

Végéphyll – COLLOQUE SCIENTIFIQUE SUR LES BIOAGRESSEURS DU BUIS
TOURS – 16 ET 17 OCTOBRE 2018

TECHNIQUES D'ELEVAGE DE LA PYRALE DU BUIS
T. DEFFERIER ⁽¹⁾, M. VENARD ⁽²⁾, E. COLOMBEL ⁽³⁾, E. TABONE ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ INRA PACA UEFM / FREDON IDF – France – thomas.defferier@inra.fr

⁽²⁾ INRA PACA UEFM – France – marine.venard@inra.fr

⁽³⁾ INRA PACA UEFM – France – etty.colombel@inra.fr

⁽⁴⁾ INRA PACA UEFM – France – elisabeth.tabone@inra.fr

RÉSUMÉ

Afin de mettre en place un programme de lutte biologique contre la pyrale du buis (*Cydalima perspectalis*), le laboratoire Biocontrôle de l'UEFM INRA PACA a mis au point un élevage de ce ravageur. Cet élevage garantit un apport en œufs permanent et nécessaire pour étudier les caractéristiques biologiques de cette pyrale et assurer l'ensemble des expérimentations.

Des études préliminaires de la biologie et des conditions de vie ont été nécessaires pour créer cet élevage. Aujourd'hui, la production de *C. perspectalis* se déroule en plusieurs étapes, suivant le cycle biologique naturel du papillon (œuf, larve, chrysalide, papillon).

L'élevage est opérationnel depuis plusieurs années et en optimisation régulière, pour répondre aux besoins expérimentaux, ainsi qu'à ceux des partenaires et de l'ensemble de la communauté scientifique.

Mots-clés : pyrale du buis, biocontrôle, élevage, trichogrammes, SaveBuxus.

ABSTRACT

BREEDING TECHNIQUES OF THE BOX-TREE MOTH

In order to set up a biological control program against the box tree moth (*Cydalima perspectalis*), the Biocontrôle laboratory of the UEFM INRA PACA started a *C.perspectalis* rearing. This rearing ensures a daily production of box tree moth eggs, necessary to study its biologic characteristics and to allow the realization of the whole experimentations.

Preliminary tests about the biology of the moth and life conditions were necessary to optimize this rearing. Today, the rearing is realized in several steps, following the natural biological cycle of the box tree moth (egg, larvae, chrysalid, moth).

The production is operational for several years now and in constant optimization, to answer all experimental needs for our laboratory, our partners and the whole scientific community.

Keywords: box tree moth, biocontrol, rearing, trichogramma, SaveBuxus.

INTRODUCTION

La pyrale du buis est un ravageur récemment introduit en France (Feldtrauer, 2009), dont l'expansion et les dommages importants au sein du territoire ont conduit, entre autres, au développement d'un programme de recherche de moyens de lutte biologique, le programme SaveBuxus.

L'Unité expérimentale Entomologie et Forêt Méditerranéenne (UEFM) de l'INRA PACA participe sur plusieurs volets à ce programme ; aujourd'hui dans sa deuxième phase (SaveBuxus II). Un de ces volets concerne l'utilisation de parasitoïdes oophages, les trichogrammes, afin de réguler les populations de pyrale en JEV (Jardins, Espaces Végétalisés et Infrastructures).

Le laboratoire Biocontrôle à Antibes, rattaché à l'UEFM, est en charge de l'évaluation de différentes espèces de trichogramme. Ces derniers agissent sur le stade œuf du ravageur, d'où la nécessité pour les expérimentations en laboratoire d'avoir à disposition, en continu, sur plusieurs années, des œufs de pyrale du buis. Ce papillon ne pondant des œufs que durant l'été, une collecte directement sur buis aurait contraint les expérimentateurs à attendre cette période précise pour manipuler. De plus, le développement des œufs étant rapide, les expérimentations auraient dû être effectuées dans ce court laps de temps.

Ainsi la décision a été prise d'élever la pyrale du buis au sein du laboratoire avec plusieurs objectifs. Tout d'abord, garantir un apport constant en œufs de pyrale du buis, indispensables pour sélectionner les meilleures souches de trichogrammes. Cet élevage possède aussi un intérêt dans la connaissance de la biologie de la pyrale, notamment au niveau de son cycle de développement, de la fécondité des femelles papillon, etc. Les tests préliminaires à la mise en place des élevages ont commencé en 2014.

