

EVALUATION DE LA REPONSE DE TROIS ESPECES D'INSECTES NUISIBLES A UN PRODUIT REPULSIF A BASE DE PLANTES

Burel Anne¹, Ronan Dao¹, Benoit Lapeyre², Lise Roy², Pierre Chicoteau¹

¹ NOR FEED SAS, 3 rue Amedeo Avogadro, 49 070 BEAUCOUZE

² CEFE, Equipe Interactions Biotiques, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier

anne.burel@norfeed.net

RÉSUMÉ

Les arthropodes ont un impact économique et sanitaire sur la production des aliments pour animaux et les animaux d'élevage. Certains de ces ravageurs s'attaquent à l'aliment mais aussi certains d'entre eux sont adaptés à la vie en bâtiments d'élevage de volailles où ils engendrent des pertes économiques importantes. Le produit testé est un produit à base de citronnelle (*Cymbopogon nardus*), de clou de girofle (*Eugenia caryophyllus*), d'origan (*Oreganum vulgare*) et d'extraits d'agrumes, qui a déjà démontré un effet répulsif envers le pou rouge des poules. Afin d'évaluer le potentiel de ce produit pour de nouvelles applications, une étude pilote a été menée afin de déterminer son effet sur des insectes problématiques en denrées stockées. Dans un premier temps, la capacité de certains insectes à détecter les molécules volatiles émises par ce produit a été mesurée par électroantennographie (EAG). Cette partie de l'étude a été menée sur des arthropodes d'importance économique et sanitaire : deux ténébrions (le ver de farine, *Tenebrio molitor*, et le petit ténébrion *Alphitobius diaperinus* (coléoptères)), une mouche du genre *Sarcophaga*). Des réponses électriques significatives ont été enregistrées chez les trois espèces. Cela a permis d'établir la capacité de détection d'au moins une partie des molécules volatiles émises par le produit chez les trois espèces testées. La seconde partie de l'étude visait à déterminer si l'effet du produit détecté était de type repoussant ou attractif chez l'une des espèces testées : *T. molitor*. Les résultats montrent un potentiel intéressant à 200 ppm.

ABSTRACT

Evaluation of the response of three insects pest to a natural repellent

Arthropods have economic and health impact on feed animal production and livestock. Some of these pests downgrade feed but also, some of them are adapted to live in poultry buildings where they cause significant economic losses. The tested product in this study is made from lemongrass (*Cymbopogon nardus*), clove (*Eugenia caryophyllus*), oregano (*Oreganum vulgare*) and citrus extracts, which has already shown a repellent effect against red mite. In order to evaluate the potential of this product for new applications, a pilot study was conducted to determine its effect on storage pest. Firstly, the ability of some insects to detect volatile molecules emitted by this product was measured by electroantennography (EAG). This first study was conducted on economic and health importance's arthropods: two tenebrio (the mealworm, *Tenebrio molitor*, and the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera), a fly of the genus *Sarcophaga*). Electrical significant responses were registered on three insect species selected in this study. This first study only showed the ability of insects to detect at least part of the compounds of this product olfacti, but didn't determine if this effect was repulsive or attractive. This is why a second step was set up to determine the nature of this effect. In this second study the objectives was to determine if the effect was repulsive or attractive on one tested species previously : *T.molitor*. Results had showed an interesting potential at 200 ppm.

INTRODUCTION

Le contrôle des arthropodes est un problème majeur dans le secteur agricole (Klys et al. 2017) autant au niveau des productions animales que végétales. Il s'agit principalement d'acariens et d'insectes. Parmi les insectes, on dénombre plus de 1660 espèces nuisibles s'attaquant aux récoltes pendant leur stockage (Kłys, Malejky, & Nowak-Chmura, 2017).

Les productions animales sont elles aussi exposées aux conséquences négatives des arthropodes. Le coléoptère *Alphitobius diaperinus* est l'insecte le plus répandu dans les élevages de volailles. Peu avant la nymphose, les larves cherchent à s'isoler dans un matériau tel que le bois ou l'isolation des bâtiments, entraînant des dommages importants sur les bâtiments (Dinev, 2013; Rezende et al., 2009).

En élevage de volailles, des insectes comme les mouches peuvent être problématiques en élevage. Elles engendrent un inconfort pour les éleveurs et les animaux. Leurs souillures favorisent le déclassement des œufs et entraînent certains risques sanitaires pour les animaux en augmentant le risque de la transmission des pathogènes (Lubac, 2007).

D'autre part, le pou rouge des poules *Dermanyssus gallinae*, engendre des problèmes divers en élevage (baisse de rendement, déclassement des œufs, réservoir de salmonelles...). Pour accomplir son cycle de vie et se développer, des repas de sang sont pour lui indispensables. Par conséquent, décourager l'acarien d'accéder à la source de sang en agissant directement sur l'hôte, par le biais de l'alimentation est susceptible de permettre un contrôle significatif.

L'impact d'un répulsif contre les acariens composés de citronnelle (*Cymbopogon nardus*), de girofle (*Eugenia caryophyllus*), d'origan (*Oreganum vulgare*) et d'extraits d'agrumes, via l'alimentation, a été démontré à plusieurs reprises sur les poux rouges (El Adouzi et al. 2017). Ce produit d'origine naturelle modifiait significativement l'odeur de la poule, rendant son hôte significativement moins attractif (au moins passagèrement répulsif) pour l'acarien.

De manière à élargir la connaissance du spectre d'action possible de ce produit, les stimuli olfactifs induits par les composants du noyau aromatique ont été mesurés chez d'autres espèces d'insectes d'importance sanitaire ou économique : le ver de farine, *Tenebrio molitor*, et le petit ténébrion *Alphitobius diaperinus*, ainsi qu'une mouche du genre *Sarcophaga*. Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer l'activité biologique (attractivité/répulsivité) associée à la détection chez l'une des espèces concernées (*Tenebrio molitor*).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Détection des molécules olfactives par les insectes

La capacité des insectes à détecter les molécules volatiles issues de la forme concentrée du produit a été mesurée par électroantennographie (EAG) en laboratoire (figure 1). Cette méthode est communément utilisée en entomologie expérimentale. Cette technique, décrite par SYNTECH en 2004, est basée sur la découverte de Schneider (1957). Cette méthode électrophysiologique permet de déterminer quelles substances volatiles sont perçues par l'appareil olfactif des insectes constitué par l'antenne. Cette dernière est un appendice porteur de multiples structures sensorielles nommées sensilles. Bien que le mécanisme précis à l'origine du signal EAG demeure mal compris, on suppose que les signaux électriques des électroantennogrammes résultent des potentiels de récepteurs synchrones de nombreuses cellules sensorielles (les neurones présents à la base de différentes sensilles) (Schneider 1967).

La base de l'antenne est placée dans l'une des électrodes, l'extrémité dans la seconde, et le signal électrique est visualisé et enregistré au moyen d'un oscilloscope relié à un ordinateur. L'antenne est maintenue dans un flux d'air continu purifié au charbon et humidifié. Le test consiste à injecter ponctuellement dans le flux, une quantité fixe de molécule(s) volatile(s) à tester (bouffée ou « puff »), de manière à observer la réponse électrique éventuelle et enregistrer l'amplitude du signal. Entre deux tests, une période d'au moins 30 secondes en l'absence de bouffée est respectée pour permettre la récupération des récepteurs olfactifs.

Des contrôles ont été effectués sur chaque antenne, l'un par l'injection d'air pur (T-), l'autre avec un mélange de 40 molécules généralement utilisées au laboratoire CEFÉ (Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive) pour obtenir des stimuli chez les principaux arthropodes (T+) et un dernier témoin (T S+) connu pour générer un stimulus sur des insectes du même groupe taxinomique que l'espèce testée.

Les témoins positifs généraliste (T+) et spécifique (T S+) permettent de détecter l'éventuelle dégradation de l'antenne à tester, et de l'éliminer pour ne tester que des antennes fonctionnelles. Le témoin spécifique utilisé pour les ténébrions et les mouches est la molécule nonanal (dilué à 1/1000).

Le témoin T- permet d'établir la réponse des mécanorécepteurs, qui sont susceptibles d'être activés par l'accélération du flux durant le puff, et de la déduire de la réponse olfactive spécifique, normalement de plus grande ampleur.

Une description générale des résultats obtenus a été réalisée par des statistiques descriptives (moyennes et écarts types des variations de tension enregistrées). Des tests d'hypothèses ont permis ensuite de mesurer la significativité des différences observées : comparaison globale des médianes d'amplitude des réponses aux différents stimuli par espèce par le test de Kruskal-

Wallis et comparaison par paire de stimuli par le test de Mann-Whitney (témoin négatif vs test, témoins positifs vs test...).

1.2. Qualification de l'effet répulsif du produit *in vitro* sur *Tenebrio molitor*

L'évaluation du pouvoir répulsif du produit aromatique sur les insectes nuisibles de l'aliment est le préalable indispensable au processus de développement d'une nouvelle application. *T. molitor* a été choisi car il s'agit d'un des insectes nuisibles des produits stockés les plus communs en Europe. Le stade le plus nuisible de cet insecte étant la larve, il a été choisi de réaliser les expériences sur ce stade du cycle de vie.

Le protocole utilisé est adapté de la méthode de préférence de zone, décrite dans de nombreuses publications sur l'effet répulsif d'extraits de plantes contre des arthropodes (Cosimi et al., 2009; Hernandez-Lambrano et al., 2015; Kłys et al., 2017; Liang et al., 2013; Liu & Ho, 1999...). La méthode de préférence de zone consiste à proposer aux insectes deux sources d'odeurs dans une enceinte close et à observer leur répartition après un intervalle de temps.

Le produit a été testé à la dose recommandée par le fabricant du produit à 100 ppm, ainsi qu'à la dose de 200 ppm. Vingt larves de *T. molitor* ont été testées par boîte, sur un total de 27 réplicats.

Pour permettre une visualisation de l'évolution de la répartition en pourcentage par boîte, nous avons calculé un pourcentage de répulsion ou PR suivant You et al. (2015) :

$$PR = \frac{N_c - N_t}{N_c + N_t} * 100$$

Avec, au moment de la lecture :

- N_c : le nombre d'insectes présents sur le papier filtre contrôle
- N_t : le nombre d'insectes présents sur le papier filtre contenant le produit à tester

Le PR est positif quand le nombre d'insectes est plus important sur le papier filtre contrôle que sur le papier filtre imprégné du produit et vice-versa. La répartition des insectes est observée 2h et 4h après la mise en place du protocole. Cet intervalle a été défini en fonction des protocoles précédemment étudiés dans la littérature. Un test t de Student apparié (par boîte) a été appliqué à chacun des jeux de données obtenus (100ppm à T+2h et T+4h, 200ppm à T+2h et T+4h). Au préalable, l'absence d'écart significatif à une distribution normale des données a été vérifiée grâce au test de Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) et l'absence d'écart significatif à l'égalité des variances grâce au test de Fisher ($p > 0.05$).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Détermination de la capacité des insectes à détecter les molécules volatiles émises par le produit testé

Chaque espèce testée (5 individus par espèce) a réagi positivement à au moins un des composés volatiles du répulsif à base de composés végétaux. L'expérience a démontré une réponse électrophysiologique claire au cocktail de molécules volatiles émis par ce produit ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis). Chez toutes les espèces, l'amplitude médiane des réponses électriques à la molécule volatile induite par le répulsif et aux témoins positifs était significativement différente de celle de T- ($P < 0,05$; test de Mann Whitney par paire).

Ce test met en évidence la capacité des insectes à détecter au moins une partie des molécules volatiles émises par le produit (figure 2). Cette méthode ne permet pas de déterminer si le produit a un effet attractif ou répulsif sur les arthropodes et les insectes. Cependant, si l'on analyse la bibliographie, l'effet répulsif vis-à-vis de différents arthropodes de certaines huiles essentielles contenues dans cette formulation, telles que la citronnelle (*C. nardus*), le girofle (*E. caryophyllus*), l'origan (*O. vulgare*), ont été clairement démontrés (Soon Il, et al. 2004; George, et al. 2009). L'effet répulsif du présent produit a déjà démontré des effets sur le pou rouge et sur des mouches (El Adouzi et al. 2017, Labalette 2015).

2.2. Activité biologique du produit : est-il attractif ou répulsif ? Résultat des tests *in vitro*

A 100 ppm, aucun effet répulsif significatif n'est mis en évidence. A 200 ppm, dans la majorité des boîtes, un plus grand nombre de larves est observé sur le papier neutre 2 h après la mise en place des insectes dans les boîtes. Cette répartition se confirme également 4h après le début de l'expérience (figure 3). La plupart des boîtes présentent une majorité de larves sur le papier filtre neutre, confirmé par un test de student apparié significatif ($p < 0,05$). On conclut donc à un effet répulsif probable du produit sur *T. molitor* à une dose de 200 ppm dans nos conditions de laboratoire (figure 4).

Les résultats sur *T. molitor* à 200 ppm ont été obtenus sur un nombre de 27 réplicas de 20 individus dans chacune d'entre elles, soit un total de 540 individus. L'activité répulsive nécessite pour être déterminée avec certitude l'exclusion du contact direct avec la substance (Deletre et al. 2016). Le design expérimental ne permet pas d'exclure complètement un effet par contact (irritation gustative ou tactile), mais il permet de conclure au moins à un effet repoussant sur l'insecte à 200 ppm. Ces premiers résultats obtenus *in vitro* sont concordants avec certaines études. En effet, des études concernant des espèces du genre *Cymbopogon* suggèrent un effet repoussant sur différents arthropodes (Hernandez-Lambrano, Pajaro-Castro, Caballero-Gallardo, Stashenko, & Olivero-Verbel, 2015; Eun Hee Kim et al., 2003; J. S. Zhang et al., 2011).

La plupart des espèces du genre *Cymbopogon* présentent une activité insecticide ou répulsive, selon la dose et selon l'espèce d'insecte, notamment chez des insectes posant problème dans les denrées stockées. *Cymbopogon winthianus* a un effet acaricide à la dose de 12,7 µg/cm (Hernandez-Lambrano *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011).

Parmi les différents composés de l'huile essentielle de *Cymbopogon distans*, ceux qui montrent l'effet repoussant le plus marqué contre les insectes sont le (+)-citronellol et le *trans*-geraniol (Zhang *et al.*, 2011). Des effets repoussants des huiles essentielles de *Cymbopogon nardus* (citronnelle de Ceylan) ont été signalés contre *Oryzaephilus surinamensis* (charançon du riz) et *Sitophilus zeamais* (charançon du maïs) avec des doses efficaces à 50% déterminées à 0,3 et 0,4 µL/cm² respectivement. La citronnelle est également connue pour son effet repoussant contre les puces et d'autres insectes piqueurs (Hernandez-Lambrano *et al.*, 2015).

CONCLUSION

Le ver de farine, *Tenebrio molitor*, le petit ténébrion *Alphitobius diaperinus*, ainsi qu'une mouche du genre *Sarcophaga* sont capables de détecter des molécules volatiles émises par le produit liquide.

Les tests *in vitro* complémentaires sur *T. molitor* ont permis de déterminer un effet repoussant à une dose de

200 ppm en conditions de laboratoire. De plus le produit a déjà été démontré actif sur les mouches en bâtiments de poules (Labalette 2015) et répulsif vis-à-vis du pou rouge (El Adouzi *et al.* 2017). Ces éléments permettent donc de constituer un début de preuve quant à l'effet répulsif des molécules de ce produit sur certains arthropodes tel que *T. Molitor*. Dans le but de développer l'application « in feed » pour le contrôle de certains arthropodes nuisibles de l'aliment et de consolider ces premiers essais une étude similaire sur l'aliment complétement lui-même pourra être envisagée sur *T. molitor*. Les présents tests présentant l'effet extemporané, il serait intéressant de déterminer la durabilité de la répulsion induite par le produit : dans quelle mesure les populations d'insectes seront-elles repoussées par l'aliment complétement malgré le jeûne ? D'autres essais sur d'autres espèces nuisibles cibles pourront également être conduits afin d'affiner le spectre d'action. L'interaction avec d'autres solutions de contrôle des arthropodes pourra également être étudiée. En effet, la combinaison entre ce type de complémentation et des méthodes de lutte biologique (inoculation de prédateurs) ou physiques (ex. hypoxie) est également susceptible d'améliorer le contrôle de ces populations nuisibles.

REMERCIEMENTS

Les expérimentations EAG ont été réalisées à la "Plateforme d'Analyses Chimiques en Ecologie" (PACE), plateforme technique mutualisée du LabEx CeMEB (Montpellier).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arunraj, C., Thomas, S. K., & Nirdev, P. M., 2013. Journal of Biopesticides, 6(1), 84–86.
- Dinev, I., 2013. The darkling beetle A health hazard for broiler chicken production.
- Cosimi, S., Rossi, E., Cioni, P. L., & Canale, A. 2009. Journal of Stored Products Research 45(2), 125–132.
- Deletre E, Schatz B, Bourguet D, Chandre F, Williams L, Ratnadass A and Martin T 2016. Chemoecology 26(4), 127-142
- El Adouzi, M., Buatois, B., Lapeyre, B., Dormont, L., Bonato, O., & Roy, L. 2016. In 8th symposium of the (EUropean Association of ACarologists), Valencia, Espagne, Juillet 2016
- George D.; Smith T; Shiel R; Sparagano J O.; Guy H. 2009. Vet parasitol May 12;161(3-4):276-82.
- Hernandez-Lambrano, R., Pajaro-Castro, N., Caballero-Gallardo, K., Stashenko, E., & Olivero-Verbel, J., 2015. Journal of Stored Products Research, 62, 81–83.
- Kłysz, M., Malejky, N., & Nowak-Chmura, M., 2017. Journal of Stored Products Research, 74, 66–77.
- Labalette A. 2015. santé animal AVES e OVOS, n° 241
- Leffer, A. M., Kuttel, J., Martins, L. M., Pedroso, A. C., Astolfi-Ferreira, C. S., Ferreira, F., & Ferreira, A. J. P., 2010. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 10(5), 481–487
- Liang, Y., Li, J. L., Xu, S., Zhao, N. N., Zhou, L., Cheng, J., & Liu, Z. L. (2013). Journal Of Economic Entomology, 106(1), 513–519.
- Liu, Z. L., & Ho, S. H., 1999. Journal of Stored Products Research, 35(4), 317–328
- Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Colares, H. C., Campos, J. M., Dos Santos, M. H., Fernandes, F. L., Zanuncio, J. C. 2017. Bulletin of Entomological Research
- Rezende, S. R. F., Curvello, F. A., Fraga, M. E., Reis, R. C. S., Castilho, A. M. C., & Agostinho, T. S. P., 2009. Brazilian Journal of Poultry Science, 11(2), 121–127
- Schneider, D. (1957). Verh. Physiol. 40. 8-41
- Soon-Il K.; Jee-Hwan Y.; Jun-hyung T.; Young-Joon A. 2004. Veterinary Parasitology 120, 2004, 297–304
- Yang, K., You, C. X., Wang, C. F., Guo, S. S., Li, Y. P., Wu, Y., Du, S. S. , 2014. J Oleo Sci, 63-11

Figure 1. Principe de L'électroantennographie

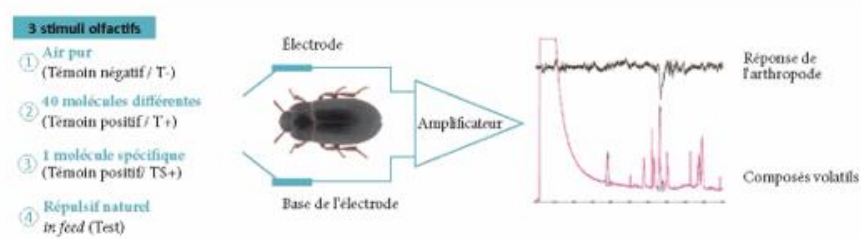


Figure 2. Boîtes à moustaches des amplitudes de réponse aux différents puffs. A. *Alphitobius diaperinus*, B. *Tenebrio molitor*, C. *Sarcophaga sp.* Les lettres a, b signalent les différences significatives avec $\alpha = 0,05$ selon le test Mann-Whitney réalisé par paire en guise de test post-hoc associé au test de Kruskal-Wallis. T-, témoin négatif, TS+, témoin positif, spécifique, T+ Témoin positif généraliste, et Test le produit testé

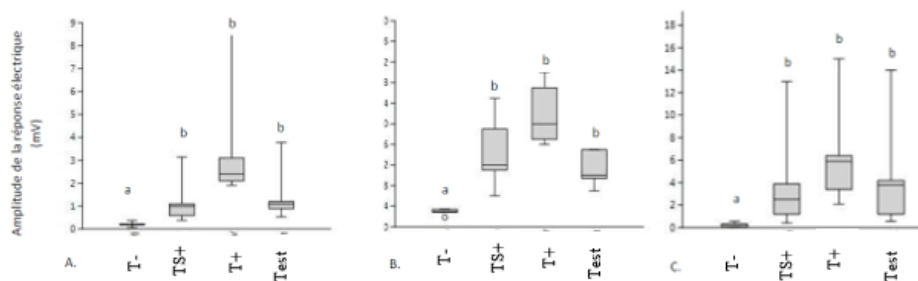


Figure 3. Photo de répartition de *T. Molitor* entre la zone neutre et zone traité (T 4h)



Figure 4. Répartition de *T. Molitor* entre le témoin et la zone contenant le produit testé à 200 ppm, test de student apparié ($p < 0,05$)

