

Production durable d'extraits naturels biocides de deux Pipéracées à La Réunion

Deguine J.-P.¹, Atiama-Nurbel T.², Ajaguin Soleyen C.¹, Bialecki A.³, Beaudemoulin H.⁴, Carrière J.⁵, Chiroleu F.¹, Clerc P.³, Cortesero A.-M.⁶, Doizy A.¹, Dorla E.³, Fillâtre J.², Ginglinger J.-F.⁷, Graindorge R.², Grondin I.³, Lamy F.⁶, Laurent P.³, Ligonnière A.², Marchand P.⁵, Tostain G.⁸

Avec la collaboration de : Aboudou F., Allègre A., Barret C., Billot T., Boyer C., Cresson C., Deuscher Z., Fremont A., Heureude L., Lamy F., Maillot L., Mahadeo K., Monot C., Moutoussamy M.-L., Pottam P., Pruvost O., Schmitt T., Shum A., Stanislas G., Vogt P.-G.

¹ CIRAD, UMR PVBMT, F-97410 Saint Pierre, La Réunion

² ARMEFLHOR, 1 Chemin de l'IRFA, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion

³ LCSNSA, Université de La Réunion, 15 avenue René Cassin, CS 92003, F-97744 Saint-Denis cedex 9, La Réunion

⁴ SHBP, 31 chemin de la Croix de Jubilé, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion

⁵ ITAB, 149, rue de Bercy, F-75595 Paris cedex 12

⁶ IGEPP, UMR INRAE 1349 - Université de Rennes 1 - 263 Avenue du Général Leclerc, CS 74205, F-35042 Rennes cedex

⁷ Plant Advanced Technologies (PAT SA), 19 Avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy

⁸ Qualitropic, 5 rue André Lardy, F-97438 Sainte-Marie, La Réunion

Correspondance : jean-philippe.deguine@cirad.fr

Résumé

Le projet BIOPIPER est un projet Casdar (Innovation et partenariat) qui s'est déroulé à La Réunion de 2015 à 2018 avec différents partenaires de la Recherche et du Développement. Sa finalité est de produire durablement des extraits naturels de deux Pipéracées (*Peperomia borbonensis* et *Piper borbonense*), en vue de leur utilisation dans le cadre de la Protection agroécologique des cultures. On distingue 3 objectifs généraux : (1) Mettre en synergie les compétences de partenaires aux mandats complémentaires sur l'utilisation de plantes endémiques comme outils de biocontrôle ; (2) Concevoir et mettre au point la production durable des deux plantes en vue de leur utilisation comme outils de biocontrôle ; (3) Diffuser et valoriser les résultats et produits obtenus. Le projet s'est articulé autour de 4 actions. L'action 1 a permis de concevoir, de mettre au point et d'optimiser la production des deux Pipéracées permettant d'assurer une production optimale de biomasse foliaire. L'action 2 a permis de produire et de caractériser sur le plan phytochimique les extraits de différents écotypes des plantes sauvages et cultivées. L'action 3 a mesuré l'efficacité biocide des extraits sur divers bioagresseurs (bactéries, arthropodes) de caractère générique et d'importance économique à La Réunion et à l'échelle nationale. Sur les Mouches des fruits, ravageurs redoutables à l'échelle mondiale, les DL 50 et DL 95 (doses létales de 50 % et 95 % de la population) ont été mesurées sur 5 espèces (*Zeugodacus cucurbitae*, *Bactrocera zonata*, *Bactrocera dorsalis*, *Ceratitis quilicii* et *Neoceratitis cyanescens*), avec des extraits à base d'huile essentielle. L'analyse des résultats des DL 50 montre des différences entre les plantes, les écotypes et les types d'extraits. Les tests de DL 50 avec les huiles essentielles ont été conduits sur d'autres ravageurs d'importance économique (*Bemisia tabaci*, individus issus d'élevage ; *Frankliniella occidentalis*, individus prélevés en culture de poivron sous serre), une drosophile (*Drosophila melanogaster*, individus issus d'élevage). L'huile essentielle de *P. borbonense* a également

été testée sur différents ravageurs des légumes métropolitains (la Mouche du chou, *Delia radicum*, le méligèthe *Meligethes aeneus* et l'altise d'hiver, *Psylliodes chrysocephala*). Un effet biocide a été trouvé sur tous les insectes testés avec des variations importantes de sensibilité. Des tests olfactométriques ont également été réalisés et ont révélé que l'huile essentielle de *P. borbonense* n'est pas répulsive. Ce résultat est encourageant et permet d'envisager une application ciblée du produit toxique via la nourriture ou les sites de nutrition du ravageur (approche « attract & kill »). L'action 4 a initié le processus visant à constituer un dossier réglementaire en vue de l'utilisation commerciale de la production des plantes ou des extraits. Le projet BIOPIPER a permis la création d'un dispositif en partenariat opérationnel et original, permettant de screener, à des fins de recherches ou de prestations de service, l'activité biocide d'extraits de différentes plantes.

Mots-clés : biocontrôle, Piperaceae, BIOPIPER, huiles essentielles, efficacité biocide.

Abstract: Sustainable production of biocidal natural extracts of two Piperaceae in Reunion

The BIOPIPER project is a French Innovation and Partnership project that took place in Reunion Island from 2015 to 2018 with different partners of Research & Development. Its purpose was to produce natural extracts of two Piperaceae (*Peperomia borbonensis* and *Piper borbonense*) in a sustainable approach, for a use in the context of agroecological crop protection. There were 3 general objectives: (1) Synergize the skills of partners with complementary mandates on the use of endemic plants; (2) Design and implement sustainable production of both plant extracts and evaluate their efficacy as bioprotection agents; (3) Disseminate and enhance the obtained results and products. The project was structured around four actions. Action 1 made it possible to design, develop and optimize the production of the two Piperaceae to ensure optimal production of foliar biomass. Action 2 made it possible to produce and characterize phytochemical extracts of different ecotypes of wild and cultivated plants. Action 3 measured the biocidal efficacy of extracts on various crop pests (bacteria, arthropods) of a generic nature and of economic importance in Reunion Island and at the French national level. On fruit flies, which are fearsome pests worldwide, LD 50 and LD 95 (lethal doses of 50% and 95% of the population) were measured on five species (*Zeugodacus cucurbitae*, *Bactrocera zonata*, *Bactrocera dorsalis*, *Ceratitis quilicii* and *Neoceratitis cyanescens*), with essential oil-based extracts. Analysis of the LD 50 results showed differences between plants, ecotypes and types of extracts. LD 50 tests with essential oils were carried out on other economically important pests (*Bemisia tabaci*, *Frankliniella occidentalis*), a non-pest fly (*Drosophila melanogaster*). The essential oil of *P. borbonensis* has also been tested on various temperate pests (*Delia radicum*, *Meligethes aeneus*, *Psylliodes chrysocephala*). A biocidal effect was found on all insects tested with significant variations in sensitivity. Olfactometric tests were also carried out and revealed that the essential oil of *P. borbonensis* is not repellent. This result is encouraging and makes it possible to consider a targeted application of essential oil via bait in an "attract & kill" approach. Action 4 initiated the process of developing a regulatory folder for the commercial use of plant or extract production. Finally, the BIOPIPER project has made it possible to create an operational and original consortium in partnership in order to screen, for research or service purposes, the biocidal activity of extracts from different plants.

Keywords: bioprotection, Piperaceae, BIOPIPER, essential oils, biocide efficacy.

Introduction

L'avenir de l'agriculture et sa durabilité économique, sanitaire et écologique reposent sur une évolution significative et attendue des pratiques phytosanitaires, qui dépendent aujourd'hui trop de l'utilisation de pesticides chimiques. La Protection AgroEcologique des Cultures (PAEC) est un concept de protection des cultures reposant sur un raisonnement écologique en vue d'un fonctionnement durable des agroécosystèmes (Deguine et al., 2016). Sur le principe, la PAEC correspond à la déclinaison des principes de l'agroécologie à la protection des cultures. La PAEC vise à favoriser le fonctionnement

écologique des agroécosystèmes, en optimisant directement ou indirectement les interactions entre les communautés vivantes (végétales, animales et microbiennes) aussi bien endogées, épigées qu'aériennes. La santé du sol et la biodiversité de l'agroécosystème sont les deux axes directeurs de la PAEC et les trois principaux piliers sont les mesures préventives, la lutte biologique et la gestion des habitats. C'est dans le cadre de la lutte biologique que des outils de biocontrôle basés sur l'utilisation de plantes ou d'extraits de plantes sont développés.

La chimiodiversité végétale représente de nouvelles sources potentielles de biopesticides. En effet, chez les plantes, la capacité à accumuler des métabolites secondaires ayant une activité antimicrobienne ou insecticide constitue l'un des premiers mécanismes de défense des plantes face aux bioagresseurs. L'utilisation d'extraits de plantes dans le domaine phytosanitaire est considérée comme une bonne alternative aux molécules synthétiques plus récalcitrantes et dont les impacts sur la santé des utilisateurs et des consommateurs sont de plus en plus évidents. La nécessité de pouvoir disposer d'alternatives à l'utilisation des pesticides chimiques a conduit à un regain d'intérêt pour l'exploration de la diversité chimique des ressources naturelles du monde vivant, et notamment des ressources végétales terrestres.

