

**VÉGÉPHYL – 13^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES RAVAGEURS ET
AUXILIAIRES EN AGRICULTURE
29, 30 et 31 OCTOBRE 2024 – Institut Agro Montpellier**

**BEAUVERIA BASSIANA PPRI5339 : UN CHAMPIGNON ENTOMOPATHOGENE POUR CONTROLER
L'ALTISE DU COLZA ?**

P. DE VIRY ⁽¹⁾, E.A. SETORDJIE ⁽²⁾, C. STEINBERG ⁽²⁾

⁽¹⁾ BASF France S.A.S. Division Agro, 21 chemin de la Sauvegarde 69134 Ecully Cedex, France

⁽²⁾ Agroécologie, INRAE, Institut Agro, Univ. Bourgogne, F-21000 Dijon, France

RÉSUMÉ

Suite à la décision de la Communauté Européenne d'interdire, dès 2022, l'utilisation du phosmet, insecticide organophosphoré de synthèse pour lutter contre l'altise du colza *Psylliodes chrysocephala* (L.), plusieurs pistes de recherche de méthodes alternatives à l'usage de l'insecticide sont mises en œuvre dans le cadre d'un Plan de sortie du phosmet. Trois partenaires : BASF, l'UMR Agroécologie de l'INRAE (Dijon) et Terres Inovia proposent d'utiliser, sous le nom de projet Velco-A, la souche PPRI5339 de *Beauveria bassiana*, un champignon entomopathogène susceptible d'infecter les larves d'altise. Ce projet a pour objectif d'évaluer les conditions de croissance et de colonisation du champignon dans le sol selon des paramètres d'humidité et de températures variables, pour une application inédite sur les ravageurs du colza. Les travaux menés permettront d'affiner le positionnement technique du produit selon l'objectif fixé : réduire les émergences d'altises.

Cette première année d'essais a permis de valider, grâce au développement méthodologique de bio-essais, le potentiel infectieux du champignon contre les larves d'altise, de confirmer la survie du champignon entomopathogène dans le sol sous différentes conditions de température et d'humidité et d'établir un outil d'aide à la décision relatif à l'inoculation. Cet outil se base sur la relation entre la densité de l'inoculum de champignon et le potentiel entomopathogène du sol contre les larves d'altise.

Mots-clés : *Beauveria bassiana*, *Psylliodes chrysocephala* (L.), biocontrôle, densité d'inoculum, potentiel entomopathogène du sol

ABSTRACT

Following the decision of the European Community to ban, from 2022 onwards, the use of Phosmet, a synthetic organophosphate insecticide to combat the rapeseed flea beetle *Psylliodes chrysocephala* (L.), the search for alternative methods to the insecticide is implemented as part of a Phosmet exit plan. Three partners: BASF, the INRAE Research Unit Agroecology (Dijon) and Terres Inovia propose to use, under the project name Velco-A, the *Beauveria bassiana* PPRI5339 strain, an entomopathogenic fungus capable of infecting flea beetle larvae. This project aims to evaluate the growth and colonization conditions of the fungus in the soil according to variable humidity and temperature parameters, for a novel application on rapeseed pests. The work carried out will refine the technical positioning of the product according to the set objective: reducing the emergence of flea beetles.

This first year of tests validated, thanks to the methodological development of bioassays, the infectious potential of the fungus against flea beetle larvae, the survival of the entomopathogenic fungus in the soil under different conditions of temperature and humidity and a decision support tool relating to inoculation based on the relationship between the density of the fungal inoculum and the entomopathogenic potential of the soil against flea beetle larvae.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Psylliodes chrysocephala*, biocontrol, soil entomopathogenic potential, inoculum density

I. Introduction

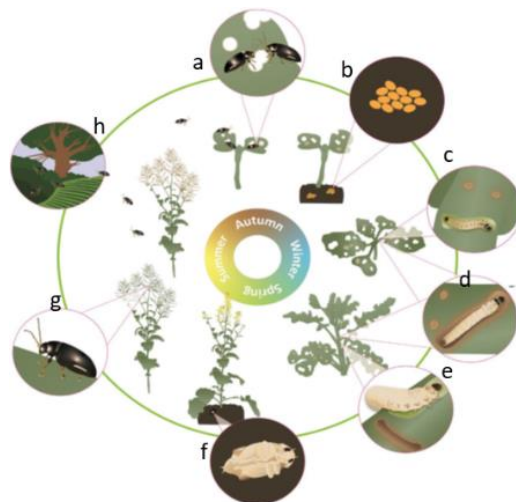
Le colza, (*Brassica napus* L.), culture annuelle appartenant à la famille des *Brassicaceae*, est principalement cultivé pour ses graines riches en huile alimentaire tandis que le tourteau de colza est utilisé en alimentation animale et la paille de colza comme litière pour les animaux (Saeidnia and Gohari, 2012 ; Bennouna et al., 2021). Le colza est l'une des cultures oléagineuses les plus importantes économiquement au monde (FAOSTAT, 2023). En France, le colza d'hiver est cultivé sur plus d'un million d'hectares, notamment dans les régions du nord, du centre et de l'est du pays en rotation avec les céréales d'hiver (Arthey, 2020).

Le colza est affecté par un large éventail de stress abiotiques et biotiques au cours de son cycle de vie. Le ravageur du colza le plus important en Europe est l'insecte herbivore *Psylliodes chrysocephala* (Hoarau et al., 2022 ; Linnaeus, 1758) plus connu sous le nom d'altise du colza.

