The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*. 18 octobre 2019. Vol. 10, pp. 1349. DOI [10.3389/fpls.2019.01349](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01349).

YANG Z.-Q., YAO Y.-X., QIU L.-F. et 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. *Annals of the Entomological Society of America*. 1 janvier 2009. Vol. 102, n° 1, pp. 39-47. DOI [10.1603/008.102.0104](https://doi.org/10.1603/008.102.0104).

YU C., DOU K., WANG S., WU Q., NI M., ZHANG T., LU Z., TANG J. et CHEN J., 2020. Elicitor hydrophobin Hyd1 interacts with Ubiquilin1-like to induce maize systemic resistance. *Journal of Integrative Plant Biology*. avril 2020. Vol. 62, n° 4, pp. 509-526. DOI [10.1111/jipb.12796](https://doi.org/10.1111/jipb.12796).

YU Y., GUI Y., LI Z., JIANG C., GUO J. et NIU D., 2022. Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes. *Plants*. 30 janvier 2022. Vol. 11, n° 3, pp. 386. DOI [10.3390/plants11030386](https://doi.org/10.3390/plants11030386).

ZABALGOGEAZCOA I., 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens: a review. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 1 février 2008. Vol. 6, n° S1, pp. 138. DOI [10.5424/sjar/200806S1-382](https://doi.org/10.5424/sjar/200806S1-382).

ZAKHARCHENKO V., KARPUN N. et BORISOV B., 2020. Trophic connections of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* Stål in the conditions of the invasive area on the Black Sea coast of the Caucasus. ASATUROVA, A. et ESAULENKO, E. (éd.), *BIO Web of Conferences*. 2020. Vol. 21, n° 00007, pp. 6. DOI [10.1051/bioconf/20202100007](https://doi.org/10.1051/bioconf/20202100007).

ZEBELO S., SONG Y., KLOEPPER J.W. et FADAMIRO H., 2016. Rhizobacteria activates (+)- $\delta$ -cadinene synthase genes and induces systemic resistance in cotton against beet armyworm (*Spodoptera exigua*): Rhizobacteria affects gossypol biosynthesis. *Plant, Cell & Environment*. avril 2016. Vol. 39, n° 4, pp. 935-943. DOI [10.1111/pce.12704](https://doi.org/10.1111/pce.12704).

ZHAI X., JIA M., CHEN L., ZHENG C.-J., RAHMAN K., HAN T. et QIN L.-P., 2017. The regulatory mechanism of fungal elicitor-induced secondary metabolite biosynthesis in medical plants. *Critical Reviews in Microbiology*. 4 mars 2017. Vol. 43, n° 2, pp. 238-261. DOI [10.1080/1040841X.2016.1201041](https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1201041).

ZHANG J., ZHANG F., GARIEPY T., MASON P., GILLESPIE D., TALAMAS E. et HAYE T., 2017. Seasonal parasitism and host specificity of *Trissolcus japonicus* in northern China. *Journal of Pest Science*. septembre 2017. Vol. 90, n° 4, pp. 1127-1141. DOI [10.1007/s10340-017-0863-y](https://doi.org/10.1007/s10340-017-0863-y).

ZHANG J., ZHANG X., YE M., LI X.-W., LIN S.-B. et SUN X.-L., 2020. The Jasmonic Acid Pathway Positively Regulates the Polyphenol Oxidase-Based Defense against Tea Geometrid Caterpillars in the Tea Plant (*Camellia sinensis*). *Journal of Chemical Ecology*. mars 2020. Vol. 46, n° 3, pp. 308-316. DOI [10.1007/s10886-020-01158-6](https://doi.org/10.1007/s10886-020-01158-6).

ZHANG M.-D., WU S.-Y., YAN J.-J., REITZ S. et GAO Y.-L., 2022. Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in potato plants and its virulence against potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insect Science*. 24 mai 2022. pp. 1744- 7917.13049. DOI [10.1111/1744-7917.13049](https://doi.org/10.1111/1744-7917.13049).

ZHANG N.X., MESSELINK G.J., ALBA J.M., SCHUURINK R.C., KANT M.R. et JANSSEN A., 2018. Phytophagy of omnivorous predator *Macrolophus pygmaeus* affects performance of herbivores through induced plant defences. *Oecologia*. janvier 2018. Vol. 186, n° 1, pp. 101-113. DOI [10.1007/s00442-017-4000-7](https://doi.org/10.1007/s00442-017-4000-7).