CONDITIONS D'ELEVAGE

Dans toutes les salles d'élevage, les conditions climatiques sont de 25°C et 70% d'humidité relative. La photopériode est de 14h jour, 10h nuit, pour respecter le cycle circadien de la pyrale. La pyrale du buis est d'ailleurs un papillon nocturne : les activités de reproduction et de ponte se déroulent donc lorsqu'il n'y a plus de lumière dans les salles d'élevage, d'où l'importance de l'alternance jour/nuit (Kawazu, 2009).

Tous les déchets des élevages, végétaux ou animaux, sont placés en congélateur, au minimum une semaine, afin de limiter l'apparition de maladies pouvant affecter nos élevages, et éviter la contamination des autres pièces du laboratoire, voire du milieu externe, par la pyrale.

L'espèce de buis utilisée est *Buxus sempervirens* et provient du milieu naturel, non traité, et d'où la pyrale du buis est absente. La variété du buis ne semble pas avoir d'impact sur la vitesse de développement des larves et seule une préférence a été montrée pour la variété 'Rotundifolia' concernant la ponte des papillons (Leuthardt, 2013).

ELEVAGE DES LARVES

Deux fois par semaine, des œufs de papillon fraîchement pondus (moins de 48h) sont placés dans des boîtes d'élevage d'au moins 2L (400 œufs répartis dans deux boîtes, soit 200 œufs par boîte).

Des brins de buis frais sont ajoutés afin que les jeunes larves se nourrissent dès leur éclosion. Du buis est ensuite ajouté tous les un à deux jours afin que les larves aient toujours du buis frais à disposition. Ce buis est conservé à 15°C dans des bacs remplis d'eau et de javel, pour éviter le développement de maladies au niveau du buis et la détérioration de sa qualité. L'eau est également renouvelée toutes les semaines pour éviter toute dégradation.

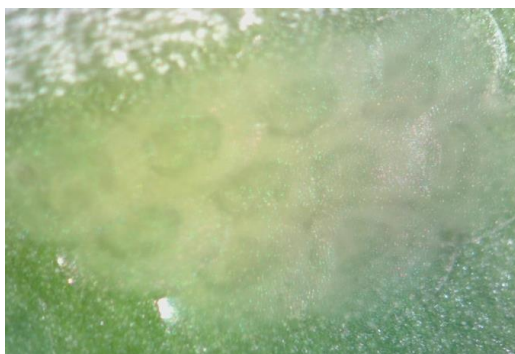


Figure 1 : Œufs de pyrale du buis vus à la loupe binoculaire (x 40)
 Figure 1: *C. perspectalis* eggs observed with binocular magnifier (x40)

Deux semaines après la mise en boîte, les larves, mesurant à ce stade plus d'un cm (stades L3-L4), sont transférées dans des boîtes d'au moins 4L afin qu'elles disposent de plus de place pour se développer. Elles sont transférées à même les brins afin d'éviter de les manipuler et de perturber leur développement.

Une semaine plus tard, les larves sont transférées sur des petits buissons de buis dans des cages de 40 x 40 x 80 cm. Ces buissons sont constitués d'une vingtaine de brins de buis dont l'extrémité est enfoncée à l'intérieur de bocal rempli d'eau. Trois buissons sont au départ placés dans la cage; des buissons sont ensuite ajoutés tous les 3-4 jours en fonction de la défoliation des buissons déjà présents. L'ajout de buisson s'arrête lorsque les larves se sont transformées en chrysalides ou lorsqu'il n'y a plus de dégât sur les buissons nouvellement ajoutés.



Figure 2 : Larves de pyrale du buis à gauche, chrysalide à droite

Figure 2: *C. perspectalis* larvae on left picture, chrysalid on the right one

L'émergence des premiers papillons a lieu deux à trois semaines après la mise en cage (c.f. partie « Cycle biologique à 25°C »). Les papillons sont, dès lors, retirés tous les jours de la cage pour être comptabilisés, sexés et placés en cage de ponte. Il est nécessaire de ne pas attendre plus de trois jours pour retirer les papillons, pour éviter qu'ils ne se reproduisent dans la cage et que cette dernière ne soit envahie de jeunes larves.