Il s'agit d'un insecte de l'ordre des Coléoptères et de la famille des *Chrysomelidae*, présent en Europe, au Canada, en Afrique du Nord et en Asie (CABI, 2021). Les adultes de l'altise sont de petits coléoptères de forme ovale avec des cuticules bleu-noir brillantes. Les adultes ont une longueur comprise entre 4 et 5 mm avec deux antennes à 10 segments et des pattes postérieures entièrement développées qui facilitent la fuite devant des prédateurs (Hoarau et al., 2022 ; Ortega-Ramos et al., 2022). L'altise provoque des dégâts sur les plants de colza aux stades adulte et larvaire. Durant l'automne, les adultes migrent vers les champs de colza nouvellement ensemencés. Les coléoptères adultes se nourrissent des jeunes pousses émergentes du colza, détruisant les zones de croissance apicales, ce qui réduit le potentiel de rendement des cultures. Deux semaines après la migration, l'accouplement et la ponte commencent, les œufs sont pondus dans des cavités peu profondes du sol, à proximité des plantules de colza. Chaque femelle pond plusieurs centaines d'œufs au cours de sa vie et la ponte peut se poursuivre pendant huit mois après l'accouplement (Hoarau et al., 2022). Les larves d'altise nouvellement écloses migrent vers les plantes, exploitant les pétioles et les tiges où elles vivent et se nourrissent pendant l'hiver et la fin du printemps, passant par trois stades larvaires. Les larves du troisième stade quittent les plantes pour le sol où les nymphes vont persister entre 8 et 12 semaines, selon les températures atmosphériques (Ortega-Ramos et al., 2022). De nouveaux adultes émergent au cours de l'été. Ces adultes subissent une diapause ou migrent vers les bordures des champs, dans les haies et autres plantes. Le cycle reprend à l'automne lorsque les températures se refroidissent et qu'une nouvelle saison de culture du colza commence. La grosse altise est un ravageur efficace du colza en raison de la synchronisation entre son cycle de vie et le cycle de croissance du colza (Figure 1).

Figure 1 : Cycle de vie de l'altise du colza ; a : migration des adultes vers la culture de colza et attaque sur cotylédons ; b : ponte des œufs dans le sol ; c, d, e : trois stades larvaires successifs minant les pétioles, les tiges et les feuilles du colza ; f : les larves sortent de la plante et s'enfouissent dans le sol pour se transformer en nymphes ; g : nouvelle génération d'adultes se nourrissant de colza ; h : migration des adultes vers les bordures et hôtes alternatifs (Ortega-Ramos et al., 2022).

(Life cycle of the oilseed rape flea beetle; a: adults migrate towards the oilseed rape crop and attack the cotyledons; b: eggs are laid in the soil; c, d, e: three successive larval stages undermine the petioles, stems and leaves of the oilseed rape; f: larvae emerge from the plant and burrow into the soil to transform into pupae; g: new generation of adults feeding on oilseed rape; h: migration of adults to borders and alternative hosts (Ortega-Ramos et al., 2022).)



Suite à l'interdiction en 2018, puis en 2022 de l'usage des néonicotinoïdes puis du phosmet (O, O-diméthylS-phtalimidométhylphosphodithioate) par l'UE pour limiter l'impact de ces substances actives sur la faune auxiliaire, dont les abeilles domestiques (EFSA, 2021 ; Ortega-Ramos et al., 2022), les insecticides pyréthrinoides ont été largement utilisés mais leur utilisation excessive par les agriculteurs a conduit au développement de résistance dans les populations d'insectes (Hoarau et al., 2022 ; Willis et al. 2020) rendant ces insecticides inefficaces et non durables pour la gestion et le contrôle des populations d'altises (Bothorel et al., 2020).

C'est la raison pour laquelle un « programme national de sortie du phosmet » a été mis en œuvre en 2022 pour stimuler la recherche sur des moyens alternatifs à l'utilisation de cet insecticide.

Différentes stratégies de gestion sont par ailleurs mises en œuvre pour tenter de gérer le ravageur mais, prises individuellement, elles ont une portée limitée. Ainsi, les recherches visant à développer des cultivars résistants à cet insecte ravageur n'ont pour l'instant pas abouti à la mise à disposition de tels cultivars pour les agriculteurs (Hervé, 2017). Les céréales incluses dans la rotation perturbent le cycle de vie des altises et ralentissent leur développement (Arthey, 2020). D'autres stratégies de gestion consistent à avancer les dates de semis et à augmenter la densité de semis mais l'efficacité de ces pratiques est discutée (Conrad et al. 2021). Un travail réduit du sol favorise la survie de parasitoïdes auxiliaires alors qu'un labour profond affecte fortement la diapause et l'hivernage de ces auxiliaires (Ortega-Ramos et al. 2022). Le désherbage et l'élimination physique, en bordure de parcelles, des plantes et des mauvaises herbes utilisées en été par les altises adultes comme hôtes alternatifs contribuent à réduire l'infestation d'insectes dans les champs. Parallèlement, des plantes de service comme la navette (*Brassica rapa*), attractives pour l'altise ou ses prédateurs, peuvent être semées dans les bordures ou en accompagnement de la culture pour réduire la pression du ravageur sur celle-ci (Barari et al 2005 ; Parker et al 2016).

Différentes méthodes de lutte biologique contre l'altise du colza ont également été proposées. Certaines reposent sur l'utilisation d'insectes parasitoïdes tels que *Tersilochus microgaster* et *Microctonus brassicae* (ordre des Hyménoptères) (Ulber et al 2010 ; Jordan et al., 2020). Des recherches en laboratoire ont démontré un impact positif des nématodes entomopathogènes, *Steinernema Feltiae* (Filipjev) sur les populations d'altise (Godina et al., 2023).

