



Identification de la kairomone attractive de la guêpe de l'amande *Eurytoma amygdali* en vue de la mise au point d'un moyen de biocontrôle par piégeage massif

Anjélica Leconte

► To cite this version:

Anjélica Leconte. Identification de la kairomone attractive de la guêpe de l'amande *Eurytoma amygdali* en vue de la mise au point d'un moyen de biocontrôle par piégeage massif. Biodiversité et Ecologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASB082 . tel-04467390

HAL Id: tel-04467390

<https://theses.hal.science/tel-04467390>

Submitted on 20 Feb 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Identification de la kairomone attractive de la guêpe de l'amande *Eurytoma amygdali* en vue de la mise au point d'un moyen de biocontrôle par piégeage massif

Identification of the attractive kairomone of the almond wasp Eurytoma amygdali for the development of its biocontrol by mass trapping

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 581, agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé
(ABIES)

Spécialité de doctorat : Ecologie

Graduate School : Biosphera. Référent : AgroParisTech

Thèse préparée dans les UMR **iEES-Paris** (Sorbonne Université, INRAE, CNRS, IRD, UPEC, Université Paris Cité) et **CEFE** (CNRS, EPHE, IRD, UM), sous la direction de **Philippe LUCAS**, Directeur de recherche, la co-direction de **Michael STAUDT**, Chargé de recherche (HDR), le co-encadrement de **Henri DUVAL**, Ingénieur de recherche, la co-supervision de **Eugénie COUTAGNE**, Directrice technique

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 14 décembre 2023, par

Anjélica LECONTE

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Anne-Marie CORTESERO

Professeure, Université de Rennes 1

Rapporteur & Examinatrice

Claudio LAZZARI

Professeur, Université de Tours

Rapporteur & Examinateur

Frédéric MARION-POLL

Professeur, AgroParisTech (Université Paris-Saclay)

Président du jury & Examinateur

Myriam SIEGWART

Ingénieure d'Etude (Docteure), INRAE (PACA)

Examinatrice

Alan KERGUNTEUIL

Chargé de Recherche, INRAE (Université de Lorraine)

Examinateur

Titre : Identification de la kairomone attractive de la guêpe de l'amande *Eurytoma amygdali* en vue de la mise au point d'un moyen de biocontrôle par piégeage massif

Mots clés : *Eurytoma amygdali*, kairomone, biocontrôle, composés organiques volatils, électroantennographie, olfactométrie.

Résumé : L'amande est l'un des fruits à coque les plus importants d'un point de vue économique et alimentaire à l'échelle mondiale, principalement produit en Californie. Cependant, avec le changement climatique, les maladies et les ravageurs deviennent récurrents. Il apparaît comme nécessaire de développer une culture locale et limitant l'utilisation de pesticides.

Eurytoma amygdali, la guêpe de l'amande, est un ravageur responsable de dommages considérables dans les vergers français sans lutte chimique. Il n'existe actuellement aucun moyen de lutte biologique efficace et applicable à grande échelle. Il a été montré dans des études précédentes que les femelles sont attirées par des signaux olfactifs issus des amandiers, mais aucune étude n'a identifié les composés organiques volatils (COV) responsables de cette attraction.

L'objectif de cette thèse était d'identifier le meilleur mélange kairomonal attractif des femelles *E. amygdali* émises par les amandiers, dans le but de développer des pièges attract-and-kill en vergers.

Notre étude a permis d'identifier et de quantifier 50 COV émis par les amandiers, en distinguant ceux émis par les organes végétatifs et reproductifs. Les émissions d'amandiers sont majoritairement constituées de composés ubiquistes dont une majorité de sesquiterpènes. De plus, nous avons montré que les émissions étaient corrélées positivement à la température mais que la composition du bouquet de COV n'était pas modifiée. Parmi 39 COV testés par électroantennographie (EAG), 29 ont été détectés significativement par les femelles. Les dix COV avec les réponses en EAG les plus fortes ont été sélectionnés pour l'étude comportementale par olfactométrie, qui nous a permis d'identifier trois COV et un mélange attractif.

Ces résultats permettront de tester l'attractivité de ces composés sur le terrain en ajustant les doses pour optimiser l'efficacité des pièges.

Title: Identification of the attractive kairomone of the almond wasp *Eurytoma amygdali* for the development of its biocontrol by mass trapping

Keywords: *Eurytoma amygdali*, kairomone, biocontrol, volatile organic compounds, electroantennography, olfactometry.

Abstract: The almond holds significant economic and nutritional value globally, with California being a major producer. However, due to climate change, diseases and pest infestations are becoming more frequent. Therefore, there is a growing need to establish local almond cultivation methods while minimizing the reliance on pesticides.

Eurytoma amygdali, the almond wasp, poses a significant threat to almond orchards in France, causing substantial damage without chemical control. Currently, no effective biological control method can be applied on a large scale. While it is known that female almond wasps are attracted to almond trees by olfactory signals, the volatile organic compounds (VOCs) responsible for this attraction have not been identified in previous studies.

The objective of this thesis was to identify the attractive kairomone of *E. amygdali* females emitted by almond trees, in order to develop attract-and-kill traps in orchards.

Our study has identified and quantified 50 VOCs emitted by almond trees, distinguishing between those emitted by vegetative and reproductive organs. Almond emissions primarily consist of widespread compounds, with the majority being sesquiterpenes. Additionally, our study revealed a positive correlation between emissions and temperature, but the composition of the VOC bouquet remained unchanged. Among the 39 VOCs tested using electroantennography (EAG), 29 were significantly detected by females. The ten best-detected VOCs in EAG were selected for behavioural experiments using olfactometry, which allowed us to identify two attractive VOCs and a mixture.

These findings will enable us to evaluate the attractiveness of these compounds in a field setting and fine-tune the dosages to enhance the efficiency of the traps.



Cette thèse a été financée par la Compagnie des Amandes pour une durée de trois ans et co-encadrée par Eugénie Coutagne. Ce projet d'écologie chimique combine chimie analytique, électrophysiologie et étude du comportement. Ainsi, la première année de thèse a eu lieu au Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE) dans l'équipe Forêts, Changement globaux, et Adaptation : Simulation et expérimentation (FORECAST) sous la direction de Michael Staudt. Lors de cette première année, nous avons travaillé avec la Plateforme d'Analyses Chimiques en Ecologie (PACE) avec Nicolas Barthes, Bruno Buatois et Joris Huguenin. Les deux années suivantes se sont déroulées sur le site INRAE Versailles de l'Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris (iEES-Paris) dans l'équipe Neuroéthologie de l'Olfaction (NeO) du département d'Ecologie Sensorielle (ECOSENS). Au cours de ces deux années, j'ai co-encadré avec Philippe Lucas, qui a co-dirigé ma thèse, trois stagiaires de master : Thomas Ruivo (M1), Camille Faber (césure) et Yassine Maarouf (M2). Tout au long du projet nous avons collaborés avec Henri Duval (GAFL, INRAE Avignon) qui a co-encadré ce projet. Toutes les figures réalisées ont été faites avec BioRender.



REMERCIEMENTS

J'en arrive enfin au moment où ma rédaction avance suffisamment pour écrire mes remerciements, et comme toute personne en fin de thèse, c'est une petite bulle de répit dans cette rédaction qui semble sans fin.

Je souhaite tout d'abord remercier toute l'équipe de la Compagnie des amandes de m'avoir offert cette opportunité de thèse, dans des conditions plus que confortables, dans un cadre que je pourrais qualifier de familial. Merci Eugénie d'avoir suivi avec attention mes travaux pendant ces trois ans, mais je te remercie également pour ta gentillesse et ta bienveillance, je n'aurais pas pu rêver mieux pour ma thèse. Un immense merci à Philippe et Michael pour m'avoir encadrée pendant ces trois années, pour m'avoir appris plus de choses que je n'aurais pu imaginer, et pour tous les conseils qui m'ont été précieux. Sans vous je n'en serais pas là, vous m'avez offert votre confiance et j'espère avoir été à la hauteur. Je te remercie Henri d'avoir apporté toutes tes connaissances, ton expertise et je suis heureuse d'avoir pu passer ces moments de partage aussi bien dans les vergers, qu'au théâtre. J'en profite pour remercier Laure Kaiser, Vincent Jacob et Benjamin Loubet, qui ont fait partie de mon comité de suivi, qui m'ont permis de m'améliorer et m'ont donné d'excellents conseils. Très sincèrement, merci à toutes et tous, j'espère avoir répondu à vos attentes et je n'aurai jamais assez de mots pour exprimer ma gratitude et la joie que ça a été de travailler ensemble.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler au CEFÉ. Toute l'équipe FORECAST pour qui j'ai fait (avec plaisir) de nombreux gâteaux, vous me manquez énormément. Michael, au risque de me répéter merci pour ta gentillesse et pour ta confiance, j'ai sincèrement apprécié travailler avec toi. Merci Lilian d'avoir supporté mes bavardages incessants et pour tous les apéros passés ensemble. Bruno, Nicolas et Joris, merci de m'avoir tant appris, merci pour les moments à discuter, à rire et les repas partagés ensemble. Toute l'équipe du TE, j'ai adoré travailler avec vous, dépasser le cadre professionnel et rencontrer de très belles personnes. J'espère que nos chemins se recroiseront. Et enfin, je ne pourrais pas lister tout le monde, mais pour toutes les personnes avec qui j'ai passé de superbes moments, merci d'avoir été dans ma vie pour ma première année de thèse. Je pense que Montpellier 2021 restera une des années les plus mémorables.

Pour ma 2^e et 3^e année de thèse, le retour à Versailles n'a pas été simple après une année dans le sud. Mais grâce à toutes les personnes qui y travaillent, ou qui y ont travaillé, j'ai passé deux années incroyables. Philippe, je te remercie de nouveau, même si tu as pu avoir l'impression de ne pas avoir assez été présent, tu m'as beaucoup appris. Ensuite, un grand merci à Thomas, Camille et Yassine, qui ont été les meilleurs stagiaires qu'un.e doctorant.e puisse rêver. Un travail impeccable, une autonomie incroyable et surtout une grande gentillesse, je crois que sans vous je n'aurais pas tenu la charge de travail. Merci à toute la team ECOSENS pour les défis desserts, les moments de rire qui m'ont fait tenir moralement sur des phases difficiles et nos balades dans les jardins de Versailles. Une petite mention

particulière pour François, que j'ai rencontré depuis le début de ma thèse à Montpellier et que j'ai eu le bonheur de retrouver à Versailles. Les danses endiablées au Bois de Montmaur me manqueront toujours.

Je remercie du fond du cœur ma famille qui a été là pour moi pendant ces trois années plus qu'éprouvantes. Tout d'abord, pour toi Maman, la personne qui a été là toute ma vie, même quand je ne le voyais pas, qui m'a soutenu de tout son cœur et m'a poussé à me dépasser quand je ne pensais pas en être capable. Je n'en serais pas aussi loin dans ma vie sans toi, et j'essaye de t'apporter à hauteur de ce que tu m'offres. J'espère que tu vas encore me laisser beaucoup de fête des mères pour te montrer à quel point je t'aime. Maintenant que tu as versé la petite larme en lisant mes mots, je vais passer à la personne suivante. A ma sœur Jade, qui m'a donné envie de faire une thèse et qui continue de m'inspirer par son intelligence et sa gentillesse (et qui m'a confiée Hatchi pour mon plus grand bonheur, surtout pendant mes arrêts). Ma tata Patricia, que j'aime plus que tout et avec qui j'ai eu mes meilleurs fous rires et qui me soutien dans tous mes projets personnels et professionnels, j'espère qu'on va continuer longtemps notre rituel de vacances entre filles à l'île de Ré. A Papa et Blandine, qui me font rire même quand ça ne va pas, et même si on ne se voit pas aussi souvent qu'on le souhaiterait, vous restez dans mon cœur au quotidien. Pour Anthony, ma moitié, ma source d'émotion au quotidien, tu as bien du courage de supporter mes sautes d'humeur, ma folie et mes idées farfelues (on se souviendra des Cévennes, des randos sans eau et de toutes mes bêtises). Je t'aime et je ne souhaite qu'une chose, continuer cette aventure avec toi. Une pensée pour mon trio, Fellini, Charly et Brownie (qui me manque), qui de retour dans le nid familial m'ont réconforté. Mamie, tu me manques énormément et j'espère que tu es fière de moi là où tu es, tu resteras une des personnes les plus courageuses que je connaisse. Enfin, un mot spécial pour toi, ma petite plante, que je n'ai jamais pu rencontrer et qui restera dans mon cœur et mon esprit à vie, juillet 2022 aura été un tournant dans ma vie.

Anaïs, Elodie, Jenny et Soizic, à vous qui êtes comme mes sœurs, vous faites partie de moi. On se connaît depuis au moins 10 ans, voir 20... ça ne nous rajeunit pas cette histoire... Vous avez été là pour moi dans les meilleurs moments comme dans les pires, je ne souhaite qu'une chose, continuer à rire avec vous et vous garder dans ma vie jusqu'à la fin. Je n'ai pas pu être présente pour vous comme je le souhaitais pendant ma thèse mais je compte bien me rattraper après.

J'en profite pour remercier trois personnes sans qui je n'aurais pas surmonter toutes ces épreuves psychologiquement et physiquement, Caroline Manificier Elisabeth Boudol et Guillaume Baissette. Ce sont la sophrologie, le Feldenkrais et la thérapie qui m'ont permis de prendre du recul et m'améliorer.

Cette thèse n'aura pas été de tout repos mais j'en ressort grandi. Mais s'il y a bien quelque chose que ces trois années m'aurent appris, c'est que de choisir la facilité n'est pas une option pour moi, et que c'est dans la difficulté que j'apprends le plus. Je remercie encore une dernière fois toutes les personnes merveilleuses qui croisent ma route, celles qui restent auprès de moi, et merci de votre soutien dans cette épreuve qu'aura été la thèse.

*« La vie n'est pas un problème à résoudre,
mais une vérité à expérimenter. »*

Bouddha

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

COV : Composé Organique Volatil

COVB : Composé Organique Volatil Biogénique

COVP : Composé Organique Volatil de Plante

EAG : Electroantennographie

FAO : Food and Agriculture Organization (organisation pour l'alimentation et l'agriculture)

FID : Flame Ionization Detector (détecteur à ionisation de flamme)

GC-EAD : Chromatographie en phase Gazeuse – Electroantennodétection

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse – Spectrométrie de Masse

GLV : Green Leaf Volatile

HIPV : Herbivore-Induced Plant Volatile

MCR : Multivariate Curve Resolution (Résolution de Courbes Multivariées)

MEP : Methylerythritol phosphate

MVA : Mévalonate

m/z : Rapport masse/charge

N : Nombre de réplicas

NRO : Neurone Récepteur Olfactif

NRG : Neurone Récepteur Gustatif

OBP : Odorant-Binding Protein (protéine de liaison aux odeurs)

OR : Olfactory Receptor (récepteur olfactif)

P : p-value (valeur de probabilité)

PA : Potentiel d'action

PR : Potentiel de récepteur

PTR-ToF-MS : Proton Transfer Reaction – Time of Flight – Mass Spectrometer
(Réaction de transfert de protons – Temps de vol – Spectromètre de masse)

PPFD : Photosynthetic Photon Flux Density (densité de flux de photons photosynthétiques)

SPME : Solid Phase Micro Extraction (micro-extraction en phase solide)

TABLE DES MATIERES

Chapitre 1 : Introduction générale	2
1.1 Les Composés Organiques Volatils	2
1.2 Facteurs de variations des émissions de COVP	4
1.2.1 Facteurs internes	4
1.2.2 Facteurs externes.....	6
1.2.3 Interactions entre facteurs internes et externes.....	8
1.3 Communication chimique plantes-insectes.....	10
1.3.1 Quelles sont les molécules impliquées dans la communication chimique ?.....	10
1.3.2 Implication des COVP dans la communication plante-insecte.....	11
1.4 Odeur : de la détection au comportement.....	13
1.4.1 Les sensilles : structures et fonctionnement.....	14
1.4.2 La localisation et la sélection d'une plante hôte	16
1.4.3 Plasticité olfactive et comportementale	18
1.5 Pourquoi réduire l'utilisation des pesticides ?.....	21
1.6 Contexte d'étude et présentation des modèles	23
1.6.1 Interactions Prunus x Eurytoma.....	23
1.6.2 L'amandier	24
1.6.3 Eurytoma amygdali.....	25
1.6.4 Les moyens de lutte contre Eurytoma amygdali.....	29
1.6.5 Objectifs et déroulement du projet	32
Chapitre 2 : Caractérisation des émissions de COV d'amandiers.....	35
2.1 Article 1 : Identification, quantification et discrimination des COV émis par les amandiers au printemps.....	36
2.2 Emissions des amandes détachées du rameau.....	57
Matériel et méthode.....	57
Résultats.....	58
Conclusion.....	59
2.3 Suivi des émissions d'amandiers par PTR-ToF-MS.....	59
Matériel et méthode.....	61
Résultats.....	61
Discussion et conclusion.....	65
2.4 Conclusion générale.....	66
Chapitre 3 : La perception des COVP par <i>Eurytoma amygdali</i>	67
3.1 Détection des COVP d'amandier par <i>E. amygdali</i>	67

3.2	Article 2 : détection et attraction des femelles <i>E. amygdali</i> par les COVP d'amandier	71
3.3	Chromatographie en phase Gazeuse – Electroantennodétection	101
	Introduction	101
	Matériel et méthode.....	102
	Résultats et discussion.....	102
	Conclusion.....	103
	Chapitre 4 : Discussion et bilan général	105
4.1	Emissions de COV d'amandiers au printemps	106
4.2	Détection des COVP par les femelles <i>E. amygdali</i>	109
4.3	Attraction des femelles par Les émissions d'amandiers.....	111
	Chapitre 5 : Conclusion et perspectives	114
	Références	116

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Schéma simplifié des voies de biosynthèses des COVP	3
Figure 2 : Paramètres externes et internes régulant les émissions de COVP.....	8
Figure 3 : Relations entre les taux de synthèses (I) et les taux d'émission (E) de COVP, selon les structures de stockage de la plante en fonction de la température et de la densité de flux photonique.....	9
Figure 4 : Communication chimique de l'atmosphère à la rhizosphère.....	11
Figure 5 : Structure et fonctionnement d'une sensille d'Hyménoptère	15
Figure 6 : arbre décisionnel d'un insecte en recherche d'une plante hôte	16
Figure 7 : carte d'utilisation des pesticides dans le monde en 2020.	21
Figure 8 : Répartition des espèces identifiées du genre <i>Eurytoma</i> par écozone	24
Figure 9 : Carte de répartition d' <i>Eurytoma amygdali</i>	26
Figure 10 : photographies de (A) une femelle <i>Eurytoma amygdali</i> , (B) d'une larve dans un fruit ouvert et (C) d'un fruit infesté avec le trou de sortie.	27
Figure 11 : Cycle phénologique de l'amandier en parallèle du cycle biologique d' <i>E. amygdali</i> sur une année	28
Figure 12 : Principe du dispositif de piégeage de type attract-and-kill pour limiter l'infestation des amandiers par <i>E. amygdali</i>	32
Figure 13 : Dispositifs de prélèvement de COVP d'amandier.....	57
Figure 14 : Emissions moyennes de 100 amandes détachées du rameau.	58
Figure 15 : Suivi de l'intensité des émissions florales par PTR-ToF-MS en fonction de la température.....	62
Figure 16 : spectres globaux des composés détectés dans l'ensemble des émissions florales par PTR-ToF-MS	63
Figure 17 : Suivi de l'intensité des émissions de feuilles et de fruits immatures par PTR-ToF-MS en fonction de la température	64
Figure 18 : spectres globaux des émissions issues des fruits et des feuilles par PTR-ToF-MS	64
Figure 19 : Dispositif d'EAG pour mesurer les réponses d' <i>E. amygdali</i> aux COVP	68
Figure 20 : Doses-réponses des femelles <i>E. amygdali</i> pour quatre COVP identifiés chez les amandiers	69
Figure 21 : Réponses moyennes des femelles <i>E. amygdali</i> au benzaldéhyde et au (Z)-hex-3-en-yl acetate à trois doses.....	69
Figure 22 : Stabilité des réponses moyennes des femelles <i>E. amygdali</i> au benzaldéhyde à 10^{-2} pendant une heure.....	70
Figure 23 : Principe de la GC-EAD	101
Figure 24 : Réponse au (Z)-hex-3-en-yl acetate à 10^{-2} en GC-EAD.....	103
Figure 25 : Schéma des objectifs et résultats de la thèse	105
 Tableau 1 : Rapport signal /bruit pour les antennes isolées, têtes coupées et insectes entiers pour le benzaldéhyde à une dose de 10^{-2}	71
Tableau 2 : liste des huiles essentielles constituées de COVP émis par les amandiers	110

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

1.1 LES COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS

Les composés organiques volatils (COV) sont des molécules majoritairement lipophiles qui ont une pression de vapeur élevée à température ambiante, permettant leur libération dans l'atmosphère (Pichersky et al., 2006). Parmi les émissions de COV, 90% sont d'origine biogénique (COVB ; Guenther et al., 1995), et 10% sont d'origine anthropique (Fuentes et al., 2000). Les plantes sont la source principale de COVB. On recense ainsi des milliers de COV émis par les plantes (COVP), dont plus de 1700 sont émis par les fleurs et appartiennent à plus de 90 familles de plantes (Knudsen et al., 2006).

Les COVP sont catégorisés en fonction de leurs voies de biosynthèse (Figure 1, Maffei, 2010). Les terpénoïdes, composés d'unités à cinq carbones, constituent la classe la plus diversifiée (isoprène, monoterpènes, homoterpènes, sesquiterpènes), et sont les composés les plus émis dans l'atmosphère en termes de flux (Fineschi et al., 2013). Les autres classes principales incluent les phénylpropanoïdes et les benzoïdes, les dérivés d'acides gras, ainsi que les dérivés des caroténoïdes (Matsui, 2006, revue par Ameye et al., 2018). Les COVP sont émis par les plantes à partir de différents compartiments cellulaires, tels que le cytosol ou les plastides, par le biais de différentes voies biochimiques, variables en fonction des composés et des espèces. Par exemple, les terpènes peuvent être produits par deux voies de biosynthèse (MEP et MVA) présentes dans des compartiments distincts (Figure 1 ; Muhlemann et al., 2014).

Selon les espèces, les COVP peuvent être spécifiquement synthétisés et stockés dans les organes internes des feuilles, tels que les canaux et cavités (Hudgins et al., 2004), ou à la surface des feuilles dans les trichomes glandulaires par exemple (Schilmiller et al., 2010 ; Balcke et al., 2017). Ces structures permettent de stocker des COVP à des concentrations élevées et d'empêcher l'accumulation intracellulaire et la toxicité de certains composés (Tissier et al., 2017). Dans le cas des plantes qui ne possèdent pas de structures spécialisées, il existe une forme de stockage non spécifique où les COVP sont émis directement après leur biosynthèse en faible quantité, dans les phases aqueuses ou lipidiques des feuilles. (Niinemets et al., 2004). Par conséquent, les composés hydrophiles et peu volatils seront plus retenus dans les feuilles que les composés lipophiles volatils. Certaines plantes émettent des COVP à partir de leurs structures de stockage et par biosynthèse *de novo*. Par exemple, l'eucalyptus commun émet des monoterpènes issus de glandes spécialisées, ainsi que de l'isoprène par une biosynthèse *de novo*

(Guenther et al., 1991). De même, le pin d'Alep émet des pinènes à partir de canaux de résine, tandis que le β -ocimène et le linalool sont émis directement après la biosynthèse (Staudt et al., 2017).

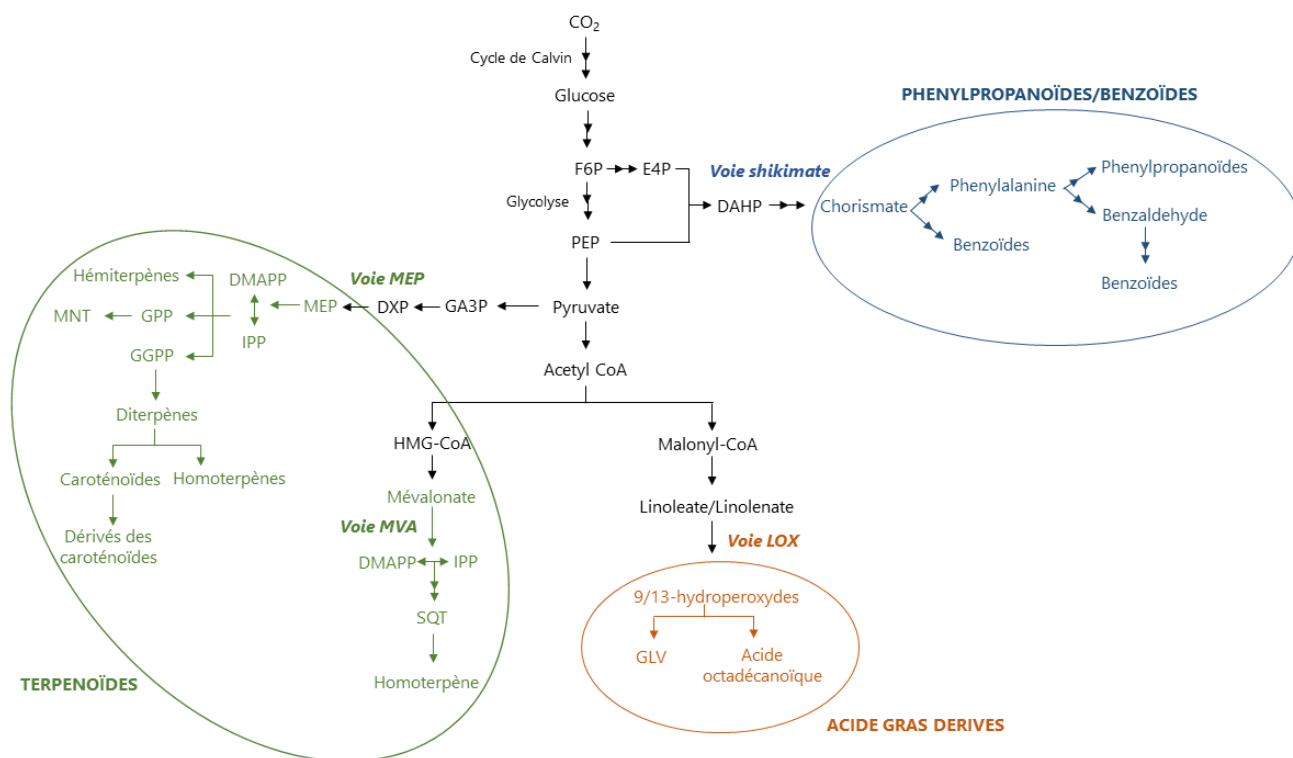


Figure 1 : Schéma simplifié des voies de biosynthèses des COVP. La biosynthèse a lieu dans différents compartiments cellulaires. Les flèches doubles indiquent des réactions intermédiaires. Liste des abréviations : DAHP, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate ; DMAPP, diméthylallyl diphosphate ; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate ; E4P, erythrose-4-phosphate ; F6P, fructose-6-phosphate ; GA3P, glyceraldehyde-3-phosphate, GLV, green leaf volatiles ; GPP, geranyl diphosphate ; GGPP, geranylgeranyl diphosphate ; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA ; IPP, isopentenyl diphosphate ; LOX, lipoxigénase ; MEP, 2-C-méthyl-D-erythritol 4-phosphate ; MNT, monoterpènes ; MVA, mevalonate ; PEP, phosphoenolpyruvate ; SQT, sesquiterpènes (modifié de Dudareva et al., 2006 et Maffei et al., 2010).

Les plantes émettent des COVP à partir de leurs parties aériennes dans l'atmosphère, ainsi que par leurs racines dans la rhizosphère (Delory et al., 2016). On peut distinguer deux types de COVP : les COVP constitutifs, émis de façon permanente par la plante (ou à certains stades de développement), et les COVP induits en réponse à un stress, comme les Green Leaf Volatiles (GLV ; Possell et Loreto, 2013). Après leur émission, les COVP sont dilués, transportés ou mélangés dans l'atmosphère. Le sol peut agir comme un puit pour ces composés, qui vont être dégradés par des microorganismes du sol, après avoir été solubilisés et adsorbés sur des surfaces

minérales (Insam et Seewald, 2010). Les microorganismes présents dans la phyllosphère, tels que les bactéries, peuvent aussi participer à la dégradation des COVP (Farré-Armengol et al., 2016). Toutefois, le puit principal reste la dégradation des COVP par réaction avec les oxydants atmosphériques, tels que les radicaux hydroxyle (OH) et nitrate (NO₃), ainsi que l’ozone (O₃). Le temps de vie moyen des COVP dans l’atmosphère varie en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, allant de quelques secondes pour certains sesquiterpènes, à plusieurs jours (Kesselmeier et Staudt, 1999 ; Yuan et al., 2009). Lors de la réaction entre les COVP et les oxydants atmosphériques, des intermédiaires instables sont formés, qui évoluent ensuite en dérivés oxygénés plus stables. Ainsi, l’importance des COVP dans la chimie atmosphérique a conduit à de nombreuses études à partir des années 1960, réalisant des criblages sur les émissions des forêts, en se concentrant sur l’isoprène et les monoterpènes. Ces recherches ont mis en évidence la contribution significative des forêts à la qualité de l’air, en mettant en avant des émetteurs majeurs tels que les conifères, les chênes et les peupliers (Geron et al., 1994 ; Guenther et al., 1994). Toutefois, avec les améliorations des méthodes analytiques permettant de mesurer des émissions de COVP très volatils tels que le méthanol et l’acétone, les études portant sur l’impact de l’agriculture sur la qualité de l’air se sont multipliées (Gentner et al., 2014). Ces études ont montré que l’agriculture, notamment les monocultures, contribuaient à modifier la qualité de l’air, bien qu’il n’y ait pas de consensus sur les effets actuellement.