La famille des Piperaceae, largement répandue dans les pays tropicaux et subtropicaux est connue pour présenter des propriétés insecticides et antimicrobiennes (Assabgui et al., 1997). Des activités acaricides, antibactériennes, anti-inflammatoires, analgésiques ont été décelées pour les huiles essentielles de diverses espèces de *Peperomia*, les phénylpropanoïdes étant les composés majoritaires pour certaines d'entre elles, avec notamment la présence du dillapiole (de Lira et al., 2009). Pour sa part, le genre *Piper* a une grande importance médicinale, économique et commerciale. Certaines espèces de ce genre sont utilisées en médecine populaire, pour des propriétés antibactériennes, antifongiques ou antiprotozoaires. Ce genre est également traditionnellement utilisé contre les ravageurs des cultures : plus de quinze espèces sont connues pour avoir une activité insecticide (Bernard et al., 1995 ; de Oliveira et al., 2012 ; Matasyoh et al., 2011).

La richesse de la chimiodiversité offerte par la flore de La Réunion présente des perspectives prometteuses dans ce contexte. La Réunion est caractérisée par un fort taux d'espèces endémiques, qui constitue un réservoir potentiel de nouvelles molécules bioactives. La Réunion appartient en effet, avec d'autres îles de la zone, à l'un des 25 « points chauds » (hotspots) de la diversité biologique mondiale. De nombreuses espèces de cette flore remarquable, principalement indigènes ou endémiques, sont utilisées traditionnellement par la population locale pour leurs vertus médicinales. En revanche, bien plus rares sont leurs usages dans le domaine de l'agroécologie ou de la médecine ethno-vétérinaire. Depuis quelques années, des travaux ont été engagés à l'Université de La Réunion sur la recherche d'activités insecticides, acaricides et antimicrobiennes d'extraits de plantes endémiques ou indigènes réunionnaises. Le criblage d'extraits de différentes plantes de la famille des Pipéracées a été mené sur des modèles de ravageurs présents sur l'île, comme par exemple la Mouche du melon (*Zeugodacus cucurbitae*) (Dorla et al., 2018) ou encore la tique du bétail (*Rhipicephalus microplus*) (Dorla et al., 2019). Parallèlement, les activités antibactériennes ont été évaluées sur trois genres bactériens phytopathogènes : *Ralstonia*, *Xanthomonas* et *Erwinia*. De ces constations bibliographiques sur cette famille de plantes et des premiers criblages des différents extraits, deux espèces ont été retenues pour leur efficacité biocide potentielle : *Peperomia borbonensis* et *Piper borbonense* (que nous appellerons respectivement *Peb* et *Pib* dans la suite). Le projet BIOPIPER s'est engagé dans la production d'extraits de ces plantes, et dans l'évaluation de leur efficacité sur des bioagresseurs des cultures. Le projet BIOPIPER s'inscrit dans ce contexte et vise à valoriser, sur le plan phytosanitaire, des plantes d'intérêt, notamment des plantes endémiques, avec une portée des résultats dépassant l'échelle de l'île (caractère générique).

Les objectifs généraux de BIOPIPER sont de (1) concevoir et mettre au point la production durable des deux plantes et de proposer des outils innovants de biocontrôle ; (2) mettre en synergie les compétences de partenaires aux mandats complémentaires sur une thématique non explorée et

prometteuse en protection agroécologique des cultures. Les objectifs spécifiques de BIOPIPER sont de (1) concevoir, mettre au point et optimiser la production de ces deux plantes ; (2) produire et caractériser sur le plan phytochimique des extraits des plantes sauvages et cultivées ; (3) mesurer l'efficacité des extraits sur divers bioagresseurs d'importance économique à La Réunion et à l'échelle nationale (insectes, acariens, bactéries) ; (4) apporter les connaissances réglementaires en vue de l'utilisation commerciale de la production des extraits ; (5) diffuser les résultats pour un transfert réussi auprès des bénéficiaires.

1. Organisation et mise en œuvre

1.1 Les actions mises en œuvre

La finalité de BIOPIPER est de produire à La Réunion des extraits naturels de deux Pipéracées, en vue de leur utilisation en protection agroécologique des cultures. En amont, BIOPIPER propose de mettre au point la production de ces plantes. Les recherches porteront sur la caractérisation phytochimique des extraits de plantes et sur la mesure de leur efficacité sur des bioagresseurs d'importance économique à La Réunion et à l'échelle nationale. En aval, BIOPIPER vise la valorisation commerciale et réglementée, en partenariat, de la production des extraits, au bénéfice des filières agricoles et des consommateurs. Cette finalité du projet a permis de structurer le projet selon 5 actions :

Action 0. Animation et coordination du projet

Action 1. Mise en production des plantes sélectionnées

Action 2. Production et caractérisation phytochimique des extraits des plantes sauvages et cultivées

Action 3. Evaluation des propriétés biocides des extraits des plantes

Action 4. Valorisation technique, scientifique et commerciale des résultats.

1.2 Le partenariat

BIOPIPER rassemble des partenaires techniques complémentaires et répartis de manière cohérente en France : en métropole et sur l'île de La Réunion :

(1) ARMEFLHOR : Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière, Légumière et Horticole ;

(2) CIRAD : Centre de Coopération Internationale de Recherche Agronomique pour le Développement (UMR PVBMT, La Réunion) ;

(3) ITAB : Institut Technique de l'Agriculture Biologique ;

(4) PAT : Plant Advanced Technologies SA ;

(5) SHBP : Société Horticole de Bassin Plat (entreprise certifiée ISO 14001)

(6) Université Rennes 1 (UMR 1349 IGEPP, INRA) ;

(7) Université de La Réunion (Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments, LCSNSA).

D'autres partenaires sont impliqués dans le comité de pilotage du projet : ARIFEL (Association Réunionnaise Interprofessionnelle des Fruits Et Légumes) ; GAB (Groupement des Agriculteurs Biologiques) ; Parc National de La Réunion ; réseau d'agriculteurs ; UMT SPAT (Santé Végétale et Production agroécologique en milieu tropical). Le projet BIOPIPER a également reçu le soutien des pôles de compétitivité QUALITROPIC et TERRALIA qui ont labellisé le projet. Le pôle QUALITROPIC a joué un rôle moteur et très actif dans la conception et la réalisation du projet. Par ailleurs, le financement du projet est assuré par le fonds CASDAR ainsi que d'autres partenaires financiers : Conseil régional de La Réunion, Conseil général de La Réunion, Etat, Union européenne.

1.3 L'animation et la coordination du projet

Les principales activités d'animation et de coordination du projet portent sur la gestion administrative et financière, la garantie du respect des conventions, la responsabilité scientifique et technique du projet, la responsabilité de l'état d'avancement du projet, la responsabilité de la communication externe, la gestion technique et animation quotidienne du projet, l'organisation des réunions et comités, la responsabilité de la rédaction et la validation des rapports, le respect de l'accord de consortium. Par ailleurs, un groupe de travail inter-acteurs regroupe différents acteurs autour du chef de projet sur la thématique de la connaissance des plantes et de leur écologie dans leur milieu. Au quotidien, le travail de coordination s'appuie sur les moyens de communication classiques (réunions, compte rendus, téléphone, mail). Des documents type newsletter interne permettent de diffuser l'information et les actualités, notamment dans l'action 4. La communication externe se fait avec parcimonie (respect de l'accord consortium) par des présentations, la participation aux événements, des restitutions, de la presse écrite et télévisée.

Un comité de pilotage se tient tous les ans. Des séminaires internes sont organisés en fin de projet et permettent de consolider des activités transversales (valorisation, communication, réglementation, ...), de mieux structurer les études d'interactions entre actions et de réfléchir aux suites des expérimentations, des orientations tactiques et stratégiques et aux besoins en recherche. Un accord de consortium entre les partenaires du projet a été conçu et signé en début de projet, grâce à l'appui du pôle de compétitivité Qualitropic. Cet accord régit l'ensemble des règles contractuelles de partenariat, dont la règle de propriété intellectuelle.

2. Mise en production des plantes sélectionnées

L'ARMEFLHOR et la Société Horticole de Bassin Plat sont en charge de préciser les itinéraires techniques de production de *Piper borbonense* (indigène) et de *Peperomia borbonensis* (endémique). Ces deux espèces, présentes en milieu naturel, n'ont jamais été cultivées ; aucune bibliographie ou fiche technique préexistante n'a pu être exploitée au démarrage du projet. Les objectifs de cette action sont de réaliser des prélèvements en milieu naturel, de mettre en collection des ascensions tracées, d'évaluer des conditions pédoclimatiques pour l'acclimatation des deux espèces et d'acquérir des références techniques sur leur production horticole.

2.1 Prélèvements de matériel de base en milieu naturel

Le matériel végétal de *P. borbonense* (Pib) et *P. borbonensis* (Peb) a été collecté sous la direction et l'assistance du Conservatoire National Botanique de Mascarin (CBN-CPIE Mascarin). En s'appuyant sur une cartographie des stations naturelles des deux espèces, il a été possible de réaliser un échantillonnage représentatif de leur aire de répartition respective. Prenant en compte la diversité de la répartition géographique et des situations pédoclimatiques, plusieurs stations naturelles ont été échantillonnées pour chacune des deux espèces. Pour chaque station (accession), 5 échantillons (portion de plantes), issus de 5 plantes différentes, sont collectés et tracés selon l'origine et la date du prélèvement. Une partie de ce matériel tracé est transmis à l'Université de La Réunion pour analyser la variabilité de la composition biochimique intra ou inter-accession. Une autre partie de ces lots est référencée et conservée à l'ARMEFLHOR, mise en multiplication puis en collection.

2.2 Caractérisation des conditions naturelles de croissance des deux espèces

Les deux espèces n'ayant jamais fait l'objet de tests de culture horticole, une bonne compréhension des conditions pédoclimatiques de leur milieu naturel doit permettre d'adapter les abris horticoles, afin de restituer au mieux les conditions optimales de croissance. C'est sur cette assise technique de départ

que sont construites les étapes ultérieures d'expérimentation et de construction d'itinéraire technique.