Près de mille espèces de champignons entomopathogènes, appartenant principalement aux familles des *Clavicipitaceae*, *Cordycipitaceae* et *Ophiocordycipitaceae* (ordre des Hypocréales, Ascomycètes) constituent un fort potentiel comme agents de lutte (Araujo and Hughes 2016 ; Wei et al., 2022). Cependant, malgré leur grande diversité, seul un petit nombre fait l'objet d'études en vue de leur utilisation pour le biocontrôle des insectes ravageurs des cultures (Meiling et Eilenberg, 2007 ; Vega et al., 2009 ; Nelson et al., 2015 ; Humbert 2016 ; Litwin et al., 2020 ; Sharma et al., 2023). Des résultats encourageants pour le contrôle de l'altise ont déjà été obtenus en conditions contrôlées avec les champignons *Metarhizium anisopliae* (brunneum) et *Beauveria bassiana* (Butt et al. 1994 ; Miranpuri and Khachatourians, 1995). *B. bassiana*, également connu sous le nom de muscardine blanche, a été isolé pour la première fois à partir de cadavres de vers à soie en 1835. C'est un bioinsecticide efficace contre plusieurs insectes nuisibles, notamment des insectes entraînant des impacts économiquement importants comme les pucerons, les thrips et les aleurodes (Feng et al 1994 ; Meiling and Eilenberg 2007). Il ne présente aucune menace pour l'environnement ou d'autres hôtes non ciblés, il est généralement formulé sous forme de conidies aériennes sèches ou en suspensions liquides et déployé dans des applications par pulvérisation (Mascarin and Jaronski, 2016). *B. bassiana* se reproduit de manière asexuée, il produit des conidies qui s'attachent à la cuticule de l'hôte. Les conidies produisent des tubes germinatifs qui pénètrent dans la cuticule de l'hôte grâce à une pression mécanique et des enzymes hydrolytiques, envahissant ainsi l'hémocèle (Feng et al., 1994 ; Mascarin and Jaronski, 2016). L'hôte est tué par l'épuisement des nutriments de son hémolymphe et par les métabolites toxiques libérés par *B. bassiana* lors de la colonisation. Ce dernier supprime l'immunité et détruit les tissus de l'hôte (Altinok et al., 2019).

Objectifs du projet

Sur la base de cette brève revue bibliographique, la question de recherche est de savoir si le champignon entomopathogène *B. bassiana* peut contrôler les populations du bioagresseur *P. chrysocephala* en infectant les larves de l'insecte pendant les phases souterraines de son cycle. Répondre à cette question suppose de tester et de valider plusieurs hypothèses incluant pour chacune les aspects méthodologiques associés :

Hyp1 : le champignon entomopathogène *B. bassiana* est pathogène pour les larves de l'altise du colza.

Hyp2 : la compétence saprophyte de *B. bassiana* permet au champignon de survivre après son inoculation dans le sol et d'y rester même aux basses températures hivernales.

Hyp3 : il existe une relation entre la densité de population de *B. bassiana* et l'activité entomopathogène exprimée dans le sol envers les larves d'altise.

II. Matériel et Méthodes

La souche de *B. bassiana* PPRI5339 utilisée pour l'ensemble des expérimentations a été fournie par BASF France Division Agro-Base de Recherche et Développement (F.31330 Merville) sous forme d'une suspension conidienne, formulée, relativement visqueuse, et titrant à environ 10^9 propagules/mL (échantillon VELIFER 100mL, ECH-2022-08686, délivré pour usage expérimental uniquement). Des prélèvements et mises en suspension dans de l'eau stérile ont été effectués à la pipette pour réaliser les inoculums liquides. Des repiquages sur milieu malt gélosé (extrait de malt 10g, gélose 15g, eau osmosée 1L) en boîtes de Petri ont été effectués depuis cette suspension à l'aide d'une öse stérile. Les boîtes de Petri sont incubées à 22°C pour permettre la croissance du champignon.

Les larves d'altises ont été obtenues par dissection au scalpel de plantes de colza cultivées dans une parcelle agricole à Genlis (F.21110) et naturellement infestées par l'altise *P. chrysocephala*. Les plantes collectées étaient conservées deux à trois semaines dans une chambre climatique à 20°C et régulièrement humidifiées. Les larves (stade L2 et L3) étaient ainsi extraites de manière extemporanée à leur utilisation. Compte tenu du cycle de vie de l'altise, ces larves n'ont pu être prélevées que pendant la période du 15 janvier environ jusqu'à la fin mars 2023. Dès qu'il ne fut plus possible d'extraire des larves à partir de plantes de colza, des larves de ténébrion (ver de farine), *Tenebrio molitor*, ont été achetées (Maxi-Zoo, F.21800 Quetigny) et utilisées en substitut.

Le sol utilisé a été prélevé dans les 15 premiers cm d'une parcelle agricole de l'Unité Expérimentale INRAE du domaine d'Epoisses (U2E) à Bretenière (F.21110). Il s'agit d'un sol limono-argileux (limons 57.7%, argile 36.2%, sable 6.1%, pH 7.2, MO 2.5%, ratio C/N 9.7) tamisé à 4 mm, utilisé soit naturel, soit stérilisé à l'autoclave, 40 minutes à 115°C. Le sol a été conditionné dans des flacons Schott de 250 mL contenant 100g de sol (naturel ou stérilisé) pour constituer les microcosmes utilisés pour les expérimentations.

II.1 Pathogénicité de la souche de *Beauveria bassiana* PPRI5339 pour les larves de *Psylliodes chrysocephala*.

Des larves d'altise ont été placées sur milieu malt gélosé, au centre de boîtes de Petri ensemencées ou non avec la souche de *B. bassiana* à raison de cinq larves /boîte et trois boîtes par modalité.

Parallèlement, des larves d'altise ont également été déposées dans des boîtes de Petri contenant chacune 40g de sol. Il s'agissait i) de sol préalablement stérilisé, ensemencé extemporanément ou non ensemencé (contrôle) avec un implant d'une culture de *B. bassiana*, ii) de sol préalablement stérilisé dans lequel la souche de *B. bassiana* se développait depuis 15 jours à 22°C, iii) de sol préalablement stérilisé dans lequel la souche de *B. bassiana* se développait depuis 15 jours à 4°C. Cinq larves par boîte et trois boîtes par modalité ont été préparées. La mortalité larvaire a été notée quotidiennement.