Le nombre de papillons est comptabilisé au jour le jour, pour suivre leur dynamique d'émergence et le rendement de l'élevage. Cette comptabilisation est primordiale pour contrôler l'état de l'élevage, et identifier les problèmes pouvant conduire à la mortalité des pyrales. Des observations régulières, que ce soit au stade œuf, larvaire ou chrysalide, doivent être effectuées pour détecter tout problème le plus en amont possible, et le résoudre rapidement le cas échéant.



Figure 3 : Papillons de la pyrale de buis
Figure 3 : *C. perspectalis* moths

La cage est vidée et nettoyée à la javel une semaine après l'émergence du dernier papillon. Les boîtes d'élevage de larves sont également nettoyées à la javel afin d'éviter l'apparition de maladies.

PONTE DES PAPILLONS

TESTS PRELIMINAIRES

La fécondité des femelles a été étudiée au cours du temps afin de prévoir la dynamique de ponte de ces dernières. En moyenne, les femelles pondent pendant 14.2 jours (± 3.2 jours). Sur toute sa vie, une femelle pond en moyenne 59 œufs (± 19 œufs) par jour et 930 œufs (± 300 œufs) en totalité. La figure 4 montre la dynamique de ponte par femelle et par jour. Cette courbe a été obtenue en faisant la moyenne de 21 cages contenant chacune 6 couples de papillons.

La connaissance de la dynamique de ponte permet de prévoir à l'avance le nombre d'œufs pondus au jour le jour, et, en fonction des besoins en élevage et en expérimentation, de créer de nouvelles cages de papillons afin d'obtenir plus d'œufs le cas échéant.

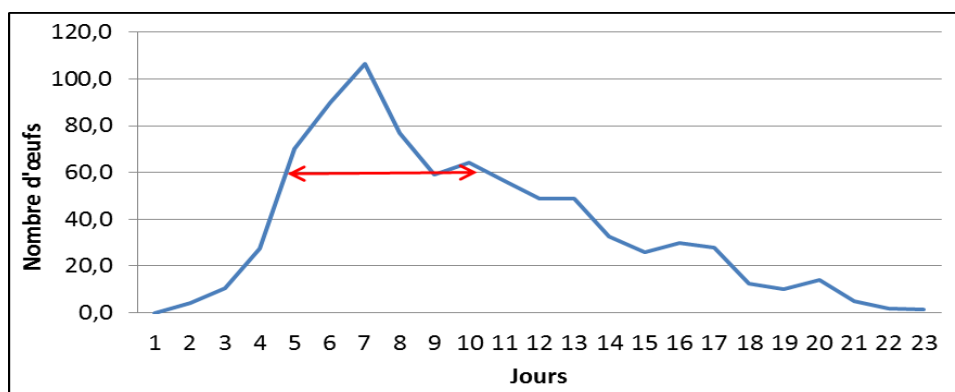


Figure 4 : Dynamique de ponte des femelles papillon au cours du temps – En rouge figure le pic de ponte de la femelle, soit entre le 4^{ème} et le 10^{ème} jour

Figure 4 : Egg-laying activity over time – The red arrow is the peak of egg-laying activity

PONTE DES PAPILLONS EN ELEVAGE

Une nouvelle cage de ponte est créée tous les jours avec 5 à 8 couples de papillons ayant moins de 48h. Ce rythme quotidien permet de produire des œufs de pyrale en permanence dans l'élevage.

Une cage de ponte (40 x 40 x 80 cm) est constituée de plusieurs flacons remplis d'eau, destinés à recevoir les brins de buis où les papillons vont pondre, ainsi que de deux petits récipients remplis de coton, un mouillé avec de l'eau, et l'autre imbibé de miel, pour permettre la nutrition des papillons.

Les cages sont nettoyées à l'eau tous les deux à trois jours pour limiter le développement de maladies. Ce nettoyage permet également d'écraser les œufs pondus sur les parois, ce qui est particulièrement vrai si des cages à parois solides sont utilisées. Les œufs pondus sur les flacons et les récipients sont également écrasés. Cette action permet d'empêcher le développement de jeunes larves dans la cage et la contamination des brins de ponte. Le nettoyage des cages est également l'occasion de renouveler l'eau des flacons et de changer le coton des récipients (sur lesquels les champignons se développent rapidement). Il faut cependant empêcher la sortie des papillons de la cage lors de ce nettoyage en plaçant des lumières à l'arrière de celle-ci (les papillons étant attirés par la lumière, ils restent cantonnés sur la face arrière de la cage, voir Figure 3).