1.2 FACTEURS DE VARIATIONS DES EMISSIONS DE COVP

Les propriétés physico-chimiques des COVP, telles que le poids moléculaire, la pression de vapeur, la volatilité et la solubilité, modifient leurs émissions dans l’environnement. De plus, ces émissions sont modulées par des facteurs internes et des facteurs externes d’origine biotique ou abiotique.

1.2.1 Facteurs internes

La régulation des émissions de COVP est un processus complexe impliquant divers mécanismes au niveau génétique, épigénétique et métabolique, tels que la régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, et post-traductionnelle, ainsi que la disponibilité des substrats. Le rythme circadien endogène, lié à l’expression génique, est également un facteur qui peut moduler les émissions de COVP.

La biosynthèse des COVP est principalement régulée au niveau de l'expression génique lors de la transcription (McConkey et al. 2000), impliquant le plus souvent des facteurs de transcription. Des études récentes ont permis d'améliorer notre compréhension de la régulation transcriptionnelle chez différentes espèces végétales comme *Arabidopsis thaliana*. Cependant, de nombreux facteurs demeurent encore mal connus, en particulier pour les fleurs (revue par Picazo-Aragonés et al., 2020 ; Ramya et al., 2020). L'étude de Li *et al.* (2023) a mis en évidence que d'autres petites molécules sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle. Outre la régulation transcriptionnelle, d'autres mécanismes de régulation épigénétique jouent un rôle dans la régulation des COVP. Par exemple, chez *A. thaliana*, l'inhibition spécifique des voies de biosynthèse d'isoprénoïdes ne modifie pas l'expression génique, mais affecte la synthèse des protéines, indiquant un effet au niveau post-transcriptionnel (Hemmerlin et al., 2012). La régulation post-traductionnelle peut également moduler l'expression des gènes, par exemple par la phosphorylation/déphosphorylation des protéines (Arimura et al., 2000). Les modifications de l'ADN, telles que les méthylations, ont également été identifiées comme des régulateurs, comme cela a été observé chez les roses (Xie et al., 2023). Cependant, les connaissances sur les mécanismes de régulation épigénétique des émissions de COVP demeurent limitées, et leur compréhension varie selon les voies de biosynthèse (Maeda et Dudareva, 2012). Enfin, les taux de biosynthèse des COVP peuvent également être influencés par des facteurs tels que la disponibilité et la spécificité des substrats au sein des réactions enzymatiques (Pichersky et al., 2006 ; Dudareva et al., 2004).

Le développement et le métabolisme de nombreux organismes sont souvent régulés par une horloge biologique interne. Chez certaines espèces végétales, des variations d'émissions ont été observées sur une période d'environ 24 heures, mettant en évidence l'existence d'un rythme circadien endogène (Hewitt et al., 2011 ; Zeng et al., 2017). Par exemple, les plantes à fleurs émettent des COVP à des moments spécifiques de la journée ou de la nuit, en corrélation avec les périodes d'activité des pollinisateurs (Maia et al., 2019). Les émissions liées au rythme circadien endogène sont régulées par des gènes spécifiques appelés « clock gene » (Fenske et al., 2015 ; Picazo-Aragonés et al., 2020). Des études ont montré l'existence d'une relation entre la disponibilité des substrats et le rythme circadien des émissions de COVP, comme c'est le cas pour les émissions de méthyl benzoate (Kolosova et al., 2001). Cependant, les autres mécanismes qui sous-tendent ces variations rythmiques au niveau moléculaire restent encore largement méconnus.

1.2.2 Facteurs externes

Les plantes sont soumises à divers facteurs externes qui influencent leurs émissions, qu'ils soient d'origine biotique ou abiotique (Figure 2, revue par Peñuelas et Staudt, 2010). Afin d'assurer leur survie et leur résilience, les plantes émettent des COVP en réponse à ces facteurs environnementaux.

Lorsqu'une plante est attaquée par un herbivore, elle émet des COVP appelés Herbivore-Induced Plant Volatile (HIPV). Ces composés peuvent être toxiques ou répulsifs et ont pour effet de perturber la physiologie de l'herbivore (Halligan, 1975 ; Litvak et Monson, 1998 ; revue par Gershenzon et Dudareva, 2007 ; exemple des GLV, Staudt et al., 2010). Certains composés, comme le (Z)-hex-3-en-1-ol, peuvent agir comme des signaux d'alerte, déclenchant les mécanismes de défense des plantes voisines (Sugimoto et al., 2014), ou d'une partie intacte de la même plante (exemple du methyl jasmonate, McCall et Karban, 2006). Certaines plantes augmentent leurs émissions de COVP, comme le β -caryophyllène chez le maïs, qui attire les ennemis naturels de la Chrysomèle du maïs (Rasmann et al., 2005). Il a également été observé que les plantes peuvent activer leurs défenses plus rapidement suite à une attaque ultérieure (Ton et al., 2006). Chez les plantes, la compétition interspécifique est un facteur peu étudié, mais peut augmenter ou diminuer les émissions de terpènes en fonction des plantes avoisinantes (Ormeño et al., 2007). Les infections causées par des bactéries ou des champignons peuvent également induire une augmentation des COVP (Piel et al., 1997 ; revue par Ponzio et al., 2013).

Les facteurs abiotiques tels que la température, l'intensité lumineuse ou l'humidité modulent les émissions de COVP. Il est important de noter que les études portant sur l'effet de ces facteurs et les modèles développés ont été réalisés sur des feuilles matures (Niinemets et al., 1999). Les terpénoïdes constituent la catégorie la plus étudiée dans la littérature scientifique. En effet, il a été montré que les émissions de sesquiterpènes et de monoterpènes augmentent en réponse à l'augmentation de la température et la lumière (Staudt et Seufert, 1995 ; Moukhtar et al., 2006). Bien que peu étudié, d'autres facteurs comme l'humidité de l'air peuvent avoir un effet sur la conductance stomatique, pouvant éventuellement influencer les taux d'émissions de COVP (Schade et al., 1999 ; Núñez et al., 2002). L'effet de la variation de l'ouverture des stomates sur les flux de COVP est variable en fonction du composé considéré en termes de cinétique. Par exemple, les COVP très volatils et lipophiles, comme l'isoprène, ne sont quasiment pas affectés directement par l'ouverture ou la fermeture des stomates, contrairement aux COVP hydrophiles comme le méthanol (Niinemets et al., 2002).

Dans le contexte actuel du changement climatique, les émissions de COVP sont soumises à des facteurs d'origine anthropique. Parmi ces facteurs, on compte l'augmentation des concentrations d'ozone troposphérique (Dubuisson et al., 2022) et de CO₂ (Daussy et Staudt, 2020), mais également la sécheresse, modifiant les émissions de monoterpènes du chêne-liège, *Quercus suber* (Staudt et al., 2008). Bien que moins étudiées, les inondations peuvent induire des émissions de GLV, en particulier chez les espèces ayant une faible résistance, telles que le chêne rouge, *Quercus rubra* (Copolovici et Niinemets, 2010 ; Bourtsoukidis et al., 2013). L'effet direct de l'eutrophisation, résultant des activités humaines, sur les émissions de COVP n'a été que relativement peu investigué (Ndah et al., 2022). Cependant, il semble que l'eutrophisation puisse impacter les cycles biogéochimiques, sans montrer de tendance claire (Peñuelas et Filella, 2001). Cela laisse supposer que ce facteur pourrait influencer les émissions de COVP. Par ailleurs, les nutriments disponibles dans le sol peuvent avoir un effet variable sur les émissions de terpènes selon les espèces (Ormeño et Fernandez, 2012), et la fertilisation azotée possède un effet positif sur les émissions de COVP (Blanch et al., 2007).

La modification des émissions de COVP en réponse à des facteurs biotiques ou abiotiques permet aux plantes de se protéger contre le stress environnemental. De nombreuses études ont montré l'impact positif de l'isoprène dans cette protection contre le stress (Loreto et Velikova, 2001 ; revue par Owen et Peñuelas, 2005). Des recherches récentes ont mis lumière le rôle de l'isoprène dans le compromis entre la défense et la croissance des plantes. En effet, ce composé agit au niveau de l'expression génique et coordonne la signalisation cellulaire, renforçant ainsi les défenses chimiques de la plante en cas de stress climatique (Monson et al., 2021).

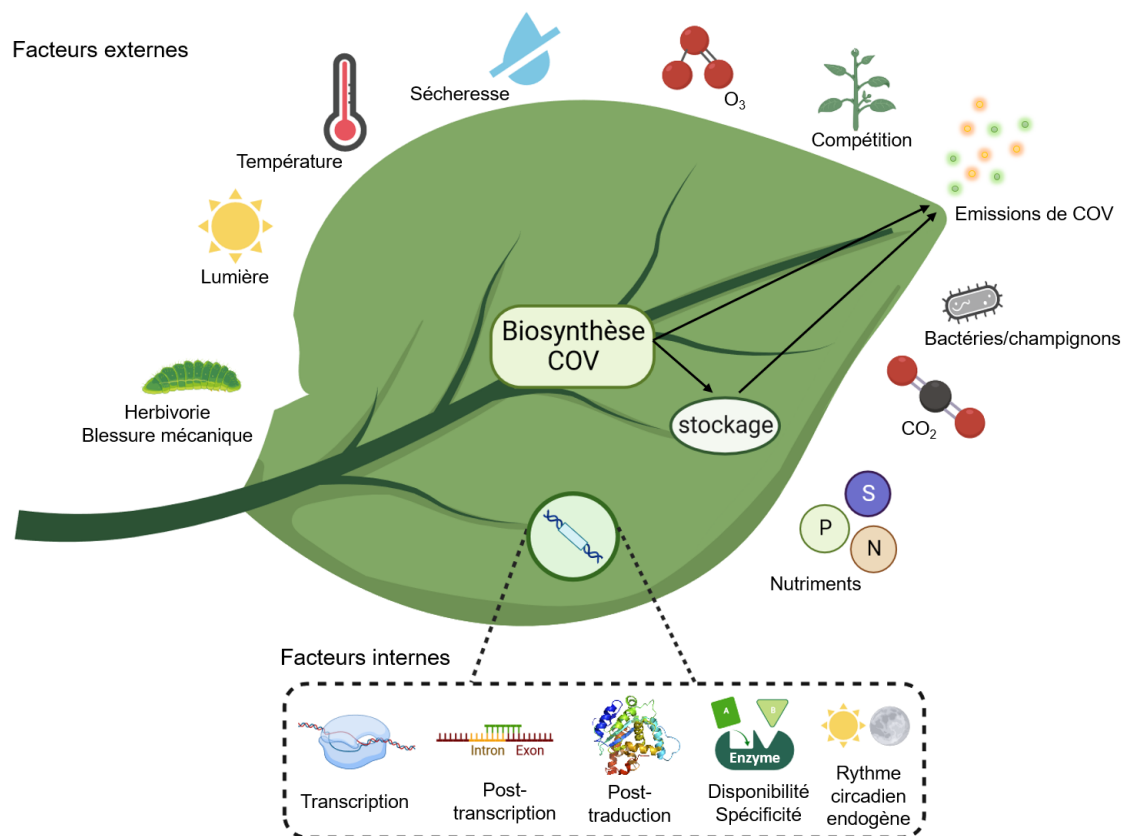


Figure 2 : Paramètres externes et internes régulant les émissions de COVP. Ils peuvent être émis directement après leur biosynthèse par diffusion ou être stockés dans des structures spécifiques (trichomes, canaux). La température, la sécheresse et la lumière peuvent modifier la biosynthèse de COVP d’une manière directe ou indirecte en affectant la photosynthèse et la repartition de ses produits dans les différentes voies métaboliques de la plante.

1.2.3 Interactions entre facteurs internes et externes

Nous avons vu précédemment que les émissions de COVP sont influencées par un ensemble de facteurs, internes et externes. Toutefois, la régulation des émissions implique souvent une combinaison de ces facteurs.

La variation des émissions en réponse à la température et à la lumière diffère selon les structures de stockage de la plante (Figure 3). En effet, le taux de synthèse varie en fonction de l’activité des enzymes limitantes, tandis que les émissions issues des structures de stockage dépendent des propriétés physico-chimiques de la molécule et des tissus à traverser lors de son passage vers l’extérieur. De plus, la disponibilité de la lumière peut avoir un impact sur la photosynthèse, ce qui peut à son tour modifier la disponibilité des précurseurs nécessaires à la biosynthèse des COVP (Niinemets et al., 1999).

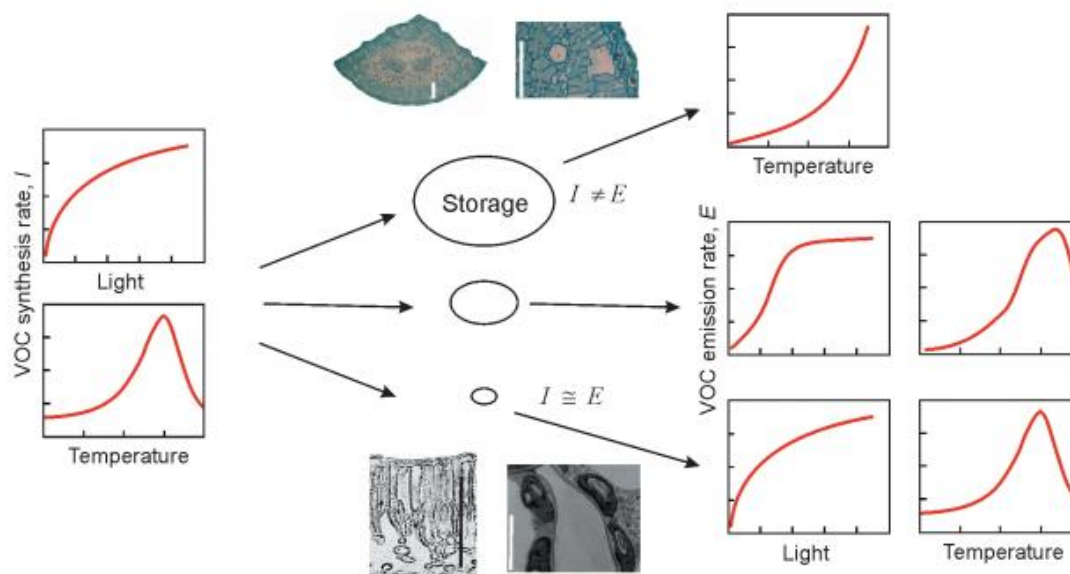


Figure 3 : Relations entre les taux de synthèses (I) et les taux d'émission (E) de COVP, selon les structures de stockage de la plante en fonction de la température et de la densité de flux photonique. 1) $I \neq E$ lorsque les structures de stockage sont importantes et les émissions de COVP ne dépendent pas directement de la biosynthèse. Les émissions augmentent en continu avec la température car la pression de vapeur du réservoir augmente, ce qui augmente la diffusion. 2) Lorsque $I \cong E$ il les émissions dépendent directement de la biosynthèse. 3) Dans le cas intermédiaire, il n'y a pas de stockage spécifique et les taux d'émissions dépendent de la biosynthèse mais également du temps que le COV passe dans la feuille avant d'être à l'extérieur, modifiant légèrement les courbes d'émissions. Schéma issu de Laothawornkitkul et al., 2009.

Points-clés

Les émissions de COV sont modulées par :

- Des facteurs internes (régulation lors de la transcription, post-transcription et post-traduction, disponibilité des substrats, rythme circadien endogène).
- Des facteurs externes biotiques (herbivorie, maladies, compétition) et abiotique (température, luminosité, réactifs atmosphériques, nutriments et humidité du sol).
- Les interactions entre les propriétés intrinsèques de la plante et les facteurs environnementaux (structures de stockage/lumière ou température).

1.3 COMMUNICATION CHIMIQUE PLANTES-INSECTES

1.3.1 Quelles sont les molécules impliquées dans la communication chimique ?

Les êtres-vivants émettent une grande diversité de molécules qui peuvent être perçues par d'autres organismes et qui agissent comme des signaux chimiques, appelés médiateurs chimiques. Ces composés chémiochimiques jouent un rôle fondamental dans la communication intra- et interspécifique, qu'il s'agisse d'animaux, de plantes ou de microorganismes (Regnier, 1971). Ainsi, on distingue les phéromones, qui ont un effet intraspécifique (Karlson et Butenandt, 1959), des composés allélochimiques, qui ont un effet interspécifique.

Les phéromones sont des composés chimiques impliquées dans la communication intraspécifique et sont classées en fonction de leur rôle. La première phéromone, le bombykol, a été identifiée chez les femelles *Bombyx mori* en montrant une attraction des mâles par ce composé (Butenandt, 1959). Par la suite, de nombreuses phéromones ont été répertoriées. Parmi celles qui ont fait l'objet de nombreuses études, on peut mentionner les phéromones d'agrégation, qui favorisent le regroupement d'individus (Sauphanor, 1992 ; Salmon et al., 2019) ; les phéromones d'alarmes, libérées en cas de danger (Blum, 1969 ; revue par Vandermoten et al., 2012) ; les phéromones sexuelles, impliquées dans l'attraction pour la reproduction (Grillet et al., 2006 ; El-Sayed et al., 2011), les phéromones de piste, permettant de marquer le chemin emprunté (Gehlbach et al., 1971 ; Morgan, 2009), ainsi que les phéromones anti oviposition qui marquent le lieu de ponte (Corbet, 1973 ; McCall et Cameron, 1995).

Les composés allélochimiques ont également suscité de nombreuses études en raison de leur rôle dans la communication interspécifique, en particulier dans les relations plantes-insectes. Ils remplissent diverses fonctions impliquant un organisme émetteur et un organisme récepteur. On distingue trois catégories :

- Les **allomones**, qui profitent uniquement à l'émetteur. Elles sont principalement émises comme moyen de défense contre les herbivores ou pour attirer certains pollinisateurs (Pichersky et Gershenzon, 2002). Par exemple *Solanum pinnatisectum* émet des composés antixénotiques contre la teigne de la pomme de terre, *Phthorimaea operculella* (Musmeci et al., 1997).
- Les **kairomones**, qui bénéficient seulement au récepteur et sont impliquées dans des interactions directes ou indirectes (Ayelo et al., 2021). Par exemple, les émissions de

COVP permettent à des insectes ravageurs de localiser leur plante hôte pour se nourrir ou pondre (Dicke et al., 1990).

- Les **synomones**, qui procurent un bénéfice à la fois à l'émetteur et au récepteur. L'exemple le plus courant est celui de COVP émis par les fleurs qui attirent les pollinisateurs, garantissant la reproduction de la fleur tout en offrant au pollinisateur une source de nourriture (Tan et Nishida, 2000).

Les COVP jouent un rôle central dans les relations trophiques de manière directe ou indirecte (Dicke, 1994 ; Guo et al., 2021 ; Figure 4). Plus précisément, ils jouent un rôle important dans la pollinisation (Dobson 2006), les mécanismes de défense (Dicke et Baldwin, 2010 ; Zhou et Jander, 2022), la communication (Hansson et Wicher, 2016) ou la dynamique spatiale des populations (Friis et al., 2006).

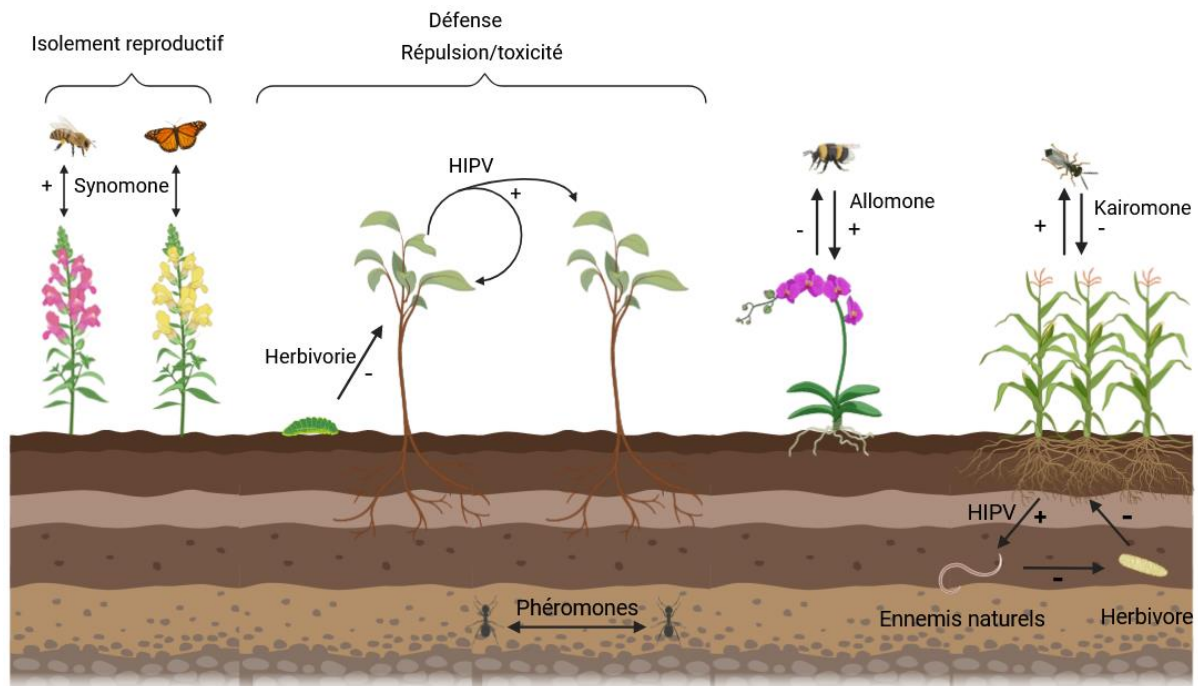


Figure 4 : Communication chimique de l'atmosphère à la rhizosphère, focalisée sur les interactions plante-insecte. Les bénéfices sont indiqués par « + » et les effets négatifs par « - ». HIPV : herbivore induced plant volatile.

1.3.2 Implication des COVP dans la communication plante-insecte

La relation plante-pollinisateur est l'un des mécanismes les plus étudiés dans les interactions plante-insecte. Pour assurer leur reproduction, les fleurs peuvent émettre un

mélange de COVP (Farré-Armengol et al., 2013 ; Byers et al., 2014) ou un seul COVP spécifique (« private channel », Chen et al., 2009). Ces composés attirent les pollinisateurs, leur fournissant généralement une récompense alimentaire, ou dans le cas des figuiers, un site de ponte (Holland et Fleming, 1999 ; Wright et Schiestl, 2009). Cependant, il existe des relations asymétriques entre les plantes et leurs pollinisateurs. En effet, les orchidées émettent des allomones qui miment les phéromones sexuelles des femelles, attirant ainsi les mâles qui tentent de s'accoupler et, ce faisant, pollinisent la fleur simultanément (pseudocopulation, Brodmann et al., 2009). Au fil du temps, les modifications dans les émissions de COVP et l'évolution de la capacité de détection des insectes ont conduit à une spécialisation ou à une généralisation des espèces (Bruce, 2015).

Les COVP jouent également un rôle dans la localisation d'une plante hôte par un insecte afin de trouver un site de ponte ou une source de nourriture. Ainsi, les pollinisateurs, les parasitoïdes et les ravageurs utilisent des signaux olfactifs, gustatifs et visuels (Renwick et Radke, 1988 ; Carrasco et al., 2015 ; Kerr et al., 2016 ; Barragán-Fonseca et al., 2020). Dans ce contexte, nous nous focaliserons uniquement sur les signaux olfactifs. Les COVP constitutifs jouent souvent un rôle central dans la localisation d'une plante hôte par un insecte, tels que les thiocyanates émis par les Brassicaceae, qui attirent la mouche du chou, *Delia brassicae* (Finch, 1978). Dans certains cas, les HIPV émis par une plante déjà infestée permettent à des insectes phytophages de localiser leur plante hôte (Dicke et Baldwin, 2010). Certains de ces composés peuvent être toxiques ou répulsifs, permettant à la plante de se protéger des attaques. Pour contrer ces effets négatifs, les insectes phytophages se sont adaptés en développant des mécanismes de détoxification grâce à des enzymes ubiquitaires ou acquises par transfert horizontal de gènes, ainsi que par séquestration des composés toxiques (revue par Heide-Fischer et Vogel, 2015). Les signaux olfactifs jouent également un rôle dans la localisation de sites d'oviposition. Chez de nombreuses espèces de Lépidoptères et d'Hyménoptères, les femelles s'orientent et sélectionnent leur site de ponte par détection de composés attractifs, seuls ou en mélanges. Les composés répulsifs ou dissuasifs émis par les feuilles ou les fruits peuvent également participer à cette sélection (McCall et al., 1993 ; Honda, 1995 ; Witzgall et al., 2005 ; Berteaux et al., 2020, Achhami et al., 2021).

Les interactions tritrophiques impliquent également des COVP dans les interactions plante-herbivore-parasitoïde ou plante-herbivore-prédateur par exemple, qui résultent d'une convergence évolutive (Turlings et Erb, 2018). Après une attaque par un herbivore, la modification des signaux émis par les plantes peut être régulée au niveau de l'expression

génique (Kellenberger et al., 2016). Ces modifications attirent des parasitoïdes ou des prédateurs, qui contribuent à réduire les populations d'herbivores et à modifier les interactions à différents niveaux trophiques (revue par Farré-Armengol et al., 2013 ; Schuman et al., 2015). Pendant la floraison, l'attraction de parasitoïdes ou de prédateurs résulte d'un trade-off entre la pollinisation et la défense. En effet, lorsqu'une plante est attaquée elle peut émettre des COVP attractifs pour les parasitoïdes ou les prédateurs, mais pas pour les pollinisateurs. Par exemple, les araignées-crabes utilisent le β -ocimène comme signal pour localiser les insectes florivores, réduisant la pression par herbivorie, mais limitant le nombre de visite des pollinisateurs (Knauer et al., 2018). L'herbivorie peut déclencher des modifications quantitatives dans les profils d'odeurs émis par les plantes. Dans le cas d'herbivores comme *Manduca sexta*, le sphinx du tabac, les sécrétions orales contiennent des isomérases qui modifient quantitativement les émissions de GLV (Allmann et Baldwin, 2010 ; Takai et al., 2018 ; Lin et al., 2023). Cette modification du ratio (3Z):(2E)-hexenal conduit à l'attraction de prédateurs généralistes lorsque le ratio est faible et à l'attraction de prédateurs spécialistes lorsque le ratio est élevé (Allmann et al., 2013).

1.4 ODEUR : DE LA DETECTION AU COMPORTEMENT

L'olfaction revêt une importance primordiale chez les insectes tout au long de leur vie, que ce soit pour localiser leur nourriture, identifier un lieu propice à la ponte, assurer leur reproduction, ou encore pour signaler un danger. Ainsi, pour communiquer et interagir avec leur environnement, les insectes possèdent des structures spécifiques : les sensilles chimioréceptrices. Les sensilles olfactives ont comme caractéristique la présence de nombreux pores par lesquels les COVP peuvent traverser la cuticule, alors que les sensilles gustatives ne possèdent qu'un pore apical ou une couronne de pores permettant l'entrée des molécules sapides (Calatayud et al., 2013). Les neurones récepteurs olfactifs (NRO) et gustatifs (NRG) de ces sensilles assurent la détection des odeurs et les goûts. D'autres sensilles, sans pores, sont impliquées dans la détection de stimuli mécaniques, de la température ou de l'humidité. Les neurones récepteurs se projettent dans le système nerveux central, les lobes antennaires pour les NRO, où leurs réponses sont intégrées et déclenchent des réponses comportementales ou physiologiques appropriées. Il existe une diversité de sensilles chez les insectes, variant en termes de nombre et de structure, permettant une adaptation optimale à leur environnement.

1.4.1 Les sensilles : structures et fonctionnement

Les sensilles olfactives présentent de nombreux pores à leur surface (Bland, 1991) et sont principalement localisées sur les antennes (Bland et Rentz, 1994), mais peuvent aussi être présentes sur les palpes maxillaires, notamment chez les drosophiles ou les criquets (Blaney, 1977 ; De Bruyne et al., 1999). Concernant les sensilles gustatives, elles sont majoritairement réparties sur les pièces buccales, les pattes et l’ovipositeur des femelles, avec un pore terminal unique (Marion-Poll et al., 1992 ; revue par Hallem et al., 2006). Le nombre et le type de sensilles varient en fonction de l’ordre des insectes et du sexe (revue par Hallberg et Hansson, 1999 ; Steinbrecht, 1996 ; Nowińska et al., 2021). Parmi les sensilles olfactives, on distingue quatre formes : placoïdes, basiconiques, coeloconiques et trichoïdes. Ces variations structurales permettent aux insectes de détecter différents types de composés comme les COVP ou les phéromones (Clyne et al., 1997).

L’environnement d’un insecte présente une multitude de COVB émanant d’une grande diversité d’organismes. Cependant, seule une fraction de ces molécules sera détectée. Lorsqu’un COVB parvient à l’antenne d’un insecte, il pénètre dans la sensille par les pores. Il se lie alors à des protéines de liaison (odorant-binding protein, OBP) qui permettent leur solubilisation dans la lymphe sensillaire et leur transport jusqu’à la membrane des NRO. Les COVB entrent ensuite en interaction avec un complexe récepteur olfactif (OR) – co-récepteur (ORco), formant un canal ionique perméable aux cations. Cette interaction déclenche l’ouverture du canal, ce qui induit la dépolarisation du NRO et déclenche un potentiel de récepteur (PR). A partir d’un certain seuil, le NRO émet des potentiels d’action (PA), dont la fréquence dépend de l’amplitude du PR. Toutes ces interactions permettant la transformation du signal chimique en signal électrique, constituant la transduction olfactive (Figure 5). Par la suite, ce signal se propage jusqu’aux glomérules constituant le lobe antennaire. Les NRO de même type expriment des OR identiques et se projettent dans les mêmes glomérules. Le message est ensuite transmis par un réseau de neurones vers les structures du système nerveux central (corps pédonculés et protocérébron latéral) qui déclencheront un comportement.