Un test similaire de pathogénicité a été réalisé avec des larves de ténébrion. Cependant, comme ces larves sont plus grosses (10-12 mm) que celles d'altise (4-6 mm), de grandes boîtes de Petri contenant 100 g de terre ont été utilisées et 10 larves de ténébrion ont été introduites dans chaque boîte. Les modalités comprenaient i) le milieu malt gélosé ensemencé ou non par *B. bassiana*, ii) du sol préalablement stérilisé, ensemencé ou non, iii) du sol naturel, ensemencé ou non. Trois boîtes par modalité ont été préparées.

Toutes les incubations en boîtes de Petri (milieu gélosé-sol, larves d'altise-larves de ténébrion) ont été effectuées à une température de 20 à 22°C

II.2 Détection et quantification de *Beauveria bassiana* PPRI5339 dans le sol

La dynamique de population de la souche *B. bassiana* PPRI5339 a été évaluée en microcosmes de sol i) pendant 10 semaines en sol désinfecté à 4 et à 22°C, à des valeurs d'humidité faible 18% et élevée 26% (3 réplicas); ii) en sol naturel à des valeurs d'humidité faible 18% et plus élevée 20% (3 réplicas) ; iii) en sol naturel et en sol désinfecté en présence ou non de 10 larves d'altise introduites 48h post inoculation du champignon dans 50g de sol à une valeur d'humidité de 20% (2 réplicas).

Les dénombrements de *B. bassiana* dans le sol ont été effectués en prélevant des aliquotes de 1 g de sol à partir des microcosmes de sol mis en œuvre pour analyser les dynamiques de population du champignon. Le gramme de sol est transféré dans un tube contenant 9 mL d'eau stérile. Le tube est ensuite vortexé pour obtenir une suspension homogène. Des dilutions au 1/10 sont effectuées à partir de ce tube. Pour chaque niveau de dilution, 3 fois 1 mL de la suspension sont déposés dans des boîtes de Petri.

Du milieu malt gélosé conservé en surfusion (42°C) et additionné, pour chaque litre de milieu, d'acide citrique (250mg), de sulfate de cuivre (200mg) et d'antibiotiques (chlortetracycline 50 mg, streptomycine 100mg) est versé dans chaque boîte et le mL de la suspension-dilution est incorporé au milieu. Les boîtes sont mises à incuber à 22°C à l'obscurité. Le nombre de colonies de *B. bassiana* émergeant du milieu est compté à partir du 3^{ème} jour post incubation et pendant les 3 jours suivants. Contrairement à la plupart des champignons du sol, *B. bassiana* est résistant au sulfate de cuivre (Davet and Rouxel 1997). Ainsi, l'utilisation de milieu malt-acide-antibiotiques-CuSO₄ permet de dénombrer *B. bassiana* en sol naturel même à des densités d'inoculum équivalente à celles des champignons indigènes.

II.3 Caractérisation de l'activité entomopathogène de la souche de *Beauveria bassiana* PPRI5339 dans le sol

Des échantillons de 300g de sol naturel (humidité 19%) ont été inoculés avec différentes dilutions d'un inoculum liquide de *B. bassiana*. 24h post inoculation, la densité de la population de *B. bassiana*, dénombrée sur milieu gélosé, était de 2x10⁷, 6x10⁶, 1.5x10⁶, 6x10⁵ et 2x10⁴ propagules / g de sol. La réalisation du test en sol naturel permet d'évaluer l'expression de la pathogénicité de la souche de *B. bassiana* en présence des composantes biotiques du sol. Les cinq modalités ont été dupliquées.

Pour chacune des 5 modalités, le sol a été dilué successivement au 1/3 dans du sable stérile (i.e. préalablement autoclavé) jusqu'à la dilution 1/90. Pour chaque niveau de dilution, le sol, ou le mélange sol dilué dans du sable, était placé dans des grandes boîtes de Petri. Dix larves de ténébrion ont été introduites dans chaque boîte. Le nombre de larves de ténébrion survivantes a été dénombré quotidiennement du jour 3 au jour 7 post introduction. L'activité entomopathogène de *B. bassiana* à chaque niveau de dilution a été quantifiée en calculant la surface sous la courbe de survie des larves (SCSL) au cours des 7 jours. La densité de population de *B. bassiana* à chaque niveau de dilution a été calculée, proportionnellement au niveau de dilution, sur la base de la densité déterminée à partir du sol naturel inoculé.

Du sol non inoculé a été soumis à la même procédure (i.e. dilution dans du sable stérile et introduction de larves). Suite à des observations épisodiques de colonies de *B. bassiana* indigène dans le sol naturel lors de dénombrements sur milieu gélosé, nous avons considéré que ce sol naturel hébergeait une population indigène de *B. bassiana* dont la densité était au plus de 10e3 propagules/g de sol.

Une relation entre la densité de l'inoculum *B. bassiana* dans le sol et l'activité entomopathogène à chaque niveau de dilution a ensuite été recherchée pour l'ensemble des modalités.

Les résultats ont été analysés statistiquement en réalisant des comparaisons de moyenne au seuil $p=0,05$.