ZHANG P.-J., HE Y.-C., ZHAO C., YE Z.H. et YU X.-P., 2018. Jasmonic Acid-Dependent Defenses Play a Key Role in Defending Tomato Against *Bemisia tabaci* Nymphs, but Not Adults. *Frontiers in Plant Science*. 20 juillet 2018. Vol. 9, pp. 1065. DOI [10.3389/fpls.2018.01065](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01065).

ŽIVKOVIĆ I.P., JURIC S., VINCEKOVIĆ M., GALEŠIĆ M.A., MARIJAN M., VLAHOVIĆEK-KAHLINA K., MIKAC K.M. et LEMIC D., 2020. Polyphenol-Based Microencapsulated Extracts as Novel Green Insecticides for Sustainable Management of Polyphagous Brown Marmorated Stink Bug (*Halyomorpha halys* Stål, 1855). *Sustainability*. 3 décembre 2020. Vol. 12, n° 23, pp. 10079. DOI [10.3390/su122310079](https://doi.org/10.3390/su122310079).

ZOBEL E.S., HOOKS C.R.R. et DIVELY G.P., 2016. Seasonal Abundance, Host Suitability, and Feeding Injury of the Brown Marmorated Stink Bug, *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae), in Selected Vegetables. *Journal of Economic Entomology*. juin 2016. Vol. 109, n° 3, pp. 1289-1302. DOI [10.1093/jee/tow055](https://doi.org/10.1093/jee/tow055).

## Sitographie

- [1] EPPO, 2022. Halyomorpha halys(HALYHA) Distribution. *EPPO Global Database*. [en ligne]. 2022. [Consulté le 4 mars 2022]. Disponible à l'adresse: <https://gd.eppo.int/taxon/HALYHA/distribution>
- [2] STREITO J.-C. et CHARTOIS M., 2022b. Fiche ravageur Punaise diabolique - Reconnaître l'adulte. *Ephytia*. [en ligne]. 11 février 2022. [Consulté le 10 mars 2022]. Disponible à l'adresse: <http://ephytia.inra.fr/fr/C/20551/Agiir-Connaitre-son-cycle>
- [3] STREITO J.-C. et CHARTOIS M., 2022a. Fiche ravageur Punaise diabolique - Connaître son cycle. *Ephytia*. [en ligne]. 11 février 2022. [Consulté le 10 mars 2022]. Disponible à l'adresse: <http://ephytia.inra.fr/fr/C/20551/Agiir-Connaitre-son-cycle>
- [4] HEITZ T., 2018. Réguler le régulateur : comment le métabolisme de l'acide jasmonique impacte l'induction des défenses chimiques des plantes. *Planet vie*. [en ligne]. 8 février 2018. [Consulté le 26 mars 2022]. Disponible à l'adresse: <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/vegetaux/phytopathologie/reguler-le-regulateur-comment-le-metabolisme-de-l-acide>



L'Institut Agro Rennes-Angers

Site d'Angers  Site de Rennes

Année universitaire : 2021-2022

Spécialité : Horticulture

Spécialisation (et option éventuelle) :

Protection des Plantes et Environnement  
appliquée à l'Horticulture (PPEH)

### Mémoire de fin d'études

- d'ingénieur de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)
- de master de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)
- de l'Institut Agro Montpellier (étudiant arrivé en M2)
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

# Évaluation du potentiel d'une rhizobactérie bénéfique et d'un champignon endophyte à induire les défenses des plantes contre la punaise invasive *Halyomorpha halys*

Par : Solène TREHIOU

## ANNEXES

***Soutenu à Angers le 6 septembre 2022***

***Devant le jury composé de :***

Président : Vanessa SOUFFLET-FRESLON

Maître de stage : Lisa IANNELLO

Enseignant référent : Nicolas CHEN

Autres membres du jury (Nom, Qualité) :

Alain SARNIGUET, DR-INRAe

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle de l'Institut Agro Rennes-Angers*

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation «Patrimoine-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France» disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>