Il est également nécessaire d'éliminer quotidiennement les papillons morts, là aussi pour limiter le développement de maladies et contrôler en même temps la qualité de l'élevage.

Le nombre de brins de buis placés dans les cages est variable au cours du temps. Chacun des brins de ponte mesure entre 10 et 15cm de long. Tous les brins sont ramassés quotidiennement, et un comptage du nombre de pontes sur chacun d'entre eux est effectué pour déterminer la productivité de la cage. Ces brins sont alors réutilisés pour la création de nouvelles boîtes d'élevage de pyrale, comme indiqué dans la partie « Elevage des larves ».

Il est possible de placer 4 à 6 brins dans les cages. Cependant, pour réduire le temps de préparation des brins et le nettoyage des flacons, notre laboratoire a décidé de raisonner le nombre de brins utilisés en fonction de l'âge et de la production des pyrales (c.f. paragraphe précédent) :

- Le premier jour, aucun brin n'est ajouté, car les femelles ne deviennent fertiles qu'au bout de 48h après l'émergence.
- Le second jour, un seul brin est ajouté.
- Du 3^{ème} au 5^{ème} jour, 4 à 6 brins sont ajoutés tous les jours, car la production d'œufs est maximale à cette période.
- Et ensuite, le nombre de brins ajoutés diminue progressivement en fonction de la production quotidienne en œufs.

La cage est vidée lorsque tous les papillons femelles sont morts. Il est également possible de vider la cage lorsque les papillons ne produisent peu ou plus (par exemple, à cause d'un mauvais développement dû à un stress lors de leur phase larvaire), s'il ne reste que très peu de femelles ou si les papillons sont âgés, afin de les remplacer par des femelles plus jeunes, qui pondent en plus grande quantité, et surtout des œufs de meilleure qualité. La cage et les ustensiles (flacons, récipients pour le coton) sont nettoyés à la javel.