III. Résultats et discussion

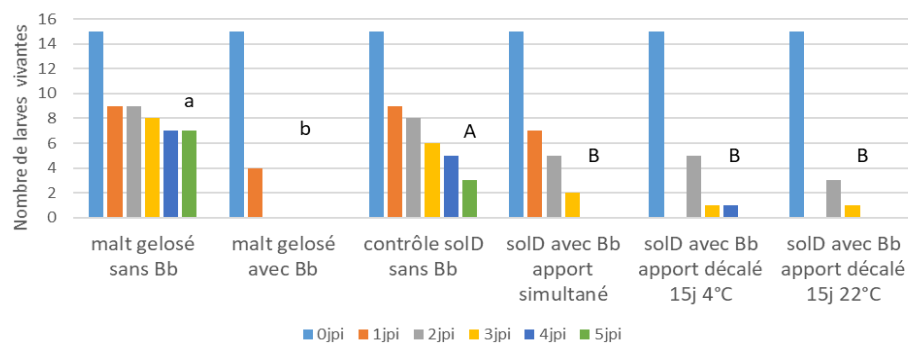
III.1 Pathogénicité de la souche de *Beauveria bassiana* PPRI5339 pour les larves de *Psylliodes chrysocephala*

Des larves d'altise mortes ont été observées dans tous les traitements, y compris les témoins, un jour après l'introduction des larves sur milieu gélosé ou dans le sol désinfecté, ce qui peut être attribué au stress causé par le changement d'environnement. Cependant, en absence de *B. bassiana*, 7 larves sont toujours

vivantes 5 jours après leur introduction sur milieu gélosé, alors qu'en présence de la souche fongique, elles sont toutes mortes 2 jours après leur introduction. De la même manière, la survie des larves est significativement meilleure en sol désinfecté en absence de *B. bassiana* qu'en sol désinfecté en présence du champignon, que les larves aient été introduites simultanément à l'introduction du champignon ou quinze jours après celui-ci, qu'il ait incubé à 4 ou à 22°C (Figure 2).

L'hypothèse Hyp1 est ainsi validée, la souche de *B. bassiana* PPRI5339 est considérée comme pathogène de l'altise *P. chrysocephala*.

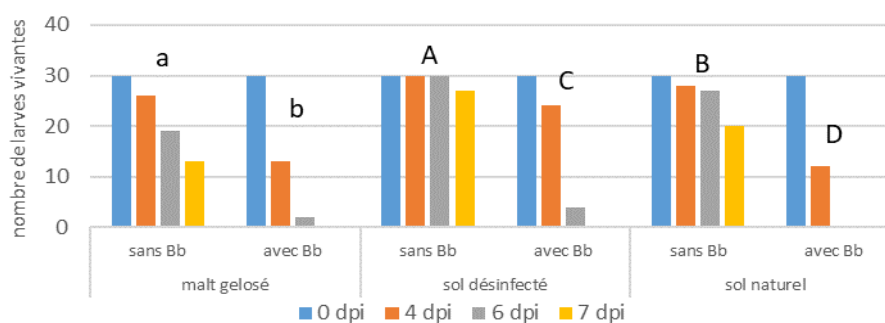
Figure 2 : Evaluation de la pathogénicité de *B. bassiana* contre les larves d'altises (Bb : *B. bassiana* ; jpi : jours post introduction des larves dans le milieu ; le caractère significatif des différences de survie est indiqué par des lettres différentes, minuscules pour le milieu gélosé, majuscules pour le sol). Le montage photo montre des muscardines de larves d'altise infestées par la souche de *B. bassiana* PPRI5339 sur milieu gélosé et dans le sol (Evaluation of the pathogenicity of *B. bassiana* against flea beetle larvae (Bb: *B. bassiana*; dpi: days after introduction of the larvae into the medium; the significant nature of the differences in survival is indicated by different letters, lower case for the agar medium, upper case for the soil). The photo montage shows the muscardines of flea beetle larvae infested with the *B. bassiana* strain PPRI5339 on an agar medium and in the soil.)



La souche de *B. bassiana* PPRI5339 est également pathogène pour les larves de *T. molitor*, aussi bien sur milieu gélosé qu'en sol stérile et naturel (Figure 3), ce qui permet d'utiliser ces larves comme modèle d'étude pour analyser le comportement de *B. bassiana* dans différentes conditions, indépendamment de la disponibilité saisonnière des larves d'altises. La survie des larves est moins bonne en sol naturel qu'en sol désinfecté, ce qui suggère une contribution des facteurs biotiques à la régulation des larves de ténébrion, et par extension, à celle des larves d'altise.

Figure 3: Evaluation de la pathogénicité de *B. bassiana* contre ténébrion (Bb : *B. bassiana* ; jpi : jours post introduction des larves dans le milieu ; le caractère significatif des différences de survie est indiqué par des lettres différentes, minuscules pour le milieu gélosé, majuscules pour le sol). La photo montre des larves de ténébrion infestées par la souche de de *B. bassiana* PPRI5339 dans le sol

(Evaluation of the pathogenicity of *B. bassiana* against darkling beetles (Bb: *B. bassiana*; dpi: days after introduction of the larvae into the medium; the significant nature of the differences in survival is indicated by different letters, lower case for the agar medium, upper case for the soil). The photo shows darkling beetle larvae infested with *B. bassiana* strain PPRI5339 in soil)