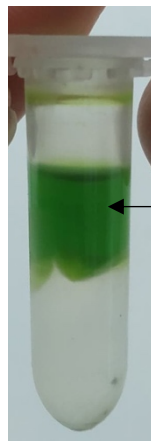


## Annexe I - Protocoles d'extraction de phytohormones testés

### 1<sup>er</sup> protocole (Salem *et al.*, 2020)

Cinquante milligrammes de feuilles broyées conservées à -80°C sont ajoutés dans un eppendorf de 2mL. L'extraction est réalisée en ajoutant 1mL de solvant d'extraction (MTBE:MeOH en proportion 3 :1) pré-refroidi à -20°C ainsi que 10 µl de SI préparé à 20 µl.mL<sup>-1</sup> et en vortexant. Les échantillons sont ensuite laissés à 4°C pendant 30 minutes sous agitation dans un thermomixer à eppendorfs, puis subissent une sonification sur bain de glace pendant 15 minutes. Un volume de 0,5 ml d'eau acidifiée (0,1% HCl) est alors ajouté et les échantillons sont vortexés pendant 1 min. Les échantillons sont une nouvelle fois laissés à 4°C pendant 30 minutes sous agitation puis centrifugés pendant 10 minutes à 4°C.

Un volume de 0,7 mL du surnageant supérieur (phase contenant le MTBE) est ensuite transféré dans un nouveau tube eppendorf et séché avec un SpeedVac à température ambiante. Les culots sont ensuite remis en suspension dans 100 µl de solution eau:méthanol (50:50) et mis en vials. Les échantillons n'ont pas pu être analysés immédiatement en UPLC-MS comme précisé dans le protocole. Ceux-ci ont été conservés à -80°C avant analyse.



Surnageant à prélever

### 2<sup>ème</sup> protocole (Glaser et Wolfender, 2013)

Cent milligrammes d'échantillon sont transférés dans des tubes eppendorf de 2mL et 1,5 mL de solvant d'extraction (isopropanol : acide formique, proportion en volume 99,5:0,5) ainsi que 20 µl de SI ( préparé à 40 µl.mL<sup>-1</sup>) sont ajoutés, puis vortexés quelques secondes. Dix billes de verre sont introduites dans les tubes qui sont ensuite placés dans un multi-vortex v-32 pendant 5 minutes. Les échantillons sont alors été centrifugés à 14 000g pendant 3 minutes et le surnageant est transféré dans un nouveau tube eppendorf. Le solvant est ensuite évaporé à l'aide d'un SpeedVac et le culot suspendu dans 400 µl de méthanol puis filtré avant d'être mis en vial.





## Annexe II – Gradient d'élution utilisé pour l'analyse UPLC-MS

<b>Temps (min)</b>	<b>Pourcentage de solvant A (%)</b>	<b>Pourcentage de solvant B (%)</b>
0	85	15
0,5	85	15
8	35	65
8,5	5	95
11	5	95
11,5	85	15
15	85	15

Ce gradient d'élution a été mis au point avec la méthode Q-TOF LC/MS, pour lequel les résultats étaient prometteurs. Cependant la machine est tombée en panne, la méthode a donc été reprise et transférée pour une analyse UPLC-MS.



### **Annexe III - Script de l'analyse de la mortalité des larves via un GLMM de loi binomiale**

```
# Définition de l'espace de travail et jeu de données
setwd("chemin d'accès au fichier")
library(readxl)
data <- read_excel("nom du fichier.xlsx")
str(data)

library(lme4)

#Variable étudiée : Statut (0 : vivant, 1: mort)
# Variables explicatives : Traitement (fixe), Plante (aléatoire), LotOeuf (aléatoire)
Statut <- data$Statut
Traitement<- as.factor(data$Traitement)
Plante <- as.factor(data$Plante)
LotOeuf <- as.factor (data$LotOeuf)

#Exploration des données omise pour l'annexe

#Modélisation statistique
modele <- glmer(Statut~Traitement +(1|Plante) +(1|LotOeuf),family=binomial(link="logit"))
drop1(modele,test='Chi')
summary(modele)
```