Dans le milieu naturel, les stations de prélèvement de *Peb* se situent dans une tranche altitudinale assez restreinte, le plus souvent entre 1400 et 1700 mètres d'altitude. C'est donc une espèce typiquement adaptée aux climats frais tempérés. Les conditions de croissance de *Peb* présentent quelques différences : dans les forêts de bois de couleurs, *Peb* pousse en position épiphyte ; dans les forêts plus ouvertes, *Peb* pousse au sol ou en recouvrement des massifs rocheux. Pour sa part, *Pib* est présent sous forêt, depuis le niveau de la mer, et jusqu'aux altitudes moyennes (1050 m pour la station des Makes). Cette espèce lianescente recherche le support des arbres où elle développe dans un premier temps un axe orthotrope muni de feuilles simples et lancéolées. Lorsque la liane parvient à la cime des arbres et y rencontre davantage de lumière, des ramifications plagiotropes se développent, porteuses de feuilles composées. Ces ramifications sont aussi porteuses des inflorescences mâles ou femelles selon les plants, l'espèce étant dioïque.

2.3 Tests de multiplication pour la mise en place de pépinières de plants-mères

L'acquisition de données sur ces deux espèces a permis de déterminer une multiplication par voie végétative performante, suite à divers tests, prenant en compte plusieurs facteurs : type de multiplication de tête ou de tronçons, type de substrat, format des contenants.

Concernant *Peb*, les taux de multiplication en plaque de multiplication atteignent en moyenne 90% quel que soit le matériel végétal utilisé (sommités apicales ou nœuds). Des différences significatives de rapidité d'enracinement en fonction des zones de prélèvement ont toutefois été observées. Cette différence de développement, dès les premiers stades, s'est vérifiée sur les cycles suivants, mettant en relief des différences morphologiques qui se traduisent par des vigueurs différentes et non pas par un effet « terroir » lié aux zones de prélèvement.

Concernant *Pib*, les campagnes de prélèvements en milieu naturel ont permis d'acquérir de nombreuses informations sur la physiologie de la plante et son développement. Un polymorphisme important lié au stade de développement des plantes a été observé. Les résultats en multiplication obtenus ont été similaires, quel que soit le stade de développement, permettant d'avoir des taux de reprise approchant les 95 %.

2.4 Mise en production et développement d'itinéraires techniques

Sur la base des connaissances acquises concernant les paramètres de multiplication de ces espèces, des expérimentations successives se sont attachées à préciser les autres facteurs de maîtrise de la qualité de la production et de l'optimisation des rendements. Ces essais ont porté principalement sur les points suivants : la maîtrise des substrats de culture, des contenants de production, des densités de plantation ; l'optimisation du climat et de l'hygrométrie dans les serres ; la maîtrise des techniques de récoltes de la production ; le contrôle phytosanitaire ; la quantification de la biomasse produite (aspects quantitatifs) et des profils chimiques obtenus (aspects qualitatifs) en fonction des origines géographiques et des plants de référence.

Pour *Peb*, après la confrontation des performances horticoles par origine et la caractérisation biochimique des lots correspondants, les deux écotypes REC (Roche Ecrite) et NDP (Notre Dame de la Paix) sont les seuls retenus pour les mises en culture dans la suite du projet. Les choix agronomiques ont été de tester des contenants avec des substrats différents, ainsi que des supports de culture de type « murs végétaux ».

La conduite sur murs végétaux de *Peb* a permis d'optimiser le développement racinaire des plants en condition plus drainante et en position épiphyte, afin de se rapprocher des conditions de croissance

dans le milieu naturel. Par ailleurs, la culture sur mur végétal a été conduite sous une petite unité de production close (serre expérimentale de l'ARMEFLHOR), qui a permis d'installer (à titre expérimental) une petite unité de climatisation. Celle-ci a permis de limiter notablement les températures maximales diurnes et nocturnes, réduisant d'autant les pertes de plants observées en saison chaude et humide (d'octobre à mars). Cette conduite de la culture en murs végétaux a donné satisfaction, correspondant bien aux besoins de drainage (par gravité) de cette plante. Ce système permet, par ailleurs, d'optimiser l'espace et de densifier horizontalement la culture. Ceci est possible du fait de la faible compétition pour la lumière entre les plants, cette espèce ayant des besoins très limités en intensité lumineuse. Il est donc possible de cultiver *Peb* à basse altitude, sans avoir à renouveler les pieds-mères en période estivale, en maintenant les plants à des températures n'excédant pas 16°C la nuit et 25°C la journée. Il est cependant nécessaire de souligner les contraintes économiques très fortes qui découleraient de l'exploitation de *Peb* sous ces conditions, qu'il s'agisse des coûts d'investissement en matériel frigorifique ou des coûts énergétiques. Tout ceci rend cette option technique peu réaliste en basse altitude à La Réunion. L'option la plus réaliste, du point de vue économique est de proposer la production de *Peb* entre 1500 et 1700 mètres d'altitude, ce qui correspond à la zone de répartition naturelle de l'espèce. Cette disposition étant prise, il est en revanche possible « d'horticoliser » la culture, c'est-à-dire d'utiliser toutes les techniques usuelles de l'horticulture, en terme d'abris (production sous ombrière à 70 % d'ombrage) et d'intrants horticoles (substrats, supports de cultures, contenants, fertilisants), afin d'optimiser les rendements. Concernant le substrat et le type de support, un substrat drainant est très important car cette plante a un système racinaire peu développé qui supporte mal l'asphyxie. Une conduite sur mur végétal se révèle efficace en termes de production de biomasse. Cela permet à la plante d'exprimer son potentiel épiphyte avec un gain de place important et une gestion en eau plus aisée.

Peb est une espèce pérenne qui ne supporte pas les coupes sévères. Dans le cadre du projet et afin d'approvisionner les essais biologiques, des coupes répétées ont cependant été réalisées toute l'année. Cela a pu se faire en prenant des précautions de taille, n'autorisant pas de récolte au-delà des deux entre-nœuds situés au-dessous de l'extrémité des tiges. Des coupes plus sévères risquent de compromettre durablement la reprise de végétation, voire de provoquer le dépérissement de la plante. Des différences très nettes quant au potentiel de rendement des différents écotypes ont pu être quantifiées. L'origine REC s'avère beaucoup plus robuste en production et beaucoup plus productive que l'origine NDP, très malingre et qui produit une biomasse faible. On peut faire le rapprochement avec les différences que l'on constate dans leur milieu d'origine pour ces deux origines, l'une étant essentiellement présente au sol (REC), l'autre essentiellement épiphyte (NDP). Ceci tendrait à démontrer une variabilité non négligeable de l'espèce caractérisant des écotypes spécifiques. Concernant les rendements, plusieurs récoltes sont possibles en récoltant les extrémités, avec un poids frais récolté de 1,5 kg /m² (10 g/plant). Ce rendement est estimé sur la base de la production de biomasse fraîche récoltée sur une année. Il tient compte de la nécessité de pérenniser la vigueur et la repousse de la culture dans la durée et donc d'utiliser des techniques de taille « douces ». Le calcul de rendement repose bien sûr sur une extrapolation des données obtenues sur la surface expérimentale réduite (100 m² de production de *Peb*).

En ce qui concerne *Pib*, l'adaptation de la plante en production horticole passe par plusieurs conditions : ombrage important (de l'ordre de 70 à 80 %), hygrométrie forte et constante, exposition peu venteuse. Trois variantes de systèmes de production ont été réalisées, respectant ces conditions : culture sous serre, équipée d'une toile d'ombrage (70 %), les plants étant disposés dans des bacs remplis de terre et disposant d'un support inerte (palissage en bois) ; culture sous couvert d'arbres et sur poteaux en bois (quarts de ronds en *Cryptomeria*, les pourtours de cette parcelle étant encadrés de filets brise-vent qui brisent le flux d'alizés et garantissent une ambiance stable et une bonne hygrométrie sous couvert) ; culture sous couvert d'arbres et sur support vivant (longani : *Dimocarpus longan*).

Pib s'adapte aux différentes conditions de culture expérimentées. Testé sous serre et à l'extérieur, il permet d'obtenir des rendements importants. Il pousse sur des supports inertes ou vivants, où il s'ancre de racines courtes et puissantes. La reprise de la croissance après la taille est importante. Durant les tests, les récoltes ont pu être réalisées tous les deux mois sur les écotypes de la modalité « sous serre ». Les plants conduits en extérieur et sous ombrage permettent également des récoltes tous les deux mois. *Pib* ne présente pas de sensibilité particulière aux problèmes sanitaires. Il est toutefois nécessaire de surveiller d'éventuelles attaques de tétraniques en conditions de faible hygrométrie et en l'absence d'une brumisation complémentaire.

La domestication de *Pib* a été très favorable. Les écotypes ne se sont pas distingués les uns des autres en termes de croissance et de rendement. On estime la densité de plantation à 7000 plants par hectare. Une taille et une récolte tous les trois mois permettent d'obtenir des rendements homogènes toute l'année, de l'ordre de 10 tonnes de matière fraîche par taille et par hectare. On peut ainsi proposer une estimation à l'année de 40 tonnes de matière fraîche récoltée par hectare (ce chiffre correspond à quatre récoltes annuelles). Les calculs de rendement proposés ici reposent sur une extrapolation de données obtenues sur une surface expérimentale réduite (28 mètres linéaires de production de *Pib*). Cette extrapolation a été ramenée au nombre de mètres linéaires d'une production de *Pib* d'un hectare avec une distance d'un mètre entre les rangs.