RESUME D'UN CYCLE D'ELEVAGE

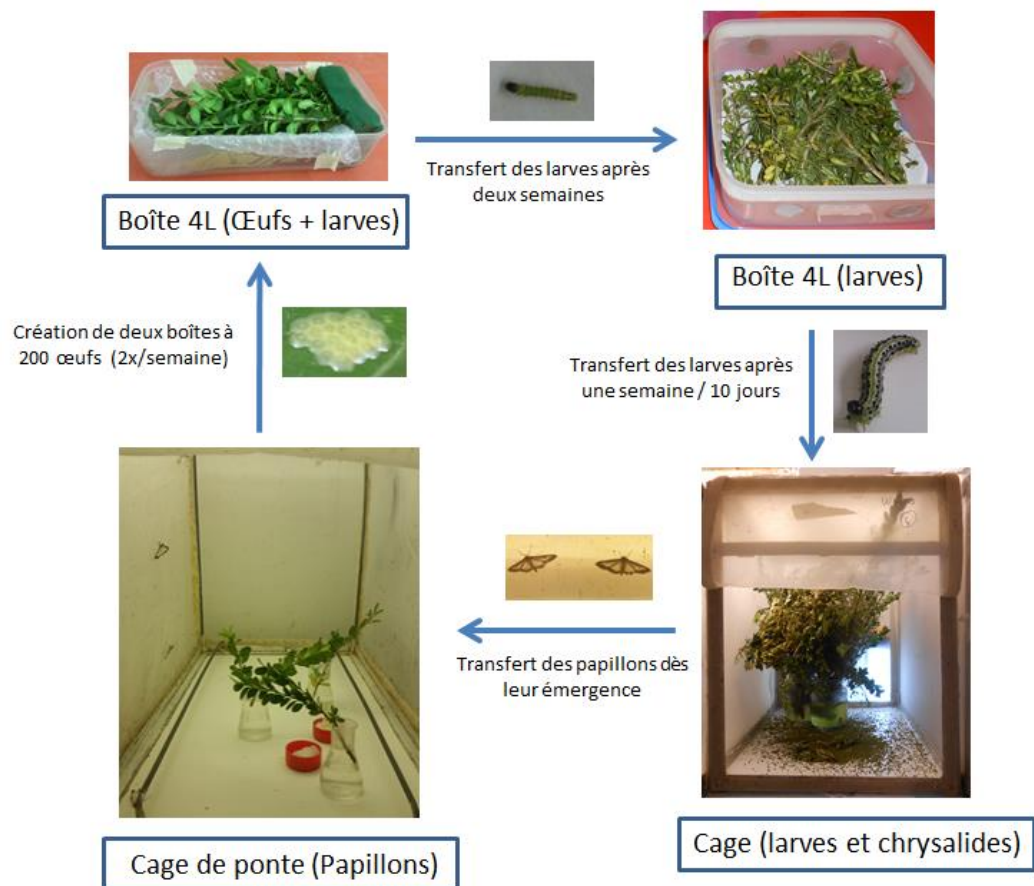


Figure 5 : Etapes de l'élevage de la pyrale du buis en laboratoire
Figure 5: *C. perspectalis* rearing steps in laboratory

CYCLE BIOLOGIQUE A 25°C

Le cycle biologique a été déterminé en calculant la durée moyenne de développement de la pyrale du buis pour chacun de ses stades (œuf, larvaire, chrysalide, papillon). Cette évaluation a été effectuée en conditions de laboratoire (25°C et 70% d'humidité relative, 14h jour, 10h nuit), sur des boîtes contenant au départ 200 œufs de pyrale du buis.

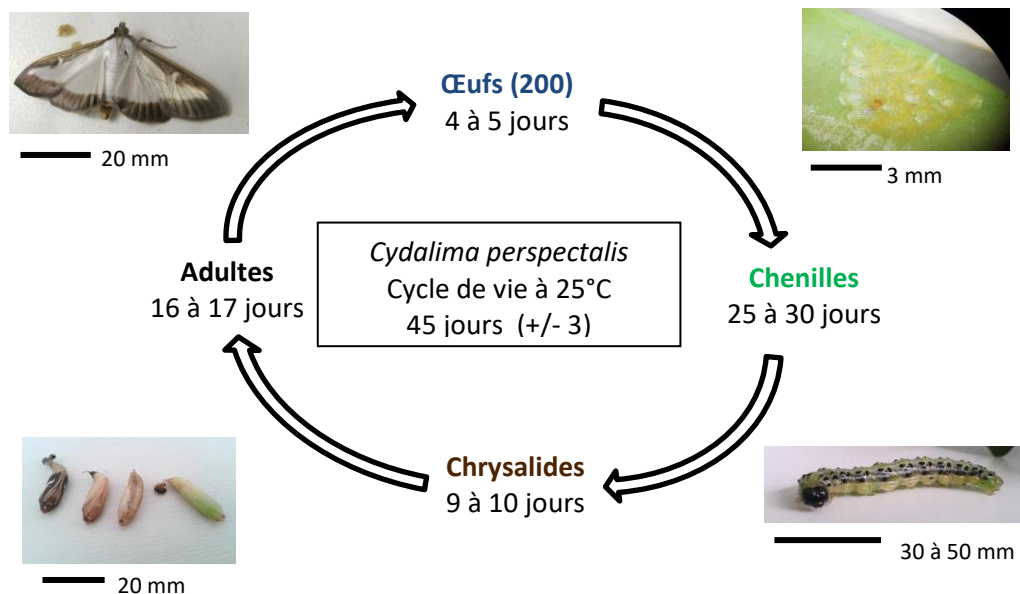


Figure 6 : Cycle biologique de la pyrale du buis (à 25°C, 200 œufs /boîte d'élevage)
Figure 6: *C. perspectalis* biological cycle (25°C, 200 eggs/rearing box)

La maturation des œufs dure en moyenne 4 à 5 jours entre la ponte par la femelle papillon et l'éclosion des larves. Il n'y a que très peu de variabilité au niveau de ce stade : la majorité des larves éclosent le même jour.