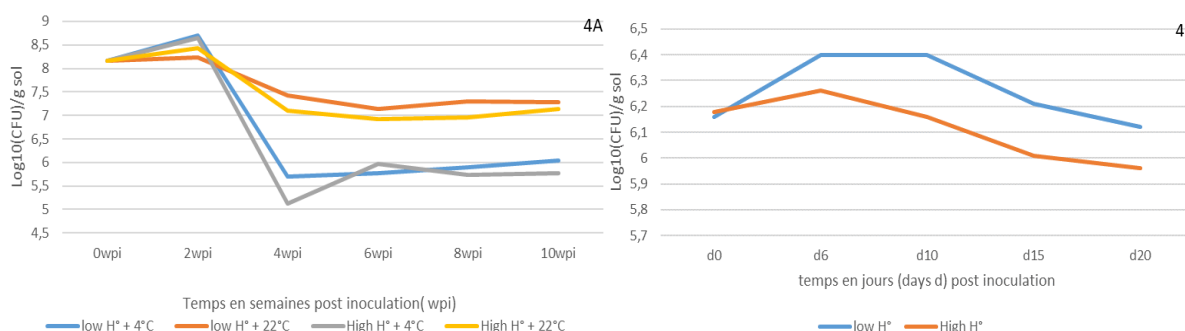


III.2 Dynamique de population de *Beauveria bassiana* dans le sol

En sol stérile, i.e. en l'absence de compétition et d'antagonisme avec d'autres microorganismes, à 22 et 4°C, à 18.5 et 26% d'humidité : *B. bassiana* PPRI5339, inoculé à une densité d'environ 1.5×10^8 propagules/g de sol se maintient à une densité légèrement supérieure à 10^7 propagules/g de sol à une température d'incubation de 22°C et à une densité légèrement inférieure à 10^6 propagules/g de sol à une température d'incubation de 4°C pendant au moins 10 semaines (Figure 4A). Malgré une tendance à une croissance légèrement moins élevée du champignon quand l'humidité est forte, les différences de densité de population ne sont pas significatives. Pour conclure quant à l'impact de l'humidité du sol sur la survie de *B. bassiana*, il conviendrait d'évaluer la survie de la souche en balayant une plus large gamme de valeurs d'humidité, depuis le sol sec observable en fin d'été jusqu'au sol hydromorphe observable en fin d'hiver dans certaines régions productrices. Les deux conclusions majeures de cette expérimentation sont d'une part que la compétence saprotrophe de *B. bassiana* lui permet de se maintenir à 10^7 propagules/g de sol dans des conditions optimales en sol stérile mais pas au-delà de cette densité, et d'autre part, que la souche PPRI5339 endure la température de 4°C.

En sol naturel, i.e. en présence de la microflore indigène, et à deux valeurs d'humidité (18 et 20%), *B. bassiana* PPRI5339, inoculé à une densité d'environ 2×10^6 propagules/g de sol croît très légèrement (2.5×10^6 propagules/g sol) juste après l'inoculation mais ne se développe pas, voire décroît progressivement jusqu'à une densité de 10^6 propagules/g de sol (Figure 4B). L'hypothèse d'une compétition pour les ressources trophiques et spatiales entre la souche de *B. bassiana* et la microflore peut expliquer l'absence de développement du champignon. Comme en sol stérile, une tendance à une croissance négativement impactée par une humidité plus forte est observée, bien que non significative statistiquement.

Figure 4: Dynamique de population de *B. bassiana* à deux T° (4 et 22°C) et deux valeurs d'humidité (18 et 26%) en sol désinfecté (4A) et à 22°C et deux valeurs d'humidité (18 et 20%) en sol naturel (4B).
(Population dynamics of *B. bassiana* at two T° (4 and 22°C) and two humidity values (18 and 26%) in disinfected soil (4A) and at 22°C and two humidity values (18 and 20%) in natural soil (4B).)



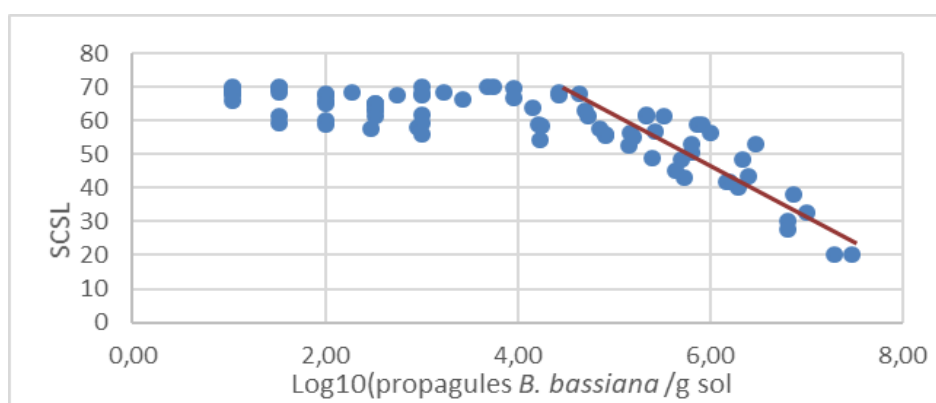
Deux hypothèses peuvent être avancées : le nombre de propagules libérées par chacune des larves est faible, en valeur relative à la densité d'inoculum du champignon (6.4×10^6 et 5.1×10^3 propagules/g de sol stérile et naturel respectivement, 5 semaines post inoculation); le pas de temps utilisé pour les mesures (3 semaines) est trop long pour mettre en évidence d'éventuelles variations de la densité de population de *B. bassiana*. Il conviendrait de conduire à nouveau cette expérimentation en augmentant le nombre de larves introduites dans le sol et en dénombrant la population de *B. bassiana* dès le jour 7 post introduction des larves.

Globalement, l'ensemble des expérimentations relatives à la dynamique de population de *B. bassiana* PPRI5339 dans le sol valident notre deuxième hypothèse Hyp2. Ils permettent de conclure que le champignon a une capacité saprotrophe de 10^7 propagules/g de sol mais, du fait de la microflore indigène, il ne s'établit dans le sol naturel qu'à une densité égale ou inférieure à 10^4 propagules/g de sol en condition d'humidité proche de 20%. Un excès d'humidité ne lui est pas favorable. Il est cependant capable de survivre (i.e. rester viable et conserver son activité entomopathogène) à une température de 4°C pendant 10 semaines (période hivernale).