3. Production et caractérisation phytochimique des extraits des plantes sauvages et cultivées

Les divers extraits végétaux étudiés sont constitués, d'une part, de composés non volatils, c'est-à-dire d'extraits organiques à l'acétate d'éthyle (AcOEt) et d'extraits aqueux et, d'autre part, de composés volatils c'est à dire d'huiles essentielles (HE) obtenues par hydrodistillation. Ces extraits sont destinés aussi bien à la détermination des profils chimiques qu'aux tests d'activités biologiques (action 3). Deux voies ont été explorées pour l'obtention des signatures chimiques : (1) l'analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG-SM) et (2) l'analyse des extraits AcOEt par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ¹H). Le mode de culture (cultivé vs sauvage), les différents écotypes, la saison de collecte (été vs hiver), le lieu de culture (ARMEFLHOR vs SHBP) tout comme l'itinéraire de culture, ont été divers paramètres considérés dans le cadre de cette approche métabolomique.

Parmi les sous-actions initialement prévues dans cette étude, deux n'ont pas été poursuivies. Ainsi, la production d'extraits racinaires de plantes cultivées a été abandonnée, car celles-ci ne se sont pas avérées adaptées aux conditions du système d'aéroponie développé par la société Plant Advanced Technologies. De même, l'étude phytochimique de certains extraits biocides de plantes cultivées n'a pas été poursuivie : les résultats obtenus pour les tests biologiques à partir d'échantillons non volatils (AcOEt) se sont avérés moins intéressants que ceux obtenus sur les composés volatils (HE). Dans cette partie, seuls les résultats de l'étude comparative des profils chimiques des HE sont présentés pour chaque espèce végétale.

3.1 Étude des huiles essentielles des plantes sauvages et cultivées

Les parties aériennes des différentes plantes étudiées ont été distillées à l'aide d'un appareil modifié de type Clevenger. L'huile essentielle obtenue a été conservée sous azote et à 4°C, puis elle a été transmise aux acteurs de l'action 3 pour les tests biologiques. Un aliquot a été systématiquement conservé pour la détermination de son profil chimique par CG-SM. Quatre molécules appartenant à la classe des phénylpropanoïdes apparaissent majoritairement et dans des proportions variables, dans l'ensemble des profils des écotypes étudiés de *Pib* et *Peb* : la myristicine, l'élémicine, le dillapiolène et l'asaricine.

Ces molécules, très proches chimiquement, sont connues pour être fréquemment retrouvées dans la famille des Piperaceae et posséder des propriétés biocides. La myristicine a notamment été étudiée pour son effet contre les arthropodes. Elle s'est montrée active contre *Aedes aegypti* et des études ont montré son activité synergique en présence d'autres molécules. Parmi les molécules agissant en synergie avec la myristicine, l'élémicine a montré une efficacité importante dans l'activité insecticide de l'huile essentielle de *Peb* contre la Mouche du melon *Z. cucurbitae* (Dorla et al, 2017). Parallèlement, le dillapiole est connu pour son activité acaricide. L'asaricine issue de *Piper sarmentosum*, quant à elle, est connue pour son activité larvicide et ovicide sur moustique. Enfin un cinquième phénylpropanoïde, le safrole, est parfois retrouvé dans les huiles essentielles des écotypes de *Pib*. Couramment isolé dans les HE du genre *Piper*, le safrole est un précurseur utilisé lors de la synthèse du butoxyde de pipéronyle, un synergisant qui augmente l'activité insecticide, notamment des pyréthrinés. La variabilité, tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif de ces molécules dans les profils chimiques des HE issues des différentes plantes sauvages et cultivées, a servi de critère dans le choix des écotypes d'intérêt et la validation des itinéraires techniques.

3.2 Sélection des écotypes d'intérêt pour *Piper borbonense*

Les rendements des HE des quatre écotypes sauvages de *Pib* varient entre 0,06 et 0,28 %. Riches en phénylpropanoïdes, deux profils chimiques se distinguent : d'une part, les HE de *Pib* provenant de la forêt de Mare-Longue (ML) et de Sainte-Rose (ROS) sont composées majoritairement de dillapiole (61,9 % et 75,2 % respectivement), et d'autre part, celles obtenues à partir de *Pib* de la forêt des Makes (MAK) et de la Plaine des Palmistes (PAL) sont composées de quatre phénylpropanoïdes à teneurs variables : l'asaricine, l'élémicine, le dillapiole et la myristicine. L'HE obtenue à partir de *Pib* PAL se distingue de celle obtenue à partir de *Pib* MAK en raison du pourcentage élevé d'asaricine (32 % et 18 % respectivement).

Lorsque les plantes sont mises en culture, la composition qualitative des HE est sensiblement identique à celle obtenue pour les HE issues de plantes sauvages. En revanche, des différences au niveau des teneurs des composés majoritaires ont été observées. Le pourcentage de dillapiole est, par exemple, supérieur dans l'HE de *Pib* ML cultivée (70,7 %) par rapport à celle obtenue à partir de la plante sauvage (61,9 %). L'HE de *Pib* PAL cultivée possède également une teneur plus élevée en asaricine (36,2 %).

Compte tenu de leur profil chimique, des activités biologiques et de leur facilité de culture, les écotypes *Pib* PAL cultivée et *Pib* ML cultivée ont été sélectionnés pour la suite du projet.

3.3 Etude des écotypes sélectionnés de *Piper borbonense*

De 2016 à 2018, un suivi des profils chimiques des HE obtenues à partir de *Pib* ML cultivée (*Pib* MLc) à l'ARMEFLHOR et à la SHBP a été réalisé. Les profils sont stables dans le temps. Sur le site de l'ARMEFLHOR, aucune différence notable n'est observée entre les deux conditions de culture (extérieur/serre). A l'extérieur, les composés majoritaires sont le dillapiole (70,62 % \pm 9,95, $n = 18$) et la myristicine (6,41 % \pm 3,93, $n = 18$). Lorsque les plantes sont cultivées sous serre, la teneur en dillapiole est proche de 72,08 % \pm 7,72 ($n = 12$) et celle de la myristicine est de 4,47 % \pm 3,66 ($n = 12$).

Concernant l'écotype *Pib* PALc, les profils chimiques des spécimens cultivés à l'ARMEFLHOR et à SHBP sont instables. Ils diffèrent dans le temps et en fonction des sites de culture. Sur le site de l'ARMEFLHOR, à l'extérieur, les composés majoritaires sont l'asaricine (47,20 % \pm 11,97, $n = 12$) et le safrole (19,53 % \pm 6,88, $n = 12$). D'autres composés sont présents à des teneurs variables : l'élémicine (7,19 % \pm 2,30, $n = 12$), le dillapiole (6,65 % \pm 7,90, $n = 12$) et la myristicine (4,88 % \pm 4,82, $n = 12$). Lorsque les plantes sont cultivées à l'intérieur, la teneur en asaricine est plus faible (31,71 % \pm 3,16, n

= 5), alors que celle du safrole semble constante ($19,72 \% \pm 2,05$, $n = 5$). En revanche en comparaison aux huiles essentielles extraites de plantes cultivées à l'extérieur, l'élémicine ($13,48 \% \pm 1,21$, $n = 5$), le dillapiole ($12,56 \% \pm 6,60$, $n = 5$) et la myristicine ($7,81 \% \pm 3,31$, $n = 5$) sont présents à des teneurs plus élevées. D'importantes variations sont observées pour l'asaricine et le dillapiole. Ces différences sont d'autant plus visibles pour les HE de plantes cultivées à la SHBP. Les profils chimiques peuvent être très différents d'une récolte à l'autre. Contrairement aux HE des plantes provenant de l'ARMEFLHOR, le composé majoritaire est le dillapiole ($43,05 \% \pm 19,18$, $n = 5$). Le second composé est l'asaricine avec des teneurs moyennes de $19,64 \% \pm 9,34$ ($n = 5$). Notons également la présence de safrole ($10,86 \% \pm 4,17$, $n = 5$), d'élémicine ($5,48 \% \pm 2,30$, $n = 5$), et de myristicine ($7,47 \% \pm 5,60$, $n = 5$). Le stade phénologique de la plante est à l'origine de ces variations, la culture sur le sol utilisé à la SHBP favorisant la présence de feuilles au stade juvénile.

Bien que la composition des HE de *Pib* MLC soit constante dans le temps pour un site de culture, il apparaît clairement que l'itinéraire de culture influence le profil chimique. Ces différences sont d'autant plus marquées pour l'écotype *Pib* PALC qui semble moins stable.

3.4 Sélection des écotypes d'intérêt pour *Peperomia borbonensis*

Les rendements des HE des écotypes de *Peb* sauvages sont plus élevés que ceux des HE de *Pib* et varient entre 0,40 et 0,56 %. Les HE provenant des spécimens sauvages de *Peb* sont composées de terpènes, de phénylpropanoïdes et d'aldéhydes. Les teneurs en terpènes sont sensiblement proches dans les différents écotypes. En revanche, les teneurs en décanal (aldéhyde) varient d'un écotype à l'autre soit 1,8 % pour *Peb* BEL (Forêt de Belouve), 3,6 % pour *Peb* REC, 9,2 % pour *Peb* NDP (Notre Dame de la Paix) et 11,7 % pour *Peb* CIL (Cilaos). Concernant les phénylpropanoïdes, deux profils se distinguent. Les profils de *Peb* NDP et *Peb* BEL sont riches en myristicine (43,4 % et 57,5 %) et en élémicine (28,1 % et 24,0 %). Les HE de *Peb* CIL et de *Peb* REC sont majoritairement composées de myristicine avec des teneurs de 67,1 % et 72,1 % respectivement.

Tout comme ceux des HE des écotypes de *Pib*, les profils des HE de *Peb* cultivés et sauvages sont quantitativement différents. Lorsque *Peb* NDP est mise en culture, le pourcentage d'élémicine est supérieur (36,5 %) alors que celui de la myristicine est inférieur (30,4 %). Concernant l'HE de l'écotype *Peb* BEL cultivé, une différence notable est observée au niveau de la teneur plus faible en élémicine (4,5 % contre 24 %). Enfin, les compositions des HE de *Peb* CIL et *Peb* REC cultivées et sauvages sont relativement proches. Compte tenu de leur composition et activités biologiques, les écotypes *Peb* NDP et *Peb* REC ont été choisis pour la suite du projet.

3.5 Etude des écotypes sélectionnés de *Peperomia borbonensis*

Le suivi des profils chimiques des écotypes sélectionnés de *Peb* a été fait de 2015 à 2017. En revanche, une étude comparative convenable n'a pu être menée pour cette espèce en raison d'un faible nombre d'hydrodistillations pour les écotypes provenant du site de culture SHBP. Il ressort néanmoins que la composition des HE des écotypes *Peb* NDPc et *Peb* RECc sont relativement stables dans le temps pour les deux sites de culture. Il ne semble pas y avoir de différence significative entre les deux itinéraires de culture.

3.6 Synthèse des résultats de caractérisation phytochimique

L'étude de la variabilité chimique des écotypes de *Pib* et de *Peb* a été réalisée grâce à des analyses métaboliques comparatives, menées aussi bien pour les composés non volatils (extraits AcOEt) que volatils (HE). Ces analyses ont été réalisées, tout d'abord sur des individus prélevés en milieu naturel, puis, après multiplication à grande échelle, sur des individus cultivés. Compte tenu des profils

chimiques des HE et de leurs activités biologiques, deux écotypes différents par plante ont été sélectionnés pour une mise en culture : NDP et REC pour *Peb* et PAL et ML pour *Pib*. L'analyse des profils en composés volatils a démontré (i) qu'il existe des profils chimiques différents entre les deux écotypes sélectionnés pour chaque espèce et (ii) que la mise en culture à grande échelle des écotypes choisis a permis de conserver cette différence en terme de profils chimiques (différence ayant été l'un de leurs critères de sélection).

Concernant l'espèce *Peb*, des différences sont observées entre les deux écotypes. L'HE de *Peb* NDP contient deux composés majoritaires (myristicine et élémicine) alors que celle de *Peb* REC ne contient majoritairement que la myristicine. Concernant l'espèce *Pib*, la composition en molécules majoritaires (dillapiole et asaricine) diffère chez les deux écotypes sélectionnés. On remarque également que la teneur de ces composés est plus importante chez les écotypes cultivés. Ces résultats démontrent ainsi que la mise en culture et le changement de zonage écologique impactent la teneur en composés volatils. Il est également intéressant de souligner la présence de safrole en quantité plus importante chez les écotypes cultivés.

Les profils chimiques des HE des écotypes *Peb* NDPc et *Peb* RECc sont relativement stables dans le temps pour les deux sites de culture. En revanche, la culture de *Peb* a dû être abandonnée en raison des difficultés de maintien des plants en saison chaude. Concernant l'espèce *Pib*, les profils chimiques de l'écotype *Pib* ML sont stables dans le temps alors que ceux de l'écotype *Pib* PAL présentent une variabilité. Il existe également des différences de composition selon les itinéraires de culture pour les deux écotypes.

A l'issue de ces résultats, l'écotype *Pib* ML semble être le plus approprié en vue d'une valorisation technique et commerciale.

4. Evaluation des propriétés biocides des extraits des plantes

L'action 3 rassemble les contributions du Cirad, de l'Université de Rennes 1 et de l'ARMEFLHOR et porte sur l'évaluation des propriétés biocides des extraits des deux espèces sur les bioagresseurs et sur les auxiliaires des cultures. Les études sont conduites à la fois au laboratoire (Cirad et Université de Rennes) et au champ (ARMEFLHOR). Il s'agit de mesurer l'efficacité des extraits sur divers bioagresseurs d'importance économique à La Réunion et à l'échelle nationale (insectes, acariens, bactéries). Dans la suite, la plupart des activités décrites portent sur les études au laboratoire qui ont constitué la majorité des études, mais à la fin de cette partie, un paragraphe porte sur les tests au champ.

Il convient de souligner que pour la plupart des études, les connaissances méthodologiques étaient assez peu nombreuses au démarrage du projet et il a fallu mettre au point les méthodes et protocoles, que ce soit pour les études au laboratoire ou pour études au champ : adaptation des protocoles aux différentes espèces sélectionnées, mise en œuvre d'élevages pour les arthropodes, mise en œuvre des cultures de colonies bactériennes.

4.1 Les modèles biologiques étudiés

Parmi plusieurs grands groupes de bioagresseurs (acariens, thysanoptères, diptères, hémiptères, coléoptères, bactéries phytopathogènes), les modèles biologiques retenus ont été sélectionnés pour leur importance économique, leur intérêt générique et scientifique, tout en tenant compte des systèmes de cultures concernés, de la disponibilité des élevages et des informations recueillies grâce au réseau d'épidémiosurveillance Ecophyto. Certains ennemis naturels ont également été pré-identifiés.

Au total, une liste de 24 arthropodes (ravageurs et auxiliaires) et souches bactériennes phytopathogènes a été retenue :

- 13 Arthropodes ravageurs : 2 Coleoptera (Nitidulidae : *Meligethes aeneus*, Méligèthe du colza ; Chrysomelidae : *Psylliodes chrysocephala*, Grosse altise d'hiver), 7 Diptera (Drosophilidae : *Drosophila suzukii*, Mouche de la cerise ; Tephritidae : *Bactrocera dorsalis*, Mouche orientale des fruits ; *Bactrocera zonata*, Mouche de la pêche ; *Ceratitis quilicii*, Mouche du Cap ; *Neoceratitis cyanescens*, Mouche de la tomate ; *Zeugodacus cucurbitae*, Mouche du melon ; Anthomyiidae : *Delia radicum*, Mouche du chou), 1 Thysanoptera (Thripidae : *Frankliniella occidentalis*, Thrips californien), 3 Hemiptera (Pseudococcidae : *Dysmicoccus brevipes*, Cochenille de l'ananas ; Aleyrodidae : *Trialeurodes vaporariorum*, aleurode des serres ; *Bemisia tabaci*, aleurode du tabac).
- 1 acarien ravageur : 1 Acari (Tetranychidae : *Tetranychus urticae*, Tétranyque tisserand).
- 6 bactéries phytopathogènes : 4 Xanthomonadales (Xanthomonadaceae : *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, Dépérissement bactérien de l'oignon ; *Xanthomonas citri* pv. *citri*, Chancre bactérien des agrumes ; *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, Bactériose de l'anthurium ; *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* et *X. vesicatoria*, Gales de la tomate et du piment), 1 Burkholderiales (Burkholderiaceae : *Ralstonia solanacearum*, Flétrissement bactérien des Solanacées), 1 Actinomycetales (Microbacteriaceae : *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Chancre bactérien).
- 4 Arthropodes auxiliaires : 1 Hemiptera (Miridae : *Nesidiocoris volucer*), 2 Coleoptera (Staphylinidae : *Aleochara bilineata*, *Aleochara bipustulata*), 1 Thysanoptera (Aeolothripidae : *Franklinothrips vespiformis*).

4.2 Tests d'efficacité sur des bactéries phytopathogènes

Les tests préliminaires ont permis de mettre au point une méthodologie et un dispositif pour tester l'efficacité bactéricide des extraits de *Peb* et *Pib* : caractérisation de la croissance des souches ; toxicité des solvants ; choix des témoins positifs (antibiotiques) ; ensemencement homogène des boîtes. La méthode retenue de l'évaluation de l'activité antibactérienne repose sur la méthode des antibiogrammes (ou méthode de diffusion). Ensuite, les études ont porté sur l'évaluation de l'efficacité des extraits aqueux, des extraits acétate d'éthyle et des huiles essentielles obtenus à partir des plantes sauvages ou cultivées, sur les 6 souches de bactéries phytopathogènes sélectionnées.

Les extraits aqueux des écotypes sauvages suivants des deux espèces ont été testés. Pour *Peb* : NDP, BEL, CIL et REC ; pour *Pib* : MAK, ML et ROS. Aucun résultat n'a pu être obtenu, à cause d'une contamination des milieux par l'eau.

Les extraits acétate d'éthyle des écotypes cultivés suivants ont été testés. Pour *Peb* : BEL, CIL et REC ; pour *Pib* : MAK, ML et ROS. Les extraits acétate d'éthyle n'ont montré aucune efficacité, quelle que soit la bactérie et quel que soit l'écotype de l'extrait

Les huiles essentielles des écotypes cultivés suivants ont été testées. Pour *Peb* : NDP, BEL, CIL et REC ; pour *Pib* : MAK, ML, ROS, PAL. Les résultats sont les suivants : a) efficacité sur *Clavibacter* avec les extraits de *Peb* (écotypes NDP, CIL, REC) ; b) efficacité sur *Ralstonia* avec les extraits de *Peb* (écotypes NDP, CIL, REC) et de *Pib* (écotype PAL) ; pas d'efficacité sur *Xanthomonas* (4 souches), quel que soit l'extrait.

4.3 Tests sur les Mouches des fruits

Les tests se sont échelonnés pendant 4 ans (2015-2019). La mise au point des méthodes a concerné :

- La réalisation d'élevage pour les 5 espèces de Tephritidae retenues ;
- La mise au point de protocoles d'évaluation d'efficacité biocide sur *Z. cucurbitae*, modèle retenu (car le mieux connu et le plus facile à élever) ;

- Le choix d'une méthode par contact sur papier filtre imbibé de la solution contenant l'extrait (acétone + dose d'extrait) dans une boîte de Pétri ;
- La caractérisation de 5 états physiologiques des mouches après contact avec le papier filtre imbibé, d'un état E1 correspondant à un comportement « normal » à un état E5 correspondant à la mort de la mouche. L'état E4 a été retenu pour les tests d'activité biologique et correspond à un état de non nuisibilité (les mouches perdent leur mobilité et sont paralysées, elles finissent par mourir, même après avoir été transférées dans un milieu sain, sans extrait). La sélection de ce critère de non nuisibilité a permis ainsi de raccourcir de plusieurs heures chacune des expérimentations ;

Des tests préliminaires sur le potentiel insecticide des différents types d'extraits ont été réalisés. L'extrait aqueux n'a montré aucune activité biocide ; il n'a donc pas été retenu pour la suite des tests qui n'ont concerné que les huiles essentielles et les extraits acétate d'éthyle. Pour les tests d'efficacité insecticide, il a été vérifié préalablement, l'absence d'influence de la toxicité du solvant de l'extrait (acétone ou acétate d'éthyle) et de la manipulation des insectes sur la mortalité des témoins.

Pour les tests de DL 50 sur les Mouches des fruits, un protocole de test et une méthodologie d'analyse ont été mis au point : 4 heures d'exposition (contact des mouches sur le papier filtre imbibé de la dose d'extrait, dilué dans l'acétone) ; 20 mouches par boîte (10 mâles et 10 femelles) ; 18 boîtes par test (3 boîtes par dose d'extrait et 6 doses d'extrait, dont le témoin à l'acétone seule) ; 2 répétitions du test. Le nombre de répétitions des tests a été fixé à 2, en raison de la grande stabilité des résultats obtenus. Les tests statistiques ont utilisé les droites de régression et de la fonction logistique pour l'établissement des DL50 et DL95 (doses létales de 50 % et 95 % de la population). Les DL 50 et DL 95 ont été mesurées sur chacune de 5 espèces de Mouches des fruits avec des extraits à base d'huile essentielle et d'acétate d'éthyle de 2 écotypes de chacune des 2 plantes concernées (écotypes REC et NDP pour *Peb* et de ML et PAL pour *Pib*).

Les principaux résultats des tests de DL 50 sont les suivants :

- L'huile essentielle de *Pib* est toujours plus (ou aussi) efficace que celle de *Peb* ;
- L'huile essentielle de *Pib* ML est, dans la grande majorité des cas, plus efficace que celle de *Pib* PAL ;
- Les huiles essentielles des deux écotypes de *Peb* (REC et NDP) ont des propriétés équivalentes ;
- L'espèce *B. dorsalis* est l'espèce la moins sensible à l'huile essentielle de *Pib*, alors que *B. zonata* est la plus sensible ;
- Aucune différence entre écotypes n'est décelée en ce qui concerne les extraits à base d'acétate d'éthyle sur *Z. cucurbitae* ;
- L'extrait à base d'acétate d'éthyle de l'écotype *Pib* PAL est plus efficace que celui de *Pib* ML sur *Z. cucurbitae* ;
- Les huiles essentielles (comparées une à une à leurs extraits homologues d'acétate d'éthyle) sont 6 à 30 fois plus efficaces que les extraits à base d'acétate d'éthyle.

Finalement, l'extrait qui apparaît le plus efficace sur les Mouches des fruits est l'huile essentielle de l'écotype Mare Longue de *Piper borbonense* : HE *Pib* ML

4.4 Tests avec des huiles essentielles sur d'autres arthropodes à La Réunion

Les huiles essentielles de *Pib* (écotypes ML et PAL) et *Peb* (écotypes ML et REC) ont été testées sur 4 autres arthropodes : *Bemisia tabaci*, *Drosophila melanogaster*, *Frankliniella occidentalis*, *Nesidiocoris volucer*. Les DL 50 ont été obtenues pour *B. tabaci*, *D. melanogaster* et *N. volucer*. Dans une analyse statistique commune, les huiles essentielles de *Pib* sont significativement plus efficaces que celles de *Peb*.

4.5 Tests avec des huiles essentielles sur des arthropodes métropolitains

Les expérimentations menées à l'Université de Rennes pour évaluer l'efficacité biocide des extraits de plantes ont porté sur 3 ravageurs et 2 auxiliaires et ont été conduites avec des huiles essentielles de *Pib* ou de *Peb*. Des protocoles adaptés de celui mis au point par le CIRAD ont été mis au point. Les adaptations apportées sont liées à la taille des insectes et leur activité locomotrice. Des gammes d'état des insectes (E1 : comportement normal à E5 : mort) ont été élaborées.

Pour la Mouche du chou, des applications topiques ont également été réalisées. Les individus traités ont reçu 1µl d'une solution d'huile essentielle à différentes concentrations, appliquée à l'aide d'une micro seringue. Ils ont ensuite été placés individuellement dans un Eppendorf de 1,5ml aéré pendant 24 heures sans nourriture, ni eau, avant d'évaluer leur état (gamme E1 à E5). De plus, des tests de répulsivité des huiles essentielles ont également été réalisés à l'aide d'un olfactomètre en T. Le comportement des mouches a été observé en présence d'air pur, d'odeurs de plante hôte ou d'air chargé de l'odeur d'huile essentielle de *Pib* (1,5 µL déposé sur un papier filtre).

Sur la Mouche du chou, l'effet de l'huile essentielle de *Pib* PALc reste modéré jusqu'à 3 mg/boîte puis devient important dès 4 mg/boîte selon la méthode par contact sur papier filtre. Avec le même extrait, par application topique à différentes concentrations, l'effet est important dès la concentration de 4%. Par ailleurs, les expérimentations menées dans l'olfactomètre en T ont montré que l'huile essentielle de *Pib* PAL n'est pas répulsive ; les insectes passent autant de temps dans la zone chargée en air pur ou en odeurs de plante hôte que dans celle chargée en odeurs d'huile essentielle. Ce résultat est encourageant et permet d'envisager une application ciblée du produit toxique via la nourriture ou les sites de nutrition du ravageur (approche « attract & kill »).

Par ailleurs, sur la grosse altise d'hiver, l'huile essentielle de *Pib* PAL est plus efficace que l'huile essentielle de *Peb* REC. Pour cette dernière, même pour une dose relativement importante (i.e. 100 mg/boîte) la mort de tous les individus n'est pas obtenue. Sur le Méléigèthe du colza, l'effet de l'huile de *Pib* PAL est faible jusqu'à 4 mg/boîte, modéré de 6 à 50 mg/boîte et fort à 100 mg/boîte où la mortalité devient très importante.

Enfin, les tests effectués avec l'huile essentielle de *Pib* PAL sur les deux espèces de staphylins parasitoïdes de la Mouche du chou, montrent une sensibilité importante qui apparaît à partir de 50 mg/boîte pour *A. bilineata* et qui reste faible à 100 mg/boîte pour *A. bipustulata*. Ces deux espèces auxiliaires semblent moins sensibles que leur hôte, *D. radicum*, pour lequel des toxicités fortes sont observées dès 4 mg/boîte.

En résumé, un effet biocide a été trouvé sur tous les insectes testés avec des variations importantes de sensibilité, le Méléigèthe du colza étant le plus sensible.

4.6 Tests au champ

Ils ont été réalisés avec des extraits aqueux des plantes et des huiles essentielles. Une étude bibliographique a visé à mettre au point des méthodes d'utilisation et d'évaluation des propriétés biocides d'extraits de plantes.

Des extraits aqueux tels que purin, décoction, infusion et macération ont été préparés à partir de végétaux séchés à l'étuve et appliqués sur deux couples ravageur/plante (*Macrosiphum rosae*, puceron vert du rosier et *Bemisia tabaci* sur une malvacée indigène de La Réunion). Les tests préliminaires effectués n'ont pas donné de résultats exploitables.

L'objectif des tests de miscibilité des huiles essentielles est de trouver un adjuvant permettant de solubiliser ou disperser une huile dans une solution aqueuse et d'obtenir ainsi une solution avec des gouttes d'huiles essentielles les plus fines possibles, réparties de façon homogène pour une bonne pulvérisation. La miscibilité de l'huile essentielle de *Pib* a été observée pour les adjuvants Heliosol,

savon noir, Actirob B et le dispersant pour huiles essentielles Pranarom aux concentrations 0,5%, 1% et 2%.

L'efficacité biocide de l'huile essentielle de *Pib* a été évaluée lors d'une expérimentation menée en plein champ sur le couple *Moissonia importunitas* / *Crotalaria juncea*, sans donner de résultats exploitables.

5. Valorisation technique, scientifique et commerciale

Aujourd'hui, un certain nombre d'agriculteurs utilisent de façon plus ou moins empirique des préparations simples de plantes (infusions, décoctions, macérations), avec comme objectif de conférer aux plantes cultivées une meilleure résistance aux attaques des bioagresseurs ou de réduire les traitements phytopharmaceutiques chimiques (nombre, fréquence, doses...). Les connaissances scientifiques concernant les modes préparatoires de ces extraits envisagés et leurs modalités d'utilisation sont rares et partiels. Or, pour que ces préparations puissent être utilisées avec une efficacité reconnue et de façon légale, il faut collecter et organiser le savoir technique et procéder aux homologations (terme générique). Il est primordial de comprendre - même partiellement - leur mode d'action de façon à pouvoir justifier des quantités, des dates et des doses d'application. Dans cet objectif, l'aspect réglementaire doit être pris en compte. En effet, la mise en place d'un programme légal de protection des plantes avec ces extraits ne peut se faire qu'après approbation communautaire de l'extrait en question.

Différentes approches, complémentaires, ont été mobilisées pour répondre aux objectifs de valorisation commerciale :

- Suivi de l'évolution des réglementations européennes et nationales. Un transfert des connaissances réglementaires a été effectué.
- Identification de la classification des substances d'intérêt (de base ou à faible risque) des 2 plantes et des procédures (AMM, SB, SFR, BSAT). Compte tenu des coûts et des critères des substances à faible risque (SFR) avec autorisation de mise sur le marché (AMM), le statut de substance de base (SB) a été choisi, avec le dossier (BSA) correspondant.
- Constitution et dépôt d'un dossier d'approbation de substance de base /substance à faibles risques. Le dossier « approbation substance de base (BSA) », est le seul accessible avec la limite des données disponibles.
- Transfert auprès des professionnels. Seule une information a été réalisée. Une fiche technique sur le site « substances » sera réalisée en cas d'approbation.
- Valorisation commerciale. Cette étape nécessite l'approbation communautaire en substance de base.
- Valorisation scientifique et technique. Des publications et des communications ont été réalisées.

Les données obtenues au cours du projet sont suffisantes pour commencer à communiquer mais les informations nécessaires à l'élaboration d'un dossier de candidature, même en substance de base, sont insuffisantes ; les caractérisations des extraits ainsi que les usages sont des informations incomplètes pour remplir les tableaux GAP (Bonnes Pratiques Agricoles) correspondants.

Un transfert des connaissances réglementaires a été effectué, en particulier concernant les données nécessaires pour la constitution des dossiers de substances de base. L'information relative à la capacité et la possibilité d'utiliser ou de vendre les substances de base approuvées a donc été transmise aux partenaires, conduisant à la décision de monter ce type de dossier pour le statut correspondant aux extraits issus des Pipéracées. Une formation interne a été dispensée auprès des partenaires du projet pour bien intégrer et comprendre la réglementation et les différentes étapes de montage des dossiers.

5.1 Identification de la classification des substances d'intérêt (de base ou à faible risque) des 2 plantes et des procédures (AMM, SB, SFR, BSAT)

Les résultats obtenus dans le projet sont conformes à tous les types de dépôt de dossier, substance active à faible risque ou substance de base. Cependant, l'investissement nécessaire pour une substance active à faible risque est de l'ordre de 2 à 5 millions d'euros, ce qui est incompatible avec les possibilités financières du consortium du projet. L'accord a donc été conclu entre les membres du consortium de constituer un dossier d'approbation de substance de base, conformément au règlement CE n°1107/2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. La procédure, le timing et les requis ont été explicités aux partenaires. Une fois ce dossier finalisé, l'ITAB le déposera auprès de la Commission Européenne. Un suivi sera réalisé jusqu'à ce que le dossier demeure admissible. Une fois que le dossier aura été déclaré admissible par la Commission Européenne et avant que l'EFSA ne donne son avis sur le dossier présenté, des interrogations sur certains critères et caractéristiques du dossier d'approbation, pourront être posées par la Commission Européenne. L'ITAB devra ainsi répondre à tous les questionnements et suivre le dossier jusqu'au vote final de la Commission Européenne. Toutes ces étapes auront lieu dans un timing supérieur au temps du projet BIOPIPER.

5.2 Constitution et dépôt d'un dossier d'approbation de substance de base

Les dossiers d'approbation de substances de base sont simplifiés par rapport aux dossiers concernant les substances actives à faible risque. Ils comportent cependant le même type de chapitres faisant référence aux données minimales d'évaluation d'extraits en tant que substance de base (cas de BIOPIPER). Les chapitres obligatoires sont : §1 porteur, §2 spécifications, §3 usages (Tableau GAP), §4 classification (type REACH), §5 impacts possibles sur les humains et les animaux, §6 résidus, §7 impacts environnementaux possibles (eaux, sols), §8 impacts sur les organismes non cibles possibles (mammifères, abeilles, lombrics, organismes aquatiques), aspects alimentaires, utilisation en tant que médicament, §9 synthèse. Les extraits envisagés dans BIOPIPER sont issus de plantes très peu connues. Aussi, les recherches bibliographiques et l'obtention des données nécessaires à la constitution des différents chapitres sont assez denses. Malgré le peu d'articles relatifs à *Pib*, un numéro CAS « chemical abstract substance » a pu être trouvé afin d'amender le chapitre §2. En revanche, aucune information n'a permis de conclure sur un numéro CAS pour l'entité *Peb*.

Les extraits ou préparations ont été évalués au laboratoire et en conditions semi-contrôlées. Ces données sont essentielles pour la constitution du chapitre §3 du dossier mais les modalités d'utilisation et les résultats ne sont pas complètement stabilisés pour définir un usage clair. Les données pour la constitution des chapitres 5, 7 et 8 sont relativement parcellaires pour le dossier *Pib*, les recherches bibliographiques ont cependant été suffisantes pour pouvoir estimer les possibles impacts sur les humains, les animaux, l'environnement et les organismes non cibles.

Des données concernant certains types d'extraits de *Pib*, obtenus par distillation via un entraînement à la vapeur, ou hydro distillation, conduisant à une huile essentielle, ont été acquises après les trois ans du projet. Le dossier *Pib* est donc en bonne voie de finalisation et la soumission d'un premier dossier sous peu au niveau communautaire est envisagée. L'arrivée au niveau du vote au CPVADAAA (Comité permanent des végétaux, des animaux, des denrées alimentaires et des aliments pour animaux) est donc loin d'être atteinte au terme du projet BIOPIPER, mais l'ITAB suivra ces dossiers comme il a été procédé précédemment dans d'autres projets de recherche (Casdar 4P et Casdar HE en particulier).

5.3 Transfert auprès des professionnels

Les substances de base, une fois approuvées, se traduisent sous forme de Review Report¹ au niveau européen sur la base de données européennes concernant les pesticides. C'est ce document qui est traduit et complété en fiche d'usage sur la base nationale des substances de base, maintenue par l'ITAB : <http://substances.itab.asso.fr/>. Ainsi, une fiche par substance (correspondant à l'extrait) et son incorporation dans les différentes fiches filières seront réalisées en cas d'approbation. Ces deux substances potentielles contribueront aussi à créer une nouvelle fiche filière « DROM » avec les lignes d'usages correspondantes ouvertes par ces approbations. Par ailleurs, le transfert auprès des professionnels s'est également traduit par la réalisation de formations, en attendant le dépôt des dossiers et les approbations des extraits. Dans le cadre d'un certificat universitaire de qualification professionnelle Protection Agro-Ecologique des Cultures (CUQP PAEC), un module a été consacré aux produits de biocontrôle utilisés comme méthodes de protection des cultures. Dans ce module, un focus précisait les aspects réglementaires et les utilisations des substances qu'elles soient à faible risque ou de base, catégories de substances correspondant aux extraits testés dans le projet. Aussi, une session par an a été dispensée lors des trois années du projet BIOPIPER.

5.4 Valorisation commerciale

Les substances de base ne sont pas officiellement converties après l'approbation communautaire en « produits » avec des autorisations de mise sur le marché (comme les substances actives « classiques »). A ce stade, les extraits retenus par le consortium concernent la spécification « Huile essentielle » et ce pour les deux espèces végétales concernées *Pib* et de *Peb*. Aussi, les huiles essentielles sont commercialisables et pourront donc être vendues. Ces aspects rejoignent l'idée de départ du projet à savoir que les producteurs locaux auront la possibilité de produire les extraits et de les commercialiser si elles sont approuvées en référence aux fiches d'usages élaborées et disponibles sur le site <http://substances.itab.asso.fr/>. Malgré tout, seule la copie des tableaux d'usages (ou GAP) pourra être mentionnée et aucune autre allégation phytosanitaire ne sera tolérée.

5.5 Valorisation scientifique et technique

Les résultats ont été diffusés lors de différents congrès et une demi-journée complète, dédiée au programme BIOPIPER, a été organisée par l'ITAB les 10 et 11 avril 2019 lors des Journées Techniques Intrants « Journées substances naturelles en production végétale ». Les résultats partiels obtenus, ont permis d'alimenter les dossiers d'homologation réalisés pour le compte du consortium au niveau européen par l'ITAB.

Pour l'extrait de *Pib* ML, considéré comme le meilleur extrait candidat à l'issue du projet, la constitution du dossier de candidature en substance de base fait aussi partie de la valorisation technique. Ci-dessous, quelques produits scientifiques et techniques.

L'identité du projet : Le projet a été référencé dans la base de données des « Qui Fait quoi » de l'ITAB (<http://qfq.itab.asso.fr/action.php?id=2156>) et une page de présentation de BIOPIPER a été réalisée sur le site internet du Cirad (<http://umr-pvbmt.cirad.fr/principaux-projets/BIOPIPER>) et sur le site de l'ITAB (http://www.itab.asso.fr/itab/biocontrôle-projets.php?request_temp=BIOPIPER).

Les newsletters : 4 lettres d'information à destination des partenaires ont été réalisées pendant le projet. Ce travail a permis d'informer les partenaires sur les différentes avancées de chacune des actions du projet.

¹<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>

Les publications :

- "Des pipéracées pour la protection des cultures" Consortium BIOPIPER, R. Graindorge, Fert'île, 2018, Bulletin #41, pp 13.
- QuiFaitQuoi, site de l'ITAB, page <http://qfq.itab.asso.fr/action.php?id=2156>
- Actes de la journée de restitution du projet (Paris, 11 avril 2019) sont en ligne sur la page <http://www.itab.asso.fr/actus/2019-jt-intrants.php>
- Articles de journaux locaux : « Des plantes pour bannir les insecticides », Le Journal de l'île de La Réunion, 20 novembre 2017 et « Plantes naturellement insecticides : se débarrasser des produits chimiques », Le Quotidien, 21 novembre 2017.

Les conférences :

- Production durable d'extraits naturels biocides de deux Pipéracées à La Réunion, restitution du projet BIOPIPER, Paris, 11 avril 2019 : Présentation du projet Casdar BIOPIPER (J.P. Deguine, CIRAD), Résultats des essais (T. Nurbel, ARMEFLHOR), Efficacité insecticides d'huiles essentielles de deux Pipéracées sur des ravageurs des cultures (A.M. Cortesero, Université de Rennes 1).
- International Conference on Ecological Sciences, 22-25 October, Rennes, France. Insecticidal activities of essential oil from *Piper borbonense* (Miq.) C. DC., an endemic Piperaceae from Reunion island. Dorla E., Cortesero A.-M., Lamy F., Ligonière A., Fillatre J., Clerc P., Beaudemoulin H., Nurbel T., Laurent P., Deguine J.-P., Grondin I.
- Third International Conference on Island ecology, evolution & conservation. Island Biology, La Réunion, 8-13 July. Acaricidal and insecticidal activities of plants among Reunion Island's flora. Dorla E., Grondin I., Hüeb T., Clerc P., Deguine J.-P., Bialecki I., Laurent P., 2019.
- 2nd Plant BioProtection Sciences and Technologies Symposium, Marrakech (Maroc), 19-22 nov. 2019, "Sustainable production of natural biocidal extracts from two Piperaceae in Reunion Island" J-P Deguine, C Ajaguin Soleyen, A Bialecki, T Atiama-Nurbel, H Beaudemoulin, J Carrière, P Clerc, F Chiroleu, A-M Cortesero, O Couillerot, A Doizy, E Dorla, J Fillâtre, J-F Ginglinger, R Graindorge, I Grondin, T Kwan-Tat, A Ligonière, P Laurent, P Marchand, G Tostain.

Pour en savoir plus : <https://umr-pvbmt.cirad.fr/principaux-projets/BIOPIPER>

Les actions réalisées dans le projet BIOPIPER déboucheront sur un dossier de soumission en substances de base pour l'extrait HE de *Pib* ML.

Les extraits trouveront sans doute des difficultés à générer des metteurs en marché privés potentiels (durée 5 ans, coût > 300 k€, redevance > 4 0k€, AMM = 2 k€) si l'approbation en substance de base n'est pas réussie. C'est pour cette raison que, malgré l'absence actuelle de résultats probants sur *Peb*, l'ITAB a proposé de procéder à la régularisation des usages dans la catégorie des Substances de base, au règlement phytopharmaceutique CE n°1107/2009 pour cet extrait ultérieurement.

Conclusion

Les principales actions conduites dans le projet BIOPIPER ont consisté à mettre au point des itinéraires techniques des plantes, à les caractériser sur le plan phytochimique, à tester leur activité biocide vis-à-vis de bioagresseurs de cultures tropicales et tempérées (arthropodes ravageurs, bactéries et champignons phytopathogènes) et à contribuer aux connaissances réglementaires (en vue d'un dépôt de dossier d'homologation d'extrait). Le projet a donné lieu à de nombreux résultats et livrables. Ces résultats apportent des connaissances et expertises dans les différents domaines d'investigation.

La durée du projet s'est avérée restreinte au vu de la vaste étendue des activités couvrant la production jusqu'à l'approbation réglementaire. Les partenaires ont ainsi convenu de la nécessité d'envisager des suites au projet BIOPIPER, ces orientations ont été décidées de manière collégiale par les partenaires du projet lors des séminaires de fin de projet (05/12/2017 et 12/06/2018).

Sur le plan organisationnel, le projet a donné naissance à un dispositif opérationnel et original pour cribler l'activité biocide de plantes, au sein d'un consortium lié par un accord-cadre (en cours de formalisation). Ce dispositif peut être valorisé par des actions de formation, d'expertise, d'accompagnement, de vente de plantes, de communications, etc. Il est aujourd'hui capable de répondre à des demandes de tiers, pour cribler l'activité biocide d'extraits de différentes plantes (réponse à des AAP, prestations de services, collaborations scientifiques ou techniques, ...).

Sur le plan de la valorisation commerciale, le montage du dossier d'approbation de substance de base pour un dépôt au niveau européen se poursuit. Il est en cours de constitution par l'ITAB et utilise l'ensemble des résultats acquis. Ce dossier d'inscription à l'annexe II du Règlement CE n°889/2008 de l'Agriculture Biologique concernera l'extrait HE *Pib* ML, correspondant à l'huile essentielle issue de l'écotype cultivé de *Piper borbonense* dont l'origine est Mare Longue. Il s'agit de l'extrait le plus stable (peu de variabilité des proportions des molécules dans le temps) et le plus efficace contre la plupart des arthropodes testés. La rédaction et la diffusion de la fiche technique d'usage de cette substance seront réalisées si le dossier obtient l'approbation communautaire.

Sur le plan du développement de nouvelle filière, le collectif a été sollicité pour appuyer une réflexion locale sur le développement d'une filière de poivre aqueux (*P. borbonense*) à La Réunion. Cette filière pourrait mobiliser l'expertise développée dans le cadre du projet concernant les techniques de production agricole et les débouchés non alimentaires potentiels.

Sur le plan scientifique et technique, certaines activités de recherche et d'expérimentation seront poursuivies :

- Caractérisation et mesure de l'efficacité des matières actives contenues dans les huiles essentielles d'intérêt ;
- Production d'huiles essentielles pour des tests au champ ;
- Production de *Pib* à l'ARMEFLHOR pour fournir de la biomasse si besoin ;
- Poursuite des tests sur *B. dorsalis* et *D. suzukii* ;
- Tests en milieu contrôlé, en préalable au champ (grandes cages) ;
- Tests sur la variabilité de la composition chimique de HE *Pib* ML en fonction de l'âge des feuilles.

Remerciements

Les auteurs du projet BIOPIPER remercient l'ensemble des personnes et des partenaires impliqués de près ou de loin dans la réalisation des actions. Par ailleurs, notre gratitude va aux responsables du Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la forêt qui nous ont permis de conduire à bien le projet BIOPIPER, via le compte d'affectation spéciale pour le développement agricole et rural (Casdar). Les travaux effectués tout au long de cette expérience ont été cofinancés par l'Union européenne (FEADER), le Conseil Régional de La Réunion, le Conseil départemental de La Réunion et le Cirad et nous les remercions.

Références bibliographiques

Assabgui R., Lorenzetti F., Terradot L., Regnault-Roger C., Malo N., Wiriyaichitra P., Danchez-Vindas P.E., San Roman L., Isman M.B., Durst T., Arnason J.T., 1997. Efficacy of botanicals from the Meliaceae and Piperaceae. In: Hedin P.A., Hollingworth R.M., Masler E.P., Miyamoto J., Thompson D.G. (eds), *Phytochemicals for pest control*. Washington, American Chemical Society, 38-48. (ACS Symposium Series 658).

Bernard C.B., Krishnamurty H.G., Chauret D., Durst T., Philogène B.J.R., Sanchez-Vindas P., Hasbun C., Poveda L., San Roman L., Arnason J.T., 1995. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *Journal of Chemical Ecology*, 21(6), 801–814.

de Lira P.N.B., da Silva J.K.R., Andrade E.H.A., Sousa P.J.C., Silva N.N.S., Maia J.G.S., 2009. Essential oil composition of three *Peperomia* species from the Amazon, Brazil. *Natural product communications* 4(3), 427-430.

de Oliveira A., Mesquita J.T., Tempone A.G., Lago J.H.G., Guimaraes E.F., Kato M.J., 2012. Leishmanicidal activity of an alkenylphenol from *Piper malacophyllum* is related to plasma membrane disruption. *Experimental Parasitology*, 132, 383-387.

Deguine J.P., Gloanec C., Laurent P., Ratnadass A., Aubertot J.N. (eds), 2016. *Protection agroécologique des cultures*. Editions Quae, Versailles, ISBN 978-2-7592-2410-4, 287 p.

Dorla E., Bialecki A., Allibert A., Grondin I., Deguine J.P., Laurent P., 2017. Insecticidal activity of the essential oil of *Peperomia borbonensis* Miq. (Piperaceae) and its major components against the melon fly *Bactrocera cucurbitae* (Coquillet.) (Diptera: Tephritidae). *Chemistry and Biodiversity*. DOI: 10.1002/cbdv.201600493

Dorla E., Cortesero A.M., Lamy F., Ligonière A., Fillatre J., Clerc P., Beaudemoulin H., Nurbel T., Laurent P., Deguine J.P., Grondin I., 2018. Insecticidal activities of essential oil from *Piper borbonense* (Miq.) C. DC., an endemic Piperaceae from Reunion island. *International Conference on Ecological Sciences*, 22-25 October, Rennes, France.

Dorla E., Grondin I., Hüb T., Clerc P., Deguine J.P., Bialecki 1., Laurent P., 2019. Acaricidal and insecticidal activities of plants among Reunion Island's flora. *Third International Conference on Island ecology, evolution & conservation*. *Island Biology*, La Réunion, 8-13 July, 2019.

Matasyoh J.C., Wathuta E.M., Kariuki S.T., Chepkorir R., 2011. Chemical composition and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malaria vector, *Anopheles gambiae*, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14, 26-28.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL ou DOI).