## Annexe IV - Script de l'analyse du gain de masse des larves via une ANOVA mixte

```
# Définition de l'espace de travail et jeu de données
setwd("chemin d'accès au fichier")
library(readxl)
data <- read_excel("nom du fichier.xlsx")
str(data)
library(nlme)

#Variable étudiée : GainMasse
# Variables explicatives : Traitement (fixe), Plante (aléatoire), LotOeuf (aléatoire)
GainMasse<- data$GainMasse
Traitement<- as.factor(data$Traitement)
Plante <- as.factor(data$Plante)
LotOeuf <- as.factor(data$LotOeuf)

#Exploration des données omise pour l'annexe

#Modélisation statistique
modele <- lme(GainMasse~Traitement,random=list(~1|Plante, ~1|LotOeuf),data=data)
anova(modele)
summary(modele)
#non respect de la normalité, transformation de la variable

modele <- lme(log(GainMasse)~Traitement,random=list(~1|Plante, ~1|LotOeuf),data=data)
anova(modele)
summary(modele)
#transformation log ayant un meilleur AIC que transformation racine, et permettant de vérifier
les postulats de normalité et d'homoscédasticité

#Validation du modèle
#1.Normalité des résidus, méthode visuelle + test statistique (shapiro)
par(mfrow=c(1,2))
hist(residuals(modele), col='red', xlab='Valeurs des résidus', ylab='Effectifs')
qqnorm(residuals(modele), col='red',pch=16)
qqline(residuals(modele))

shapiro.test(residuals(modele))

#2. Homogeneité des variances, méthode visuelle + test statistique (bartlett)
par(mfrow=c(2,2))
plot(residuals(modele)~fitted(modele, col='red', pch=16, xlab = "Valeurs ajustées",ylab =
"Residus")
abline(h = 0, v = 0, lty = 2)

boxplot(residuals(modele)~ Traitement, varwidth = TRUE, ylab = "Résidus", xlab =
"Traitement")
abline(h = 0, v = 0, lty = 2)

bartlett.test(residuals(modele), g=Traitement)
```



## Annexe V - Script de l'analyse de la durée du stade larvaire via un GLMM de loi gamma

```
# Définition de l'espace de travail et jeu de données
setwd("chemin d'accès au fichier")
library(readxl)
data <- read_excel("nom du fichier.xlsx")
str(data)

library(lme4)

#Variable étudiée : Nb_jours_avant_mue
# Variables explicatives : Traitement (fixe), Plante (aléatoire), LotOeuf (aléatoire)
Nb_jours_avant_mue <- data$Nb_jours_avant_mue
Traitement <- as.factor(data$Traitement)
Plante <- as.factor(data$Plante)
LotOeuf <- as.factor(data$LotOeuf)

#Exploration des données omise pour l'annexe

#Modélisation statistique
modele <- glmer(Nb_jours_avant_mue ~ Traitement +(1|Plante) +(1|LotOeuf),
family=Gamma(link=identity))
drop1(modele,test='Chi')
summary(modele)
```





## Annexe VI - Script de l'analyse des concentrations en phytohormones des échantillons via une ANOVA à un (A) ou deux facteurs (B)

```
# Définition de l'espace de travail et jeu de données
setwd("chemin d'accès au fichier")
library(readxl)
data <- read_excel("nom du fichier.xlsx")
str(data)

#Variable étudiée : Concentration (pour la phytohormone étudiée)
# Variables explicatives : Traitement (fixe), Temps (fixe)
Traitement<-as.factor(data$Traitement)
Plante<-as.factor(data$Plante)
Temps<-as.factor(data$Temps)
Concentration <- data$Concentration

#Exploration des données omise pour l'annexe

#Modélisation statistique
#A, ANOVA à un facteur lorsque la phytohormone est quantifiable pour un seul pas de temps
(le temps n'est alors plus un facteur)
modele <- lm(Concentration~Traitement,data=data)
anova(modele)
#transformation de la variable pour respecter la normalité et l'homoscédasticité (cf Annexe IV
pour le script permettant la vérification ce ces postulats), ici transformation avec la fonction
racine carrée
modele <- lm(sqrt(Concentration)~Traitement,data=data)
anova(modele)

#B, ANOVA à deux facteurs lorsque la phytohormone est quantifiable pour plusieurs pas de
temps
modele <- lm(Concentration~Traitement+Temps+Traitement:Temps,data=data)
anova(modele)
#suppression de l'interaction (non significativité de celle-ci)
modele <- lm(Concentration~Traitement+Temps,data=data)
anova(modele)

#transformation de la variable pour respecter la normalité et l'homoscédasticité avec la fonction
racine carrée
modele <- lm(sqrt(Concentration)~Traitement+Temps,data=data)
anova(modele)

#Comparaison multiple, lorsque facteur Temps significatif (arrivé pour l'OPDA)
library(multcomp)
library(lsmmeans)
resultat<-lsmmeans(mod1,~Temps)
pairs(regrid(resultat))
contrast(regrid(resultat),"pairwise")
```