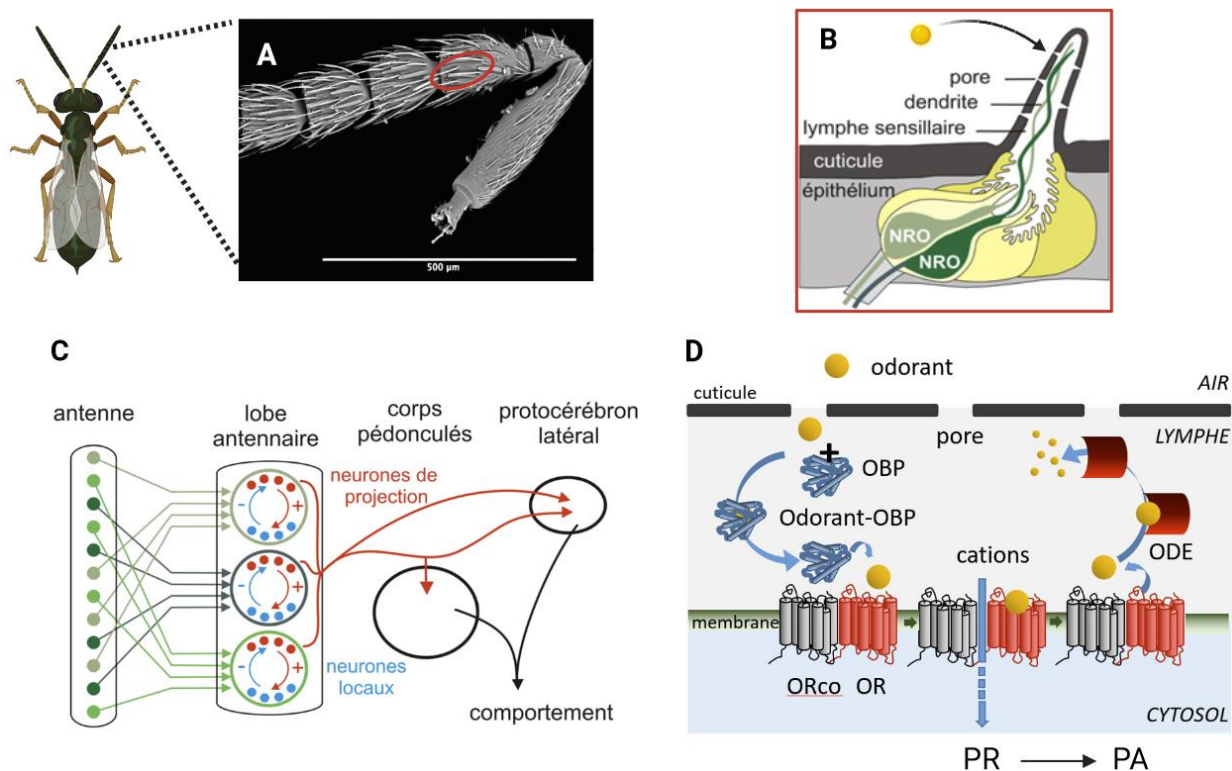


Figure 5 : Structure et fonctionnement d'une sensille d'Hyménoptère. **(A) Image par microscopie électronique à balayage d'une antenne d'*Eurytoma shortousei*** (Hyménoptère : Chalcidoidea, Zhang et al., 2017). **(B) Schéma d'une sensille olfactive exposée à un odorant.** Les neurones récepteurs olfactifs (NRO) sont enveloppés par trois cellules accessoires (en jaune) qui délimitent un espace intrasensillaire rempli de lymphe sensillaire dans laquelle baignent les dendrites des NRO qui portent les récepteurs olfactifs. La lymphe sensillaire contient les OBP (odorant-binding protein) et les ODE (odorant-degrading enzyme) qui assurent respectivement le transport et la dégradation des molécules odorantes. **(C) Organisation du système olfactif.** Les NRO (en vert) exprimant le même OR (olfactory receptor) se projettent vers le même glomérule dans le lobe antennaire. Le signal est intégré par un réseau de neurones locaux en majorité inhibiteurs (bleus) et de neurones de projection en majorité excitateurs (rouges). Les neurones de projection se projettent via un à plusieurs tractus nerveux vers les corps pédonculés et le protocérébron latéral. **(D) Schéma de la transduction olfactive.** Le récepteur olfactif est un hétéromère composé d'un OR spécifique du NRO et qui définit sa spécificité olfactive et d'ORco, son co-récepteur. Le complexe OR-ORco est un récepteur canal (récepteur ionotrope) perméable aux cations dont le calcium. L'activation du récepteur génère son ouverture et se traduit par l'entrée de cations et donc par la dépolarisation du NRO au niveau dendritique (potentiel de récepteur). Le potentiel de récepteur est traduit en décharge de potentiels d'action au niveau du site générateur (soma ou segment initial de l'axone). PR : potentiel de récepteur, PA : potentiels d'action. Schéma adapté de Lucas *et al.* (2020).

1.4.2 La localisation et la sélection d'une plante hôte

La localisation et l'acceptation d'une plante hôte se décomposent en plusieurs phases (Figure 6). Les insectes phytophages utilisent d'abord les signaux olfactifs à distance, puis, une fois en contact, utilisent le goût pour déterminer s'ils acceptent ou non la plante comme hôte.

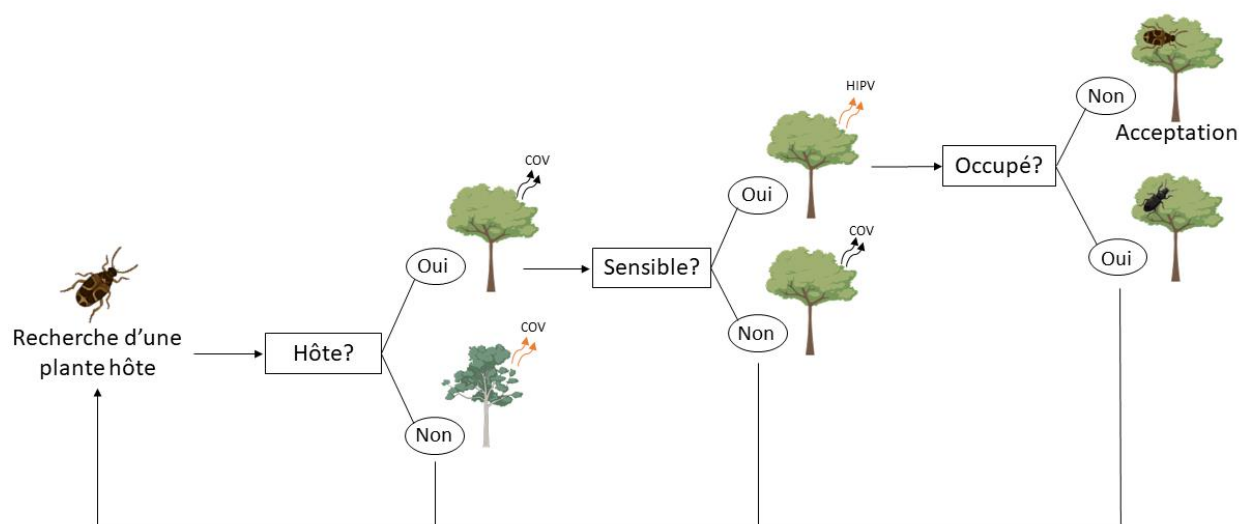


Figure 6 : arbre décisionnel d'un insecte en recherche d'une plante hôte, de la détection des COVP à l'acceptation de la plante hôte, pour pondre ou se nourrir (adapté de Borden, 1997). Si l'insecte ne sélectionne pas la plante à chaque étape, il retourne à la recherche d'une autre plante.

La reconnaissance d'une plante hôte peut dépendre de composés spécifiques émis par une famille de plantes, comme les alcaloïdes pyrrolizidiniques émis par les Asteraceae (Krasnoff et Dussourd, 1989), ou les isothiocyanates émis par les Brassicaceae (Blight et al., 1995). Pour de nombreuses espèces généralistes de Coléoptères ou de Lépidoptères, l'attraction peut être induite par des composés ubiquistes émis par différentes familles telles que les Solanaceae, les Rosaceae, les Aceraceae, etc. (Ranger et al., 2014 ; Revadi et al., 2015 ; Zhang et al., 2023). Les espèces spécialistes attirées par des COVP ubiquistes les détectent et les différencient grâce à la composition ou aux proportions relatives du mélange. Chez le figuier, bien que la composition en terpènes soit similaire entre les espèces, l'augmentation de la proportion d'un des terpènes permet aux Agaonidae de localiser leur hôte (Grison-Pigé et al., 2002). Des COVP tels que le (Z)-hex-3-en-yl acetate, le (Z)-hex-3-en-1-ol ou le benzaldehyde sont couramment retrouvés dans des mélanges attractifs. Toutefois, ils sont détectés spécifiquement par certains insectes par la variation dans leurs proportions, et peuvent être associés avec d'autres composés tels que des dérivés d'acides gras ou des terpénoïdes (Bruce

et Pickett, 2011). Le comportement des insectes peut également être influencé par des stéréoisomères et leurs ratios, tels que les scarabées japonais par le (R)- et (S)-japonilure (Tumlinson et al., 1977 ; Wojtasek et al., 1998) ou *M. sexta* par le (+)- et (-)-linalool (Reisenman et al., 2010).

Lors de la reconnaissance d'une plante hôte, des études ont mis en évidence un phénomène de redondance, où certains COVP s'avèrent essentiels tandis que d'autres peuvent être substitués, sans altérer significativement l'attractivité. Tasin *et al.* (2007) ont démontré que trois terpènes sont attractifs pour le ravageur *Lobesia botrana*, et que le remplacement de certains composés ne modifie pas leur attractivité. Cette redondance a également été observée par Nojima *et al.* (2003) dans l'interaction entre la mouche de la pomme, *Rhagoletis pomonella*, et l'aubépine (*Crataegus*, Rosaceae), ainsi que par Cha *et al.* (2008) pour la tordeuse de la vigne, *Paralobesia viteana*.

Le rôle des COVP émis par les plantes hôtes est essentiel pour guider les insectes à distance. Néanmoins, il a été montré que les odeurs des plantes non-hôtes optimisent le processus de détection à distance. En effet, des NRO spécifiques des isothiocyanates, spécifiques aux Brassicaceae, ont été identifiés chez *Aphis fabae* et génèrent une répulsion (Nottingham et al., 1991). De même, chez les Scolytes, des COVP de plantes non-hôtes ont été déterminés comme important dans la reconnaissance des plantes hôtes (Zhang et Schlyter, 2004). De plus, en fonction du contexte dans lequel il est perçu, un COVP peut être répulsif s'il est détecté individuellement, tandis qu'en présence d'autres composés, il peut avoir un effet attractif (Webster et al., 2010).

Une fois la plante hôte atteinte, les insectes vont utiliser des composés de surface et des COVP détectés par gustation, qui peuvent stimuler la ponte ou l'alimentation (Chapman, 2003 ; Heisswolf et al., 2007). Inversement, certains composés agissent comme antiappétants (Koul, 2008), tels que l'amertume chez les Drosophiles (revue par French et al., 2015). Les cires épicuticulaires présentes à la surface d'une feuille fournissent des informations à l'insecte concernant l'état physiologique de la plante, son stade phénologique ou la présence antérieure d'autres organismes (Jenks et Ashworth, 1999 ; Lo Giudice et al., 2011). D'autre part, la composition des cires varie en fonction des espèces et permet aux insectes herbivores d'établir des préférences entre leurs plantes hôtes (Tomasi et al., 2018). Par exemple, *Mayetiola destructor*, un Diptère ravageur du blé, montre une préférence entre deux variétés de blé en raison de la composition de leurs cires (Cervantes et al., 2002). En plus des informations

obtenues au contact des plantes, les COVP jouent un rôle dans l'acceptation de l'hôte par contact. Ce constat a été établi chez des espèces spécialistes comme *Yponomeuta cagnagella* (Hora et Roessingh, 1999) ou généralistes comme *L. botrana* (Tasin et al., 2011). Chez certaines espèces, un seul COVP peut suffire à stimuler l'oviposition. Par exemple, le β -caryophyllène induit une stimulation de l'oviposition chez *Maruca vitrata* (Feng et al., 2017), et le limonène chez *Drosophila melanogaster* (Dweck et al., 2013). Toutefois, les mécanismes sous-jacents responsables de cette acceptation restent moins étudiés que ceux impliqués dans la localisation à distance.

Bien que les COVP suffisent à attirer un insecte vers une plante hôte, ils peuvent agir de manière synergique avec les phéromones sexuelles, renforçant ainsi leur pouvoir attractif (Rochat et al., 2000). Les GLV sont souvent impliqués dans cette synergie, notamment chez *Helicoverpa zea* et *Cydia pomonella*, attirés par les pièges contenant des phéromones sexuelles et du (Z)-hex-3-en-yl acetate (Light et al., 1993).

1.4.3 Plasticité olfactive et comportementale

Chez les insectes, la détection et la réponse comportementale aux COVB peuvent être modulées par des facteurs physiologiques ou environnementaux, variables en fonction des espèces (revue par Anton et Rössler, 2021). Ces facteurs influencent de manière variable la détection des odeurs dans le système nerveux périphérique (SNP) et central (SNC). Cette plasticité olfactive peut être régulée par des hormones (hormone juvénile, insuline, ecdysone), des neuropeptides et des amines biogènes (sérotonine, octopamine, dopamine) (revue par Gadenne et al., 2016). Il existe plusieurs facteurs physiologiques qui modifient la sensibilité et le comportement des insectes en réponse à une stimulation par des COVP ou des phéromones :

- **La maturité sexuelle ou l'état d'accouplement.** La sensibilité aux phéromones chez les mâles *Agrotis ipsilon* est réduite après l'accouplement (Barrozo et al., 2010 ; Diesner et al., 2018). A l'inverse, les femelles *Spodoptera littoralis* présentent une augmentation de la sensibilité aux plantes hôtes après l'accouplement facilitant la recherche d'un site de ponte (Martel et al., 2009).
- **L'alimentation.** Les insectes qui ne sont pas nourris passent davantage de temps à rechercher de la nourriture, et sont donc plus sensibles aux signaux olfactifs provenant d'une source de nourriture, d'origine florale par exemple, ou par l'odeur humaine chez

les moustiques (Wäckers, 1994 ; Takken et al., 2001). Chez le parasitoïde du puceron, *Aphidius ervi*, le temps passé à se nourrir augmente avec la concentration de sucre présente dans la nourriture (Azzouz et al., 2004).

- **Le rythme circadien.** La capacité de détection des phéromones et le comportement d'attraction ou de répulsion coïncident avec les périodes d'activités chez *S. littoralis* et *D. melanogaster* (Krishnan et al., 1999 ; Merlin et al., 2007).
- **L'âge.** Les réponses aux phéromones ou aux COVP présentent une augmentation avec l'âge chez de nombreuses espèces dans le SNP (Seabrook et al., 1979 ; Domingue et al., 2006 ; Martel et al., 2009). En revanche, dans le SNC, l'âge peut augmenter ou diminuer la détection des phéromones (Gadenne et Anton, 2000), mais est indépendant pour les COVP (Greiner et al., 2002),

En dehors des facteurs physiologiques, la plasticité olfactive et comportementale peut être induite par la socialité. En effet, les insectes sociaux possèdent plus de types d'OR et plus de glomérules dans les lobes antennaires, modifiant leur sensibilité (Anton et Homberg, 1999). Par exemple, les criquets sociaux possèdent moins de sensilles, et donc une sensibilité plus faible, que les criquets non-sociaux (Greenwood et Chapman, 1984 ; revue par Couzin-Fuchs et Ayali, 2021). A l'inverse, des abeilles initialement solitaires qui ont été déplacées dans un environnement social ont donné naissance à des progénitures ayant davantage de sensilles (Boulton et Field, 2022). Chez les fourmis, le SNC est adapté avec des glomérules spécifiques à la détection de phéromones d'alarmes émises par leur congénères (Yamagata et al., 2006). Le rythme circadien peut aussi être influencé par un environnement social. En effet, chez de nombreuses espèces non-sociales, les insectes émergent avec un rythme circadien établi, tandis que chez les insectes sociaux ce rythme se développerait au sein des colonies, notamment en fonction des castes (Eban-Rothschild et Bloch, 2012).

Au cours de sa vie, un insecte est confronté à des expériences d'apprentissage, qu'elles soient associatives ou non. Cependant, les mécanismes neuronaux responsables de cet apprentissage demeurent peu connus chez de nombreuses espèces. Les expériences non-associatives sont principalement acquises à l'âge adulte. Chez les mâles *S. littoralis*, une exposition rapide à la phéromone sexuelle entraîne une augmentation de la sensibilité des NRO (Guerrieri et al., 2012). Les expériences associatives permettent de trouver plus facilement un site favorable à l'oviposition ou une source de nourriture. Elles sont largement répandues et peuvent impacter la mémoire à long-terme (revue par Anton et al., 2021). Un des cas les plus utilisés pour étudier la mémoire, la perception et l'apprentissage, est le réflexe d'extension du proboscis en réponse

à une odeur de nourriture par conditionnement (Ômura et Konda, 2009 ; Giurfa et Sandoz, 2012). On recense également un apprentissage chez les coccinelles concernant leur alimentation (Glinwood et al., 2011) ou chez *D. melanogaster* (Chabaud et al., 2006). De plus, ces capacités d'apprentissages varient en fonction de l'âge des insectes et peuvent entraîner des modifications des structures du lobe antennaire à long-terme, affectant leur capacité à détecter des odeurs et modifiant leur comportement (Arenas et al., 2012).

En plus des facteurs physiologiques et environnementaux, les facteurs abiotiques, d'origine anthropique ou naturelle, conduisent à une modification de la perception et du comportement. Parmi ces facteurs, l'humidité et la température sont ceux qui ont le plus d'impact sur le comportement (Rousse et al., 2009). Par ailleurs, l'augmentation des concentrations d'ozone ou l'utilisation de pesticides neurotoxiques peuvent altérer négativement la détection des odeurs et les comportements de vols orientés (Rabhi et al., 2014 ; Vanderplanck et al., 2021).

Points-clés

- Les sensilles olfactives sont principalement situées sur les antennes et varient entre les espèces en nombre et anatomie externe, mais leur organisation reste constante.
- La transduction olfactive regroupe toutes les étapes qui permettent la transformation d'un signal chimique, l'entrée de molécules odorantes par les pores des sensilles, en un signal électrique, la décharge de potentiels d'action par les NRO.
- Pour localiser une plante hôte, les insectes phytophages s'orientent grâce à des COVP spécifiques ou ubiquistes, puis acceptent la plante par olfaction et gustation.
- La plasticité olfactive et comportementale est liée aux facteurs physiologique (âge, alimentation, rythme circadien et maturité sexuelle), externes (socialité, expérience) et abiotiques (température, humidité, ozone, pesticides).

1.5 POURQUOI REDUIRE L'UTILISATION DES PESTICIDES ?

En agriculture, les pesticides sont définis comme l'ensemble des produits utilisés contre les espèces considérées comme nuisibles pour les cultures. Ce terme regroupe ainsi les insecticides, herbicides, fongicides, bactéricides, rodenticides, régulateurs de croissance et désinfectants. Parmi ces catégories, les herbicides représentent la moitié des pesticides utilisés dans le monde, suivis par les insecticides et les fongicides-bactéricides.

En 2020, on estime que près de trois millions de tonnes de pesticides ont été utilisées dans le monde, soit une augmentation de 30% en l'espace de 20 ans (Figure 7). En France, l'utilisation de pesticides est passé de 97 700 tonnes en 1990 à 64 516 tonnes en 2020, avec un pic atteignant 114 700 tonnes en 1999 (source : FAO). L'utilisation de pesticides varie d'une année à l'autre en fonction des conditions climatiques et de l'évolution des réglementations. En termes d'objectifs, le plan Ecophyto II+ vise à réduire de 50% l'utilisation de pesticides et d'arrêter le glyphosate (herbicide) d'ici 2025 en France, l'objectif ayant déjà été reporté de 2018 à 2025. Un nouveau plan Ecophyto 2030 vient d'être présenté en septembre 2023, qui affirme les objectifs de diminution de l'usage des pesticides, et renforce la politique de recherches d'alternatives pour la protection des cultures.

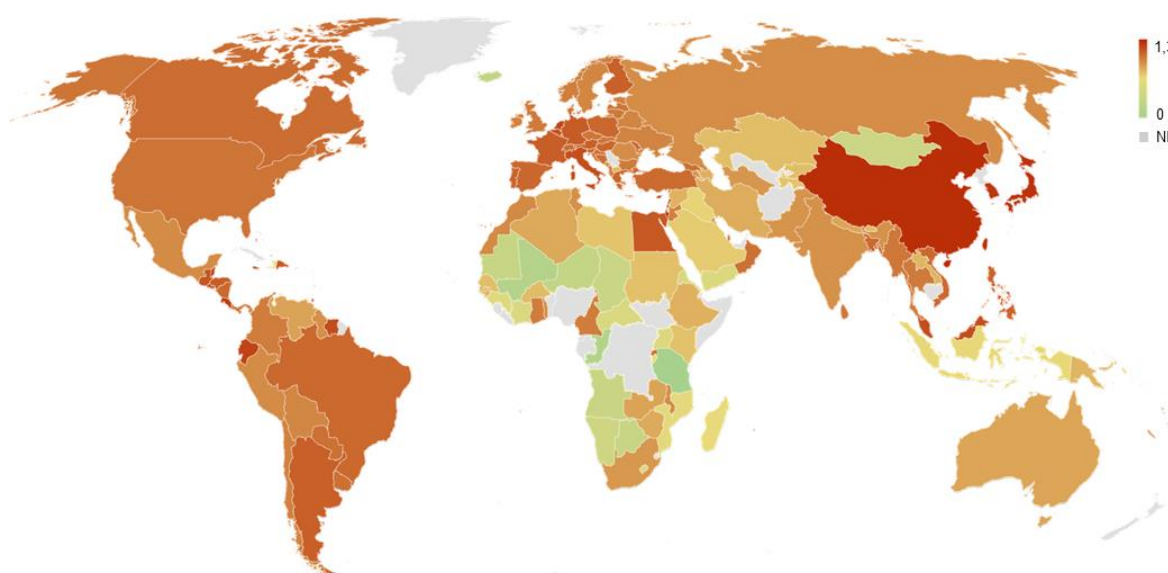


Figure 7 : carte d'utilisation des pesticides dans le monde en 2020 (kg/ha). ND : absence de données. Les données sont des valeurs estimées (source : FAO).

En France, la réglementation établit des limites maximales de résidus (LMR) pour les denrées alimentaires telles que les fruits, les légumes et les céréales, en fonction de chaque paire "denrée

- substance active de pesticides". Ces valeurs sont établies pour des aliments non lavés et non épluchés.

Bien que l'utilisation de pesticides soit la méthode la plus répandue pour assurer la production agricole mondiale, elle a un impact négatif avéré sur la santé (revue par Koureas et al., 2011) et la biodiversité, notamment par une augmentation de la mortalité chez les abeilles (Wintermantel et al., 2020), ainsi que d'autres espèces non ciblées (Pimentel, 1971). Parmi les pesticides, les néonicotinoïdes et les pyrréthroïdes sont deux neurotoxiques très utilisés, impactant la communication chimique. En effet, les néonicotinoïdes comme la clothianidine ont montré une modification de la sensibilité des neurones du lobe antennaire (mais pas des NRO), conduisant à une modification du comportement chez *A. ipsilon* selon la dose utilisée (Rabhi et al., 2016). De plus, la plasticité olfactive doit être prise en compte étant donné que les mâles pré-exposés à ce pesticide ne présentent pas les mêmes réponses selon l'âge (Abrieux et al., 2016). De même, chez *D. melanogaster*, l'imidaclopride réduit l'activité des NRO à partir d'une certaine dose, ainsi que leurs performances de choix, et rallonge le retour à l'activité antennaire de base (Tatarko et al., 2023). Les pyrréthroïdes induisent aussi des modifications du système olfactif. Par exemple, la perméthrine entraîne une hyperexcitation neuronale chez *B. mori* (Kaissling, 1980) et la deltaméthrine bloque l'émission de PA chez *Mamestra brassicae* (Lucas et Renou, 1992). Le comportement des insectes est également impacté par l'utilisation de pyrréthroïdes. Par exemple, le temps d'initiation de parade sexuelle chez les mâles *S. littoralis* est réduit avec l'exposition à la deltaméthrine et peut induire une baisse du succès reproducteur en fonction de la dose. Ces modifications peuvent s'expliquer par des modifications du profil protéique (Lalouette et al., 2016) et des modulations de l'ouverture des canaux sodiques (Kadala et al., 2019).

Il existe une rémanence des pesticides, variable selon la famille chimique et le type de sol, qui mène à leur accumulation dans les sols (Rodríguez-Cruz et al., 2006 ; revue par Wood et Goulson, 2017). En dehors de la mortalité et de la toxicité, les pesticides entraînent une perturbation dans la communication intra- et interspécifique en altérant les mécanismes de détection et de comportement, mais également dans l'immunité et la fécondité (revue par Desneux et al., 2007). L'apparition de résistance aux molécules est également un problème majeur en agriculture (Dunley et Welter, 2000 ; revue par Hawkins et al., 2019). Toutes les raisons évoquées précédemment mettent en évidence l'importance de développer des méthodes alternatives à l'utilisation des pesticides.

Encart 1 : L'histoire des pesticides

La lutte chimique existe depuis des millénaires, comme en témoignent les écrits d'Homère dans la Grèce Antique (VIII^e siècle av. J.-C.) qui préconisait d'utiliser le soufre pour lutter contre la galle. L'utilisation de produits chimiques a évolué avec l'expansion des surfaces agricoles et le développement de la chimie minérale. Au XIX^e siècle le DDT a été synthétisé et largement utilisé au siècle suivant, avec la démonstration de ses propriétés insecticides. A partir du XX^e siècle, les organochlorés ont été développés et largement commercialisés comme insecticides, entraînant des conséquences sur l'environnement et la santé, longtemps ignorés. Suite à l'interdiction d'utiliser certains produits, d'autres ont vu le jour : les organophosphorés, les benzimidazoles, les pyrimides, ou les pyréthriinoïdes, qui dominent actuellement le marché des insecticides (Matthews, 2018).

L'augmentation des pesticides a été encouragée par les objectifs de rentabilité (nécessité d'augmenter les rendements et la productivité), et une nécessité de faciliter le travail manuel, en parallèle de la moto-mécanisation. De plus les maladies et ravageurs se sont multipliés dans un contexte de simplification des itinéraires techniques, de diminution des rotations et des espèces propices aux auxiliaires de cultures (arrachage des haies). De plus, le changement climatique profite à l'installation d'espèces invasives au détriment des ennemis naturels et des espèces endémiques.

1.6 CONTEXTE D'ETUDE ET PRESENTATION DES MODELES

1.6.1 Interactions *Prunus* x *Eurytoma*

Le genre *Prunus* regroupe plus de 300 espèces d'arbres et arbustes appartenant à la famille des Rosaceae (Das et al., 2011). Parmi les espèces de *Prunus*, certaines sont infestées par des *Eurytoma*, qui peuvent être spécifiques ou non de chaque *Prunus*. Le genre *Eurytoma* regroupe plus de 600 espèces dont la moitié est répartie en écozone Paléarctique (Figure 8). Parmi les *Eurytoma*, on compte des espèces parasites, phytophages (Zerova et Fursov, 1991 ; Zerova et Seryogina, 2009), entomophytophages, ou de biologie encore inconnue. Notre intérêt se portera sur les espèces phytophages, en particulier celles sur les interactions *Prunus* x *Eurytoma*. Il existe des interactions spécifiques comme dans le cas d'*Eurytoma amygdali* qui a pour hôte unique *P. dulcis* (amandier), et plus généralistes comme *E. maslovskii*, qui a pour hôte *P. persica* (pêcher) ou *P. mume* (prunier du japon), (Zerova et Fursov 2009 ; Yang et al.,

2020). La littérature relatant ces interactions se concentre majoritairement sur la biologie des *Eurytoma*. Bien que des études soient en cours, à notre connaissance, il n'existe aucun moyen de lutte biologique efficace pour limiter les infestations contre les espèces phytophages d'*Eurytoma*.

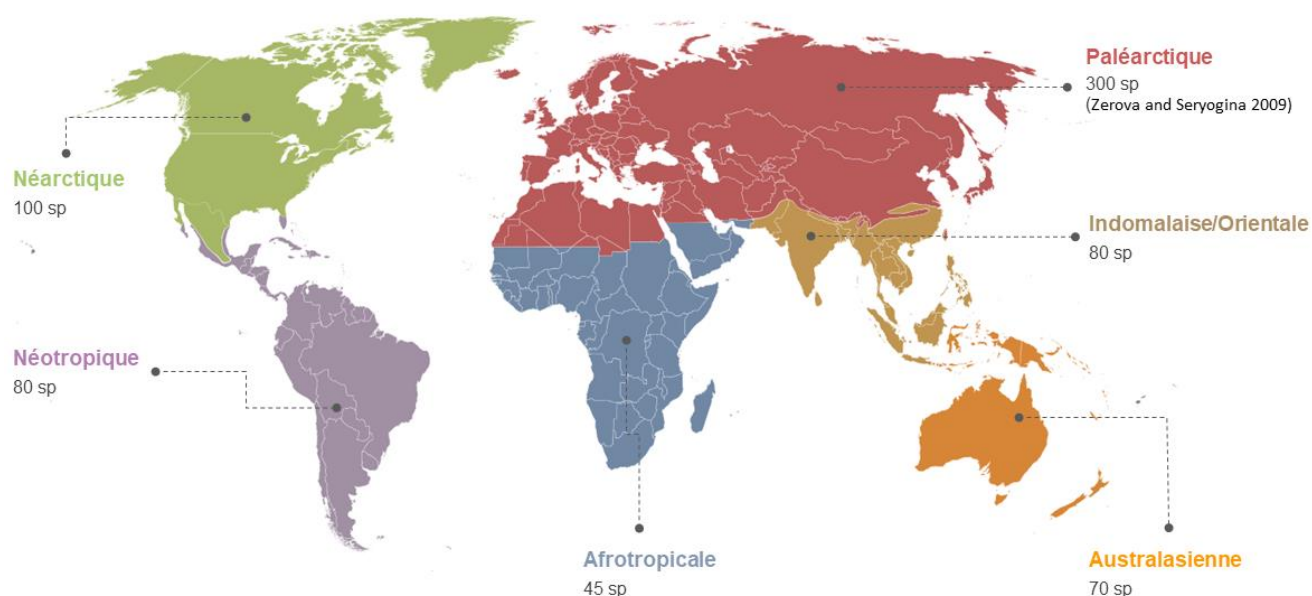


Figure 8 : Répartition des espèces identifiées du genre *Eurytoma* par écozone (Park and Lee, 2021). Plus de la moitié des espèces sont situées en zone Paléarctique. Les valeurs sont des approximations.