III.3 Caractérisation de l'activité entomopathogène de la souche de *Beauveria bassiana* PPRI5339 dans le sol

La dynamique de survie des larves de ténébrion introduites dans un sol hébergeant un inoculum de *B. bassiana* donne une indication de l'activité entomopathogène de cet inoculum. Pour quantifier cette activité et la comparer à d'autres activités réalisées par d'autres inoculums de la même souche, dans le même sol ou d'autres sols, il convient de mesurer la surface sous la courbe de survie des larves introduites (SCSL). Ainsi, la confrontation de larves de ténébrion à différentes densités de populations de *B. bassiana* dans le sol naturel révèle une activité entomopathogène proportionnelle à la densité d'inoculum mais seulement pour des densités d'inoculum comprises entre 5×10^4 (4.7 Log) et 3×10^7 (Log7.5) propagules/g de sol (Figure 5). Notre troisième hypothèse, Hyp3, n'est donc vérifiée que pour cet intervalle de densités, borné aux valeurs hautes par le fait que le champignon ne s'installe pas à des densités au-delà de 10^7 propagules/g de sol, et aux valeurs basses par le fait que cette densité de 5×10^4 propagules /g de sol constitue un seuil en dessous duquel la probabilité de rencontre entre les larves et les champignons est trop faible pour assurer rapidement la régulation de la population de ténébrion. Cependant, la mortalité d'un plus ou moins grand nombre de larves en 3 à 7 jours donne une indication du potentiel entomopathogène du sol et permet de décider de la pertinence ou non d'une (ré)inoculation de *B. bassiana* pour avoir un contrôle des larves d'altise.

Figure 5: Activité entomopathogène de *B. bassiana* sur des larves de ténébrion en sol naturel. SCSL : surface sous la courbe de survie des larves
(Entomopathogenic activity of *B. bassiana* on darkling beetle larvae in natural soil. SCSL: surface area under the larval survival curve)



Conclusion

La validation des trois hypothèses proposées confirme que la souche de *B. bassiana* PPRI5339 est entomopathogène des larves d'altise présentes dans le sol, qu'elle peut s'installer dans le sol naturel et persister à différentes valeurs d'humidité de même qu'à des températures de 4 à 22°C, ce qui inclut de fait des conditions hivernales classiques observées dans les régions productrices de colza en France et fait de cette souche un agent de biocontrôle prometteur pour lutter contre *P. chrysocephala*. Par contre, le seuil d'établissement de la population de *B. bassiana* cinq semaines post inoculation est relativement faible (de l'ordre de 5×10^3 propagules/g de sol), or son activité entomopathogène dans le sol n'impacte significativement la survie des larves qu'à des densités de populations supérieures à 5×10^4 propagules/g de sol. Il apparaît donc opportun d'inoculer le champignon à l'automne, lors du semis du colza de manière à protéger les plantules d'une infestation par les larves issues de l'éclosion des pontes d'altises adultes.

IV. Perspectives

Pour maximiser la probabilité de rencontre entre le champignon et les larves d'altises et ainsi prévenir l'infestation du colza par celles-ci à l'automne, l'inoculation de *B. bassiana* doit se faire au plus proche de la plantule, i.e. dans la raie de semis du colza. En outre, la formulation devra d'une part fournir l'énergie trophique pour faciliter (booster) la colonisation de la rhizosphère du colza par la souche fongique mais également assurer une libération continue de l'inoculum pendant la période d'éclosion des pontes d'altise. Un focus doit donc être porté sur le support de formulation le plus approprié pour répondre à cette exigence.

Les résultats obtenus permettent d'envisager une association entre *Brassica rapa* (plante de service attractive) et *B. bassiana* PPRI5339 pour réduire la densité de population d'altises susceptible d'infester la culture.

Une interaction de type endophyte entre la souche de *B. bassiana* PPRI5339 et le colza devrait être mise en œuvre pour tester une activité entomopathogène *in planta* du champignon vis-à-vis des larves dès leur tentative d'infestation et d'ainsi prémunir le colza.

Remerciement :

Les auteurs remercient SOFIPROTEOL pour son soutien financier dans le cadre du Projet VELCO-A

Références bibliographiques

- Altinok H, Altinok M, Koca A, 2019. Modes of Action of Entomopathogenic Fungi. *Current Trends in Natural Sciences* 8, 117-124.
- Araujo JPM, Hughes DP, 2016. Diversity of Entomopathogenic Fungi: Which Groups Conquered the Insect Body? In: Lovett B, Stleger RJ, eds. *Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi*. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 1-39 - doi 10.1016/bs.adgen.2016.01.001
- Arthey, T. (2020). Challenges and Perspectives in Global Rapeseed Production. AgriBenchmark. Retrieved from <http://www.agribenchmark.org/fileadmin/Dateiablage/B-Cash-Crop/Reports/RapeseedReport-2020-complete.pdf>
- Bennouna, D., Tourniaire, F., Durand, T., Galano, J.M., Fine, F., Fraser K, Benatia, S., Rosique, C., Pau, C., Couturier, C., Pontet, C., Vigor, C., Landrier, J.F., Martin, J.C. (2021). The *Brassica napus* (oilseed rape) seeds bioactive health effects are modulated by agronomical traits as assessed by a multi-scale omics approach in the metabolically impaired ob-mouse. *Food Chem (Oxf)*, 2:100011. doi: 10.1016/j.fochms.2021.100011
- Barari H, Cook SM, Clark SJ, Williams IH, 2005. Effect of a turnip rape (*Brassica rapa*) trap crop on stem-mining pests and their parasitoids in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *BioControl* 50, 69-86. doi: 10.1007/s10526-004-0895-0
- Bothorel, S., Robert, C., Ruck, L., Carpezat, J., Lauvernay, A., Leflon, M., Siegwart, M. (2018). Resistance to pyrethroid insecticides in cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*) and rape winter stem weevil (*Ceutorhynchus picipitarsis*) populations in France. *Integrated Control in Oilseed Crops IOBC- WPRS Bulletin*, 136, 89–104. 27
- Butt, T.M., Ibrahim, L., Ball, B.V., Clark, S.J., 1994. Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honeybee. *Biocontrol. Sci. Technol.* 4 (2), 207–214. doi: 10.1080/09583159409355328.
- Conrad, N., Brandes, M., Ulber, B., Heimbach, U. (2021). Effect of immigration time and beetle density on development of the cabbage stem flea beetle, (*Psylliodes chrysocephala* L.) and damage potential in winter oilseed rape. *J Plant Dis Prot*, 128, 1081–1090. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00474-7>
- FAOSTAT 2023. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Extracted from: [<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>]. Data of Access: [27-05-2023]
- Feng. M.G., Poprawski, T.J., Khachatourians, G.G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4, 3-34. doi: 10.1080/09583159409355309
- Gimsing, A.L. and Kirkegaard, J.A. (2006). Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of *Brassica* biofumigants. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 2255-64, doi: 10.1016/j.soilbio.2006.01.024