La variabilité est plus grande pour le développement des chenilles (entre 25 et 30 jours en moyenne). Cette variabilité a probablement plusieurs origines, mais une des principales hypothèses est la nutrition des larves et la qualité du buis. Les larves, en particulier les plus jeunes, arrivent plus facilement à attaquer et manger des feuilles fraîches et jeunes que des feuilles plus sèches et plus vieilles. La vitesse de croissance sur des brins de buis frais et jeunes est donc plus élevée que sur des brins vieux et secs. Le développement de certaines chenilles peut même durer plus de 30 jours, en particulier quand celles-ci ont subi un stress (manque de nourriture, d'humidité, compétition, ...).



Figure 7 : Evolution de la taille de la pyrale du buis au cours du temps (1 carreau = 5mm de long)
Figure 7: Growing of *C. perspectalis* (1 case = 5mm)

Les caractéristiques génétiques peuvent avoir une influence sur la vitesse de développement des larves, ainsi que le sexe de ces dernières ; en effet, les mâles vont avoir tendance à se développer

plus rapidement que les femelles. Il est à noter que la présence de moisissure dans les boîtes d'élevage pourrait être également un frein au développement des larves, même si cela n'a pas été expérimentalement confirmé.

La chrysalide se développe en 9 à 10 jours. Elle passe d'une couleur verte/jaune au blanc/noir en 5 à 6 jours.

Enfin, les papillons ont, sans activité de reproduction, une durée de vie moyenne de 16 à 17 jours. Avec activité de reproduction, la survie des papillons est moins bonne (10 jours environ). La sex-ratio est de 0.5 (soit en moyenne 50% de mâles et 50% de femelles). Les mâles émergent plus tôt (deux à trois jours en moyenne) que les femelles.

Au total, un cycle complet de développement dure en moyenne 45 ± 3 jours. Il est possible d'accélérer (ou de ralentir) le développement de chacun des stades en augmentant (ou diminuant) la température des salles en fonction des besoins d'élevage et d'expérimentation, en particulier pour les stades œuf et chrysalide.

PROBLEMATIQUES D'ELEVAGE

PROBLEMATIQUES LIEES A L'HUMIDITE

Un des problèmes majeurs de l'élevage de pyrale du buis est le fait d'utiliser des brins de buis, qui, lorsqu'ils sont coupés, sèchent en deux à trois jours. Les larves, en particulier les plus petites, ne peuvent alors plus se nourrir et finissent par mourir assez rapidement. Elles vont alors essayer de sortir de la cage, ou avoir un développement perturbé.

Le premier dispositif utilisé par notre laboratoire correspond à des boîtes dans lesquels les brins sont simplement empilés les uns sur les autres. Ces derniers étaient aspergés d'eau quotidiennement, et des brins frais étaient ajoutés tous les jours sur les anciens.

A cause du dessèchement encore trop rapide des brins, un second dispositif a été testé. Dans ce dispositif, le fond des boîtes est rempli d'eau. De la mousse florale absorbante est placée dans cette eau et les brins sont enfoncés dans cette mousse. Une toile en plastique (ou du papier bulle) est scotchée sur les parois de la boîte et sert d'isolant entre l'eau et les brins. Les brins ne sont ainsi jamais en contact avec l'eau, si ce n'est leur extrémité qui est à l'intérieur de la mousse. Cette dernière permet au brin de rester frais bien plus longtemps (jusqu'à deux semaines, alors qu'il est difficile de garder les brins frais plus de cinq jours avec le premier dispositif).

La mortalité des larves par dessèchement des brins est ainsi réduite, mais le dispositif est plus long à mettre en place, et plus contraignant (il faut par exemple faire attention à ne pas faire trop pencher la boîte pour éviter que l'eau ne passe par-dessus la toile protectrice et vienne noyer les larves).



Figure 8 : Dispositif d'élevage avec mousse absorbante et isolant entre les brins de buis et le fond de la boîte rempli d'eau

Figure 8: Rearing box with absorber foam and protection between box tree strands and the bottom of the box (full of water)

AUTRES PROBLEMATIQUES

Un des problèmes évoqués dans les parties précédentes est la possibilité de développement de maladie, qui est un danger majeur pour tous les élevages d'insectes. L'hygiène, à la fois de la salle d'élevage et des objets utilisés pour ce dernier, est primordiale. L'utilisation de gants est fortement recommandée pour diminuer la transmission de maladies aux insectes et protéger le laborantin.