1.6.2 L'amandier

L'amandier [*Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb] est un arbre à feuilles caduques cultivé depuis environ 5 000 ans en Asie Centrale (Velasco et al., 2016). Il a ensuite été introduit dans les régions méditerranéennes avec l'expansion de l'agriculture (Delplancke et al., 2013), puis dans le reste du monde. Les caractéristiques des amandiers telles que la hauteur, la résistance aux maladies, la productivité ou la phénologie, varient selon les variétés, les conditions pédoclimatiques et les pratiques agricoles (Socias i Company et al., 2017 ; Sakar et al., 2019).

P. dulcis possède une floraison précoce, de février à mars, avec un système d'auto-incompatibilité gamétophytique (locus S) qui nécessite une pollinisation croisée, sauf pour les variétés autofertiles où le gène SRnase n'est pas fonctionnel (Dicenta et al., 2002 ; Bošković et al., 2003 ; Socias i Company, 2017 ; Henselek et al., 2018). Le développement des fruits et des feuilles se produit de fin mars à début juin et la maturité des fruits est atteinte à l'automne.

Actuellement, on compte plus de 50 variétés sélectionnées au fil du temps, mais qui reposent principalement sur trois cultivars, témoignant d'une faible diversité génétique (Pérez de los Cobos et al., 2021). En France, les principales variétés sont Lauranne, Mandaline, Ferragnès, Ferraduel et Ferrastar (Duval et Froment, 1998).

L'amande est l'un des fruits à coque les plus consommés dans le monde avec un fort intérêt nutritionnel. Par conséquent, l'amandier représente un enjeu économique mondial, avec une production d'amandes non décortiquées atteignant 4 millions de tonnes en 2021, réparties sur 2,3 millions d'hectares. La production est majoritairement assurée par les Etats-Unis (57%), l'Espagne (9%) et l'Australie (7%) (source : FAO). En comparaison, la France a produit seulement 2000 tonnes en 2021 et a importé 47 000 tonnes. En 2022, moins de 1% des amandes produites en France ont été exportées (source : douanes françaises). Au cours des dix dernières années, la France a augmenté sa production de 65% en augmentant les surfaces cultivées mais cette augmentation reste insuffisante pour répondre à la demande croissante. En raison des épisodes de sécheresse de plus en plus fréquents et des maladies, courantes chez les arbres fruitiers, il est important de développer une culture plus durable et locale en France. De plus les attentes du marché correspondent au développement d'une production locale (se démarquant des amandes importées, réputées de qualité médiocre à moyenne), répondant à des cahiers des charges en agriculture biologique ou du moins éco-responsables.

1.6.3 *Eurytoma amygdali*

Comme pour de nombreux arbres fruitiers, les maladies et les ravageurs représentent un obstacle majeur au développement de la culture d'amandiers. Les maladies et dommages peuvent être causés par :

- Des champignons tels que *Fusicoccum amygdali* (flétrissement des rameaux), *Monilia laxa* (dessèchement des fleurs et chancre sur rameaux) et *Coryneum beijerinckii* (nécrose des feuilles, arrêt de croissance des fruits).
- Des bactéries comme *Pseudomonas syringae* (dessiccation des rameaux) et *Xylella fastidiosa* (flétrissement, nécrose et brûlure des rameaux).
- Des nématodes à galle, qui sont des pathogènes polyphages des racines.
- Des insectes ravageurs, tels que *Monosteira unicostata* (faux-tigre de l'amandier), les pucerons, les acariens, les cicadelles et *Eurytoma amygdali* (guêpe de l'amande).

Eurytoma amygdali End. (Hyménoptère : Eurytomidae), appelée guêpe de l'amande, est un ravageur détecté pour la première fois en France en 1981 (Arambourg, 1983). Originaire du Moyen-Orient (Enderlein, 1907 ; Zerova et Fursov, 1991 ; Figure 9), il peut causer plus de 80% des pertes des récoltes (Duval et Millan, 2010) et aucun moyen de biocontrôle efficace et applicable à large échelle n'existe à ce jour. Toutefois des essais sont en cours avec les huiles essentielles et de l'argile.



Figure 9 : Carte de répartition d'*Eurytoma amygdali* (sources : Mentjelo & Atjemis 1970, Plaut 1970, Zerova and Fursov 1991, Doğanlar et al. 2006, Yiğit et al. 2020).

Cette espèce univoltine pond ses œufs au printemps, lorsque les fruits sont en croissance (Figure 10). Cependant, si la phénologie de l'arbre est décalée, la ponte dans un fruit trop jeune peut provoquer la chute physiologique de celui-ci (Tzanakakis et al., 1997), avec un impact important sur le rendement. En revanche, lorsque le fruit est plus développé, la coque devient plus dure et les guêpes ne peuvent plus perforer la coque et déposer leur œuf dans l'amandon.



Figure 10 : photographies de (A) une femelle *Eurytoma amygdali*, (B) d'une larve dans un fruit ouvert et (C) d'un fruit infesté avec le trou de sortie (source : Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes).

Pour pondre dans l'amande, la guêpe perce l'amande avec son ovipositeur pour y déposer un œuf. Le nombre d'œufs pondus par une femelle varie d'une quinzaine à plus d'une centaine sur 14 jours (Talhok, 1977). Lors de la ponte, les femelles émettent une phéromone anti-oviposition non-volatile qui empêche les autres femelles de pondre (Kouloussis et Katsoyannos, 1991). La composition de cette phéromone reste inconnue mais des recherches sont en cours. Dans de rares cas, il peut cependant y avoir plusieurs œufs déposés dans une même amande, mais une seule larve se développera. Au cours de sa croissance, la larve se nourrit de l'amandon et entre en diapause en août (Figure 11). Elle est protégée du froid par l'amande et peut résister à des pics de températures allant jusqu'à -20°C (Khanmohamadi et al., 2016).

Le stade larvaire se divise en deux phases de diapauses dépendantes de la température (Tzanakakis et al., 1991 ; Tzanakakis et Veermand, 1994 ; Margaritopoulos et al., 2006) et se termine en janvier si les conditions climatiques sont favorables (Mentjelo et Atjemeis, 1970 ; Khanmohamadi et al., 2016). La nymphose a lieu de janvier à février et est plus rapide chez les mâles (Plaut, 1972). Les guêpes adultes émergent entre mars et fin avril, en perçant l'amande à l'aide de leurs pièces buccales. Les femelles peuvent s'accoupler immédiatement après émergence (Talhok, 1977) mais peuvent également se reproduire par parthénogénèse (observations en laboratoire). Ainsi, les femelles fécondées engendrent des femelles, tandis que les femelles vierges produisent des mâles (Duval, données non publiées), avec un sexe-ratio d'environ 1:2 (Plaut, 1971). La durée de vie moyenne des guêpes est d'environ trois semaines.

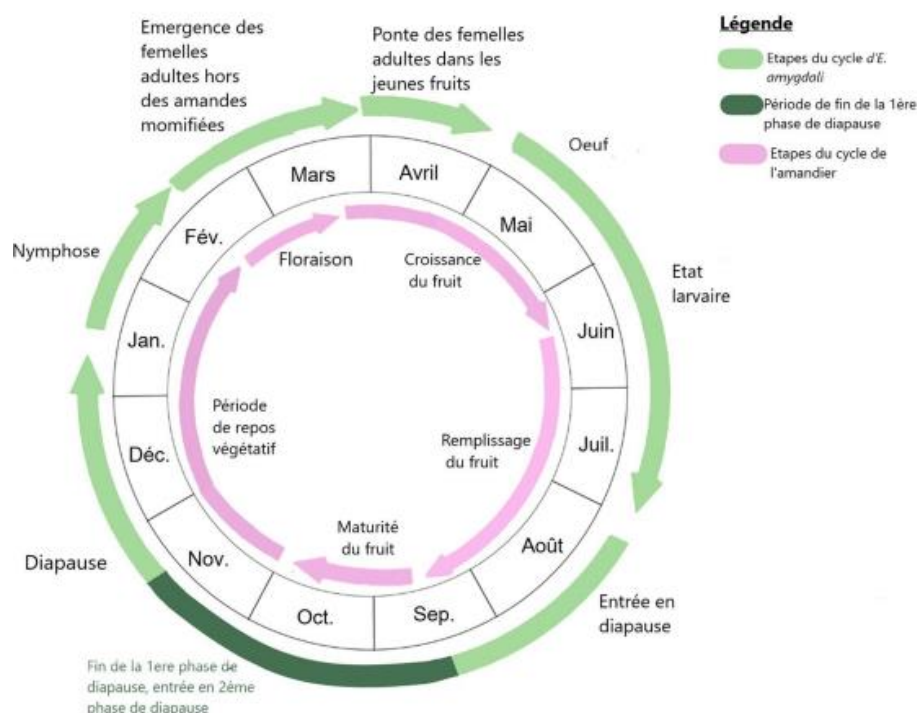


Figure 11 : Cycle phénologique de l'amandier (en rose) en parallèle du cycle biologique d'*E. amygdali* sur une année (en vert clair) avec les deux phases de diapause (vert foncé), (Dhillit-Lemmonier et al., 2020).

Encart 2 : l'introduction d'espèces invasives

L'introduction d'espèces invasives animales ou végétales, qu'elle ait été volontaire ou non, pose un problème majeur depuis des décennies, entraînant d'importants dégâts sur les plans économique, écologique et sanitaire (vecteurs de maladies). D'un point de vue écologique, les espèces invasives s'implantent souvent au détriment des espèces endémiques, perturbant l'équilibre des écosystèmes. Par exemple, l'arrivée du frelon asiatique en France ou du *Varroa destructor*, a provoqué des pertes considérables dans les colonies d'abeilles, entraînant des conséquences économiques estimées à une trentaine de millions d'euros (Barbet-Massin et al., 2020 ; Requier et al., 2022). Les plantes confrontées à de nouveaux pathogènes ou parasites peuvent également subir des pertes considérables, car elles ne sont souvent pas adaptées pour faire face à ces nouveaux intrants. Cette situation peut avoir des conséquences désastreuses, entraînant des pertes importantes en termes de rendement et de qualité des cultures, le coût mondial total ayant été estimé à 1288 milliards de dollars US entre 1970 et 2017 (Diagne et al., 2021).

1.6.4 Les moyens de lutte contre *Eurytoma amygdali*

Afin de contrôler l'infestation des vergers par *E. amygdali*, des études sont en cours pour évaluer l'efficacité d'huiles essentielles ayant déjà montré leur efficacité contre d'autres ravageurs (Cho et al., 2004 ; Kimbaris et al., 2010). L'utilisation d'argile est également testée comme moyen de biocontrôle selon les mêmes principes que contre les ravageurs du pommiers (Markó et al., 2008) ou le puceron vert du pêcher (Garcin, 2009). A priori l'argile n'aurait pas d'impact négatif sur la photosynthèse et limiterait les pertes d'eau en cas de forte chaleur (source : EcophytoPIC, fiche technique 13). Cependant, jusqu'à présent, ni les huiles essentielles ni l'argile n'ont montré une efficacité suffisante contre *E. amygdali*, et aucun protocole fixe n'est proposé aux producteurs. Bien que l'utilisation de filets semble être une solution efficace, leur coût élevé et la complexité de leur installation rendent cette méthode difficilement applicable à grande échelle, mais elle peut être envisagée pour des petits vergers. En France, deux insecticides sont autorisés pour la culture d'amandier : le Karate Zeon avec comme composé actif la lambda-cyhalothrine, un pyréthrianoïde, et le Spinosad composé de deux toxines (spinosyne A et D) sécrétées par la bactérie *Saccharopolyspora spinosa*. Ces deux insecticides sont des neurotoxiques à large spectre agissant par contact. Le Spinosad est autorisé en agriculture biologique par dérogation annuelle, en l'absence d'autres produits. Le Karate Zeon a une rémanence de 3 semaines et atteint près de 100% d'efficacité avec deux applications (Duval et Millan, 2010) tandis que le Spinosad aurait une rémanence de 7 jours et une efficacité moins avérée (Warlop, 2012). Toutefois, ces deux insecticides sont toxiques pour les pollinisateurs (comme les abeilles) et ne doivent pas être utilisés pendant les périodes de pollinisation (Biondi et al., 2012 ; Arthidoro de Castro et al., 2022). Ils peuvent également affecter le comportement d'autres arthropodes bénéfiques en réduisant, par exemple, l'oviposition et la recherche d'hôtes des parasitoïdes qui contribuent à la protection des plantes (Desneux et al., 2003). Devant la faiblesse des solutions de contrôle et l'impact fort sur l'environnement des rares solutions chimiques existantes, il est impératif de trouver des méthodes de lutte biologique spécifiques pour faire face à *E. amygdali*.

Les rares études menées sur le genre *Eurytoma* se sont principalement focalisées sur la détection des phéromones sexuelles femelles par les mâles, notamment pour *E. maslovskii*, un ravageur de *P. mume* (Yang et al., 2020). Cependant, cette stratégie ne semble pas être la plus pertinente pour *E. amygdali* pour trouver une alternative à court terme, compte tenu de sa biologie et de l'implantation des amandiers. En effet, les phéromones sexuelles femelles attirent les mâles. En piégeant les mâles, les femelles engendreraient des mâles par parthénogénèse, ainsi on

assisterait à une réduction de population, mais à long terme (sur plusieurs générations). De plus, les amandiers sauvages peuvent contribuer à une réintroduction des femelles. Ainsi, dans le passé, une phéromone sexuelle constituée de deux composés majeurs a été identifiée et testée dans des pièges en verger (Krokos et al., 2001). Les essais ont été infructueux et les recherches n'ont pas été poursuivies (Mazomenos et al., 2004).

En ce qui concerne les autres méthodes de biocontrôle, comme l'introduction de parasitoïdes, il n'existe pas d'espèce endémique en France. Au Moyen-Orient, *Adontomerus amygdali* est un parasitoïde naturellement présent, mais son introduction en France nécessiterait des études à long terme (Abdul-Rassoul et Mohammed, 2017). De plus, ce parasitoïde se nourrissant de la larve d'*E. amygdali*, l'impact sur les fruits reste présent, et l'intérêt de cette méthode ne permettrait pas une disparition totale de l'infestation d'*E. amygdali*.

Récemment, une étude a suggéré que certaines variétés pourraient être résistantes mais il s'agit de variétés dont le taux de chute physiologique des fruits est plus important, se traduisant par un taux d'infestation bas, mais aussi par une perte des récoltes (Taghizadeh et al., 2022). De plus cette supposée résistance pourrait être due à une phénologie plus tardive.

Encart 3 : Les moyens de lutte biologique basés sur l'utilisation de médiateurs chimiques

Les méthodes de lutte biologique se développent de plus en plus afin de réduire l'utilisation de pesticides pour limiter les effets néfastes sur la biodiversité et la santé, ainsi que l'apparition de résistance. Chaque méthode possède ses avantages et inconvénients (efficacité, coût, interactions et compétition multitrophiques, apparition de résistance, etc.). Il existe différentes techniques de biocontrôle telles que les **pratiques culturales** (Bajwa et Kogan, 2004), les **barrières physiques** (filets, Simon et al., 2014) ou la sélection de **variétés résistantes** (revue par Smith et Clément, 2012). Ici nous nous focaliserons sur l'utilisation de médiateurs chimiques, dont les principales utilisations sont :

- Le **push-pull**, qui consiste à mettre des plantes attractives autour des cultures, et des plantes répulsives au centre. Le push-pull est très étudié pour les cultures de maïs en Afrique (revue par Cook et al., 2007 ; Pickett et al., 2014).
- L'**attract-and-kill**, pour attirer l'insecte par une odeur et le piéger, souvent avec une colle à insecte dans le cas des pièges à diffusion (Navarro-Llopis et al., 2012 ; Gregg et al., 2018).
- La **confusion sexuelle**, pour perturber l'accouplement en diffusant des phéromones sexuelles femelles. Il existe plusieurs formes de confusion : le camouflage (diffusion de phéromones en quantités importantes), la fausse piste (perte de temps et d'énergie des mâles à suivre une fausse piste), le déséquilibre sensoriel (diffuser un des composés de la phéromone en grande quantité) et la désensibilisation (exposition constante aux phéromones), (Shorey et Gerber, 1996 ; Trematerra et al., 2013).
- L'**utilisation d'ennemis naturels (prédateurs, parasitoïdes, parasites ou pathogènes)** qui permettent de protéger les plantes des herbivores. Par exemple en diffusant des HIPV, les ennemis naturels seront attirés (Ye et al., 2018 ; Zhou et Jander ; 2022). Une autre possibilité est de réaliser des lâchers d'auxiliaires contrôlés (Cakmak et al., 2009 ; Zouba et Mahjoubi, 2010 ; Mansour et Biondi, 2021).
- Le **piégeage sexuel pour l'avertissement agricole** est utilisé pour suivre le vol d'insectes ravageurs, comme le Carpocapse des pommes, *Laspeyresia pomonella* (Touzeau, 1980), ou encore les Tordeuses des vignes (Thiéry, 2008). Cette pratique permet de suivre les niveaux de population de ravageurs pour ajuster l'utilisation de traitements phytosanitaires.

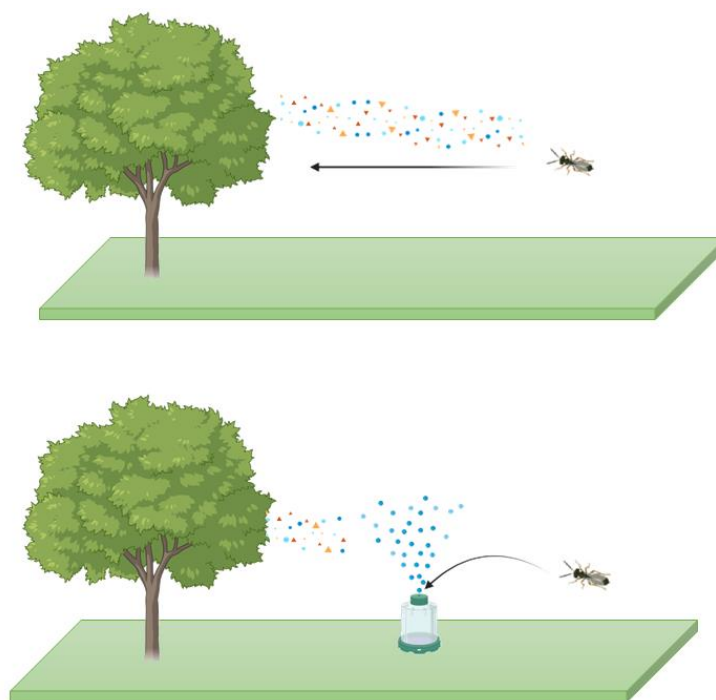


Figure 12 : Principe du dispositif de piégeage de type attract-and-kill pour limiter l’infestation des amandiers par *E. amygdali*. Le premier schéma représente l’attraction d’*E. amygdali* par les COVP d’amandiers en verger sans dispositif. Le second schéma représente l’attraction des guêpes dans les pièges à diffusion, compétitifs avec les odeurs d’amandiers. L’objectif est de disposer les pièges autour des vergers après en avoir retiré les amandes contaminées qui sont noires et restent accrochées sur l’arbres. Ainsi, les guêpes piégées proviendront uniquement des amandiers sauvages externes aux vergers (adapté de Gregg et al., 2018).

1.6.5 Objectifs et déroulement du projet

Mes travaux de thèse ont pour objectif principal d’identifier les COVP ayant une activité kairomonale des femelles *E. amygdali* afin de développer à long terme des pièges en verger de type attract-and-kill (Figure 12). Ce type de piège a démontré son efficacité sur d’autres ravageurs comme *Cearitis capitata*, la mouche des fruits, dans les vergers d’agrumes (Navarro-Llopis et al., 2012) ou *Halyomorpha halys*, la punaise diabolique, dans les vergers de pommiers (Morrison et al., 2018).

Dans le cas de Morrison et al., les pièges sont des plaques collantes de couleur jaune dont l’efficacité a été montrée

A ce jour, nos connaissances sur *E. amygdali* restent limitées en dehors de sa biologie. Pourtant, cette guêpe cause des dégâts en termes de production dans de nombreux pays du Moyen-Orient,

tels que la Turquie, la Grèce ou l'Iran, où l'utilisation de pesticides est prédominante au détriment des moyens de lutte biologique.

Selon nos connaissances actuelles, les femelles *E. amygdali* sont attirées à distance par les COVP émis par les amandiers (Kouloussis et Katsoyannos, 1994). Dans cette perspective, l'utilisation de pièges diffusant un mélange de ces composés attractifs apparaît comme la méthode la plus prometteuse pour contrôler l'infestation à court terme. Le stade phénologique des amandiers est primordial à considérer pour tenter d'identifier la présence de COVP qui pourraient être spécifiques et jouer un rôle central dans l'attraction. Cependant, dans un environnement naturel, de nombreux facteurs entrent en jeu et peuvent influencer la détection des COVP. Ainsi, la prise en compte des facteurs abiotiques s'avère essentielle pour obtenir une compréhension approfondie de la cinétique des émissions des COVP potentiellement impliqués dans l'attraction des femelles. Cette approche multidimensionnelle contribuera à affiner notre compréhension des mécanismes sous-jacents à l'attraction des femelles d'*E. amygdali*, ouvrant ainsi la voie à des stratégies de contrôle plus ciblées et efficaces.

Nos travaux se découpent en trois axes majeurs afin de répondre à notre objectif, mais également d'apporter de nouvelles connaissances sur nos modèles et d'enrichir la littérature existante. Les objectifs de la thèse sont les suivants :

1) A. Identifier et quantifier les COVP émis par les amandiers en conditions environnementales contrôlées, en fonction du stade phénologique et des organes.

Hypothèse : les émissions des *Prunus* étant faibles et majoritairement composées de terpènes (Winer et al., 1992), nous nous attendons à obtenir des résultats similaires et d'identifier des COVP qui n'auraient pas été obtenus auparavant. De plus, nous nous attendons à des émissions variables en fonction de la phénologie et de la source d'émission (fleur, fruit, feuille).

Approche expérimentale : le prélèvement des COVP issus des organes de l'amandiers se fait avec un dispositif de collecte d'effluves par des cartouches adsorbantes, désorbées par GC-MS, en parallèle des prélèvements par PTR-ToF-MS (Proton Transfer Reaction-Time of Flight-Masse Spectrometry).

B. Étudier l'influence de la luminosité et de la température sur les émissions de COV, en vue de mieux connaître la cinétique d'émission, et cibler les composés susceptibles d'attirer les femelles *E. amygdali*.

Hypothèse : nous supposons que les émissions d'amandiers varient quantitativement et qualitativement en fonction de la lumière et de la température de façon journalière.

Approche expérimentale : le même dispositif de collecte d'effluve est utilisé (1A) pour réaliser des gradients de température et de lumière sur les différents organes de l'amandier.

2) *Déterminer les COVP détectés de manière significative par les femelles.*

Hypothèse : nous nous attendons identifier un nombre restreint de COVP bien détectés, afin de limiter le nombre de ceux à tester en comportement.

Approche expérimentale : les composés identifiés lors de l'objectif 1 seront testés individuellement par électroantennographie (EAG).

3) *Identifier un mélange de COVP attractif dans des proportions optimales parmi les composés détectés.*

Hypothèse : les composés les mieux détectés sont les plus intéressants pour l'étude de comportement et les COVP sont plus attractifs en mélange, en raison d'effets de synergie entre les composés.

Approche expérimentale : l'attractivité des COVP seuls et en mélanges est testée à différentes doses dans des olfactomètres linéaires.

CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DES EMISSIONS DE COV D'AMANDIERS

Dans le cadre de ma thèse, l'identification et la quantification des COVP émis par les amandiers était la première étape clé pour élaborer un mélange attractif des femelles *E. amygdali*. Il convient de noter que les études portant sur les émissions d'amandiers sont rares et souvent difficiles à comparer. En effet, les dispositifs utilisés dans ces études ne permettent pas de quantifier précisément les émissions (Beck et al., 2008), ou ne mesurent pas des émissions mais des concentrations dans les organes (Nawade et al., 2019). C'est pourquoi nous avons développé un dispositif de collecte d'effluves afin de prélever les COVP émis par les fleurs, les feuilles et les fruits. Afin de caractériser le plus grand nombre de composés, nous avons combiné deux méthodes de prélèvement : l'utilisation de cartouches d'adsorbants et le PTR-ToF-MS. Dans un premier temps, les émissions ont été identifiées et quantifiées sur des arbres en pot avec les cartouches, en conditions environnementales contrôlées. Pour identifier et quantifier le plus de composés, et essayer de cibler les COVP émis lors des périodes d'activité des femelles *E. amygdali*, nous avons réalisé des gradients de température et de lumière. Dans un second temps, nous avons étudié les émissions issues d'amandes détachées de la branche avec un dispositif de collecte d'effluves adapté.

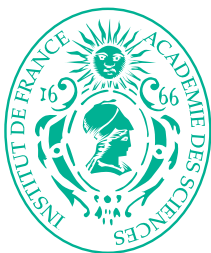
Toutes les expérimentations présentées dans ce chapitre ont été réalisées au CEFÉ, au Terrain Expérimental et à la Plateforme d'Analyses Chimiques en Ecologie (PACE) en collaboration avec Joris Huguenin pour l'utilisation du PTR-ToF-MS, et Nicolas Barthes et Bruno Buatois pour les données de GC-MS.

2.1 ARTICLE 1 : IDENTIFICATION, QUANTIFICATION ET DISCRIMINATION DES COV EMIS PAR LES AMANDIERS AU PRINTEMPS

Présentation de l'article publié dans les Comptes Rendus Chimie

L'objectif de cette étude est dans un premier temps d'identifier et de quantifier les COVP émis par les amandiers en fonction du stade phénologique. Les émissions de COVP varient en fonction des facteurs environnementaux tels que la température, la lumière et l'humidité ou peuvent être liées à un stress biotique ou abiotique (Vallat et al., 2002 ; Loreto et al., 2014). *E. amygdali* étant attirée en journée aux heures les plus chaudes et lumineuses, nous avons testé l'effet de la température et de la lumière sur les émissions de COVP par les amandiers. Nous avons également testé si la variété influence les émissions d'amandiers. Pour obtenir ces résultats, les mesures ont été réalisées sur des arbres en pot en conditions standards contrôlées (30°C, 750 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ PPFD). Les prélèvements ont été réalisés avec des cartouches Carbotrap-Tenax, désorbées thermiquement et analysées par GC-MS. Dans un deuxième temps, l'objectif est de tester la capacité de détection et le comportement des femelles *E. amygdali* aux COVP identifiés.

Nous avons ainsi identifié et quantifié 40 COVP émis par les amandiers et différencié ceux émis par les fleurs de ceux émis par les feuilles et les fruits. De plus, huit COVP ont été quantifiés mais non identifiés. Conformément à nos attentes, notre étude a révélé un effet significatif de la température sur les émissions de COVP, montrant qu'elles augmentent avec la température. Cependant, contrairement à la température, nous n'avons pas constaté d'effet significatif de la lumière sur les émissions de COVP. Etant donnée que la lumière impact les émissions de certains composés comme les terpènes, nous pouvions nous attendre à observer un effet de la lumière (Schuh et al., 1997 ; Kegge et al., 2013). Nous avons également mis en évidence un effet de la variété sur les émissions foliaires et florales. Des études ont montré que la variété impacte les émissions florales des fraises (Ceuppens et al., 2015), les émissions florales et foliaires des roses (Yuan et al., 2021), ou encore les émissions de GLV du coton (Loughrin et al., 1995). Cependant, nos observations n'ayant pas identifié au champ de variétés moins infestées par *E. amygdali*, nous avons choisi de nous affranchir de ce facteur.



INSTITUT DE FRANCE
Académie des sciences

Comptes Rendus

Chimie

Anjélica Leconte, Nicolas Barthes, Bruno Buatois, Eugénie Coutagne, Henri Duval, Philippe Lucas and Michael Staudt

Volatile organic compound emissions from almond shoots during spring—dissociation between reproductive and vegetative organs

Published online: 22 August 2023

<https://doi.org/10.5802/crchim.241>

Part of Special Issue: Chemical Ecology – Chemical Mediation in the Environment

Guest editors: Anne-Geneviève Bagnères (Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE), Montpellier, France) and Olivier Thomas (University of Galway, Ireland)



This article is licensed under the
CREATIVE COMMONS ATTRIBUTION 4.0 INTERNATIONAL LICENSE.
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Les Comptes Rendus. Chimie sont membres du
Centre Mersenne pour l'édition scientifique ouverte
www.centre-mersenne.org
e-ISSN : 1878-1543



Chemical Ecology – Chemical Mediation in the Environment

Volatile organic compound emissions from almond shoots during spring—dissociation between reproductive and vegetative organs

Anjélica Leconte^{®*, a}, Nicolas Barthes^{® a}, Bruno Buatois^{® a}, Eugénie Coutagne^b, Henri Duval^{® c}, Philippe Lucas^{® d} and Michael Staudt^{® a}

^a CEFE, CNRS, Univ Montpellier, EPHE, IRD, Montpellier, France

^b Compagnie des amandes, Aix-en-Provence, France

^c GAFL, INRAE, Montfavet, France

^d iEES Paris, INRAE, Sorbonne Université, CNRS, UPEC, IRD, Université P7, Paris, France

E-mails: anjelica.leconte@gmail.com (A. Leconte), nicolas.barthes@cefe.cnrs.fr

(N. Barthes), bruno.buatois@cefe.cnrs.fr (B. Buatois),

ec@compagniedesamandes.com (E. Coutagne), henri.duval@inrae.fr (H. Duval),

philippe.lucas@inrae.fr (P. Lucas), michael.staudt@cefe.cnrs.fr (M. Staudt)

Abstract. *Prunus dulcis*, a fruit tree of global economic and nutritional importance, is infested by *Eurytoma amygdali*, the almond wasp, due to the lack of biocontrol measures. This study characterizes the volatile organic compounds (VOCs) emitted by almond trees. We identified and quantified by GC-MS 44 VOCs emitted during spring. VOCs emitted during flowering were benzaldehyde and 1,4-dimethoxybenzene, while VOCs emitted during fruit and leaf growth were mainly sesquiterpenes. Emissions increased with temperature but light did not affect short-term emissions. VOCs identified in this study could be used to develop a biocontrol method to prevent infestation.