- Godina, G., Vandenbossche, B., Schmidt, M., Sender, A., Tambe, A.H., Touceda-González, M., Ehlers, R.U. (2023), Entomopathogenic nematodes for biological control of *Psylliodes chrysocephala* (Coleoptera: Chrysomelidae) in oilseed rape. *J Invertebr Pathol.* doi: 10.1016/j.jip.2023.107894
- Hagley, E.A.C. and Chiba M. (1980). Efficacy of Phosmet and Azinphosmethyl for control of major insect pests of apple in Ontario. *Canadian Entomologist*, 112, 1075-1083. doi: 10.4039/Ent1121075-10
- 29
- Hervé, M.R. (2017). Breeding for insect resistance in oilseed rape: Challenges, current knowledge, and perspectives. *Plant breeding*. DOI: 10.1111/pbr.12552
- Hoarau, C., Campbell, H. Prince, G., Chandler, D., Pope, T. (2022). Biological control agents against the cabbage stem flea beetle in oilseed rape crops, *Biological Control*, 167, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104844>.
- Humber R.A. (2016). Seeking stability for research and applied uses of entomopathogenic fungi as biological control agents. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 19, 1019-1025. doi: 10.1016/j.aspen.2016.09.006
- Jordan, A., Broad, G.R., Stigenberg, J., Hughes, J., Stone, J., Bedford, I., Penfield, S., Wells R. (2020). The potential of the solitary parasitoid *Microctonus brassicae* for the biological control of the adult cabbage stem flea beetle, *Psylliodes chrysocephala*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 168(11). DOI: 10.1111/eea.12910
- Lazzeri, L., Curto, G., Leoni, O., Dallavalle, E. (2004). Effects of glucosinolates and their enzymatic hydrolysis products via myrosinase on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 6703-7, doi: 10.1021/jf030776u
- Litwin, A., Nowak, M., Rozalska, S. (2020). Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in Environmental Science & Bio-Technology* 19, 23-42. doi: 10.1007/s11157-020-09525-1
- Mascarin, G.M. and Jaronski, S.T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 32, 26. doi: 10.1007/s11274-016-2131-3
- Meyling, N.V. and Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control* 43, 145-155. doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.07.007
- Miranpuri, G.S., and Khachatourians, G.G., 1995. Entomopathogenicity of *Beauveria bassiana* toward flea beetles, *Phyllotreta cruciferae* Goeze (Col., *Chrysomelidae*). *J. Appl. Entomol.* 119 (1–5), 167–170. doi: 10.1111/j.1439-0418.1995.tb01265.x
- Nelson, T.L., Willoughby, B.E., Wilson, D.J., Eden, T., Glare, T.R. (2004). Establishing the fungus *Beauveria bassiana* in pasture for clover root weevil (*Sitona lepidus*) control. In: Zydenbos SM, ed. *New Zealand Plant Protection*, 57, 314-318.
- Ortega-Ramos, P.A., Coston, D.J., Seimandi-Corda, G., Mauchline, A.L., Cook, S.M. (2022). Integrated pest management strategies for cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*) in oilseed rape. *Global Change Biology Bioenergy*, 14, 267-286. doi: 10.1111/gcbb.12918.
- Parker JE, Crowder DW, Eigenbrode SD, Snyder WE, 2016. Trap crop diversity enhances crop yield. *Agriculture Ecosystems and Environment* 232, 254-62, doi: 10.1016/j.agee.2016.08.011
- Saeidnia, S., Gohari, A. R. (2012). Importance of *Brassica napus* as a medicinal food plant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(14), pp. 2700-2703
- Sharma, A., Sharma S, Yadav PK, (2023). Entomopathogenic fungi and their relevance in sustainable agriculture: A review. *Cogent Food and Agriculture* 9, 2180857. doi: 10.1080/23311932.2023.2180857
- Ulber B, Williams IH, Klukowski Z, Luik A, Nilsson C, (2010). Parasitoids of Oilseed Rape Pests in Europe: Key Species for Conservation Biocontrol. In: Williams IH, ed. *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Dordrecht: Springer Netherlands, 45-76. doi: 10.1007/978-90-481-3983-5_2
- Vega, F. E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N.K., Monzo, A., Ownlwy, B.H., Pell, J.K., Rangel, D.E.N., Roy, H.E., (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal ecology*. 2, 149-159
- Wei, D.P., Gentekaki, E., Wanasinghe, D.N., Tang, S.M., Hyde, K.D. (2022). Diversity, molecular dating and ancestral characters state reconstruction of entomopathogenic fungi in Hypocreales. *Mycosphere* 13, 281-351. doi: 10.5943/mycosphere/si/1f/8
- Willis, C.E., Foster, S.P., Zimmer, C.T., Elias, J., Chang, X., Field, L.M., Williamson, M.S., Davies, T.G.E. (2020). Investigating the status of pyrethroid resistance in UK populations of the cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*). *Crop Prot.* doi: 10.1016/j.cropro.2020.105316
- Winde I. and Wittstock U (2011). Insect herbivore counter adaptations to the plant glucosinolate-myrosinase system. *Phytochemistry*, 72(13):1566-75. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.016.