



## Projet de thèse CIFRE avec la société La Compagnie des Amandes sur l'écologie chimique de la guêpe de l'amande, *Eurytoma amygdali*

### Titre :

Identification de la kairomone attractive pour le ravageur de l'amandier *Eurytoma amygdali* (guêpe de l'amande) en vue de la mise au point d'une lutte de biocontrôle par piégeage massif

### Contacts pour candidature :

Merci d'envoyer lettre de motivation et CV à :

Philippe LUCAS, encadrant ([philippe.lucas@inrae.fr](mailto:philippe.lucas@inrae.fr), INRAE, [UMR iEES](#) à Versailles)

Michael STAUDT, co-encadrant ([michael.staudt@cefe.cnrs.fr](mailto:michael.staudt@cefe.cnrs.fr), CNRS, [UMR CEFE](#) à Montpellier)

### Déroulement de la sélection du doctorant :

La sélection du doctorant doit avoir lieu courant avril pour un dépôt en mai du dossier de thèse CIFRE à l'ANRT par la société La Compagnie des Amandes qui finance une partie du projet. L'accord de l'ANRT devrait être disponible en septembre pour un début de doctorat en octobre ou novembre.

### Lieu de travail :

La 1<sup>ère</sup> année de thèse sera plus spécifiquement encadrée par Michael STAUDT au CEFE de Montpellier et impliquera des travaux en laboratoire et des collectes d'effluves sur le terrain (domaine INRAE d'Amarine à Bellegarde, près de Nîmes). Les 2 années de thèse suivantes seront encadrées par Philippe LUCAS (UMR iEES) et se dérouleront à INRAE de Versailles. Les travaux sur le terrain (collectes d'effluves et d'insectes) seront effectués en interaction avec Henri Duval ([Unité GAFL](#), INRAE Avignon).

### Contexte et objectifs du projet :

*Eurytoma amygdali* Enderlein est un hyménoptère ravageur de l'amandier. La biologie de cet insecte est bien décrite <sup>[1-3]</sup>. Cet insecte présente une seule génération annuelle. Les femelles pondent leurs œufs dans les jeunes amandes au printemps et la larve se développe dans le fruit qui reste accroché à l'arbre jusqu'au printemps suivant. Pendant la ponte, la femelle dépose une phéromone anti-oviposition qui empêche les autres femelles de pondre dans une amande déjà infectée <sup>[4]</sup>.

Les seuls moyens efficaces de lutte contre ce ravageur requièrent l'utilisation d'insecticides. Les recommandations de la réduction de leur utilisation nécessitent la recherche de méthodes alternatives de lutte contre cet insecte ravageur. Il n'existe à ce jour aucune méthode de biocontrôle efficace permettant un développement durable de la culture d'amandes biologiques en France.

La mise en évidence d'une kairomone émise par l'amandier et qui attire les femelles présente de ce point de vue un intérêt majeur. A la différence des mâles, les femelles sont attirées par les composés volatils émis par les fleurs et les amandes vertes <sup>[2,5]</sup>. Ces composés ont donc une activité kairomonale mais ils n'ont pas été identifiés. En revanche, les composés émis par les parties végétatives de l'amandier ne sont pas attractifs.

L'objectif de ce projet de thèse est d'exploiter ces résultats en identifiant les kairomones responsables de l'attraction des femelles d'*E. amygdali* puis en élaborant un mélange attractif qui pourra servir ultérieurement pour un piégeage massif dans les vergers des femelles de ce ravageur.

## **Projet de recherche :**

Le projet est organisé en 3 grandes tâches correspondant aux trois années de la thèse et qui nécessitent d'avoir les amandiers aux bons stades phénologiques (début de floraison jusqu'à la production des amandes vertes) puis de disposer des adultes d'*E. amygdali*.

### **1- Analyse et quantification des composés organiques volatils émis par l'amandier**

La 1<sup>ère</sup> année de la thèse consistera i) à initier la caractérisation de la nature et mesurer les quantités des composés organiques volatils (COV) émis par l'amandier et ii) préparer un grand nombre d'extraits de collectes d'effluves qui serviront aux tests d'électrophysiologie (partie 2) puis d'analyse du comportement (partie 3).

Des collectes d'effluves émis seront effectuées à partir de jeunes arbres en pot conservés en serre (au CEFE, Montpellier) et d'arbres cultivés en plein champ (Domaine INRAE d'Amarine). Les expériences sur le terrain débiteront dès que la floraison commence et se poursuivront tant que les fruits des arbres cultivés en plein champ sont au stade de développement vulnérable aux attaques d'*E. amygdali*.

Les émissions de COV des fleurs, du feuillage et des fruits intacts seront recueillies sur adsorbant par collectes statiques et dynamiques en conditions environnementales de lumière, température, humidité et concentration en CO<sub>2</sub> physiologiquement réalistes afin de limiter les émissions artéfactuelles de COV. Le bouquet de COV peut présenter de fortes oscillations temporelles qui sont potentiellement importantes pour la perception des insectes. Des expériences de suivi des émissions de COV seront donc menées sur le long terme en plus des mesures ponctuelles.