Keywords. Volatile organic compounds, *Prunus dulcis*, *Eurytoma amygdali*, Biocontrol, GC-MS.

Funding. This work was funded by ANRT, and the Compagnie des Amandes with the support of LabEx CeMEB, an ANR “Investissements d’avenir” program (ANR-10-LABX04-01).

Published online: 22 August 2023

1. Introduction

The almond tree, *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb (Rosaceae), was already cultivated in Central Asia 5000 years ago [1], then spread to the Mediterranean basin [2], and later to other countries. The almond

tree is well adapted to the Mediterranean climate, and tolerant to drought and summer heat. Most of the almond trees have low chilling requirements, but there is a high variability for the blooming time ranging from February to March. About fifty varieties are grown worldwide, with a genetic base mainly founded on three cultivars, Tuono, Cristomorto, and Nonpareil [3]. In France, five varieties released from the INRAE breeding program are mainly cultivated:

* Corresponding author.

Lauranne, Mandaline, Ferragnès, Ferraduel, and Ferrastar [4].

The almond tree represents a global economic stake with an unshelled almond production of 4 million tons in 2021, for a total crop area of 2.3 million hectares (source: FAO) and 57% of current production comes from the United States of America. World production and harvested area have increased by 30% in 10 years. French almond consumption has increased and is continuing. In 2021, 47,111 tons of shelled almonds were imported by France, while only 1940 tons were produced locally, representing a cost of 238 million euros (source: French customs). The country is working towards developing a local and sustainable almond industry to reduce its dependence on imports.

The almond tree is susceptible to a range of diseases and pests, including those caused by fungi, bacteria, root-knot nematodes, and insects like *Eurytoma amygdali* End. (Hymenoptera: Eurytomidae). Due to a lack of effective control methods and the absence of biocontrol, *E. amygdali* is one of the most serious issues facing almond cultivation in France.

Native to the Middle East [5], *E. amygdali* appeared in France in the 1980s [6] and can cause more than 80% of crop losses [7]. This univoltine species has a well-described biology [5,8–10], with adults emerging and laying eggs in early spring (April) on developed fruits. The larva feeds on the kernel until the end of July and stays in the larval stage until January inside the shell with two diapause phases [11]. The pupation begins in February until March and the insect adult perforates the shell to emerge. Wasps have a diurnal rhythm and are active between 10 a.m. and 7 p.m. with the highest activity around 3 p.m. when temperature and light are most important [12].

Research has tested different ways of developing biocontrol solutions in almonds (clay, essential oils, nets) in order to convert conventional agriculture. So far, there are no approved effective biocontrol methods. Attract-and-kill devices based on the dispersal of volatile organic compounds (VOCs) from plants may be a promising solution, as they have been successfully used to monitor and control other insect pests [13–15]. Indeed, Kouloussis and Katsoyannos [16] observed that flower and fruit emissions stimulate oviposition and aggregation in *E. amygdali* females. By investigating the volatile emissions during the flowering phase, we aim to uncover any

chemical cues that may be involved in attracting the wasps, even though they are not present at that time. However, the identity of the compounds responsible for this attraction remains unknown. In the literature, only a few studies have reported VOC emissions from almond trees, and not all of them present quantitative values in terms of emission rates [17–19]. Furthermore, the results of these studies may differ for many reasons, such as the use of different analytical and headspace techniques, the control and measurement of environmental factors, the stage and size of the measured organ, or the almond variety. Generally, almond tree and other *Prunus* species have been described as low VOC emitters releasing mainly terpenes (mono- and sesquiterpenes) along with some oxygenated low-molecular weight VOCs such as (*Z*)-hex-3-en-1-ol, methyl salicylate, nonanal or (*Z*)-hex-3-enyl acetate [17–22].

The objective of the present study was to characterize the composition and quantities of VOCs emitted by fruits, leaves and flowers of four varieties of almond trees during spring. We studied short-term and long-term emission variations in the laboratory under controlled conditions. The short-term study examined the temperature and light dependence of emissions to determine which VOCs are emitted during the diurnal activity of the wasp. The long-term emission variations were monitored at different stages of fruit and leaf development, to spot the key VOCs emitted during the first emergence of the wasps in the spring. These findings will enable further investigation into the detection of these VOCs by *E. amygdali* and the impact on their behavior. The goal is to identify an attractive mixture that can be utilized in trapping devices for effective pest control strategies.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Four varieties of almond trees (*Prunus dulcis*) were used in our study (Table 1) from February to June 2021. By including varieties with different precocity, we were able to extend the duration of plant material availability. The trees were grown in individual plastic pots of 45 L (40 cm diameter, 37 cm height) and were stored outside on the platform “Terrain Experimental” of the research center in Functional and Evolutionary Ecology in Montpellier, France (43°38′19.8″ N

Table 1. Varieties of *Prunus dulcis* used for VOC sampling under environmental controlled conditions

Origin	Planting year	Code	Variety name	Rootstock	Self-fertile	Earliness (1–9) ³
INRAE ¹	2014	R1004	Hybrid R1004	GF677	Yes	4
INRAE ¹	1998	R1568	Hybrid R1568	GF305	No	4
PHP ²	2018	R916	Lauranne	GF677	Yes	5
INRAE ¹	2020	R1569	Hybrid R1569	GF677	No	7

¹ INRAE Avignon, France. ² Pépinière Haute-Provence, France. ³ Earliness of the variety, ranked from earliest (1) to the latest variety (9).

3°51'43.4" E). On frost days, the pots were placed in a greenhouse at 20 °C. Trees were irrigated daily from June to August and weekly during the rest of the year. To ensure almond development, we manually pollinated flowers. For the self-fertile varieties, the pollen was not supplemented, and we used a brush to transfer pollen between flowers on the same tree. In the case of self-incompatible varieties, we used pollen from another hybrid variety provided by INRAE.

The phenological stages in our study were defined based on the development of almond tree organs, following the classification system established by Socias i Company *et al.* [23]. Our stages 1 to 5 correspond to their G to H stages. Stages 1 to 3 represent young almonds characterized by their smaller size, while stages 4 to 5 represent almonds that have reached their final size. The size varies among different varieties and the classification was adapted for each variety.

To ensure an adequate number of replicates for statistical analysis, we grouped these developmental stages of fruits and leaves into two categories. The first category, referred to as “young fruits,” includes stages 1 to 3. The second category, referred to as “mature fruits,” includes stages 4 and 5 (Supplementary Figure S1). By grouping the stages in this way, we aimed to ensure a sufficient sample size for robust statistical analysis.

2.2. VOC emissions measurement device

The terminal part of an intact twig with a length of about 15 cm was placed in a 125 mL FP double-walled glass thermostatic flask (75 mm outer diameter; Legallais, Montferrieux-sur-Lez, France) with a GL 14 cap and an inner tube (75 mm outer diameter), (Figure 1). Depending on the phenological

stage (flowering, young fruits and mature fruits), the twigs were composed of flowers alone or flowers with young leaves during the flowering period. During the growth period, the twigs were composed of fruits, fruits and leaves, or leaves alone. During our experiments, we employed two trees of each variety for all the samples in random order. While the trees were reused throughout the study, the branch utilized in each sample was never reused.

The airflow circulating in the system came from a bottle of Alphagaz 2 ultrapure air (Air Liquide, Paris, France) and was regulated by a mass flow controller (Vögtlin red-y GSC-B4KA-BB26, Muttenez, Switzerland). The air was humidified via a bypass holding a washing bottle (GL 45 central). The CO₂ mixing ratio of the air chamber was adjusted to 400 ± 100 ppm by injecting pure CO₂ via high-precision mass flow controllers (El-Flow Select, Bronkhorst France S.A.S., Montigny-lès-Cormeilles, France). The flow rate within the chamber was set to 300 mL·min⁻¹. A gas analyzer (LI-COR 840; Lincoln, NE, USA) was used to measure the outflows of CO₂ and H₂O.

A lamp (LX60 Heliospectra AB, Göteborg, Sweden) was used to control the light. The air temperature inside the chamber was measured by a thermocouple (Chrom-Constantan, OMEGA, Biel, Switzerland) connected to the temperature controller of the water bath to adjust the temperature.

VOCs were sampled through adsorbent cartridges filled with Carbotrap (40 mg, 20–40 mesh) and Tenax TA (80 mg, 20–35 mesh) at a flow rate of 100 mL·min⁻¹ for 30 min using a pump (Gillian GilAir Plus, Sensidyne LP, USA). Prior to sampling, the cartridges were conditioned for 30 min at 250 °C with an N₂ flow from 20 to 50 mL·min⁻¹.

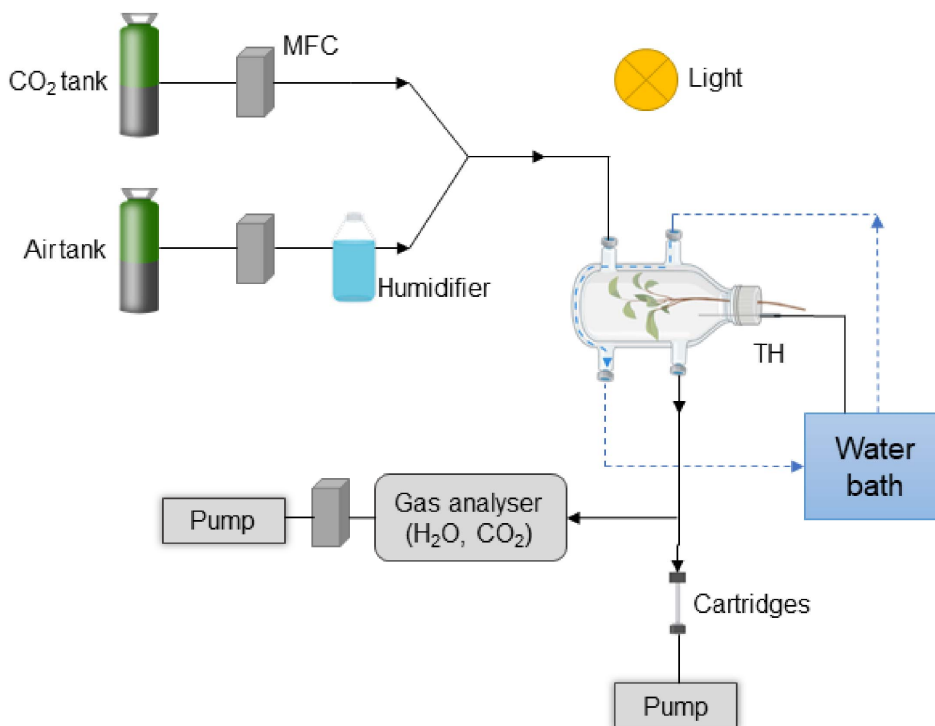


Figure 1. Chamber system used to collect almond tree VOCs. It is composed of an intact branch, circulation of ultrapure air and CO₂ (black arrow), and water in the double wall (dotted blue arrow). The temperature sensor (thermocouple; TH) in the chamber is connected to the water bath. MFC: Mass Flow Controller. The diagram was made with <https://www.Biorender.com>.

2.3. VOC analyses

2.3.1. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

We used a gas chromatograph (GC, Trace™ 1310, Thermo Scientific™ Milan, Italy) coupled to a mass spectrometer (ISQ™ QD Single Quadrupole, Thermo Scientific™ Milan, Italy) with an Optima 5-MS capillary column (30 m length, 0.25 mm Internal Diameter, 0.25 µm film thickness; Macherey-Nagel, Düren, Germany). The VOCs trapped on the cartridges were desorbed with a double-stage desorption system, composed of a Thermal Desorption Unit (TDU) and a Cold Injection System (CIS) (multi-purpose sampler, Gerstell, Mülheim, Germany). First, the cartridges were desorbed at a temperature of 250 °C in splitless mode on the CIS trap cooled at −80 °C by liquid nitrogen. Then, the CIS trap was heated to 250 °C with a 1:4 split ratio to inject the compounds in the column. Helium was used as carrier gas at a rate of

1 mL·min^{−1}. The oven temperature was held at 40 °C for 3 min, increased from 40 °C to 220 °C at a rate of 5 °C·min^{−1} and from 220 to 250 °C at 10 °C·min^{−1}, and finally held for 2 min. The temperature of the transfer line and the ion source of the mass spectrometer were 250 °C and 200 °C respectively. We acquired masses from 38 m/z to 350 m/z and the ionization energy was set to 70 eV.

2.3.2. GC-MS data processing

MZMine 2.53 software [24] was used to detect VOCs and obtain the area under the curve (AUC) from chromatograms. The parameters chosen to process chromatograms are listed in Supplementary Table S1. XCalibur™ software (Thermo Scientific™ Milan, Italy) was used to identify VOCs with NIST (2011) and Wiley (9th edition) databases. Retention indices (RI) were calculated from the retention times (RT) of a series of *n*-alkanes (alkane standard solution,

04070, Sigma Aldrich®) and compared with the literature (Adams, 2007).

AUCs were calibrated by means of standard solutions of benzaldehyde, DMNT, (Z)-hex-3-enyl acetate, limonene, methyl salicylate, and β -caryophyllene dissolved in methanol at three concentrations: 1, 10, and 100 ng· μ L⁻¹. One μ L of each solution was injected into the cartridges ($N = 3$), then placed for 5 min under an N₂ flow (Alphagaz 1, Air Liquide) and analyzed by GC-MS.

Each organ (stem, leaves, flowers, fruits) was scanned to calculate the emissions to obtain a total area projected with ImageJ software [25]. Concentrations were calculated from the AUC of each VOC, the calibration factor and the volume sampled.

The calculation of emissions corresponds to:

$$E_{\text{VOC}} = \frac{(C_{\text{VOC}} - C_{\text{blank}})}{S} \times F$$

with E_{VOC} : VOC emission in ng·m⁻²·s⁻¹; S : total projected area in m²; C_{VOC} and C_{blank} : VOC concentration in ng·m⁻³ in the chamber with almond tree and in the empty chamber; F : airflow in the chamber in m³·s⁻¹.

2.3.3. Protocol of testing temperature and light effects on emissions

In order to assess how emissions varied during day and night, the emission responses to temperature and light were investigated using the following protocol: six temperature levels were tested on the same branch, ranging from 15 to 40 °C in steps of 5 °C at a light intensity of 750 $\pm$ 50 μ mol·m⁻²·s⁻¹ photosynthetic photon flux density (PPFD). For each step, the plant was left to adapt for 30 min and then VOC emissions were collected for 30 min. The steps were performed in ascending or descending order. The effect of temperature on emissions was tested on three stages: flowering ($N = 10$), young fruits ($N = 5$), and mature fruits ($N = 11$) for three varieties: R1568, R1569, and R1004. The Lauranne variety could not be used in the temperature experiments due to technical constraints (tree disease requiring treatment).

The effect of light was studied at a temperature of 30 $\pm$ 0.2 °C by increasing or decreasing the incident light level on the same branch, by 0, 75, 250, 500, 1000, and 2000 μ mol·m⁻²·s⁻¹ PPFD only on mature fruit and leaves at stages 4 ($N = 8$) and 5 ($N = 5$). The varieties tested were Lauranne, R1568, R1569, and R1004.

2.3.4. Statistical analyses

Data processing was done with RStudio [26] with R 4.2.1 version. Mean comparisons between flowering and fruit growth stages were made with permutation Student's test or Fligner–Policello test for non-homogeneous variances. Two Redundant Discriminant Analysis (RDA, R package “RVAideMemoire”) were performed to study the effects of temperature and light on VOC emissions. In each RDA, variety, branch composition (flowers, fruits, leaves), phenological stage, and their interactions were tested. The effect of variables was tested by a pairwise factor fit with 999 permutations and a correction of p -values by a false discovery rate method. Before RDA analyses, raw data was transformed by adding a constant to 0.0001 to remove zeroes and a quadratic-root transformation [27].

3. Results

3.1. Volatile emissions of almond tree in spring

Under standard temperature and light conditions, 40 compounds were identified in almond tree emissions collected between February and May (Table 2). The trees' phenological stages were divided into two categories: “flowering” and “fruit and leaf growth”. Sesquiterpenes (SQTs) accounted for half of the VOCs emitted during both the flowering and growth stages. The average emissions from *Prunus dulcis* were low, with a mean value of 36.3 $\pm$ 9 ng·m⁻²·s⁻¹ ($N = 19$) during the development stages, but higher during the flowering amounting to 167.1 $\pm$ 64 ng·m⁻²·s⁻¹ ($N = 11$). Among the VOCs detected, nine compounds, including five SQTs and one monoterpene (MNT), could not be identified. Three compounds were exclusively detected during flowering, namely 1,4-dimethoxybenzene, unknown compound and unknown MNT, while 10 compounds were identified during the development stages.

These results suggest that the emissions of different classes of VOCs vary depending on the phenological stage of almond trees. Phenolic compounds, such as benzaldehyde and 1,4-dimethoxybenzene, two major compounds, were found to be more emitted during the flowering stage ($P = 0.006$, Table 1). For mean comparisons, DMNT and nonanal were grouped by their biosynthetic pathway (fatty acid), into a class called other VOC (OVOC). On the

Table 2. Mean emission rates $\pm$ standard errors of almond trees measured under standard conditions (30 °C at 750 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD) for 30 min, across four varieties, without distinguishing between fruit and leaf growth stages

Class ^e	VOC	Retention time (min)	Retention index		Database	Emissions ($\text{ng}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ^d	
			Calculated	Database		Flowering	Fruit/leaf growth stages
GLV	(<i>E</i>)-hex-3-en-1-ol	9.05	858	800	Adams	0	0.03 $\pm$ 0.02
MNT	α -Pinene	11.73	938	932	Adams	0.12 $\pm$ 0.04	0.02 $\pm$ 0.01
Phenolic	Benzaldehyde	12.1	939	935	NIST	48.3 $\pm$ 34.5	2.76 $\pm$ 2.48
GLV	(<i>E</i>)-hex-3-en-yl Acetate	13.92	1003	1004	Adams	0	0.2 $\pm$ 0.11
Phenolic	<i>p</i> -methyl Anisole	14.03	1007	1015	Adams	0	0.03 $\pm$ 0.02
Unknown	Unknown compound	15.31	1038			0.08 $\pm$ 0.06	0
MNT	(<i>E</i>)- β -Ocimene	15.35	1048	1044	Adams	0.38 $\pm$ 0.12	2.28 $\pm$ 0.64
MNT	Unknown MNT	16.01	1060			0.009 $\pm$ 0.008	0
MNT	Linalool	16.93	1097	1095	Adams	0	0.03 $\pm$ 0.01
Aldehyde	Nonanal	17.06	1096	1100	Adams	1.2 $\pm$ 0.45	2.91 $\pm$ 0.96
HT	DMNT ^a	17.69	1114	1115	PACE	0.95 $\pm$ 0.28	2.26 $\pm$ 0.49
Unknown	Unknown compound 1	18.08	1127			0	0.005 $\pm$ 0.005
Phenolic	1,4-dimethoxyBenzene	19.1	1161	1161	Adams	67.4 $\pm$ 50.6	0
Phenolic	Methyl Salicylate	20.09	1194	1190	Adams	0	0.06 $\pm$ 0.03
GLV	(<i>Z</i>)-hex-3-en-yl Valerate	22.13	1228	1243	NIST	0	0.003 $\pm$ 0.003
SQT	Unknown SQT 1	24.18	1345			0.13 $\pm$ 0.07	0.04 $\pm$ 0.01
SQT	α -Cubebene	24.58	1356	1345	Adams	0.1 $\pm$ 0.04	0.04 $\pm$ 0.02
SQT	Unknown SQT 2	24.71	1361			0.05 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.02
SQT	α -Copaene	25.32	1383	1374	Adams	0.5 $\pm$ 0.21	0.67 $\pm$ 0.21
SQT	β -Bourbonene	25.58	1393	1387	Adams	1.29 $\pm$ 0.6	4.42 $\pm$ 1.42
SQT	α -Bourbonene	25.64	1351	1384	NIST	0	0.35 $\pm$ 0.30
SQT	α -Gurjunene	26.24	1419	1409	Adams	0.09 $\pm$ 0.04	0.04 $\pm$ 0.02
SQT	(<i>E</i>)- β -Caryophyllene	26.5	1429	1417	Adams	1.68 $\pm$ 0.53	1.4 $\pm$ 0.33
SQT	β -Copaene	26.73	1438	1430	Adams	0.63 $\pm$ 0.29	0.74 $\pm$ 0.23
SQT	Unknown SQT 3	26.84	1446			0.32 $\pm$ 0.14	0.17 $\pm$ 0.09
MNT	(<i>E</i>)-geranyl Acetone	27.18	1456	1453	Adams	0.65 $\pm$ 0.5	0.63 $\pm$ 0.4
SQT	(<i>Z</i>)-Muurolo-3,5-diene	27.2	1393	1448	Adams	0	0.04 $\pm$ 0.01
SQT	(<i>E</i>)- α -Bergamotene ^b	27.23	1458	1430	Adams	0.71 $\pm$ 0.35	0.04 $\pm$ 0.04
SQT	α -Humulene	27.37	1464	1452	Adams	1.18 $\pm$ 0.36	0.84 $\pm$ 0.23
SQT	Allo-Aromadendrene	27.57	1472	1458	Adams	0.98 $\pm$ 0.38	0.6 $\pm$ 0.2
SQT	Unknown SQT 4	27.64	1475			0.007 $\pm$ 0.006	0.04 $\pm$ 0.02
SQT	(<i>E</i>)-muurolo-4(14),5-diene ^b	27.71	1476	1465	Adams	0.09 $\pm$ 0.04	0.03 $\pm$ 0.02
SQT	Unknown SQT 4B	27.84	1483			0.1 $\pm$ 0.09	0.09 $\pm$ 0.05
SQT	Germacrene D	28.04	1490	1484	Adams	36.2 $\pm$ 12.6	12.54 $\pm$ 5.41
SQT	BicycloGermacrene/ (<i>E,E</i>)- α -Farnesene ^c	28.45	1507	1500	Adams	2.89 $\pm$ 0.98	2.43 $\pm$ 0.76
SQT	δ -Cadinene	28.79	1526	1513	Adams	0.36 $\pm$ 0.17	0.13 $\pm$ 0.05
SQT	γ -Cadinene	29	1536	1522	Adams	0.53 $\pm$ 0.21	0.23 $\pm$ 0.08
SQT	α -Cadinene	29.38	1553	1537	Adams	0.19 $\pm$ 0.1	0.06 $\pm$ 0.03
Phenolic	(<i>E</i>)-hex-3-en-yl Benzoate	29.95	1578	1565	Adams	0	0.08 $\pm$ 0.03
Unknown	Unknown compound 2	30.15	1586			0	0.009 $\pm$ 0.007

^a (*E*)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene. ^b Tentative identification of *Z* or *E* isomers. ^c Tentative identification. ^d Mean $\pm$ SE. ^e MNT: monoterpene, SQT: sesquiterpene, HT: homoterpene, Phenolic: phenolic compounds, GLV: green leaf volatile.

other hand, OVOC, MNTs, and green leaf volatiles (GLVs) were more emitted during the development of fruits and leaves (Figure 2). However, the difference between these classes was only significant for OVOC ($P = 0.03$). There was no significant difference in emissions between flowering and growth stages for SQTs and unknown compounds ($P > 0.1$).

SQTs were identified as the second most prevalent class of compounds emitted during flowering, comprising $53.4 \pm 17.2 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ out of total emission of $180.8 \pm 63.1 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, or approximately 30% of total emissions (Figure 2). During fruit and leaf growth, SQTs were the primary class of emitted VOCs, accounting for $25 \pm 8.6 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ out of total emission of $36.3 \pm 9 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, or approximately 70%. Germacrene D was found to be the most abundant SQT emitted by almond trees across all phenological stages. The bicycloGermacrene/(*E,E*)- α -farnesene was another major compound found at both flowering and growth stages. Additionally, (*E*)- β -caryophyllene was identified as the second most abundant compound during fruit and leaf growth (Figure 3). During the flowering stage, two unidentified compounds along with α -gurjunene were detected as minor SQT. As for the developmental stages, (*E*)-muurola-4(14),5-diene, α -gurjunene, and one unidentified compound were identified as minor VOCs.

3.2. Impact of temperature and light on VOC emissions

We analyzed the effects of light and temperature on VOC emissions. In the course of this experiment, we identified four new compounds in addition to the 40 compounds identified under standard conditions (Table 2). Three compounds were identified during the first sampling of temperature or light gradients in mature fruit and leaf. Among these three VOCs, (*Z*)-hex-3-en-1-ol was the most abundant VOC emitted, with an average of $3.54 \pm 1.34 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. (*Z*)-hex-3-en-yl butanoate and (*Z*)-hex-3-en-yl-2-methyl-butanoate were also detected, with emissions of 0.71 ± 0.19 and $0.29 \pm 0.12 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectively. Additionally, an unidentified SQT was emitted in trace amounts by R1568 flowers between 15 and 30 °C, and at 0.14 and 0.2 $\text{ng}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at 35 and 40 °C (Supplementary Figure S2).

3.2.1. RDA analysis for the temperature model

The RDA model accounted for 57% of the constrained variance, with the first two components of the RDA analysis explaining 81% of this variance. As a result, these two components were deemed sufficient to explain the model. Figure 4 displays a score plot of RDA analysis for differentiating between temperatures. The results of the effect of vegetative and reproductive parts of the twig and the variety are shown in Supplementary Figure S3.

The first RDA analysis demonstrated that temperature had a significant effect on VOC emissions, with a cluster at 15 °C; 20–25 °C; 30–35 °C and 40 °C. The analysis revealed a significant effect of temperature on the quantities of VOC emitted, but this effect was observed only when there was a temperature difference of 10 °C or more between samples (Table 3, Supplementary Table S3). The analysis also identified two significant interactions, including a Temperature $\times$ Phenology interaction indicating that the temperature effect depended on the phenological stage (Table 3, Figure 5). VOC emissions increased with temperature for all classes during fruit and leaf development, except for phenolic compounds, which remained stable and were emitted only in low quantity between 0.13 ± 0.08 and $1.88 \pm 1.42 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figure 4, Supplementary Figure S4). Notably, GLVs were absent during the flowering stage and were present in greater quantity at 15 °C or 40 °C during the first sampling. Moreover, with the exception of GLVs, emissions were very low at 15 °C.

Regarding other factors, there was no difference in volatile emissions between twigs bearing only flowers and those with both flowers and young leaves. However, there was a significant difference in emissions between twigs with flowers and those with fruits and leaves ($P = 0.01$), regardless of the development stage. Furthermore, pairwise tests highlighted a difference between young and mature fruits and leaves ($P = 0.01$).

The model was conducted on three varieties with different precocity, with two trees per variety: R1568 ($N = 12$), R1569 ($N = 7$), and R1004 ($N = 8$). We found a significant difference between R1004 and R1568 ($P = 0.003$, Supplementary Figure S3 and Table S2). The analysis of individual VOC compounds did not reveal any significant differences among the varieties. However, when considering the overall emis-

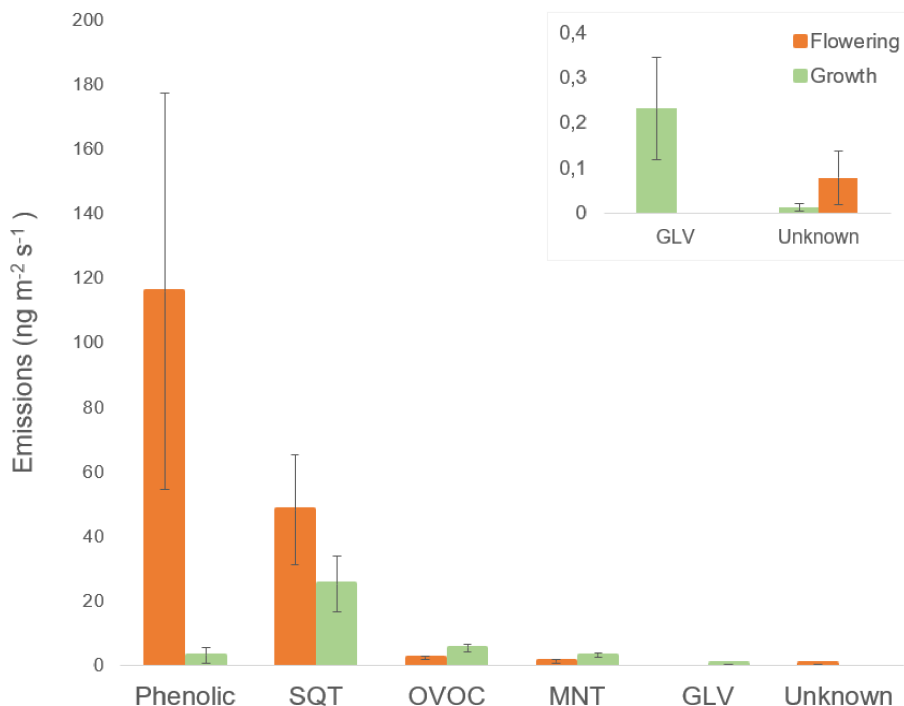


Figure 2. VOC class comparisons between flowering ($N = 11$) and fruit and leaf development ($N = 31$). Emissions (in $\text{ng} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) were measured in standard controlled conditions at 30°C and $750 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD. Fruit and leaf development was grouped without differences in stages. Data are presented as mean $\pm$ standard errors. SQT: sesquiterpenes, OVOC: other VOC, MNT: monoterpenes and GLV: green leaf volatiles.

sions per class, variations were observed (Figure 6). The R1004 variety exhibited higher emissions of phenolics compounds and MNTs compared to R1568 and R1569, and similar emissions of SQTs compared to R1568. Both R1004 and R1568 varieties had significantly higher emissions compared to R1569. No significant differences were observed for OCOVs. The R1569 variety displayed the highest emissions GLVs among the three varieties. Additionally, the second significant interaction Phenology $\times$ Variety, indicated that the chemical profile was variable according to the varieties between flowering and the fruit and leaf growth.

By examining both the score plots and the correlation plot, we found that floral emissions were positively correlated with SQTs, (*E*)- α -bergamotene, and 1,4-dimethoxyBenzene, while no other cluster was observed. On the other hand, fruit and leaves were positively correlated with SQTs, which were the variables that best explained the model. Regarding

varieties, the odor profile of R1568 was primarily composed of SQTs and 1,4-dimethoxyBenzene, while no clear grouping was observed for R1004. GLVs were common to all three varieties. Overall, SQTs and 1,4-dimethoxyBenzene were the VOCs that best explained the model (Figure 4).

3.2.2. RDA analysis for the light model

The effect of light was evaluated in stage 4 ($N = 8$) and stage 5 ($N = 5$), where fruits with leaves or fruits and leaves separated were used. For the branch with only fruits, the leaves were not removed beforehand. The varieties tested were Lauranne ($N = 2$), R1568 ($N = 2$), R1569 ($N = 4$), and R1004 ($N = 4$). The proportion of constrained variance explained by the model was 62% with 78% of this variance explained by the first four dimensions. The light had no significant effect on VOC emissions, but there were significant effects of phenology, variety, and branch composition, as well as a significant interaction between

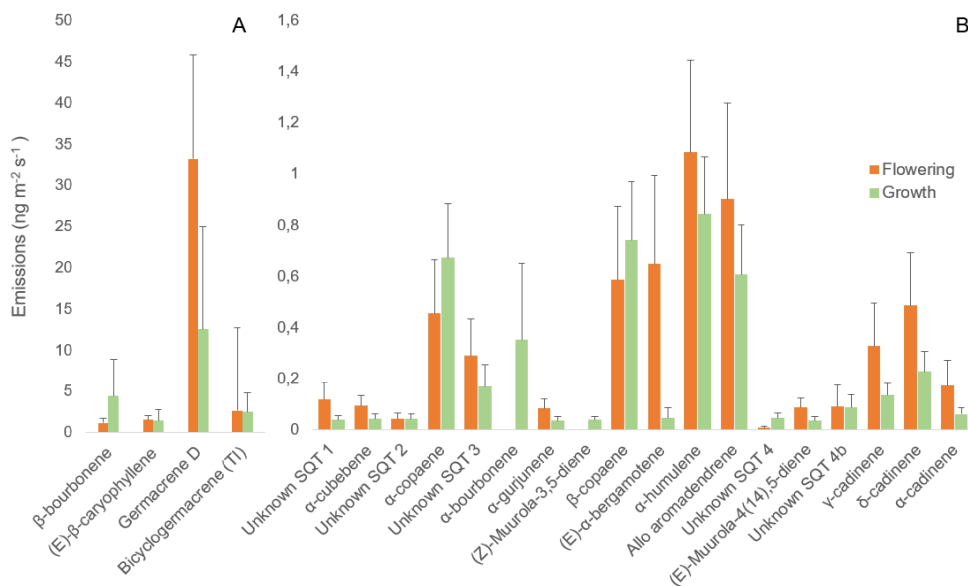


Figure 3. Average SQT emissions from almond twigs at the flowering stage ($N = 11$) and the fruit and leaf growth stage ($N = 31$) under standard controlled conditions. (A) Major SQT and (B) minor SQT. Data are presented as mean + standard errors. The compounds are ranked in ascending order of retention time. Bicyclogermacrene (TI) is bicyclogermacrene or (*E,E*)- α -farnesene.

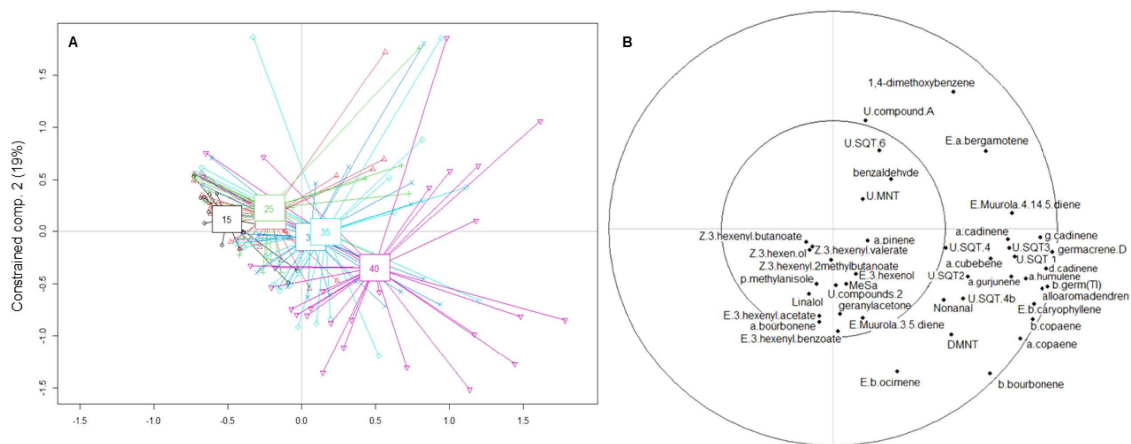


Figure 4. Score plot and correlation plot of the first two constrained components from RDA analysis for the temperature effect on VOC emissions. The factor shown is the temperature in correlation with VOCs. The constrained variance was explained at 62% by component 1 and at 19% by component 2. The composition of the measured twigs, the varieties and the phenological stages are in Supplemental S3.

phenology and variety (Table 3). This interaction indicated that the chemical profile varied among varieties at different stages of fruit and leaf growth. Each variety had a distinct odor profile, and emissions from fruits with leaves differed from those

from separated fruits or leaves (Figure 7, Supplementary Table S3). While emissions varied with the phenological stage, there was no difference in profile odor between stages 4 and 5 ($P = 0.14$). SQTs and GLVs played a role in explaining the emission pattern

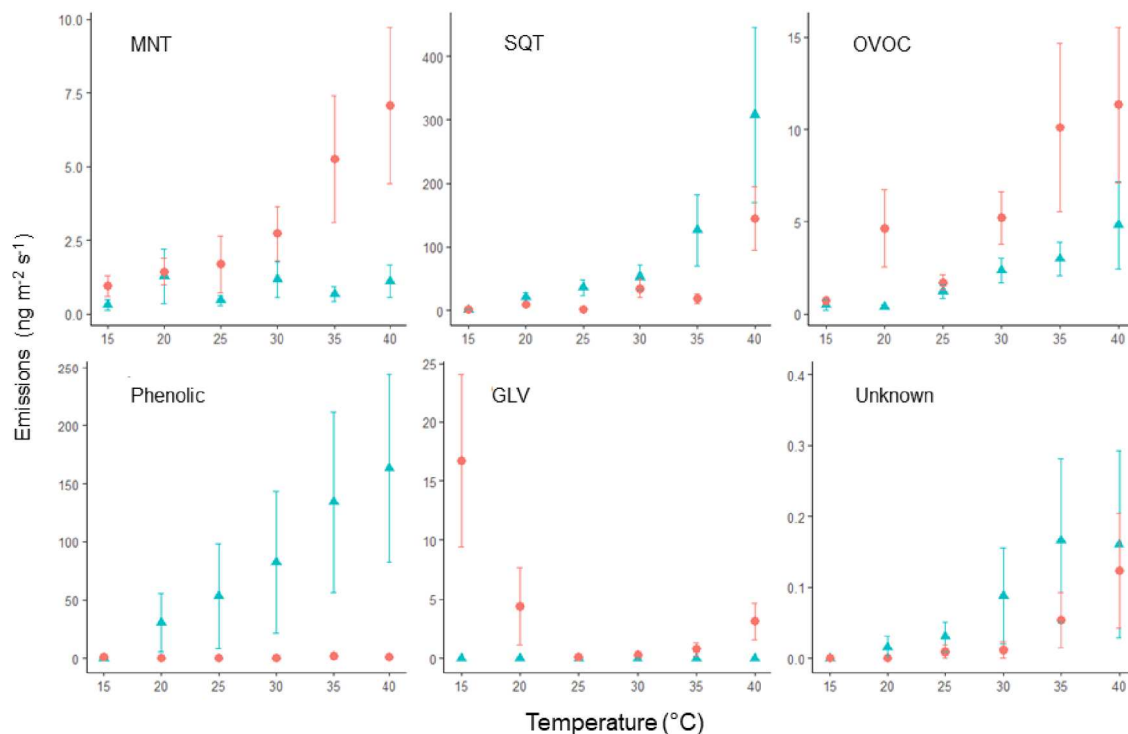


Figure 5. Effect of temperature on VOC emissions according to the phenological stage (triangle: flowering, circle: fruit and leaf growth). Emissions were summed by class for each sample and averaged by temperature level. Error bars are standard errors.

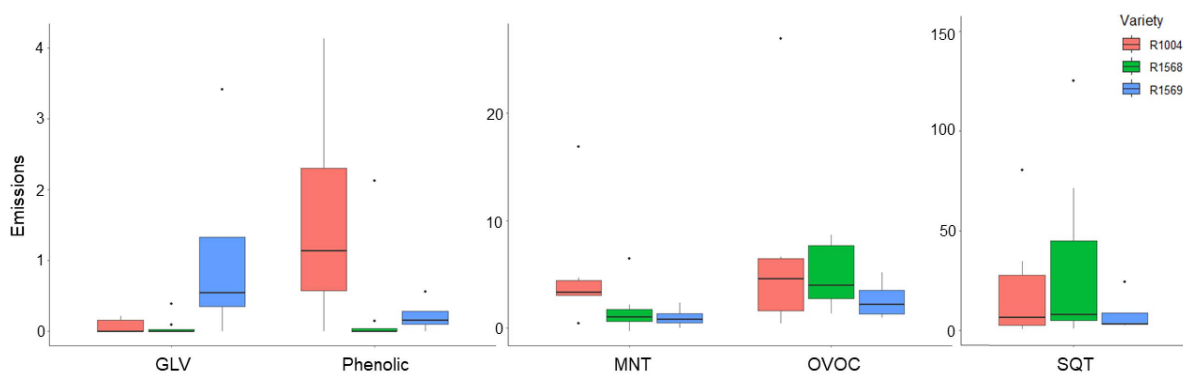


Figure 6. VOC emissions summed by class and averaged by variety (ng·m⁻²·s⁻¹). Three varieties were measured in the temperature experiments: R1004, R1568 and R1569. The emissions presented here are those at 30 °C but the pattern is similar for each temperature level. VOC emissions were averaged for fruit and leaf growth stages. SQT: sesquiterpenes, OVOC: other VOC, MNT: monoterpenes and GLV: green leaf volatiles.

Table 3. Summary of the significant permutation *F*-test results for the two RDA models on VOC emissions and interactions between factors

Model	Variable ^a	<i>p</i> -value	Significance
Temperature effect	Temperature	0.001	* * *
	Phenology	0.001	* * *
	Branch composition	0.018	*
	Variety	0.001	* * *
	Temperature: phenology	0.011	*
	Phenology: variety	0.007	**
Light effect	Light	0.095	.
	Phenology	0.001	* * *
	Branch composition	0.001	* * *
	Variety	0.001	* * *
	Phenology: variety	0.001	* * *

^a Phenology was categorized into “flowering”, “young” or “mature” fruits and leaves for the temperature model, and into stage 4 and stage 5 for the fruit and leaf growth in the light effect model. The composition of branches was “flowers”, “flowers + leaves”, “fruits”, “leaves” or “fruits + leaves”.

and were correlated with emissions from R1569 and R1004 (Figures 7B and 8).

No significant effect of light was observed on VOC emissions. However, there was a significant effect of variety on these emissions (Figure 8). In the light experiments, R1004 and R1568 varieties were found to be the main emitters of MNTs, OVOCs and SQTs. On the other hand, the Lauranne variety exhibited lower emissions of VOCs overall, except for phenolic compounds.

4. Discussion

4.1. Overview of emissions from almond trees

To our knowledge, only a few studies have investigated VOC emissions from almond trees (Table 4). Because different analysis and headspace techniques, units, and almond varieties were used in each study, a direct comparison of the numerical values is not possible. Nevertheless, our and previous studies consistently show that *P. dulcis* is rather a significant emitter of SQTs than an emitter of MNTs [17–19].

Qualitatively, we find several common compounds between the studies, such as β -caryophyllene, α -humulene, β -(*E*)-ocimene, linalool

and (*E*)-hex-3-enyl acetate. These VOCs were also detected in our study but not in major amounts. Some VOCs were not detected in our study as perillene [19] or butyrolactone [18]. The study conducted by Nawade *et al.* [28] did not report on VOC emissions but examined the concentrations of VOCs found in crushed almond tree tissue. While it is not possible to directly compare this study to ours, we found that some of the VOCs we detected were similar to the composition of ground tissues (Table 4).

Minor VOCs may be as important as major VOCs in plant–insect interactions [29]. Our study allowed us to identify many VOCs emitted in small quantities, though not all. Moreover, low molecular weight VOCs may not have been retained by our adsorbent cartridges.

4.2. Seasonal variation of VOCs

The results highlight the variability in the composition and quantities of VOCs emitted during flowering and the growth of fruits and leaves, with stronger emissions from the flowers. However, there was no significant difference in VOC emissions between flowering shoots with or without leaves, which could be attributed to the relatively small size of leaves appearing towards the end of flowering. The floral

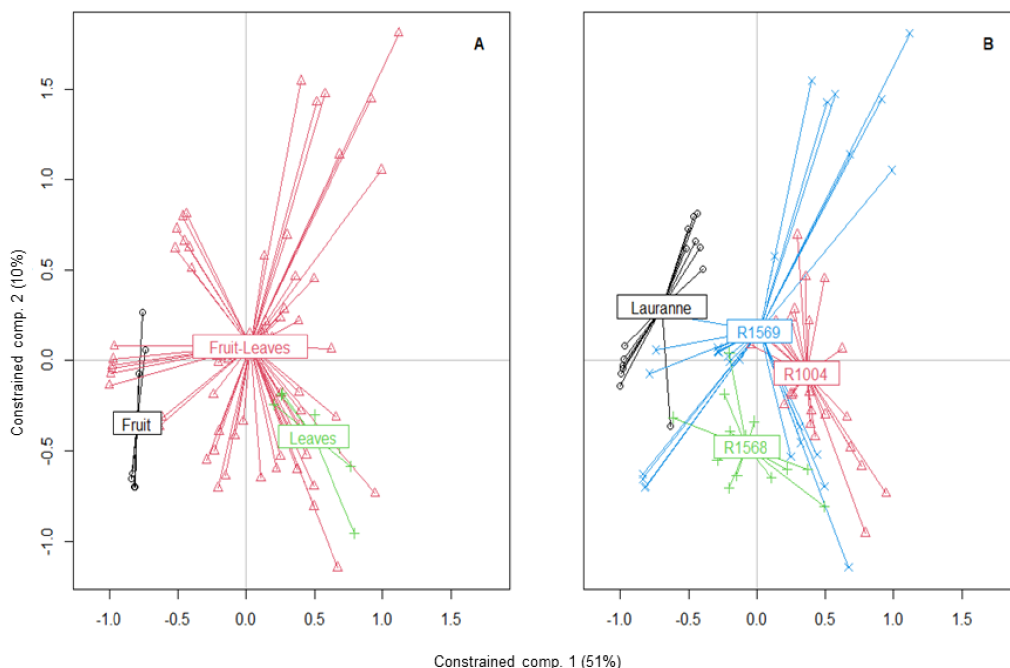


Figure 7. Score plots of the first two constrained components from RDA analysis for the light effect. The factors were the plant parts (A), and the varieties (B). The constrained variance was explained at 51% by component 1 and at 10% by component 2. The correlation plot of these components, and components 3 and 4 are in Supplementary Figure S5.

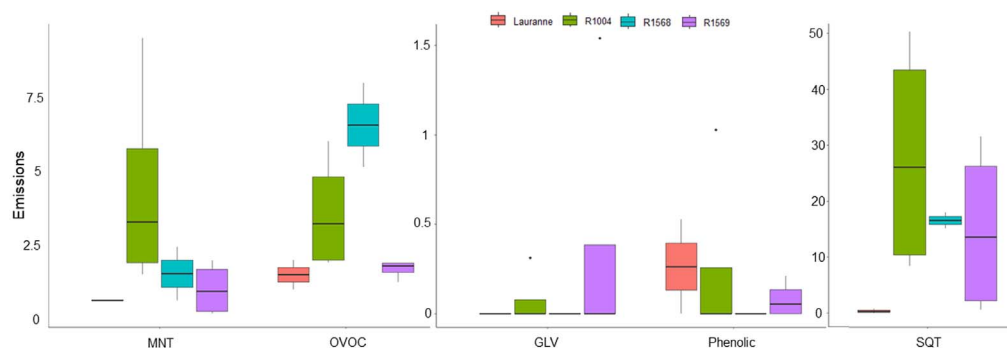


Figure 8. VOC emissions summed by class and averaged by variety (ng·m⁻²·s⁻¹). Four varieties were measured in the temperature experiments: Lauranne, R1004, R1568 and R1569. The emissions presented here are those at 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD but the pattern is similar for each light level. VOC emissions were averaged for fruit and leaf growth stages. SQT: sesquiterpenes, OVOC: other VOC, MNT: monoterpenes and GLV: green leaf volatiles.

profile of *P. dulcis* showed similarities with other *Prunus* species [30], particularly the presence of benzaldehyde, a floral compound commonly found in plants [31,32]. The other major VOCs of *P. dulcis*, 1,4-dimethoxybenzene and germacrene D, differed from

other *Prunus* species. Germacrene D was found in the Rosaceae family such as rose scents [33], and 1,4-dimethoxybenzene was not found in *Prunus* species but similar phenolic compounds existed in *P. persica* and *P. avium* [32]. However, 1-4-dimethoxybenzene

Table 4. Overview of major VOCs of *Prunus dulcis* reported in the previous and present study

Compound	Value	Unit ^b	Objective	Experimental	Reference
Benzaldehyde	2.8–48.3	ng·m ⁻² ·s ⁻¹	Spring emissions under environmentally controlled conditions	Dynamic headspace in a glass chamber Carbotrap/Tenax cartridges	Our study
1,4-dimethoxyBenzene	0–67.4				
Germacrene D	12.5–36.2				
bicycloGermacrene/ (<i>E,E</i>)- α -Farnesene	2.4–2.9				
(<i>Z</i>)-hex-3-en-yl Acetate ^a	<0.5–400	Relative peak area ($\times 10^6$)	Seasonal variation of emissions between March and August	Static headspace in Teflon bag SPME–GC–MS	Beck <i>et al.</i> [18]
Caryophyllene ^a	<0.5–150				
α -Humulene ^a	0.5–50				
Butyrolactone	0.5–50				
MNTs	<0.05	$\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ DW	Emissions from agricultural crops	Dynamic headspace in Teflon bag Adsorbent cartridges GC–MS/GC–FID	Winer <i>et al.</i> [17]
SQTs	No data				
Hex-3-en-1-ol + hex-3-en-yl Acetate	2.1				
MNTs	68 $\pm$ 51	ngC·gDM ⁻¹ ·h ⁻¹	Emissions from plant enclosures in a greenhouse in standard conditions	Dynamic headspace Tenax/Carbopack cartridges GC/MS–FID	Gentner <i>et al.</i> [19]
Oxygenated MNTs	150 $\pm$ 28				
SQTs	10,000 $\pm$ 3300				
Benzaldehyde ^a	573.8–1145.5	ng·g ⁻¹ FW	Concentration in crushed flowers	Fresh tissues crushed in liquid nitrogen SPME GC–MS	Nawade <i>et al.</i> [28]
(<i>E</i>)-2-Hexenal	62.06–414.14				
Hexanal	15.42–48.82				
1,4-dimethoxyBenzene ^a	2.02–205.9	ng·g ⁻¹ FW	Concentration in crushed young fruits		
<i>n</i> -Nonanal ^a	2.42–61.41				
<i>n</i> -Decanal	2.65–14.59				
<i>n</i> -Octanol	1–9.18				
Undecanal	0.75–7.52	ng·g ⁻¹ FW	Concentration in crushed leaves		
Eugenol	1.58–674.48				
Phenyl ethyl Alcohol	9.42–92.81				
Methyl Salicylate ^a	1.97–51.62				
Germacrene D ^a	1.55–37.26				

The table lists the ranges or mean values $\pm$ standard deviation of the major VOCs detected in each study. Note that the first four studies use different units for emission rates and that the last study [28] reports tissue concentrations instead of emissions.

^a Compounds found in our analyses. See Table 2. ^b FW: fresh weight, DW: dry weight, DM: dry matter, C: carbon.

is commonly found among major compounds emitted by the flowers of various *Salix* species and elicits a behavioral response in bees [34,35]. Consequently, the high 1,4-dimethoxyBenzene emission in flowers of almond trees is probably related to pollinator attraction.

Due to the small number of measurements on the fruits and leaves at stages 1 and 2, we grouped these two stages into a “young” stage, and stages 3 to 5 were

grouped in a “mature” stage. Our analysis of seasonal emission variations during fruit and leaf growth revealed a diverse range of VOCs, but the majority were SQTs in young and mature fruits and leaves. Our findings are consistent with those of Beck *et al.* [18], who investigated seasonal variations in VOC emissions from March to August. They found that GLVs, particularly (*Z*)-hex-3-enyl acetate, were present from mid-May to mid-July, which corresponds to the

period when the fruit is mature. However, we identified germacrene D as a major compound, although it was present in only small quantities in Beck *et al.*'s study.

There seem to be differences between leaf and fruit emissions, but more replicates are needed to identify these VOCs. Since it is difficult to have branches with only fruits, leaves could be removed several days before to avoid a burst of GLVs, but this might create a bias. By adapting the device to the size of an almond, it would enable targeted sampling of specific VOCs emitted by almonds. The longer accumulation time provided by the device would allow for a greater collection of low-level VOC emissions, facilitating more accurate identification of the specific compounds present in almonds.

4.3. Influence of temperature and light on emissions

As reported in numerous studies, plant VOC emissions are influenced by temperature [31,36]. To our knowledge, no study had shown the impact of temperature on VOC emissions from *P. dulcis*. Since wasps have a peak in activity in the middle of the day, VOCs emitted at higher temperatures should be more likely to attract wasps. Our study shows a positive correlation between emissions and temperature, with a continuous increase in emissions up to 40 °C. GLVs, such as (*Z*)-hex-3-en-1-ol, (*Z*)-hex-3-en-yl butanoate, and (*Z*)-hex-3-en-yl-2-methylbutanoate were detected during the most advanced stages of fruit and leaf growth. However, these VOCs were only present during the initial measurement and disappeared afterwards regardless of variations in temperature or light conditions. It is likely that these VOCs have been induced by mechanical stress during the branch positioning in the device and were not influenced by temperature, as discussed by Winer *et al.* [17].

Furthermore, a significant temperature effect was observed when the difference between the two samples was at least 10 °C. All the VOCs we detected were present within a temperature range of 15 to 40 °C, which made it impossible to select specific VOCs.

No study has investigated the impact of light on VOC emissions from *Prunus* species. Since wasps are active during the day, discriminating the VOCs

emitted according to the time of day would have allowed better targeting of the compounds to be tested. Yet, the apparent absence of a light effect did not allow us to exclude any VOCs on this criterion. Our study was however based on the short-term effect of light. The continuous monitoring of VOC emissions during the natural day/night courses could provide further insights into the environmental factors determining the dial emission rhythm.

The effect of light on emissions could not be assessed during the flowering stage due to the very short flowering time. Thus, four compounds were not found: an unknown compound, 1,4-dimethoxyBenzene, unknown SQT 6, and unknown MNT. (*E*)- α -bergamotene and linalool were only found in the temperature experiments during the flowering and fruit/leaf growth stages, but not in the light study. It is possible that these compounds were not emitted during the mature stage or were present in such small amounts to be detected. The same hypothesis applies to unknown compound 1, which was not detected in the temperature experiments.

4.4. Impact of variety on VOC emissions

Temperature and light effect models aimed to select VOCs to identify the simplest and most attractive volatile mixture of *E. amygdali*. Both models demonstrated a significant difference in odor profiles between varieties. In the light experiments, the Lauranne variety exhibited the lowest emissions of VOCs, except for phenolic compounds. This finding can be partially attributed to the fact that the Lauranne variety produced fewer leaves and fruits compared to the other varieties. In contrast, R1004 and R1568 were found to be the two varieties with the highest VOC emissions. To reduce the variability in emissions, conducting additional replicates per variety is recommended. Furthermore, in order to compare the different varieties, we initially hypothesized that the variations observed between the varieties would follow a similar pattern during plant growth. However, to further strengthen our findings and account for interactions between the variety and growth stage factors, it would be beneficial to increase the number of replicates for each stage and variety. However, the impact of variety on the chemical profile of almond trees did not allow the exclusion of VOCs since all varieties were parasitized by *E. amygdali*

during the spring, indicating that their behavior was not affected by varietal emission differences. However, given the abundance of almond varieties, further exploration of differences in VOC emission profiles may prove interesting. Although our experiences are not comparable, Nawade *et al.* [28] studied the effect of the variety on the compounds present in the tissues and the expression of the TPS genes responsible for the synthesis of terpenes. The tissue-derived compounds partially supported our identification of the effect of variety and phenology on VOC composition. The expression of TPS genes was found in each tissue and variety, but in varying quantities, which could explain the variations in chemical profiles. This variability could potentially impact the interactions between *P. dulcis* and *E. amygdali*, although no study has focused on the almond wasp to date.

5. Conclusion

In this study, 44 VOCs emitted by four varieties of almond trees were identified and quantified. VOC emissions were positively correlated with temperature, except for GLVs which are emitted under stressful conditions such as high temperature or rough handling [37]. Light conditions had no significant effect on emissions. We observed an effect of phenology on the VOC profile though sesquiterpenes-dominated emissions throughout the spring.

To our knowledge, our work is the first study that measured almond tree emissions under environmentally controlled and physiologically normal conditions and investigated their dependency on light and temperature. However, several parameters can influence emissions and create measurement uncertainties [37]. In our study, we only measured emissions from a limited section of the branch and not from the whole tree. Moreover, in our study emissions were measured on potted trees, which could be different from field-grown trees. Another aspect that we did not investigate was the effect of air and soil humidity on the emissions. Given the current climatic context, with more frequent drought episodes, it would be worthwhile to consider the impact of air and soil humidity on emissions as observed on other species [38–40]. Moreover, *E. amygdali* activity is negatively correlated with humidity [12] and

a context of drought would potentially favor infestation. Therefore, identifying emissions in this context could provide valuable insights. Although our results did not allow us to identify VOCs that likely do not attract the almond wasp, the chemical characterization of the 44 VOCs will enable us to conduct electroantennography tests to evaluate their detection by *E. amygdali*. This will help in the development of a biocontrol method for trapping the almond wasp in orchards.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgement

We wish to thank the CEFEX experimental field team for their involvement in our project.

Supplementary data

Supporting information for this article is available on the journal's website under <https://doi.org/10.5802/crchim.241> or from the author.

References

- [1] D. Velasco, J. Hough, M. Aradhya, J. Ross-Ibarra, *G3 Genes Genomics*, 2016, **6**, 3985–3993.
- [2] M. Delplancke, N. Alvarez, L. Benoit, A. Espíndola, H. I. Joly, S. Neuenschwander, N. Arrigo, *Mol. Ecol.*, 2013, **22**, 1092–1104.
- [3] F. Pérez de los Cobos, P. J. Martínez-García, A. Romero, X. Miranau, I. Eduardo, W. Howad, M. Mnejja, F. Dicenta, R. Socias i Company, M. J. Rubio-Cabetas, T. M. Gradziel, M. Wirthensohn, H. Duval, D. Holland, P. Arús, F. J. Vargas, I. Batlle, *Hortic. Res.*, 2021, **8**, article no. 11.
- [4] H. Duval, P. Froment, *Arboric. Fruit.*, 1998, **514**, 57–62.
- [5] H. N. Plaut, *Bull. Entomol. Res.*, 1971, **61**, 275–281.
- [6] Y. Arambourg, G. Fauvel, H. Chevin, *Protection du verger*, 1983, **358**, 27–28.
- [7] H. Duval, M. M. Millan, in *XIV GREMPA Meeting on Pistachios and Almonds* (G. Zakyntinos, ed.), CIHEAM / FAO / AUA / TEI Kalamatas / NAGREF, Zaragoza, 2010 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 94). 14. GREMPA Meeting on Pistachios and Almonds, 2008/03/30–2008/04/04, Athens (Greece). <http://om.ciheam.org/om/pdf/a94/00801302.pdf>, 175–180.
- [8] H. N. Plaut, *Bull. Entomol. Res.*, 1972, **61**, 681–687.
- [9] H. Plaut, F. Mansour, *Entomol. Exp. Appl.*, 1973, **16**, 415–421.

- [10] M. D. Zerova, V. N. Fursov, *Bull. Entomol. Res.*, 1991, **81**, 209-219.
- [11] J. T. Margaritopoulos, M. E. Tzanakakis, *Eur. J. Entomol.*, 2006, **103**, 733-742.
- [12] N. A. Kouloussis, B. I. Katsoyannos, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 1995, **88**, 547-553.
- [13] V. Navarro-Llopis, J. Primo, S. Vacas, *Pest Manage. Sci.*, 2013, **69**, 478-482.
- [14] W. R. Morrison, B. R. Blaauw, B. D. Short, A. L. Nielsen, J. C. Bergh, G. Krawczyk, Y. Park, B. Butler, A. Khirmian, T. C. Leskey, *Pest Manag. Sci.*, 2019, **75**, 104-114.
- [15] P. C. Gregg, A. P. Del Socorro, P. J. Landolt, *Annu. Rev. Entomol.*, 2018, **63**, 453-470.
- [16] N. A. Kouloussis, B. I. Katsoyannos, *Entomol. Exp. Appl.*, 1994, **73**, 211-220.
- [17] A. M. Winer, J. Arey, R. Atkinson, S. M. Aschmann, W. D. Long, C. L. Morrison, D. M. Olszyk, *Atmos. Environ.*, 1992, **26A**, 2647-2659.
- [18] J. J. Beck, G. B. Merrill, B. S. Higbee, D. M. Light, W. S. Gee, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 3749-3753.
- [19] D. R. Gentner, E. Ormeño, S. Fares, T. B. Ford, R. Weber, J.-H. Park, J. Brioude, W. M. Angevine, J. F. Karlik, A. H. Goldstein, *Atmos. Chem. Phys.*, 2014, **14**, 5393-5413.
- [20] M. Staudt, B. Jackson, H. El-Aouni, B. Buatois, J.-P. Lacroze, J.-L. Poessel, M.-H. Sauge, *Tree Physiol.*, 2010, **30**, 1320-1334.
- [21] V. Būda, S. Radžiūtė, V. Apšegaitė, L. Blažytė-Čereškienė, R. Čepulytė, G. Bumbulytė, R. Mozūraitis, *Insects*, 2022, **13**, article no. 114.
- [22] F. Rapparini, R. Baraldi, O. Facini, *Phytochemistry*, 2001, **57**, 681-687.
- [23] R. Socias i Company, M. José, J. M. Ansón, M. T. Espiau, *Botany, Production and Uses*, CABI, Boston, MA, 2017, 33-122 pages.
- [24] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, M. Orešič, *BMC Bioinform.*, 2010, **11**, article no. 395, PMID: 20650010.
- [25] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods*, 2012, **9**, 671-675.
- [26] RStudio Team, "RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA", 2020, <http://www.rstudio.com/>.
- [27] M. R. Hervé, F. Nicolè, K.-A. Lê Cao, *J. Chem. Ecol.*, 2018, **44**, 215-234.
- [28] B. Nawade, M. Yahyaa, H. Reuveny, L. Shaltiel-Harpaz, O. Eisenbach, A. Faigenboim, I. Bar-Yaakov, D. Holland, M. Ibdah, *Plant Sci.*, 2019, **287**, article no. 110187.
- [29] A. C. McCormick, J. Gershenzon, S. B. Unsicker, *Plant Cell Environ.*, 2014, **37**, 1836-1844.
- [30] C. Larcenaire, F. Wang, I. Holásková, R. Turcotte, M. Gutensohn, Y.-L. Park, *Plants*, 2021, **10**, article no. 2195.
- [31] M. Sagae, N. Oyama-Okubo, T. Ando, E. Marchesi, M. Nakayama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2008, **72**, 110-115.
- [32] A. M. El-Sayed, A. Sporle, K. Colhoun, J. Furlong, R. White, D. M. Suckling, *Chemoecology*, 2018, **28**, 39-49.
- [33] K. Hendel-Rahmanim, T. Masci, A. Vainstein, D. Weiss, *Planta*, 2007, **226**, 1491-1499.
- [34] U. Füssel, S. Dötterl, A. Jürgens, G. Aas, *J. Chem. Ecol.*, 2007, **33**, 749-765.
- [35] A. Jürgens, U. Glück, G. Aas, S. Dötterl, *Bot. J. Linn. Soc.*, 2014, **175**, 624-640.
- [36] Ü. Niinemets, R. K. Monson, A. Arneth, P. Ciccioli, J. Kesselmeier, U. Kuhn, S. M. Noe, J. Peñuelas, M. Staudt, *Biogeosciences*, 2010, **7**, 1809-1832.
- [37] Ü. Niinemets, U. Kuhn, P. C. Harley, M. Staudt, A. Arneth *et al.*, *Biogeosciences*, 2011, **8**, 2209-2246.
- [38] E. Bourtsoukidis, H. Kawaletz, D. Radacki, S. Schütz, H. Hakola, H. Hellén, S. Noe, I. Mölder, C. Ammer, B. Bonn, *Trees*, 2014, **28**, 193-204.
- [39] G. W. Schade, A. H. Goldstein, M. S. Lamanna, *Geophys. Res. Lett.*, 1999, **26**, 2187-2190.
- [40] L. Nunez, J. Plaza, R. Perez-Pastor, M. Pujadas, B. S. Gimeno *et al.*, *Atmos. Environ.*, 2002, **36**, 4441-4452.

Supplementary material: Volatile organic compound emissions from almond shoots during spring—dissociation between reproductive and vegetative organs

Anjélica Leconte^{®*, a}, Nicolas Barthes^{® a}, Bruno Buatois^{® a}, Eugénie Coutagne^b, Henri Duval^{® c}, Philippe Lucas^{® d} and Michael Staudt^{® a}

^a CEFE, CNRS, Univ Montpellier, EPHE, IRD, Montpellier, France

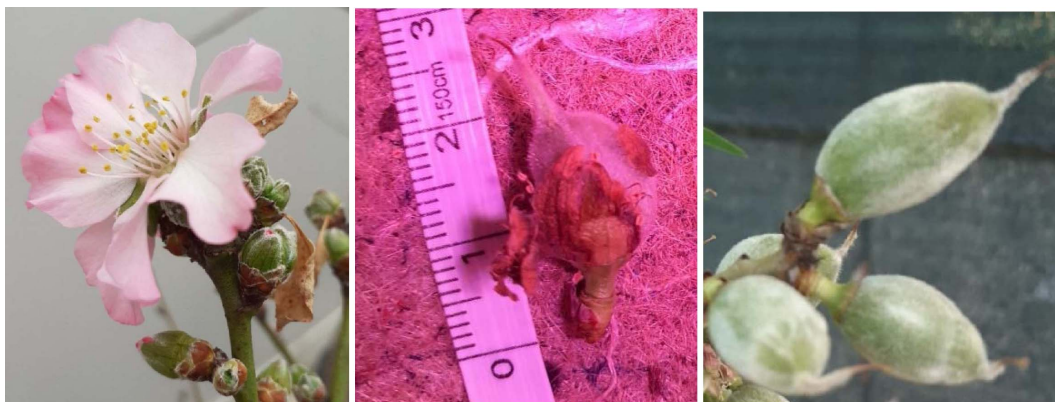
^b Compagnie des amandes, Aix-en-Provence, France

^c GAFL, INRAE, Montfavet, France

^d IEES Paris, INRAE, Sorbonne Université, CNRS, UPEC, IRD, Université P7, Paris, France

E-mails: anjelica.leconte@gmail.com (A. Leconte), nicolas.barthes@cefe.cnrs.fr (N. Barthes), bruno.buatois@cefe.cnrs.fr (B. Buatois), ec@compagniedesamandes.com (E. Coutagne), henri.duval@inrae.fr (H. Duval), philippe.lucas@inrae.fr (P. Lucas), michael.staudt@cefe.cnrs.fr (M. Staudt)

Not yet published



Supplementary Figure S1. Simplified phenological stages in our experiments, inspired by Socias i Company *et al.* (2017) for an almond tree: flowering (left), young (middle) and mature (right).

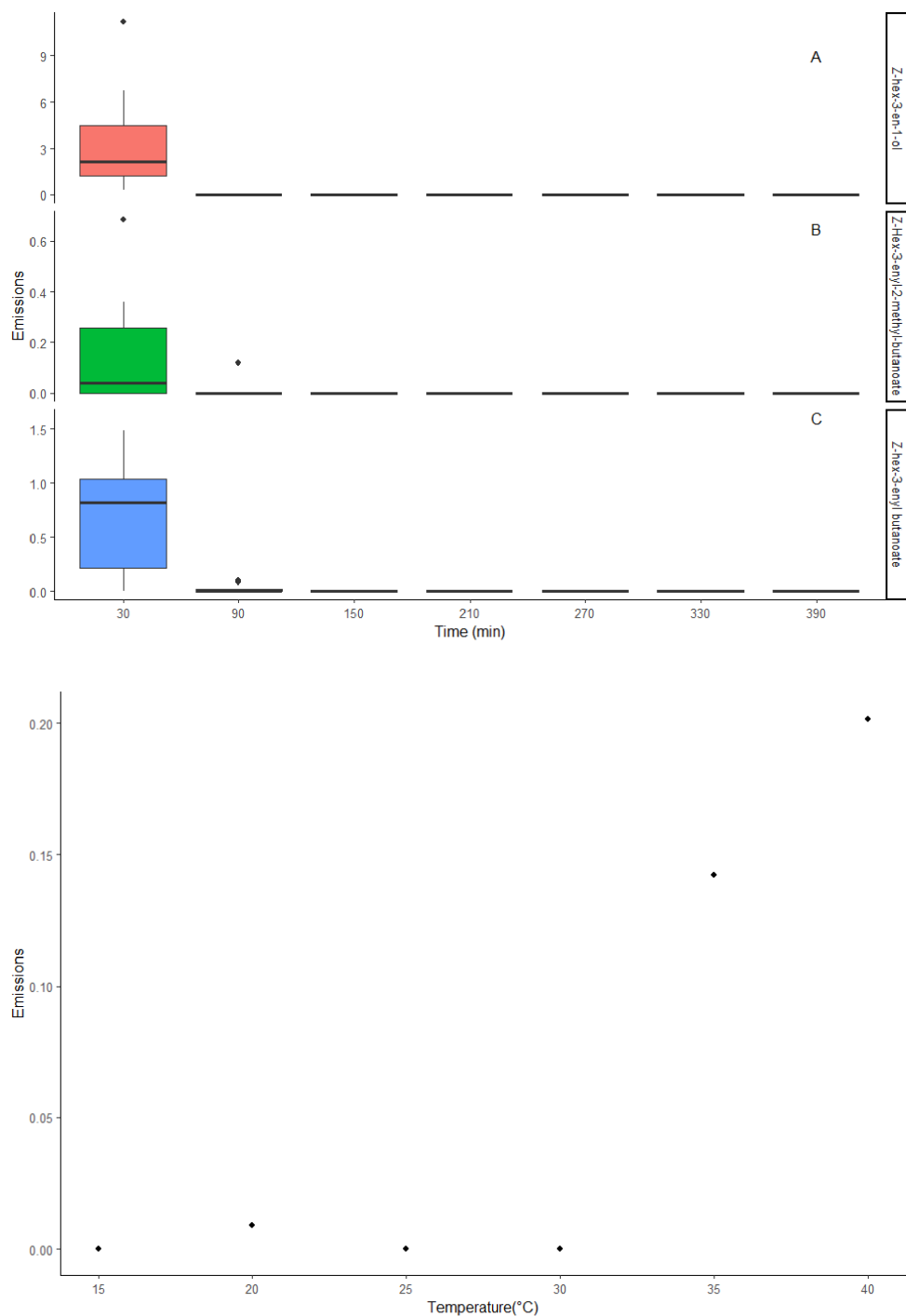
* Corresponding author.

Supplementary Table S1. Parameters chosen in MZMine software to process the chromatograms and obtain the area under the curve (AUC)

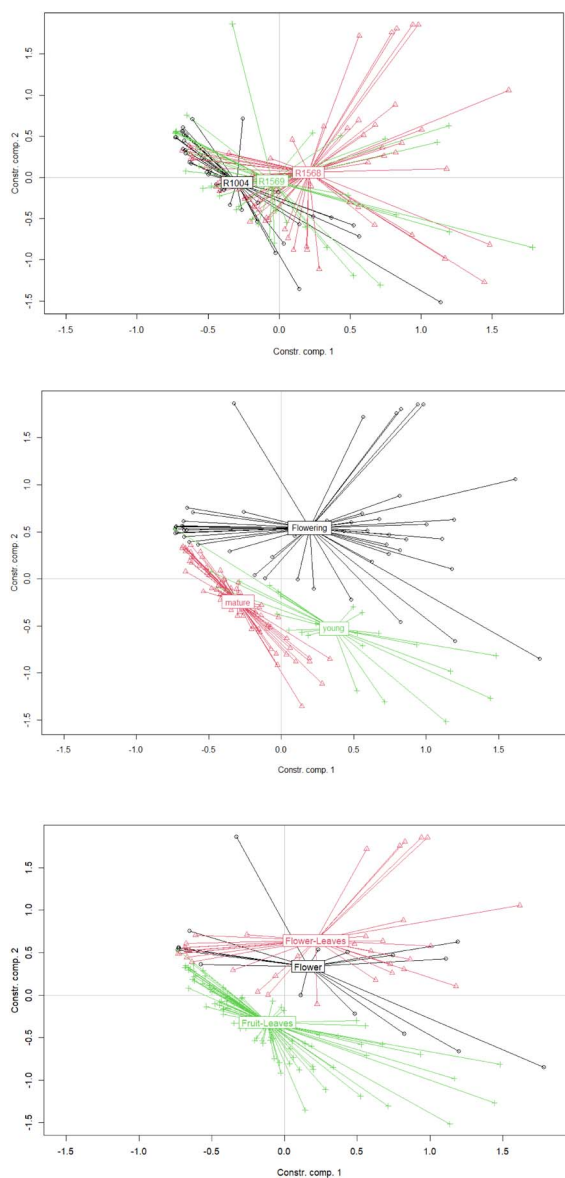
Parameter	Value
Scan-by-scan filtering	Round resampling filter
Crop filter	m/z 38–350
Baseline correction module	RollingBall baseline correction (wm = 100, ws = 12)
Mass detection parameters	Centroid; noise = 4×10^2
ADAP chromatogram builder	Min group size = 5; group intensity threshold = 10^2 ; min highest intensity = 3×10^2 ; m/z tolerance = 0.3 or 1000 ppm
ADAP Chromatogram deconvolution	S/N = 7; Wavelet Coeff. SN; min feature height = 200, coefficient = 50; peak duration range: 0.02–0.6; RT wavelet range = 0–0.05
MCR Spectral deconvolution parameter	Window = 0.2; RT tolerance = 0.15; min peaks = 1
ADAP aligner	Min confidence = 0.7; RT tolerance = 0.5 min; m/z tolerance = 0.001 or 5 ppm; m/z score threshold = 0.75; score weight = 0.1; RT difference (fast)

Supplementary Table S2. Pairwise comparisons between group levels with false discovery rate correction for the temperature model. Only factors with a significant effect on the model are presented

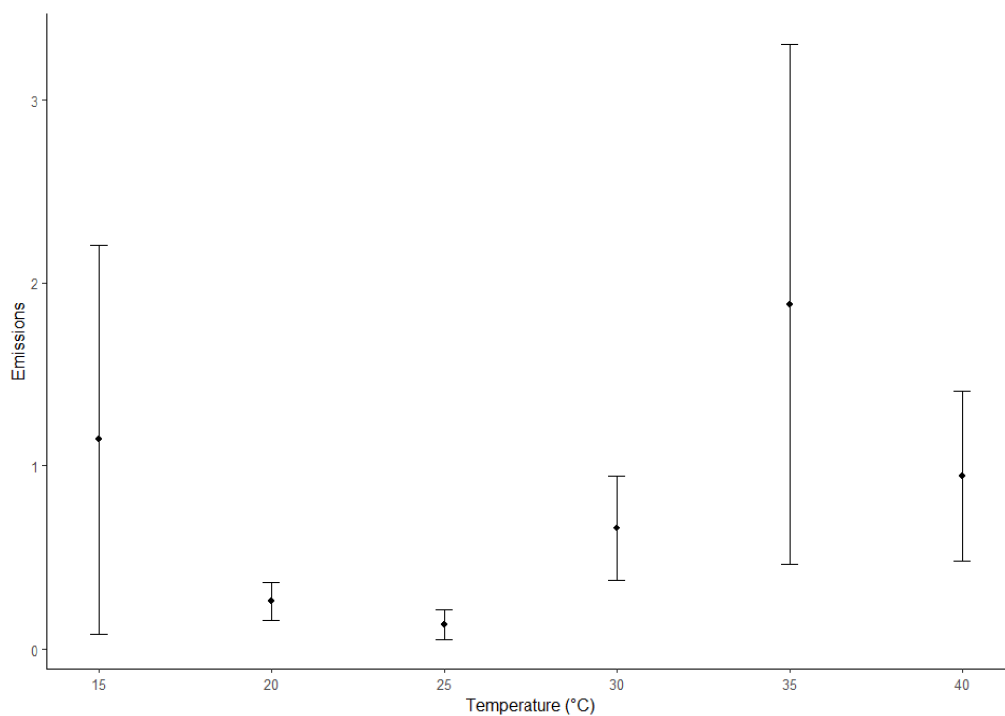
Variety	R1004		R1568		
R1568	0.003		-		
R1569	0.152		0.13		
Temperature	15	20	25	30	35
20	0.061	-	-	-	-
25	0.107	0.853	-	-	-
30	0.003	0.061	0.061	-	-
35	0.003	0.061	0.085	0.853	-
40	0.003	0.003	0.003	0.057	0.129
Branch composition	Flower		Flower-leaves		
Flower-leaves	0.267		-		
Fruit-leaves	0.0015		0.0015		
Phenology	Flowering		Mature		
Mature	0.001		-		
Young	0.001		0.001		



Supplementary Figure S2. (A) Green leaf volatiles emitted at the start of the experiment regardless of temperature and light effect. Emissions were given in ng·m⁻²·s⁻¹ depending on the time. One time step corresponds to 30 min of sampling. (B) Unknown SQT 6 emissions according to temperature.



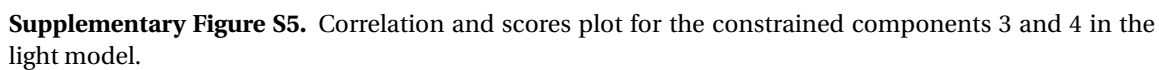
Supplementary Figure S3. Correlation and scores plot for the constrained components 1 and 2 in the temperature model. The profile of VOC emissions from top to bottom depends on varieties, phenological stage, and the composition of the measured branch.



Supplementary Figure S4. Phenolic compounds emissions according to the temperature with error bars (standard errors) for the fruit and leaf development. Emissions were summed by sample and averaged by class.

Supplementary Table S3. Pairwise test with a false discovery rate correction for the effect with a significant effect on the model. Variety and branch composition of VOC emissions are presented

Variety	Lauranne	R1004	R1568
R1004	0.002	-	-
R1568	0.002	0.002	-
R1569	0.009	0.032	0.02
Branch composition		Fruit	Fruit-Leaves
Fruit-leaves		0.0015	-
Leaves		0.0015	0.009



2.2 EMISSIONS DES AMANDES DETACHEES DU RAMEAU

Lors du développement des fruits et des feuilles, les feuilles représentent généralement la source principale des émissions de COVP (Guenther, 1997). Or chez les *Prunus*, ces émissions sont faibles (Winer et al., 1992 ; Gentner et al., 2014). Nos analyses précédentes n'ont pas permis de discriminer clairement les émissions provenant des feuilles de celles provenant des amandes. Cette absence de distinction peut probablement s'expliquer par le fait que les émissions provenant des amandes ont été masquées par celles des feuilles, c'est pourquoi nous avons modifié le dispositif de prélèvement afin d'isoler les amandes.

MATERIEL ET METHODE

Nous avons utilisé le même dispositif expérimental décrit dans l'article 1 en modifiant uniquement la chambre de mesure (Figure 13), afin de collecter les émissions de 100 amandes détachées du rameau, provenant d'amandiers sauvages du terrain expérimental au CEFE (Montpellier). Nous avons choisi d'utiliser des amandiers sauvages pour avoir assez de matériel végétal, étant donné que nos arbres en pot produisaient peu d'amandes, et que celles-ci étaient nécessaire pour les mesures d'émissions (Article 1). Cette expérimentation a été réalisée en condition statique (Figure 13B), contrairement au dispositif initial (Figure 13A) qui était utilisé en condition dynamique. Le système a été maintenu en circuit fermé pendant une heure afin de permettre l'accumulation des COVP, avec un ventilateur pour assurer l'homogénéisation de l'air. Pour prélever les COVP, le flux d'air de la chambre a été ouvert et les échantillons ont été collectés pendant 30 minutes à un débit de $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ avec des cartouches Carbotrap-Tenax. Les cartouches ont été désorbées thermiquement par GC-MS pour identifier et quantifier les COVP en suivant le protocole de l'article 1.

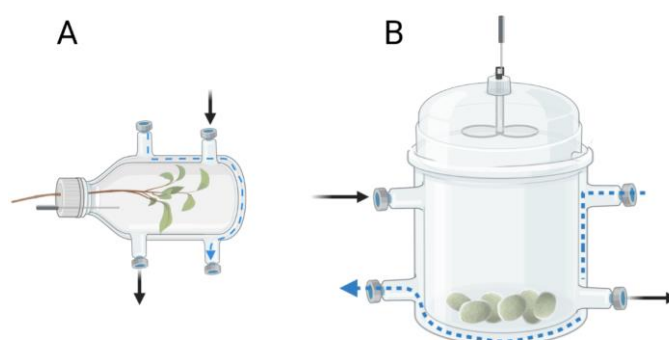


Figure 13 : Dispositifs de prélèvement de COVP d'amandier sur une branche intacte (A) et de 100 amandes détachées du rameau (B). Les deux dispositifs possèdent un thermocouple relié au bain marie pour réguler la température. Les flèches indiquent le sens de circulation de l'air (noir) et de l'eau (bleu pointillé).

Nous avons utilisé le même dispositif (Figure 13B) pour tester un rameau d'amandier sauvage coupé et placé dans l'eau afin de comparer les COVP émis par des amandes seules et par un rameau avec des feuilles et des fruits.

RESULTATS

Parmi les COVP émis par les amandes isolées du rameau (Figure 14), certains n'ont pas été identifiés dans les émissions des rameaux coupés ou des branches intactes, tels que : isopentyl alcool, methyl- et ethyl isovalerate, ethyl tiglate, 6-methyl-hept-5-en-2-one (sulcatol), myrcene, α -phellandrene, Δ -3-carene et *p*-cymene. Le β -ocimene est le COV le plus émis par les amandes avec le methyl isovalerate et le β -bourbonene.

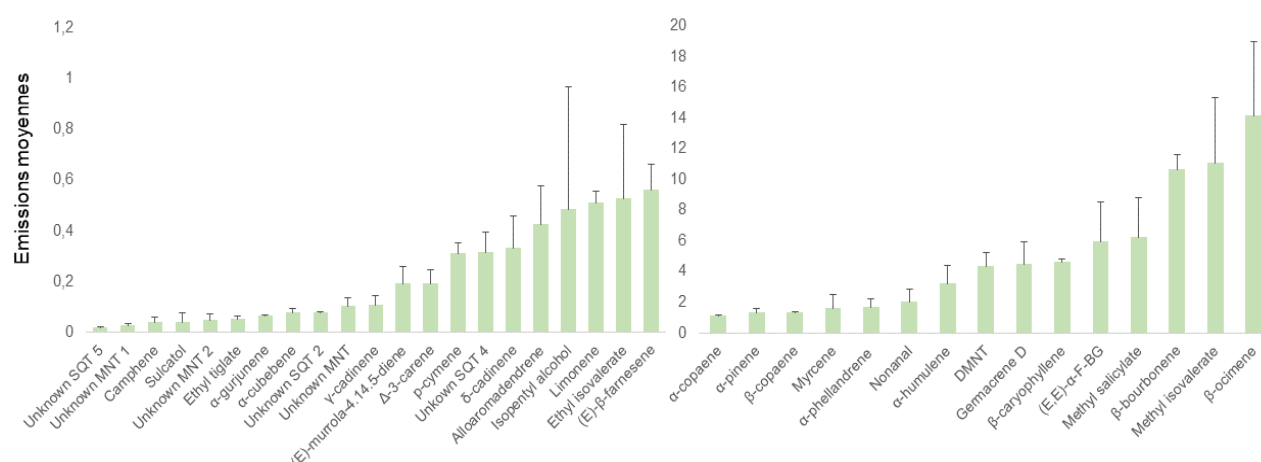


Figure 14 : Emissions moyennes de 100 amandes détachées du rameau. Les données correspondent à la moyenne (ng.m⁻².s⁻¹) + erreur standard (N=4). Abréviations : (E, E)- α -F-BG : (E,E)- α -farnesene/bicyclogermacrene ; SQT : sesquiterpène ; MNT : monoterpène.

Inversement, certains COVP n'ont pas été retrouvés dans les émissions des amandes mais uniquement avec les rameaux coupés ou les branches intactes, laissant supposer que ces COVP sont émis spécifiquement par les feuilles : (E)- et (Z)-hex-3-en-yl acetate, geranylacetone, (Z)-muurola-3,5-diene, α -cadinene, *p*-methyl anisole, linalool et benzaldehyde.

Cette expérience a permis d'identifier des COVP émis par les amandes détachées et de retrouver des composés communs émis par les amandes et par les feuilles. Cependant, les amandes ayant été isolées du rameau, certains composés peuvent provenir de la blessure mécanique. De plus, l'air ayant été peu renouvelé pendant une heure, les concentrations étaient plus élevées que celles retrouvées *in natura*. Par ailleurs, l'émission par les amandes de l'isopentyl alcool est

peut-être un artefact. Il s'agit d'un composé produit par les champignons et les microorganismes et qui régule la croissance des plantes (Nieto et Frankenberger, 1990 ; Hung et al., 2012). De plus, ce composé n'a pas été retrouvé dans tous les prélèvements, il est donc peu probable qu'il soit émis par les amandes. Les autres COVP ont également été identifiés dans la littérature sur des amandiers en verger (Winer et al., 1992 ; Beck et al., 2008). Il est important de noter que malgré le biais lié à la blessure, notre expérience permet de discriminer les composés émis par les feuilles de ceux émis par les fruits.

CONCLUSION

La modification du dispositif de prélèvement nous a permis de discriminer les émissions provenant des amandes de celles provenant des feuilles. En effet, nous n'avions pas pu identifier clairement les émissions issues des amandes qui étaient masquées par les émissions foliaires. Cette étape a élargi notre panel de COVP à tester par la suite dans les études d'électrophysiologie et de comportement.

2.3 SUIVI DES EMISSIONS D'AMANDIERS PAR PTR-TOF-MS

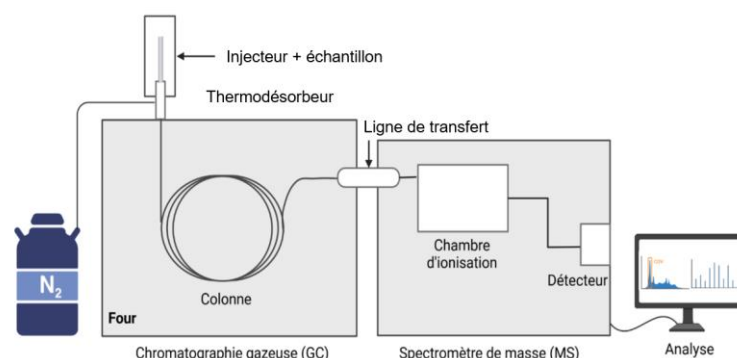
Lors du prélèvement de COVP, en fonction du dispositif de collecte d'effluves utilisé (Tholl et al., 2006), de la méthode de prélèvement (SPME, cartouches, adsorbants choisis) ou de la colonne GC-MS, les COVP retrouvés lors de l'analyse varient entre les études. La GC-MS est une méthode fiable et très répandue dans la littérature et qui permet notamment de distinguer les isomères. Cependant, le PTR-ToF-MS (abréviation : PTR-MS) offre une sensibilité plus élevée permettant de détecter une gamme plus large de COVP, notamment pour les composés très volatils. Cette technique permet également un suivi en temps réel avec précision (de l'ordre de la seconde). Toutefois, nous ne pouvons pas distinguer les composés ayant la même masse molaire. Pour ces raisons nous avons utilisé ces deux méthodes en parallèle pour notre étude (voir Encart 4 pour le principe des deux techniques).

Pour des raisons techniques et de disponibilité du PTR-MS, nous avons mesuré les émissions de COVP lors de la floraison et au début de la maturation des fruits et des feuilles (stades 1 et 2). Seul l'effet de la température a pu être investigué pour cette raison. De plus, l'acquisition récente du PTR-MS au CEFÉ, ainsi que le développement du script durant la période de thèse n'ont pas permis de développer les analyses comme prévu initialement.

Encart 4 : Principe des méthodes d'analyses GC-MS et PTR-ToF-MS

1) GC-MS

Cette technique permet de séparer les COV présent dans un mélange selon leur affinité vers le gaz vecteur et la phase stationnaire de la colonne chromatographique. Dans le cas des COV retenus par un adsorbant, une première thermodesorption sur un piège froid est nécessaire. Ensuite le piège froid est chauffé très rapidement pour injecter le mélange de COV dans la colonne où les composés sont séparés. Les COV sont ionisés dans le spectromètre de masse (MS) avant d'arriver au détecteur. La colonne et les adsorbants utilisés varient en fonction des propriétés physico-chimiques des molécules recherchées.



2) PTR-ToF-MS (Hansen et al., 1995)

Cette méthode analyse en temps réel la composition moléculaire d'un échantillon gazeux. La résolution temporelle est modulable et très fine (de l'ordre de la seconde). Le principe de base repose sur la réaction de transfert de protons entre les COV et les ions H_3O^+ générés en continu dans une source d'ions. Lors de cette réaction, les COV sont ionisés en acquérant un proton sans fragmentation. Ces ions sont ensuite introduits dans un ToF-MS où ils sont accélérés et séparés selon leur rapport masse/charge (m/z). Lors de l'analyse les COV ont un poids moléculaire avec une unité supplémentaire (un sesquiterpène de masse molaire 204 $g.mol^{-1}$ aura une masse molaire finale de 205 $g.mol^{-1}$).