## **Annexe VII - Script de l'analyse du temps passé sur les plantes via un GLMM de loi gamma**

```
# Définition de l'espace de travail et jeu de données
setwd("chemin d'accès au fichier")
library(readxl)
data <- read_excel("nom du fichier.xlsx")
str(data)

library(lme4)

#Variable étudiée : Temps
# Variables explicatives : Traitement (fixe), Sexe (fixe)
Temp <- data$Temps
Traitement<- as.factor(data$Traitement)
Sexe<- as.factor(data$Sexe)

#Exploration des données omise pour l'annexe

#Modélisation statistique
modele <- glmer(Temps ~ Temps~Sexe+Traitement+Sexe:Traitement,
family=Gamma(link=identity))
drop1(modele,test='Chi')
#interaction non significative, on la supprime

modele <- glmer(Temps ~ Temps~Sexe+Traitement, family=Gamma(link=identity))
drop1(modele,test='Chi')
summary(modele)
```



## **Annexe VIII - Script du test de choix des punaises via un test du $\chi^2$**

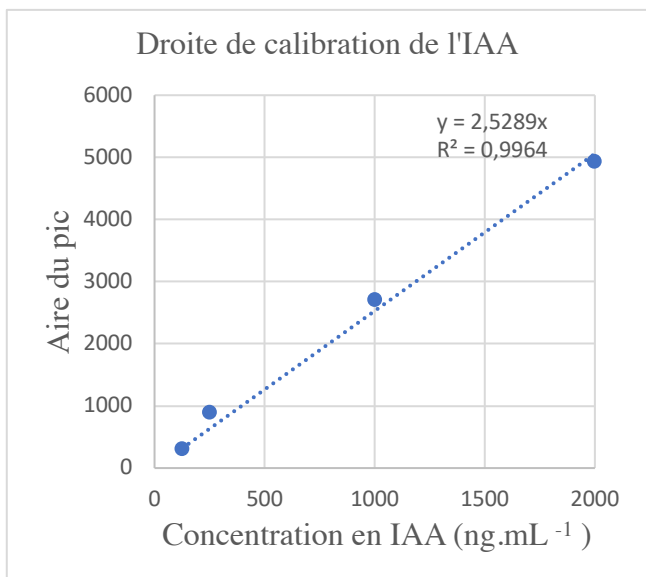
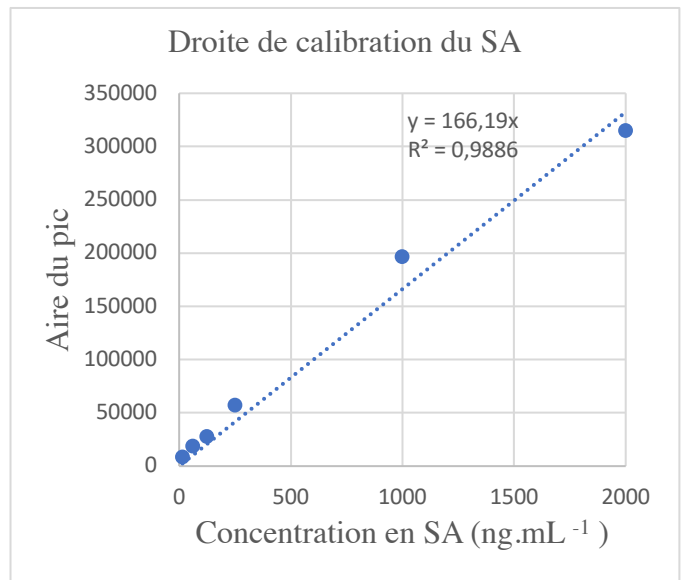
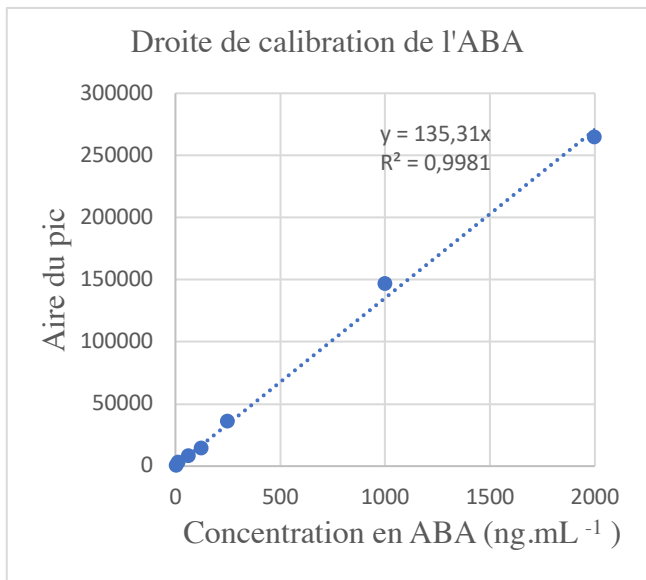
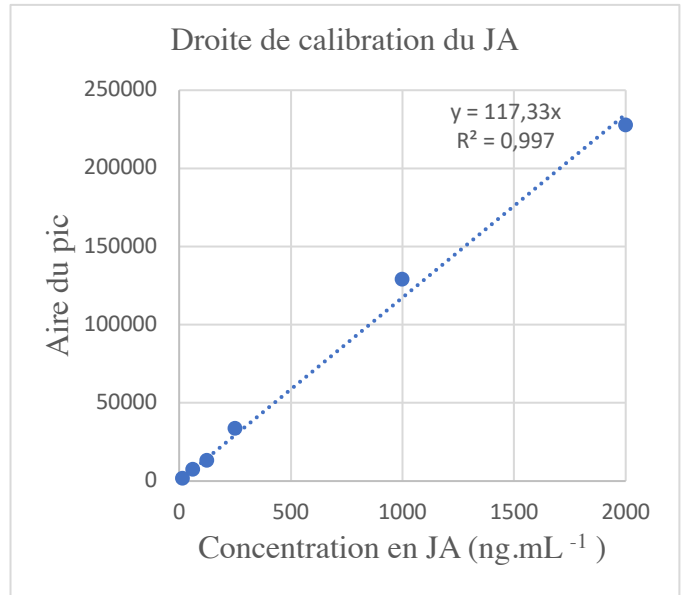
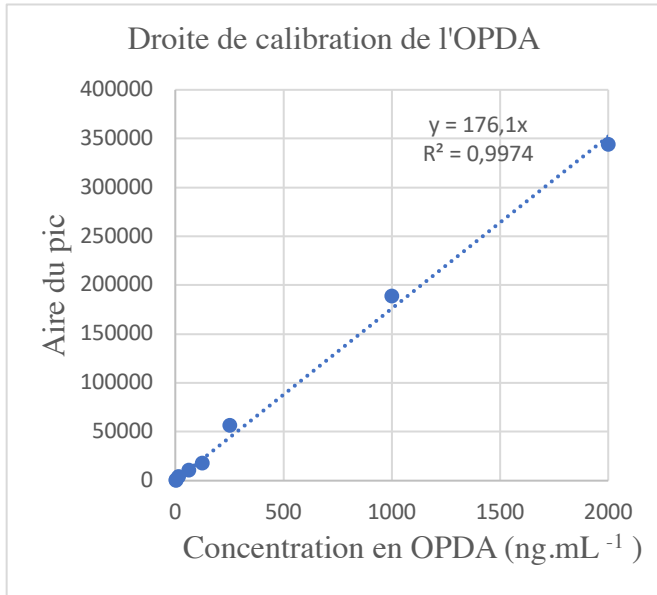
```
choix <- c(a,b) # a et b: le nombre de punaises allant sur la plante de l'une et l'autre modalité
```

```
# Test du  $\chi^2$ 
```


```
resultat<- chisq.test(choix, p = c(1/2, 1/2)) # avec p les proportions normalement attendues  
resultat
```