Les COV émis par les feuilles, fleurs et fruits seront analysés par 3 techniques :

- La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) pour analyser les COV accumulés dans des cartouches d'adsorbants.
- L'utilisation de fibres de microextraction en phase solide (SPME) qui est plus adaptée pour les mesures de composés peu volatils et très polaires.
- La spectrométrie de masse à temps de vol avec une source d'ionisation par transfert de proton (PTR-TOF-MS) pour mesurer les variations temporelles d'émission de COV.

### **2- Identification des COV détectés par les femelles d'*E. amygdali***

La 2<sup>ème</sup> année de thèse aura pour objectif de déterminer quels COV sont susceptibles d'avoir un rôle de kairomone pour les femelles d'*E. amygdali*.

La première étape sera d'évaluer la détection par les femelles des COV émis par le feuillage intact, les fleurs et les fruits de l'amandier. Cette mesure se fera par électroantennographie (EAG). Une fois l'activité globale des extraits de COV établie, la mesure de la détection de leurs constituants individuels sera effectuée en couplant la GC avec l'EAG. Le couplage GC-EAG est une technique de choix pour l'identification des composés biologiquement actifs dans un mélange complexe. Les résultats obtenus par EAG seront complétés si nécessaire par des enregistrements monosensillaires, plus résolutifs et sensibles.

L'identification chimique des COV réalisée au CEFE Montpellier (partie 1) sera axée sur les composés actifs en EAG. Les COV de synthèse biologiquement actifs seront achetés s'ils sont disponibles commercialement, sinon il faudra les faire synthétiser. Ils seront testés en EAG pour établir les courbes dose-réponse et déterminer les seuils de détection de ces composés. Ces études fourniront un panel de COV de synthèse à tester sur le comportement des femelles.

### **3- Identification des COV avec une activité kairomonale pour les femelles d'*E. amygdali***

La 3<sup>ème</sup> année de thèse portera sur l'évaluation par olfactométrie de l'attractivité des COV de l'amandier pour les femelles d'*E. amygdali*. L'objectif final sera de définir le mélange de composés le plus efficace pour attirer les femelles et le plus simple par le nombre de ses constituants.

Comme en électrophysiologie, les premiers tests seront effectués en utilisant les extraits récoltés à partir de fleurs et d'amandes vertes et déclenchant les meilleures réponses en EAG (partie 2). Ces extraits normalement attractifs pour les femelles permettront de mettre au point les conditions expérimentales d'utilisation des olfactomètres. Deux approches complémentaires seront suivies pour identifier un mélange connu de COV à activité kairomonale :

- L'extrait le plus attractif en olfactomètre sera fractionné et l'attractivité de chacune des fractions éluées sera mesurée. Ce processus sera reproduit jusqu'à ce qu'aucune sous-fraction ne reproduise l'attractivité pour les femelles du mélange complet.
- Un mélange des composés actifs en EAG de la fraction attractive sur le comportement sera préparé et son attractivité sera comparée aux extraits complets et à la fraction la plus active sur le comportement des femelles. La reconstitution des mélanges artificiels sera effectuée selon les proportions naturelles d'émission de leurs constituants (cf partie 1).

A terme, ces travaux doivent fournir une liste de COV de l'amandier attractifs pour les femelles d'*E. amygdali* et un mélange de synthèse attractif qui pourra ensuite être testé sur le terrain pour le piégeage massif des femelles.

### Projet connexe

L'analyse de la composition de la phéromone anti-oviposition déposée par les femelles lors de la ponte<sup>[4]</sup> pourra faire l'objet d'un sous-projet spécifique dans le cadre de cette thèse. Il s'agira d'extraire cette phéromone à partir d'amandes contaminées et d'en analyser la composition par GC-MS, comme évoqué pour l'identification des COV dans la partie 1. Cette phéromone est détectée par voie gustative et pas olfactive car les amandes contaminées ont la même attractivité à distance pour les femelles que les amandes non contaminées. Tout comme la kairomone, l'utilisation de phéromone anti-oviposition présente un fort potentiel pour lutter efficacement contre la guêpe de l'amandier.

### Références

- <sup>[1]</sup> Plaut HN (1972) On the biology of the immature stages of the almond wasp, *Eurytoma amygdali* . End. (Hym. Eurytomidae) in Israel. *Bull. Entomol. Res.* 61:681-687.
- <sup>[2]</sup> Plaut HN, Mansour F (1973) Studies of the behaviour, dispersal, and damage potential of the almond wasp, *Eurytoma amygdali*. *Entomol. Exp. Appl.* 16:415-421.
- <sup>[3]</sup> Talhouk AS (1977) Contributions to the knowledge of almond pests in East Mediterranean countries. V. The fruit-feeding insects, *Eurytoma amygdali* End, and *Anarsia lineatella* Z. *Ang. Entomol.* 83:145-154.
- <sup>[4]</sup> Kouloussis NA, Katsoyannos BI (1991) Host discrimination and evidence for a host marking pheromone in the almond seed wasp, *Eurytoma amygdalus*. *Entomol. Exp. Appl.* 58:165-174.
- <sup>[5]</sup> Kouloussis NA, Katsoyannos BI (1994) Adult response of the almond seed wasp, *Eurytoma amygdali*, to chemicals from its host and certain nonhosts. *Entomol. exp. appl.* 73(3):211-220.