Cependant, la forte humidité que requiert ce type d'élevage, en particulier pour garder le buis frais, ainsi que l'accumulation des déchets sous forme de fèces, de soies et de feuilles dégradées par les larves, favorisent le développement de champignons et de bactéries dans les boîtes d'élevage. Ces pathogènes sont particulièrement durs à éviter dans les dispositifs où les brins sont ajoutés les uns sur les autres, et où le buis est maintenu frais par aspersion d'eau. En effet, l'eau aspergée va entrer directement en contact avec ces déchets et favoriser le développement de ces pathogènes.

Pour résoudre ce problème, il peut être utile de retirer régulièrement les brins de buis complètement mangés, voire de nettoyer la boîte de tous les déchets. Il faut cependant veiller à ne pas trop manipuler les larves, pour ne pas perturber leur développement.

Le second dispositif, utilisé actuellement dans notre laboratoire, résout en partie le problème du développement des champignons, car les déchets ne sont plus en contact direct avec l'eau. Les brins mangés vont avoir tendance à sécher et à ne pas développer de mycélium. Cependant, un plus faible volume sera disponible dans la boîte, ce qui peut perturber le développement des chenilles. Le buis ajouté sera en effet tassé plus fortement, et les chenilles auront moins d'espaces pour circuler. L'aération à l'intérieur de la boîte sera également moins bonne. Il faut donc utiliser des boîtes avec assez de volume, à la fois pour aérer la boîte et limiter l'apparition de maladies, mais également pour permettre un meilleur développement des chenilles en leur laissant plus d'espace.

CONCLUSION

L'élevage de pyrales du buis au sein du laboratoire Biocontrôle (UEFM INRA PACA) répond aujourd'hui parfaitement aux contraintes posées initialement. Tout d'abord, il garantit l'apport d'œufs de pyrale du buis de bonne qualité de façon quotidienne, à la fois pour renouveler les générations de pyrale au sein de l'élevage, mais également pour les utiliser en expérimentation.

L'élevage est en constante évolution, répondant aux différentes contraintes humaines, matérielles, et aux différents problèmes qui ont pu être rencontrés (humidité du buis, développement de moisissure, renouvellement génétique des populations, ...). Les besoins ont également évolué, que ce soit en œufs, mais également en larves, en chrysalides et en papillons, notamment pour nos partenaires souhaitant effectuer des expérimentations sur ces organismes.

Pour ces partenaires, il est nécessaire d'adapter l'élevage en fonction de leurs demandes, et de produire en amont plus de pyrales qu'habituellement en augmentant le nombre de boîtes d'élevage par génération. Attention toutefois à ne pas augmenter le nombre de pyrale par boîte, ce pour éviter les effets de concurrence entre larves au sein d'une même boîte, ce qui pourrait diminuer leur espérance de vie. Les partenaires souhaitant obtenir des pyrales doivent nous prévenir à l'avance de leurs besoins afin que nous puissions nous adapter suffisamment tôt pour y subvenir.

BIBLIOGRAPHIE

Feldtrauer J-F., Feldtrauer J-J., Bruan C., 2009 – Premiers signalements en France de la Pyrale du Buis *Diaphania perspectalis* (Walker, 1859), espèce exotique envahissante s'attaquant aux Buis. Bulletin de la Société d'entomologie Mulhouse, 65, 4, 55-58.

Kawazu K. Nakamura S., Honda H., Adati T., 2010. Effects of photoregime on the diel rhythmicity of male responses to sex pheromones in *Glyphodes perspectalis* (Lepidoptera : Crambidae). Applied Entomology and Zoology, 45, 1, 169-176.

Leuthardt F. L. G., Baur B., 2012 – Oviposition preference and larval development of the invasive moth *Cydalima perspectalis* on five European box-tree varieties. Journal of Applied Entomology, 137, 6, 437-444.

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés grâce au concours financier et technique de Plante & Cité, Astredhor, Val'hor, FranceAgriMer, l'Onema dans le cadre d'Ecophyto, et la Fondation de France, à travers le programme SaveBuxus.

Et enfin, un remerciement aux anciens collaborateurs ayant travaillé à la mise en place et à l'amélioration constante de ces élevages : Caroline Giorgi, Thomas Enriquez, Arnaud Cartier, Sarah Grauby et Cyrielle Digout.