## Annexe IX - Droites de calibration des différents standards de phytohormones





	Diplôme : Ingénieur de l'Institut Agro Rennes-Angers Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : Protection des Plantes et Environnement appliquée à l'Horticulture (PPEH) Enseignant référent : Nicolas CHEN
Auteur(s) : Solène TREHIOU  Date de naissance* : 21/04/1999	Organisme d'accueil : Gembloux Agro-Bio Tech - Université de Liège  Adresse : Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux (Belgique)
Nb pages : 23                      Annexe(s) : 9	
Année de soutenance : 2022	Maître de stage : Lisa IANNELLO
Titre français : Évaluation du potentiel d'une rhizobactérie bénéfique et d'un champignon endophyte à induire les défenses des plantes contre la punaise invasive <i>Halyomorpha halys</i> Titre anglais : Evaluation of the potential of a beneficial rhizobacterium and an endophytic fungus to induce plant defenses against the invasive stink bug <i>Halyomorpha halys</i>	
Résumé (1600 caractères maximum) : La punaise diabolique, <i>Halyomorpha halys</i> (Stål, 1885), est un ravageur hautement polyphage causant de larges pertes économiques. Les stratégies de gestion de l'insecte reposent essentiellement sur l'utilisation d'insecticides à large spectre. Cependant, les méthodes alternatives sont de plus en plus étudiées en raison de l'évolution de l'agriculture vers un modèle plus durable. Le renforcement des défenses des plantes par l'utilisation micro-organismes bénéfiques, largement étudié pour la lutte contre les agents pathogènes gagne en importance pour la lutte contre les insectes phytophages. Dans ce contexte, cette étude a évalué le potentiel de la rhizobactérie favorisant la croissance des plantes (PGPR) <i>Bacillus velezensis</i> FZB42 et du champignon endophyte <i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF 4556 pour la lutte contre <i>H. halys</i> . Le traitement avec la PGPR a entraîné une augmentation de la mortalité mais n'a pas impacté le développement des larves. Cependant, cela n'a pas pu être mis en relation avec une réponse défensive plus accentuée des plants traités, même si une tendance de surproduction de l'acide 12-oxo-phytodiénoïque est observable après l'attaque des punaises. La forte variabilité des résultats et le seuil de détection trop élevé des autres phytohormones étudiées n'ont pas permis une caractérisation claire des voies de défenses induites. Le traitement avec <i>M. brunneum</i> n'a quant à lui eu aucun effet sur les paramètres biologiques de <i>H. halys</i> . Enfin, les deux micro-organismes étudiés n'ont induit ni comportement d'évitement ni comportement d'attraction des punaises.	
Abstract (1600 caractères maximum) : The brown marmorated stink bug, <i>Halyomorpha halys</i> (Stål, 1855), is a highly polyphagous pest species causing large economic losses. Insect management strategies are essentially based on the use of broad-spectrum insecticides. However, alternative methods are increasingly being studied due to the progress of agriculture towards a more sustainable model. The priming of plant defenses through the use of beneficial microorganisms, widely studied for pathogen control, is gaining importance for the control of phytophagous insects. In this context, this study evaluated the potential of inoculation of <i>Vicia faba</i> with the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) <i>Bacillus velezensis</i> FZB42 and with the endophytic fungus <i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF 4556 for the control of <i>H. halys</i> . Treatment with PGPR resulted in increased mortality but did not impact larval development. However, this could not be related to a more pronounced defensive response of treated plants, even if a tendency of overproduction of 12-oxo-phytodiénoic acid is perceptible after the attack of stink bugs. The high variability of the results and the too high detection threshold of the other phytohormones studied did not allow a clear characterization of the induced defense pathways. On the other hand, treatment with <i>M. brunneum</i> had no effect on the biological parameters of <i>H. halys</i> . Finally, treatment of plants with the two microorganisms studied did not induce avoidance or attraction behavior of stink bugs.	
Mots-clés : <i>Halyomorpha halys</i> , punaise, biologie, <i>Bacillus velezensis</i> , <i>Metarhizium brunneum</i> , PGPR, champignon endophyte, defense des plantes, phytohormones, comportement Key Words: <i>Halyomorpha halys</i> , stink bug, biology, <i>Bacillus velezensis</i> , <i>Metarhizium brunneum</i> , PGPR, endophytic fungus, plant defense, phytohormones, behavior	

\* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires