

**Tree injection : une nouvelle technologie durable de protection des arbres contre les
insectes ravageurs**

TREE-INJECTION

Rapport de synthèse final période du 01/10/2018 au 31/12/2021

Numéro de convention

D31-1394



Résumé

Le projet Tree-injection avait pour but l'analyse de la faisabilité d'une nouvelle méthode de protection des arbres contre les deux principaux ravageurs en verger de pommiers et de poiriers : le puceron cendré du pommier (*Dysaphis plantaginea*) et le psylle du poirier (*Cacopsylla pyri*). Celle-ci se base sur l'injection d'une émulsion d'huile essentielle à activité insecticide directement dans le xylème de l'arbre. Elle présente de nombreux avantages, comme une diminution des doses à appliquer et donc des coûts, une rémanence plus importante que la simple pulvérisation d'huile et très peu de conséquences négatives pour l'environnement.

Afin de réaliser les objectifs de ce projet, le travail a été divisé en 4 Works-packages (WP): 1) Sélection des huiles, formulation et test d'efficacité des huiles en application directe, 2) Test de la phytotoxicité des huiles essentielles, 3) Test d'efficacité des traitements, 4) Test d'efficacité des traitements en verger expérimental.

A la fin du WP1, trois huiles ont été sélectionnées pour leur pouvoir insecticide contre les deux ravageurs (la cannelle de Chine, la menthe verte et le giroflier). La nano émulsion développée pour l'injection de ces trois huiles est composée de tween 20 comme surfactant, et d'EDTA pour augmenter sa diffusion dans l'arbre.

Le WP2 vise à identifier les mécanismes et doses éventuelles d'huiles essentielles menant à des phénomènes de phytotoxicité au sein du pommier. L'impact de l'huile de cannelle a été caractérisé en termes de stress et dégâts oxydatifs à haute dose. L'élicitation des défenses de la plante a également été mise en évidence à plus faible dose. La diffusion jusqu'aux feuilles des composés injectés a également été démontrée.

Le WP3, Dans le cadre de ce projet, le work package 3, visait à identifier l'impact de notre traitement sur les deux principaux ravageurs, mais aussi sur différents auxiliaires de culture. Les différentes expériences réalisées en laboratoire ont montré que l'injection d'une émulsion d'huile essentielle dans l'arbre modifie le comportement alimentaire du puceron et du psylle tuant ainsi une partie des individus présents sur l'arbre. Nous avons également démontré que l'utilisation d'huiles essentielles n'avait pas d'impact sur les auxiliaires de culture (parasitoïde, prédateur, ou pollinisateur).

En ce qui concerne les études de terrains en verger de pommier (WP4), le traitement a eu un impact sur la dynamique des populations de pucerons mais n'a pas permis de contrôler *D. plantaginea*. Des différences significatives ont été repérées en termes d'émissions de COV par l'ensemble des arbres, mais elles étaient associées à la variation saisonnière et non au traitement. L'augmentation des taux de substances actives a entraîné une phytotoxicité visuelle, une réduction de l'indice de performance et de la croissance des pommiers, ce qui a permis d'établir le taux d'application maximal. Le traitement n'a présenté aucun résidu dans les fruits ni aucun impact sur le rendement.

Cette étude met en évidence le manque d'adaptabilité des solutions efficaces en laboratoire aux conditions agronomiques et identifie les défis pratiques et les limitations qui doivent être abordés.

Introduction

L'objectif principal du projet est de mettre au point un système de protection des arbres contre les insectes et champignons ravageurs en arboriculture fruitière. Cette nouvelle méthode de lutte se fera grâce à l'injection d'huiles essentielles de plantes reconnues comme ayant une activité pesticide naturelle directement dans le xylème de l'arbre fruitier. Cette technique est déjà utilisée occasionnellement pour des injections d'insecticides directement dans le xylème des arbres à protéger. Cependant, dans ce cas, l'arbre et les fruits contiennent des résidus de pesticides. Par contre, le recours aux huiles essentielles revient à utiliser des composants naturels qui sont issus d'une longue coévolution entre plantes et insectes et qui protègent les plantes contre les infestations de ravageurs. Toutes les plantes n'ont pas développé les mêmes propriétés. La technique proposée consiste donc à utiliser les propriétés développées par certaines plantes pour en protéger d'autres. Il s'agit d'une voie nouvelle et originale en termes de protection à long terme des arbres fruitiers. De plus, en raison de son action à longue durée, ces injections pourraient offrir une solution élégante de protection des cultures sans dommages pour l'environnement. Ainsi, le projet s'inscrit dans un but global de réduction de l'utilisation des pesticides chimiques, d'une amélioration de l'environnement et de la création d'une gamme de fruits de qualité différenciée. L'étude va s'intéresser à l'arboriculture fruitière, et plus particulièrement la culture de pommiers et de poiriers. L'efficacité de la technique sera vérifiée en étudiant l'évolution des populations de deux ravageurs le puceron cendré (*Dysahis plantaginea*), pour le pommier et le psylle du poirier (*Carcopsylla pyri*) pour ce dernier. À noter qu'actuellement aucun moyen de lutte biologique n'existe pour lutter efficacement contre ces deux insectes. Ce projet répond, dès lors, à un impératif pour les arboriculteurs qui ont vu ces espèces progresser au fil des années. Si la méthode fonctionne, une méthode de protection écologique et durable sera mise au point et pourra s'étendre aux arbres en milieu urbain et aux essences dédiées à la production de bois.

Afin de réaliser les objectifs de ce projet, le travail a été divisé en 4 Works-packages :

N° du Works package	Intitulé
WP1	Sélection des huiles, formulation et test d'efficacité des huiles en application directe
WP2	Test de la phytotoxicité des huiles essentielles
WP3	Test d'efficacité des traitements
WP4	Test d'efficacité des traitements en verger expérimental

Work package 1, sélection des huiles, formulations et tests d'efficacité des huiles

Lors de la première année du projet, des tests sur milieux artificiels ont été effectués pour sélectionner les huiles essentielles ayant une action insecticide par ingestion sur le psylle du poirier et le puceron cendré du pommier. Afin de tester la toxicité de ces huiles, différentes émulsions composées d'un milieu nutritif pour nourrir l'insecte testé (©Viridaxis), de tween 20 pour l'émulsion et d'une huile essentielle à différentes concentrations ont été utilisées. Le dispositif est mis en place en condition stérile sous hotte à flux laminaire et se présente comme suit (Figure 1) : 500 μ L d'émulsion sont placés sur un support stérile et étalés en y apposant un morceau de parafilm étiré. Ce dispositif est ensuite placé au congélateur (-20°C) jusqu'à utilisation.

Milieu artificiel:

- Huile essentielle
- Tween 20
- Solution nutritive



Figure 1: Milieu artificiel

Les différents tests effectués, ont permis de sélectionner trois huiles pour leur capacité insecticide: la cannelle de Chine, la menthe verte et le giroflier.

Concernant la formulation des huiles, les résultats obtenus nous ont démontré la possibilité de réaliser une nano-émulsion stable à partir d'huiles essentielles et de tween 20. Cette formulation a de plus comme avantage d'être non phytotoxique et stable dans le temps. L'ajout d'EDTA, un agent anticatrisant pour la plante, permet une cinétique de diffusion plus rapide dans le système vasculaire de l'arbre.

Cependant certaines huiles n'ont pu être testées de cette manière car elles n'étaient pas compatibles avec l'utilisation d'un milieu artificiel, provoquant notamment des déchirures du parafilm et donc des fuites de la solution nutritive. Ces huiles pouvant montrer des propriétés intéressantes, il a été nécessaire de développer de nouveaux protocoles en utilisant des substrats plus naturels. Ces protocoles sont présentés dans la partie ci-après:

Agro-infiltration

Lors des tests de toxicité, certaines huiles n'ont pas pu être testées, car elles détruisaient le Parafilm®. Nous avons donc développé une nouvelle méthode pour pallier ce problème. La technique d'agro-infiltration consiste à faire rentrer de force une solution, à l'intérieur des organes d'une plante, dans notre cas, il s'agira des feuilles. La méthode consiste à plonger une feuille dans une solution, puis de créer une dépression à l'aide d'une pompe à vide (Figure 2) ce qui va provoquer l'évacuation des gaz contenus dans la feuille par les stomates. Le volume laissé vide par les gaz va ensuite être rempli par un volume équivalent de solution.

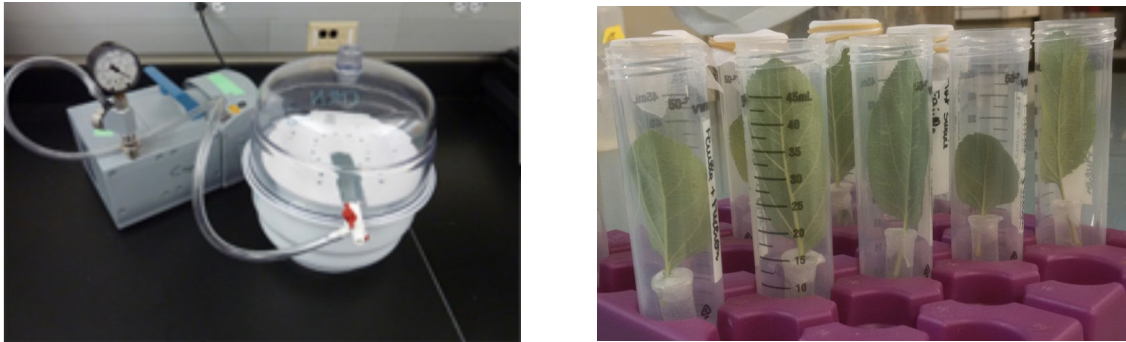


Figure 2: dispositif de pompe à vide utilisé pour l'agro-infiltration

Protocole d'injection dans les petits arbres

Tout d'abord, une aiguille seule (10 mm de long et de 0,4 mm de diamètre) a été utilisée pour percer la tige de la plante jusqu'au xylème à 2 cm du bas de la tige. Un Baxter® relié à une autre aiguille (L :10 mm, Ø : 0,4 mm) par un tuyau (L :300 mm) insérée dans le trou réalisé précédemment. De la colle chaude a ensuite été appliquée pour maintenir le dispositif en place. Du papier aluminium a été placé autour du Baxter® (Figure 3).

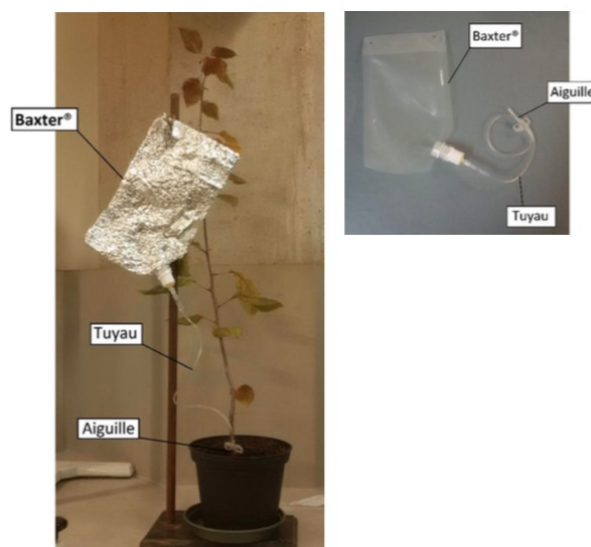


Figure 3: dispositif d'injection des émulsions d'huile essentielle dans les arbres

Ce dispositif est laissé en place pendant 24 h. L'inconvénient majeur de cette technique est que nous ne contrôlons pas la quantité d'émulsion qui va être absorbée par la plante. Le Baxter® a donc été pesé avant et après les 24h d'injection passive pour connaître exactement la quantité d'émulsion injectée à l'intérieur de la plante.

Injection en verger expérimental

Différents dispositifs sont disponibles sur le marché, notamment aux États-Unis (TreeCareScience ©, Arborjet ©, ArboSystems ©). Dans cette étude, le dispositif utilisé est un ENDOKIT Manual PRO © (Figure 9) acheté chez ENDOterapia Vegetal (Espagne) (Figure 4).

Ce dispositif nécessite le forage d'un trou avant l'injection. Les paramètres à régler avant l'injection ont été déterminés à partir d'études antérieures sur le sujet et selon le manuel d'utilisation de l'appareil. Voici la liste du volume d'injection et des paramètres :

- Profondeur et diamètre du trou : le trou a été percé à 60cm de hauteur sur le tronc à l'aide d'une mèche de 8mm de diamètre avec une perceuse. Tout d'abord, la couche extérieure de l'écorce a été délicatement grattée en utilisant une pression minimale et une faible vitesse de forage. Les résidus d'écorce ont ensuite été nettoyés, ce qui a permis de creuser le reste du trou sans être contaminé par la couche d'écorce extérieure. Le trou a ensuite été complété à vitesse plus élevée à une profondeur de 2 cm, soit la longueur d'un bouchon (plug). Les éclats de bois ont été retirés du trou autant que possible avant l'insertion du bouchon.
- Insertion du plug : le plug est poussé dans le trou à l'aide du dispositif d'insertion fourni avec l'ENDOKIT. Pour s'assurer que le bouchon a été entièrement poussé dans le trou, l'arrière du dispositif d'insertion a été légèrement martelé jusqu'au positionnement correct du bouchon. Le plug doit être entièrement inséré et la partie verte doit affleurer l'écorce de

l'arbre pour assurer une cicatrisation optimale. Le positionnement correct du plug permet à l'arbre de former un cal, ce qui accélère et facilite le processus de cicatrisation (Aćimović *et al.*, 2016).

- Injection : la solution à injecter a été versée dans le récipient. L'aiguille de l'injecteur a été insérée dans le bouchon. Après avoir positionné correctement l'aiguille, la solution a été injectée et l'aiguille a été retirée du bouchon après que le piston soit revenu à sa position initiale. L'injection nécessite la pression de la main sur le piston de la seringue, aucune pression supplémentaire n'est nécessaire.



Figure 4: Dispositif d'injection ENDOTerapia Vegetal pour arbre adulte

Work package 2, tests de la phytotoxicité des huiles essentielles

L'application des HE est soumise à une contrainte majeure, la phytotoxicité. Elles peuvent présenter des propriétés phytotoxiques pour les plantes non ciblées comme les cultures. Les HE les plus efficaces dans la lutte contre les ravageurs sont également phytotoxiques, et des précautions considérables sont nécessaires en ce qui concerne la formulation des produits. De nombreux paramètres déterminent cet impact, tels que le mode d'application (arrosage des racines, pulvérisation aérienne ou injection dans le système vasculaire), les organes végétaux visés, le stade phénologique (graine, plantule ou plante mature), l'état physiologique et la formulation du produit. La phytotoxicité peut être définie comme un impact négatif sur la croissance ou la santé des plantes et peut être liée à des dysfonctionnements cellulaires. L'altération physiologique peut être observée par des mesures intégratives du stress, par exemple sur l'appareil photosynthétique. Cependant, la détermination du site primaire d'action est beaucoup plus difficile. Il a été démontré que divers produits phytochimiques influencent plusieurs processus physiologiques de croissance et de développement dans la division cellulaire des plantes et l'élongation des racines. Les mélanges de composés végétaux naturels ont souvent de nombreux mécanismes d'action, ce qui les rend très efficaces pour agir sur le métabolisme primaire d'une plante. Tous les mécanismes impliqués

dans la phytotoxicité des HE ne peuvent pas être facilement interprétés individuellement. De nombreuses cibles moléculaires peuvent être impliquées telle que l'interaction/la perturbation des membranes, l'induction d'espèces réactives de l'oxygène/l'azote, la génotoxicité et la perturbation des microtubules, l'inhibition de la respiration mitochondriale ou de la photosynthèse et la régulation enzymatique ou des phytohormones. Il semble donc très important de mieux comprendre l'impact physiologique des HE sur les cultures végétales afin de concevoir des tests biologiques appropriés et des biopesticides efficaces. Cependant, même si certains processus semblent être inhibés de manière dose-dépendante, une concentration inférieure au seuil phytotoxique pourrait également stimuler la plante, un phénomène appelé biostimulation. Les nouvelles opportunités découlant de cette biostimulation et de l'élicitation des défenses seront également abordées dans ce workpackage.

Les premières mesures de suivi suite à différents traitements ont été effectuées par fluorescence chlorophyllienne et activité photosynthétique. Ces mesures ont permis de démontrer l'absence d'impact à faible dose sur l'appareil photosynthétique (rapport tree-injection n°1).

Par la suite des mesures de métabolites ont été effectuées afin de mieux comprendre si le stress était capable de modifier l'homéostasie cellulaire par la production de formes réactives de l'oxygène. En effet, l'accumulation phytotoxique de ces différents radicaux oxygénés peut entraîner la mort de la plante. Cependant, ils ont récemment été identifiés comme des acteurs essentiels de la réponse au stress et leur rôle comme messager secondaire est maintenant clairement établi. Le rapport glutathion réduit sur la forme total GSH/(GSH+GSSG) peut être utilisé comme indicateur du stress oxydatif. Le GSH peut être oxydé en GSSG par de nombreux oxydants (espèces réactives de l'oxygène/azote) et par des radicaux libres. Le glutathion est également un tampon redox et agit dans l'homéostasie redox qui a pour fonction de moduler l'induction de processus de défense. Ces résultats ont permis de démontrer que l'injection d'huiles essentielles pouvait bel et bien mener à un stress oxydatif (rapport tree-injection n°2).

Les dégâts oxydatifs potentiel tel que la peroxydation des lipides et la dégradation des pigments photosynthétiques a été étudiés, à travers la quantification du malondialdéhyde (MDA), de la chlorophylle a & b et enfin des caroténoïdes. Leur implication dans la régulation de l'expression génique est observée dans la réponse au stress. Dès lors afin de déterminer le potentiel d'activation des défenses des mesures de niveaux d'expressions géniques (par RT PCR) ont été effectuées pour les principales voies de défense (barrière chimique/physique et signalisation hormonale) pour 29 gènes afin de déceler les propriétés d'élicitation potentielles de l'HE de cannelle (rapport tree-injection n°3).

En conclusion, la phytotoxicité potentielle de l'HE de *C. cassia* (CEO) sur le pommier (*Malus domestica*) a été étudiée en termes de burst oxydatif (état redox du glutathion) et de dommages (malondialdéhyde). Aux concentrations de 2 % de CEO, la teneur en glutathion réduit des feuilles chute après 30 minutes, ce qui illustre un burst oxydatif rapide/fort. En ce qui concerne les dommages oxydatifs, le malondialdéhyde augmente significativement 24

heures après l'application. L'induction de la défense des plantes a été précédemment suspectée après l'application de trans-cinnamaldéhyde (composé principal de l'HE). Par conséquent, le potentiel éliciteur a été étudié par qRT-PCR sur le niveau d'expression de 29 gènes des principales voies de défense (protéine PR, stress oxydatif, modification pariétale). L'analyse multivariée et l'augmentation du niveau d'expression (log2) suggère l'induction d'une résistance systémique. Ainsi, la présente recherche illustre la phytotoxicité dose-dépendante de CEO en termes de peroxydation lipidique. Les données transcriptomiques illustrent les propriétés élicitrices de CEO. Ces résultats peuvent aider à concevoir des stratégies de lutte contre les ravageurs en tenant compte de leurs risques (phytotoxicité) et de leurs avantages (activation de la défense combinée à des propriétés biocides directes).

Work package 3, tests d'efficacité des traitements

Dans le cadre de ce projet, le work package 3, visait à identifier l'impact de notre traitement sur les deux principaux ravageurs en verger de pommier et de poirier (le puceron cendré du pommier, *Dysaphis plantaginea*, et le psylle du poirier, *Cacopsylla pyri*), mais aussi sur différents auxiliaires de culture.

Impact de l'injection sur le comportement alimentaire de *D. plantaginea* et *C. pyri*

Afin de voir si l'injection d'une émulsion d'huile essentielle de cannelle modifie la façon dont les insectes se nourrissent, nous avons utilisé la technique de l'électropénétrographie (EPG). C'est une technique permettant d'étudier l'interaction entre les insectes piqueurs-suceurs et leur plante hôte. Nous avons ainsi pu démontrer les effets de notre traitement sur le comportement alimentaire du puceron cendré du pommier et du psylle du poirier, en comparant leurs comportements sur des arbres traités ou non traités.

Notre étude montre que le traitement, par injection de l'émulsion d'huile essentielle de cannelle à 1%, a induit une perturbation du comportement alimentaire chez *D. plantaginea* ainsi que chez *C. pyri* et pourrait donc potentiellement avoir un impact sur le développement des populations de pucerons et/ou de psylle.

Impact des huiles sur la survie de *D. plantaginea* et *C. pyri*

Afin de voir si notre traitement par injection modifiait la dynamique de survie des deux insectes, nous avons placé 10 larves de puceron ou de psylle sur leur plante hôte et dans les conditions suivantes:

- Condition « Témoin » : Les arbres n'ont reçu aucun traitement.
- Condition « HE » : Les arbres ont été injectés, puis les insectes ont été placés dessus dans les 4 heures suivant la fin de l'injection.

La survie était ensuite relevée quotidiennement pour chaque modalité pendant 10 jours.

Pour les pucerons comme pour les psylles, les résultats de la survie cumulée montrent un effet du traitement, avec une survie moindre sur les arbres traités. Les résultats EPG permettent de mieux comprendre les résultats de l'expérience sur la dynamique de population. Pour les pucerons, l'absence d'ingestion de phloème conduit à la mort des pucerons par famine. De plus, la présence de composés toxiques dans le phloème, comme le suggère l'augmentation de la salivation, peut conduire également à la mort par intoxication. Pour les psylles, le fait que le comportement alimentaire du psylle soit peu modifié par rapport à la condition témoin (seul le nombre de piqures est affecté), suggère que la mortalité observée est exclusivement due à une intoxication.

Impact des huiles sur le comportement des auxiliaires de culture

Afin de tester l'impact de notre traitement sur les auxiliaires principaux de *D.plantaginea* et de *C. pyri*, nous avons également testé le potentiel pouvoir attractif ou répulsif de différentes concentrations d'huiles essentielles sur le parasitoïde *Aphidius matricariae* qui s'attaque au puceron cendré du pommier, sur le prédateur *Anthocoris nemoralis* du psylle du poirier, et sur le pollinisateur *Bombus terrestris*. Ces expériences menées en laboratoire sur différents auxiliaires pouvant être rencontrés en verger de pommier et de poirier n'ont pas permis de mettre en évidence une influence (ni négative, ni positive) quelconque des huiles essentielles ou de l'injection d'une émulsion d'huile sur le comportement de ces insectes. Il faut cependant ne pas tirer de conclusions hâtives, car les conditions dans lesquelles ont été réalisées ces expériences étaient éloignées des conditions rencontrées en verger et de plus amples expériences en conditions réelles doivent être effectuées pour confirmer les résultats obtenus.

Work package 4, tests d'efficacité des traitements en verger expérimental

Essai en condition semi contrôlée sur de jeunes pommiers

Afin de connaître l'effet de notre traitement sans influences extérieures telles que la prédation ou le degré d'infestation initial de pucerons, nous avons décidé de réaliser une expérience en condition semi-contrôlée. Pour cela nous avons réalisé des infestations artificielles standardisées dans des manchons sur des pommiers traités avec notre méthode d'injection, et nous avons ensuite suivi le développement de ces colonies.

Les résultats montrent que notre traitement a eu un effet sur les populations de pucerons avec un nombre plus faible d'individus quand les arbres sont injectés. Il faut cependant noter que le traitement n'est pas efficace à 100 %. En effet, des pucerons ont été retrouvés sur les arbres traités et parfois en quantité importante. Cela veut donc probablement dire que les branches choisies pour notre expérience n'ont pas ou peu reçu de solution et que la diffusion de cette dernière n'est pas homogène au sein de l'arbre. De plus suite à l'injection la présence de bourgeons brûlés a été constatée sur les arbres traités, allant parfois jusqu'à brûler l'intégralité des bourgeons présents sur la branche (Figure 5). Cela confirme l'hétérogénéité

de la diffusion de notre solution eu sein du système vasculaire du pommier avec des branches ayant reçu trop de solutions alors que d'autres n'en ont pas eu assez, voire pas du tout.



Figure 5: Brûlures observées suite à l'injection d'une émulsion d'huile essentielle.

Essais en verger expérimental

Ce workpackage synthétise deux années d'essais visant à développer un biopesticide à base d'huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum cassia*, J. Presl) pour lutter contre le puceron cendré du pommier en utilisant l'injection dans les arbres comme méthode d'application. 40 et 45 pommiers (*Malus domestica*, Borkh) du cultivar Jonagold suivis pendant l'expérience respectivement en 2020 et 2021. Ces injections (Tableau 1) ont été appliquées comme traitements curatifs et préventifs pendant le stade végétatif et au débourrement. La dynamique des populations d'insectes ravageurs (nombre de colonies et de pucerons) a été suivie ainsi que les populations d'autres ravageurs et prédateurs après les traitements. De plus, les émissions de composés organiques volatils (COV) des arbres ont été échantillonnées pour identifier l'impact potentiel sur les signaux biologiques aéroportés. En raison de la phytotoxicité potentielle des OE, la physiologie des arbres a été suivie par une évaluation visuelle, la croissance et la mesure de la fluorescence chlorophyllienne. Enfin, les rendements totaux et commerciaux ont été estimés ainsi que les résidus de trans-cinnamaldéhyde (composé principal de l'HE) dans les fruits par SBSE-TDU-GC-MS.

Tableau 1: Modalités testées lors des essais de terrain de 2020 et 2021

2020	2021
Pas d'injection	Pas d'injection
Injection d'un blanc avec de l'eau	Injection de 10ml d'une émulsion d'huile essentielle de cannelle à 2%
Injection à blanc avec l'émulsifiant (Tween 80+EDTA)	Injection de 10ml d'une émulsion d'huile essentielle de cannelle à 2%
Injection d'une émulsion d'huile essentielle de cannelle à 2%	Injection de 20ml d'une émulsion d'huile essentielle de cannelle à 2%
Injection d'une émulsion d'huile essentielle de cannelle à 1%	Injection de 50ml d'une émulsion d'huile essentielle de cannelle à 2%

Dynamique des populations d'insectes (*Dysaphis plantaginea*, autres ravageurs et prédateurs)

Les résultats obtenus dans ces expériences suggèrent que nos traitements ont eu un impact modéré sur la dynamique des pucerons des populations. En 2020, les résultats ont montré un pic de pucerons plus élevé dans le traitement témoin sans injection, par rapport aux autres conditions de notre expérience. Pour l'essai de 2021, les résultats obtenus ont montré un nombre plus élevé de populations de pucerons dans la condition avec le plus petit volume d'émulsion CEO injecté (3mL) alors que les doses plus élevées présentaient des colonies de pucerons plus petites. Bien que les résultats de notre étude aient montré un impact de notre traitement sur les populations de *D. plantaginea*, nous n'avons pas réussi à les contrôler suffisamment d'un point de vue économique. La raison principale est que l'émulsion CEO que nous avons injectée n'a pas été distribuée de manière homogène dans la couronne de l'arbre. La non-uniformité de la distribution du produit chimique dans l'arbre, conduisant à une sur- ou sous-alimentation du produit à l'intérieur de la canopée. En effet, le fait que certaines colonies de pucerons se soient bien développées dans notre traitement le plus fort (50mL) malgré un nombre élevé de bourgeons brûlés, montre que certaines branches ont reçu une forte dose d'émulsion alors que d'autres non. Il est possible que certaines colonies se soient alors développées sur des branches qui ont reçu peu ou pas d'émulsion.

Un autre résultat de notre étude est que nous n'avons pas observé d'impact de notre traitement sur les populations de prédateurs. En effet, durant les deux années de traitement, nous avons observé qu'en cours de saison les populations de ravageurs diminuaient alors que les populations de prédateurs augmentaient. Il semble donc que notre traitement n'ait pas d'impact sur la lutte biologique naturelle du verger. Confirmant ainsi les résultats obtenus lors des expériences en laboratoire.

L'étude des composés organiques volatils (COV) émis par le pommier a mis en évidence l'absence d'impact sur l'écologie chimique et ne conduira pas à perturber les auxiliaires.

L'analyse des résidus dans les pommes a montré que ceux-ci étaient inférieurs au seuil de détection humain (50-750pbp).

En terme d'impact physiologique du traitement, la fluorescence chlorophyllienne ainsi que les mesures de croissance des arbres ont mis en évidence la phytotoxicité des deux plus grands volumes injectés (20mL et 50mL).

La production de pommes n'a pas été modifiée par les traitements au cours des deux essais.

Conclusion générale

A la fin du projet Tree injection, nous avons pu sélectionner trois huiles essentielles et développer une émulsion pouvant être injectée dans le pommier ou le poirier pour lutter contre le puceron cendré du pommier et le psylle du poirier. Nous avons également montré que cette injection permettait la diffusion de l'huile essentielle jusqu'aux feuilles ce qui a pour conséquence d'élucider les défenses de la plante et de modifier le comportement alimentaire des deux insectes étudiés et ainsi d'augmenter leur taux de mortalité. Nous avons également démontré que l'utilisation d'huiles essentielles pour lutter contre ces deux insectes n'avait pas d'impact sur les auxiliaires de culture (parasitoïde, prédateur, ou pollinisateur).

Cependant les solutions qui se sont montrées efficaces en laboratoire n'ont malheureusement pu être adaptées aux conditions agronomiques, en effet bien que nos traitements réalisés en verger aient eu un impact sur la dynamique des populations de pucerons, nous n'avons pas réussi à les contrôler suffisamment d'un point de vue économique. La raison principale est que l'émulsion CEO que nous avons injectée n'a pas été distribuée de manière homogène dans la couronne de l'arbre. Il serait donc important de continuer à développer la méthode d'injection afin d'uniformiser sa distribution et ainsi confirmer les résultats prometteurs obtenus en laboratoire. Il faudrait également optimiser le timing de l'injection ou des injections à réaliser pour cibler le moment idéal permettant de contrôler les deux insectes ravageurs. La phytotoxicité devra également être étudiée sur le plus long terme afin que le traitement n'affecte pas la croissance des arbres fruitiers.

Publications issues du projet

WP2: Test de la phytotoxicité des huiles essentielles

Trois publications scientifiques:

- Werrie, P.-Y.; Durenne, B.; Delaplace, P.; Fauconnier, M.-L. Phytotoxicity of Essential Oils: Opportunities and Constraints for the Development of Biopesticides. A Review. *Foods* 2020, 9, 1291.
- Werrie, P.-Y., Burgeon, C., Le Goff, G. J., Hance, T., and Fauconnier, M.-L. (2021). Biopesticide Trunk Injection Into Apple Trees: A Proof of Concept for the Systemic Movement of Mint and Cinnamon Essential Oils. *Front. Plant Sci.* 12, 495. doi:10.3389/fpls.2021.650132.
- Phytotoxicity and plant defence induction by *Cinnamon cassia* essential oils application on *Malus domestica* tree: a molecular approach (rédaction en cours)

Trois mémoires de fin d'étude:

- Clément Burgeon: "Contribution to the development of a biopesticide based on essential oils by tree-injection application in fruit orchards"
- Laura Lheureux: "Contribution to the study of the molecular physiological response of apple trees to an essential oil emulsion applied by tree injection"
- Jean Bouvry: "Study of the phytotoxicity caused by cinnamon essential oil tree-injection in apple trees as a bio-insecticide"

WP3: Test d'efficacité des traitements

Une publication scientifique:

- Thomas Denoirjean, Daphné Belhassen, Géraldine Doury, Arnaud Ameline, Pierre Yves Werrie, Marie Laure Fauconnier, Thierry Hance, Guillaume Jean Le Goff. Essential oil trunk injection into orchard trees: consequences on the performance and preference of Hemipteran pests. (rédaction en cours)

Trois mémoires de fin d'étude:

- Aurélie Vanden Bouverie: "Étude du pouvoir répulsif et de la toxicité des huiles essentielles *Mentha spicata*, *Cinnamomum cassia* et *Eugenia caryophyllus* sur le puceron cendré du pommier (*Dysaphis plantaginea*) et son parasitoïde (*Aphidius matricariae*)"

- Dorian Cordier: “Etude des comportements du psylle du poirier (*Cacopsylla pyri*) et de son prédateur (*Anthocoris nemoralis*) en réponse à différentes huiles essentielles (*Cinnamomum cassia*, *Eugenia caryophyllus*, *Mentha spicata*)”
- Daphné Belhassen: “Contribution au projet « Tree-injection » pour le développement d’un nouveau traitement à base d’huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum cassia*) en injection dans les arbres, contre le puceron cendré du pommier (*Dysaphis plantaginea*) et le psylle du poirier (*Cacopsylla pyri*)”

WP4: Test d’efficacité des traitements en verger expérimental

Une publication scientifique:

- Pierre Yves Werrie, Guillaume Jean Le Goff, Valentin Kumps, Thomas Dhont, Marie Laure Fauconnier, Thierry Hance. Tree-injection: field-trial application of cinnamon essential oil as bio-insecticide in fruit arboriculture. (rédaction en cours)

Deux mémoires de fin d’étude:

- Thomas Dhont: “Tree-injection: field-trial application of cinnamon essential oil as bio-insecticide in fruit arboriculture”
- Valentin Kumps: “Tree injection, The effect of *Cinnamomum cassia*’s essential oil on the rosy apple aphid (*Dysaphis plantaginea*) and the crop auxiliaries. ”

Une thèse a été réalisée sur l’ensemble du projet

- Pierre-Yves Werrie: Essential oils as potential botanical insecticide against rosy apple aphid (*Dysaphis plantaginea* P.) by trunk injection, Avril 2022, 231pp.

Perspectives

Comme les résultats de ce projet sont encourageants, les promoteurs ont décidé d'un commun accord de rentrer un nouveau projet en collaboration avec la Société APEO et intitulé Oilinjection (Appel Win2Wal). Le livrable final du projet sera une solution formulée d'huile essentielle à une concentration déterminée à utiliser en injection dans le phloème pour la protection des arbres à la fois contre le puceron cendré et l'oïdium. Cela implique de déterminer les concentrations d'activité d'huiles essentielles déjà testées au laboratoire contre ces deux ravageurs sans produire de phytotoxicité pour la plante. Leur activité dans la plante et les conditions de leur diffusion homogène en relation avec le type d'injection seront déterminées. L'effet secondaire des adjuvants sur la plante sera également défini.