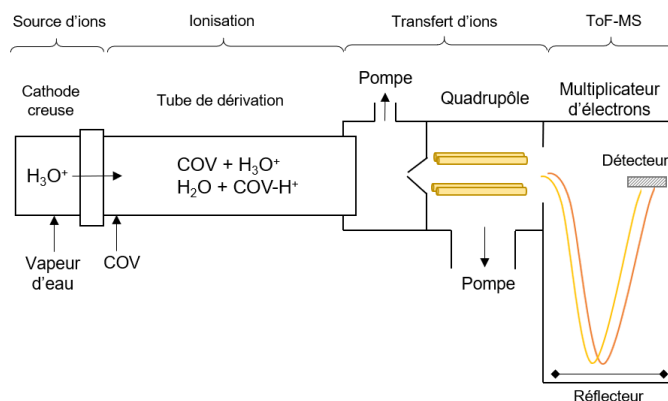


Schéma modifié de Graus et al., 2010.

MATERIEL ET METHODE

Le dispositif utilisé est présenté dans l'Article 1, le PTR-MS étant utilisé en parallèle des cartouches. Les prélèvements du PTR-MS et des cartouches ont été réalisés à des débits respectifs de 100 mL.min^{-1} , avec un flux d'air total de 300 mL.min^{-1} dans la chambre (voir Article 1 pour le détail des protocoles de température et de lumière). La durée de prélèvement était de 30 min avec une acquisition toutes les 10 s. Comme pour la GC-MS, un prélèvement avec la chambre vide a été réalisé au début de chaque expérience, permettant de différencier le bruit de fond des émissions.

Le suivi des émissions journalières et les analyses ont été réalisées avec le package ProvoC (Huguenin, J.) avec Rstudio. Pour analyser les données du PTR-MS, nous avons utilisé une Résolution Multivariée de Courbes (MCR ; Juan et al., 2014 ; Ruckebusch et Blanchet, 2013). Cette méthode d'analyse est souvent utilisée en chimie analytique et en spectroscopie. Elle permet d'extraire des informations à partir de données multivariées complexes pour lesquelles on dispose de peu d'informations. Ainsi la MCR décompose les matrices de données brutes pour obtenir des données simplifiées et interprétables. Il est nécessaire d'estimer le nombre de composantes pures à utiliser pour différencier les composantes contenant des informations de celles associées au bruit. Dans notre cas, l'objectif de la MCR est d'identifier des COVP qui n'auraient pas été identifiés par GC-MS, et de connaître la contribution des composés pour chaque composante nos échantillons. De plus, la MCR permet de visualiser le spectre global des prélèvements réalisés. Pour identifier de nouveaux COVP, nous avons recherché sans a priori l'ensemble des composés présents dans les échantillons qui différaient du bruit de fond.

RESULTATS

Le PTR-MS nous a permis un suivi détaillé des émissions de fleurs, de feuilles et de fruits, en fonction des variations de température, corroborant les résultats obtenus en GC-MS (Figure 15). En effet, lors de la floraison les monoterpènes n'ont pas montré de variation liée à la température, contrairement aux sesquiterpènes et au benzaldehyde dont les émissions augmentaient significativement avec la température. Pour nous aider dans nos analyses, nous avons utilisé le tableau des coefficients de vitesse de réaction de transfert de protons (Cappellin et al., 2012). L'identification des COVP se base sur leur poids moléculaire mais ne permet pas la discrimination des isomères. La quantification est plus difficile car le taux d'ionisation varie selon les composés, des paramètres de l'appareil et probablement d'autres facteurs, tels que

l'humidité relative. Nous avons également comparé les poids moléculaires (M en g.mol^{-1}) retrouvés par PTR-MS, aux études portant sur les COVP chez les *Prunus* (Baraldi et al., 1999 ; Winner et al., 1992 ; Beck et al., 2008 ; Nawade et al., 2019). Nous avons pu identifier la présence d'acétone (58.05 g.mol^{-1}), 4-kétoisophorone ($152.19 \text{ g.mol}^{-1}$), et d'ethyl benzoate ($150.17 \text{ g.mol}^{-1}$). Toutefois, la masse molaire du 4-kétoisophorone est très proche de celle du methyl salicylate ($152.15 \text{ g.mol}^{-1}$). Nous avons également identifié des composés appartenant aux cétones (86 g.mol^{-1}), mais que nous n'avons pas réussi à identifier. Le suivi des émissions a montré que la température n'a pas eu d'effet sur les taux d'émission de ces composés.

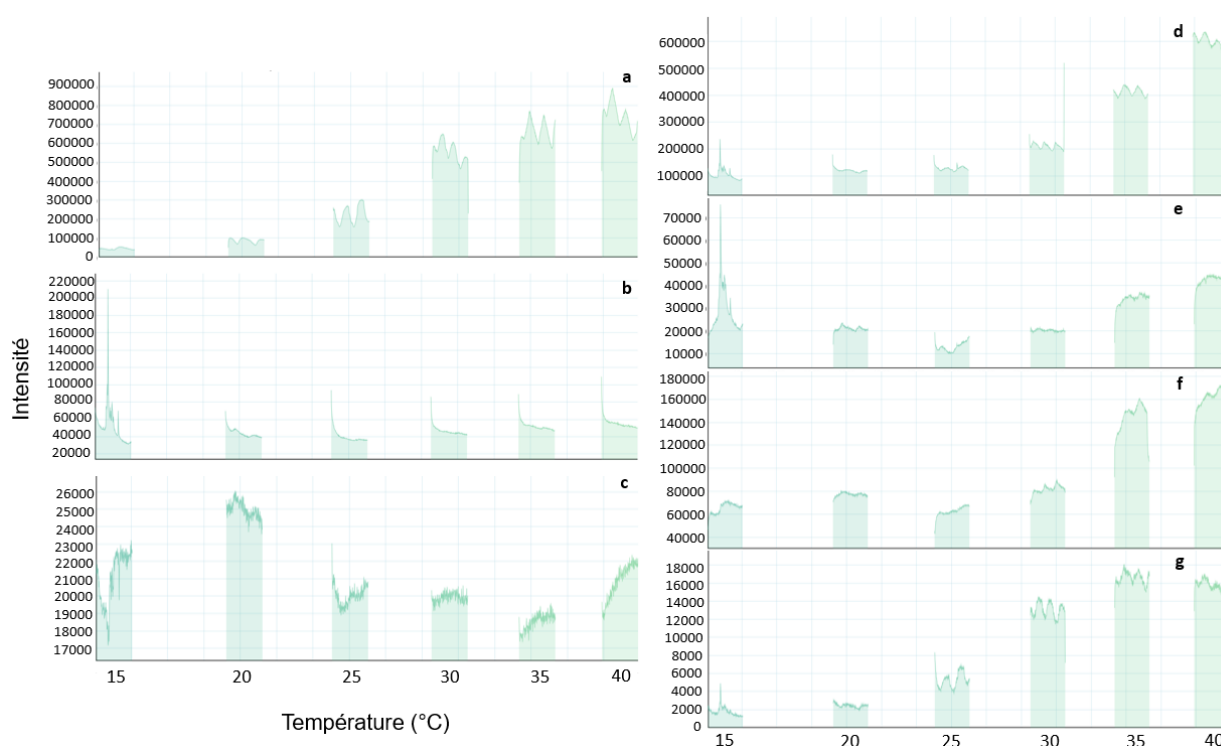


Figure 15 : Suivi de l'intensité des émissions florales par PTR-ToF-MS en fonction de la température (N=6). (a) Sesquiterpènes 204 g.mol^{-1} , (b) monoterpènes 136 g.mol^{-1} , (c) cétones $86.089 \text{ g.mol}^{-1}$, (d) acétone 58.05 g.mol^{-1} , (e) 4-kétoisophorone $152.19 \text{ g.mol}^{-1}$ (tentative d'identification), (f) benzaldehyde $106.124 \text{ g.mol}^{-1}$, (g) ethyl benzoate $150.17 \text{ g.mol}^{-1}$.

Nous avons sélectionné les cinq premières composantes lors de l'analyse par MCR afin de conserver un niveau d'information suffisant en minimisant le bruit potentiel qui aurait entravé l'interprétation des données (Figure 16). Les composantes 1 et 4 sont principalement associées aux sesquiterpènes, tandis que la composante 2 est dominée par les monoterpènes et les benzoïdes (138 g.mol^{-1}). La composante 3 est essentiellement corrélée à l'acétone. En revanche, la composante 5 présente une interprétation plus complexe. Elle affiche un pic de faible intensité correspondant aux sesquiterpènes, ainsi que plusieurs pics de plus grande intensité liés

à l'acétone, aux monoterpènes et aux benzoïdes. Ces résultats montrent que les émissions florales se composent principalement de terpénoïdes et de benzoïdes. Ces résultats mettent en évidence que les émissions florales se composent principalement de terpénoïdes et de benzoïdes.

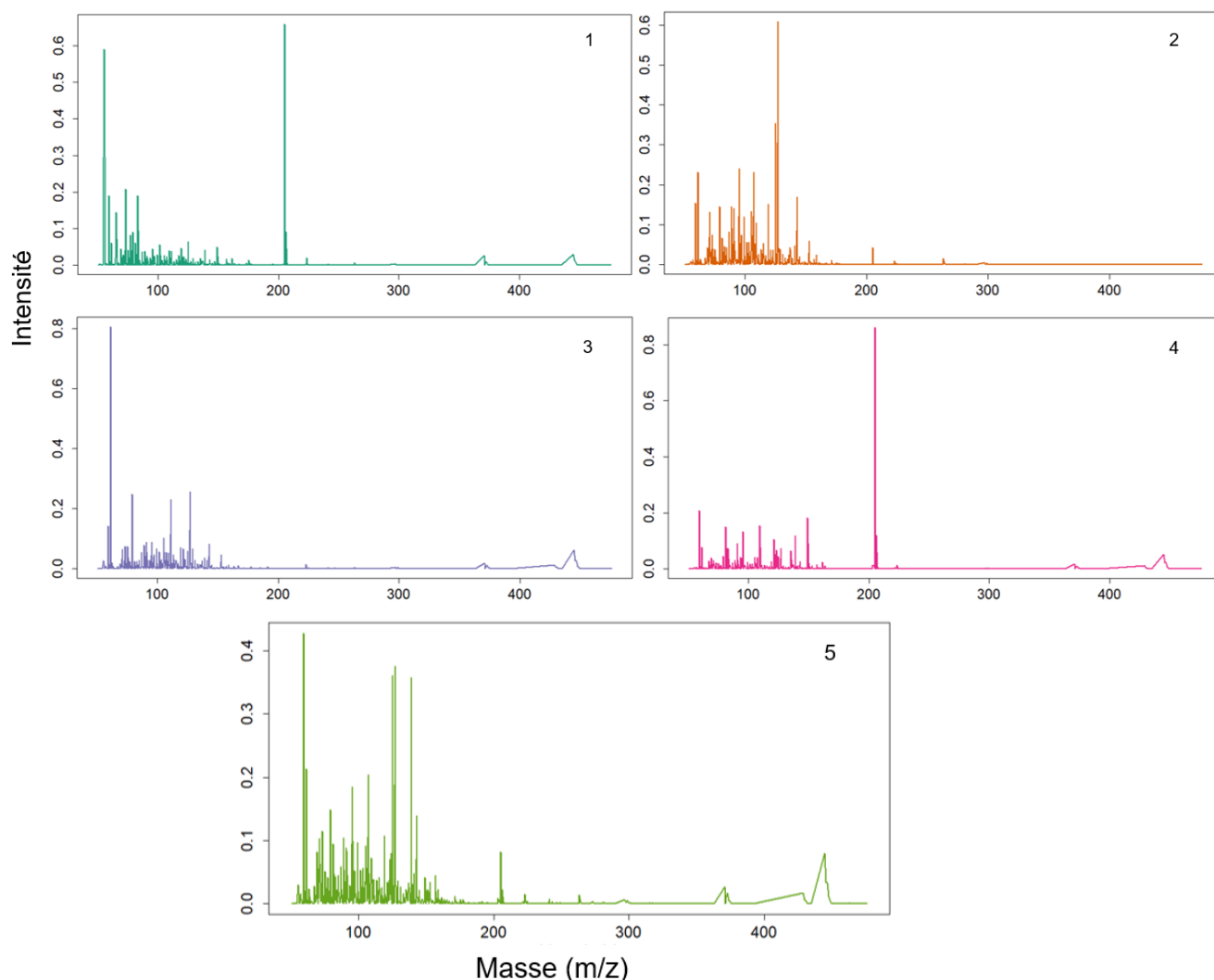


Figure 16 : spectres globaux des composés détectés dans l'ensemble des émissions florales par PTR-ToF-MS pour les composantes 1 à 5 de la MCR. Chaque spectre global correspond à une somme de tous les ions présents dans les échantillons.

Nous avons également suivi les émissions des fruits et des feuilles à un stade de développement immature (Figure 17). Les résultats du PTR-MS sont cohérents avec la GC-MS et nous retrouvons les composés déjà identifiés avec une majorité de sesquiterpènes. Comme pour la floraison, le 4-ketoisophorone, l'acétone et l'éthyl benzoate ont également été identifiés. Nous avons trouvé des GLV comme le (Z)-hex-3-en-yl acetate ou le (Z)-hex-3-en-1-ol, et restent stables avec la température mais présents en très faible quantité. De plus, les émissions

augmentaient avec la température de manière significative à 40 °C.

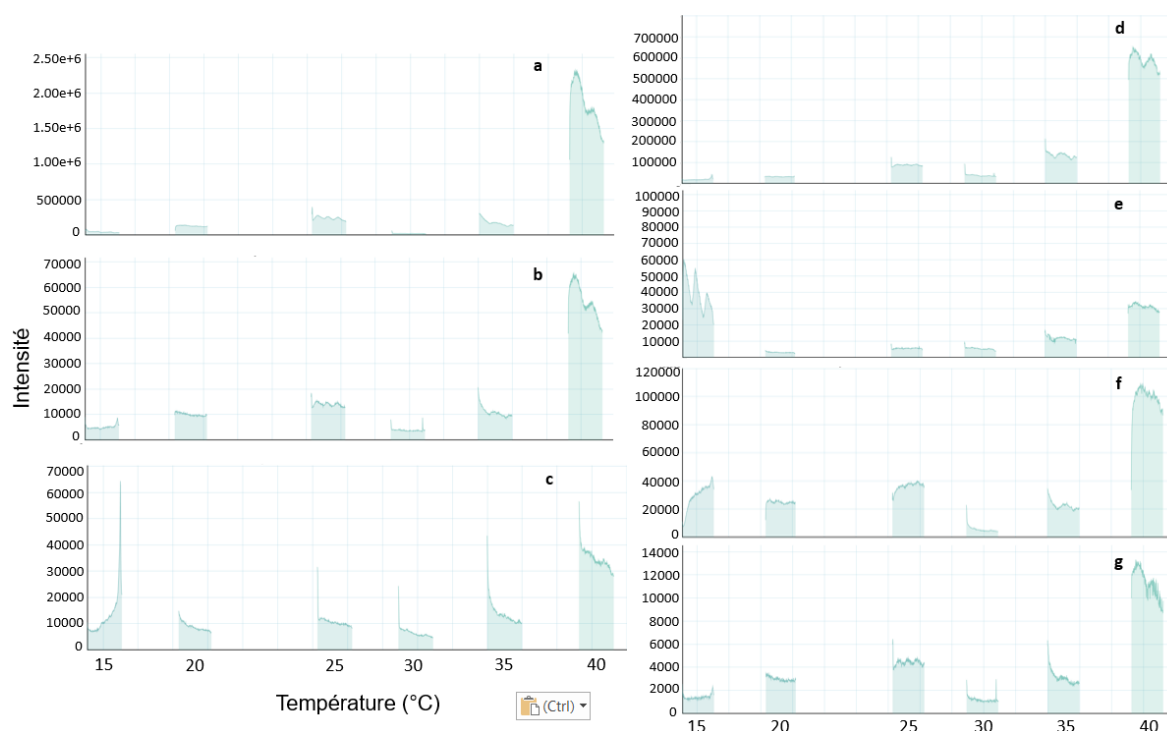


Figure 17 : Suivi de l'intensité des émissions de feuilles et de fruits immatures par PTR-ToF-MS en fonction de la température (N=3). (a) Sesquiterpènes 204 g.mol⁻¹, (b) monoterpène 136 g.mol⁻¹, (c) cétones 86.089 g.mol⁻¹, (d) acétone 58.05 g.mol⁻¹, (e) benzaldehyde 106.124 g.mol⁻¹, (f) 4-kétoisophorone (tentative d'identification) 152.19 g.mol⁻¹, (g) ethyl benzoate 150.17 g.mol⁻¹.

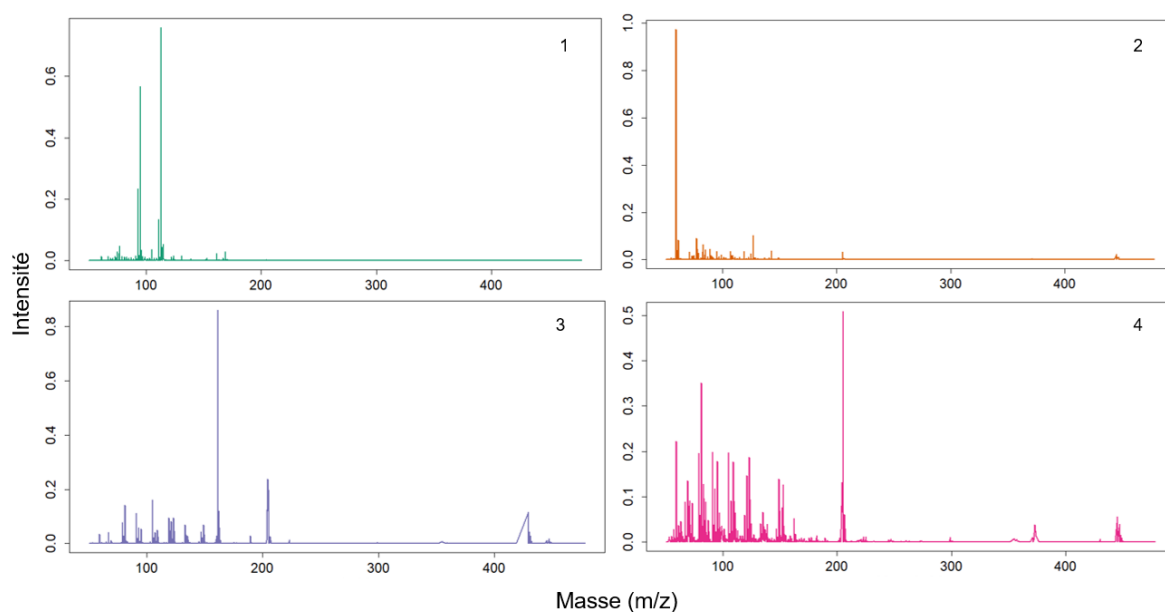


Figure 18 : spectres globaux des émissions issues des fruits et des feuilles par PTR-ToF-MS pour les composantes 1 à 4 de la MCR. Chaque spectre global correspond à une somme de tous les ions présents dans les échantillons, donnant un aperçu de la composition globale.

L'analyse des composantes de la MCR appliquée aux émissions de fruits et de feuilles (Figure 18) a révélé une prédominance des terpènes, qui sont principalement représentés par les composantes 3 et 4. La composante 1 semble principalement associée aux cétones, ainsi qu'à un composé de masse $118,08 \text{ g.mol}^{-1}$ qui n'a pas été identifié. La composante 3 est principalement représentée par l'acétone. Dans le cadre de cette analyse, seules quatre composantes ont été conservées, car les spectres de masse présentaient un bruit trop important à partir de la cinquième composante pour être pertinents.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Chez plusieurs espèces de *Prunus*, comme *P. persica* et *P. armeniaca*, on retrouve des lactones dans les émissions foliaires, comme le γ -butyrolactone (Takeoka et al., 1990) mais qui ne sont pas présents chez *P. dulcis*. Nous avons également détecté des composés appartenant à la famille des cétones, sans pouvoir les identifier de manière précise. De plus, les émissions des cétones n'ont pas montré de variations significatives en fonction de la température, que ce soit pendant la floraison, le développement des fruits ou des feuilles. Le composé ayant une masse de $58,05 \text{ g.mol}^{-1}$ correspond à l'acétone, un COVP commun retrouvé chez différentes familles, notamment chez les Rosaceae (Knudsen et al., 2006). En ce qui concerne le 4-ketoisophorone, il est plus émis par les feuilles et les fruits que par les fleurs et a été retrouvé chez l'amandier dans des études précédentes (Beck et al., 2008 ; Nawade et al., 2019). Toutefois, sa masse molaire est très proche de celle du methyl salicylate ($152,15 \text{ g.mol}^{-1}$), qui a été retrouvé dans nos analyses par GC-MS. Par ailleurs, l'ethyl benzoate, identifié dans les émissions d'amandes détachées, a également été retrouvé dans nos analyses par PTR-MS, montrant que ce composé était bien issu des amandes et non des feuilles.

Les mesures réalisées par PTR-MS ont confirmé les connaissances obtenues par GC-MS et ont révélé des composés supplémentaires. Cependant, en raison de la disponibilité limitée du matériel végétal aux stades de développement souhaités, nous n'avons pas pu effectuer de mesures sur des stades de développement des fruits et des feuilles plus avancés. Il serait intéressant de mesurer les émissions de COVP à des stades de développement plus avancés pour discriminer de manière plus précise les émissions à différents stades de maturité. De plus, bien que nous ayons pu confirmer l'effet de la température sur les émissions de COVP à l'aide des deux techniques, nous n'avons pas pu étudier l'impact de la lumière sur ces émissions. Un inconvénient majeur est que nous n'avons pas pu quantifier les émissions de la même manière que pour la GC-MS. En conclusion, le couplage des deux méthodes d'analyse nous a permis

d'obtenir un profil d'émissions des amandiers assez complet, ce qui est essentiel pour la suite du projet.

2.4 CONCLUSION GENERALE

Cette étude a joué un rôle essentiel dans la caractérisation des COVP émis par les parties végétatives et reproductives des amandiers au printemps, de la floraison au développement des amandes et des feuilles. Nous n'avons pas mesuré les émissions provenant des fruits à maturité complète (de juin à septembre), étant donné que les guêpes ne peuvent pas percer l'amande pour pondre lorsque la coque est trop dure et qu'elles n'émergent plus. Les résultats obtenus ont corroboré nos hypothèses, montrant que *P. dulcis* est un faible émetteur de COVP, majoritairement de terpénoïdes, et que les émissions florales sont plus fortes que les émissions issues des fruits et des feuilles. De plus, les émissions augmentent avec la température, mais ne sont pas influencées par la lumière. Cependant, nous n'avons pas pu cibler les COVP émis lorsque les femelles sont les plus actives, car les COVP sont émis en continu. Cette partie de la thèse a été une étape clé pour pouvoir identifier les COVP détectés par les femelles *E. amygdali* par électrophysiologie.

CHAPITRE 3 : LA PERCEPTION DES COVP PAR *EURYTOMA AMYGDALI*

Le premier objectif de ce chapitre est de déterminer quels sont les COVP d'amandiers précédemment identifiés détectés par les femelles *E. amygdali* en électroantennographie (EAG). Plusieurs expérimentations ont été nécessaires pour définir le meilleur protocole de stimulation, la guêpe de l'amande n'ayant jamais été étudiée par EAG. En plus des résultats en EAG, nous avons optimisé notre dispositif de chromatographie en phase gazeuse couplée à l'électroantennodétection (GC-EAD). Cette méthode nous permettra de tester par la suite des composés présents en mélange sans à priori, notamment dans les huiles essentielles qui contiennent des composés non disponibles dans le commerce. Une fois que les composés sont détectés, certains vont induire un comportement d'attraction ou de répulsion. C'est pourquoi notre second objectif est de trouver quels sont les COVP qui attirent les femelles, c'est-à-dire lesquels possèdent une activité kairomonale. Pour cela, nous avons développé des olfactomètres linéaires pour confirmer l'attraction par les rameaux d'amandiers et nous avons cherché à identifier les composés attractifs seuls et en mélanges, dans différentes proportions.

Les travaux sur *E. amygdali* ont été réalisés à l'INRAE Versailles, avec la collaboration d'Adrien Le Navenant (post-doctorant) qui a réalisé les tests préliminaires en EAG et mis en place le premier olfactomètre. Thomas Ruivo (stage de M1) a réalisé le screening EAG. Camille Faber (stage de césure) a mis en place les olfactomètres linéaires et réalisée les tests de comportement avec Yassine Maarouf (stage de M2) qui a aussi réalisé le second screening EAG.

3.1 DETECTION DES COVP D'AMANDIER PAR *E. AMYGDALI*

Les insectes utilisent les odeurs pour localiser une plante hôte à distance grâce à leurs sensilles chimioréceptrices. Parmi les espèces phytophages du genre *Eurytoma*, *E. maslovskii* a davantage été étudié ces dernières années en raison des dommages causés en Corée chez l'abricotier du japon (Yang et al., 2020 ; Nguyen et al., 2022). En élargissant nos recherches à la famille des Eurytomidae, des espèces phytophages telles que *Bruchophagus roddi* détectent principalement des GLV et des COVP ubiquistes (Light et al, 1992). Actuellement aucune étude n'a été publiée sur la détection de COVP par *E. amygdali*, et les connaissances sur les phéromones sexuelles et le comportement sont basées sur des études anciennes (Kouloussis et Katsoyannos, 1994 ; Krokos et al., 2001).

Parmi les COVP identifiés, tous n'étaient disponibles dans le commerce, principalement des sesquiterpène, listés ci-après : β -copaene, β -bourbonene, (Z)-muurola-3,5-diene, (E)-Muurola-4(14),5-diene, bicyclogermacrene et α -cubebene. Ces COVP pourraient être intéressants à étudier, toutefois l'objectif étant de réaliser des pièges à coût abordable et facilement disponibles, synthétiser ces composés ne nous semblait pas pertinent.

Dans le but d'évaluer la détection de ces COVP, nous avons utilisé un dispositif d'EAG décrit dans l'article 2 (Figure 19), avant de réaliser le screening des 39 COVP.

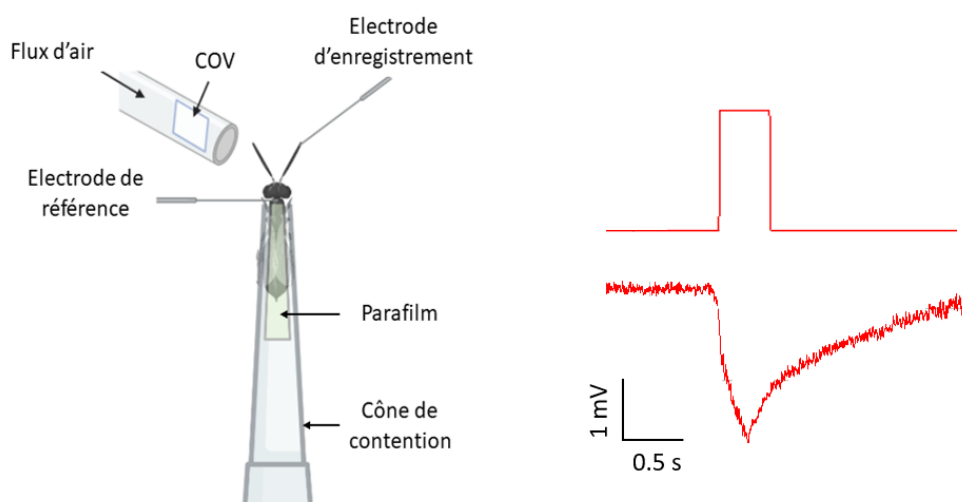


Figure 19 : Dispositif d'EAG (à gauche) pour mesurer les réponses d'*E. amygdali* aux COVP (à droite).

Nous avons tout d'abord déterminé les doses appropriées pour obtenir des réponses suffisantes. Nous avons choisi deux COVP qui ont déclenché des réponses significatives lors de tests préliminaires (N=3) réalisés par Adrien Le Navenant (Figure 20) : le benzaldéhyde et le (Z)-hex-3-enyl acetate. Ces COVP ont été dilués dans de l'huile de paraffine aux dilutions de 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} (volume/volume). Les COVP ont été testés dans un ordre aléatoire avec un contrôle (huile de paraffine) au début et à la fin de chaque expérience.

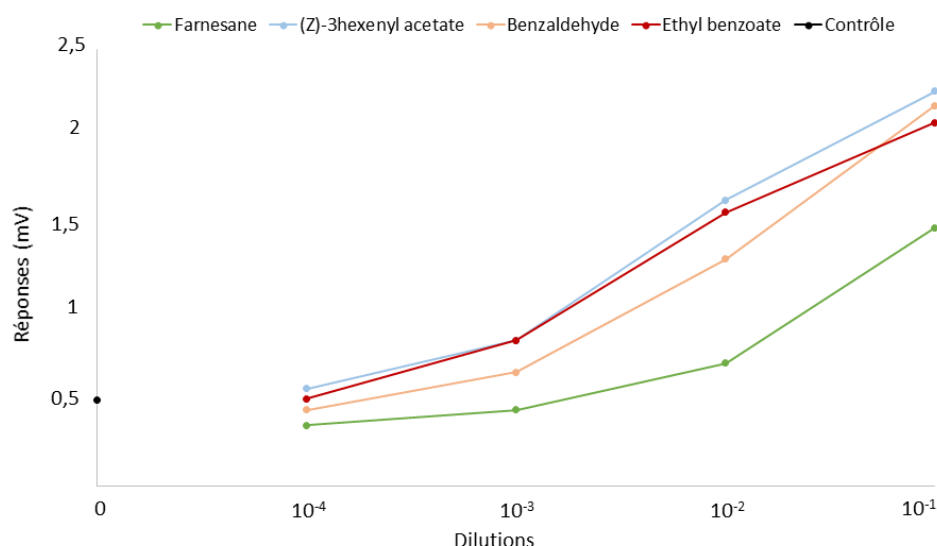


Figure 20 : Doses-réponses des femelles *E. amygdali* pour quatre COVP identifiés chez les amandiers, comparées au contrôle (N=3). Les réponses étaient significatives à partir d'une dilution à 10⁻².

La réponse aux COVP (Figure 21, N=7) était significativement différente du contrôle à partir d'une dilution à 10⁻³ et plus forte à 10⁻² sans que la différence ne soit pas significative entre ces deux dilutions. Nous avons donc choisi de travailler avec une dilution 10⁻² pour le screening des 39 COVP. De plus, il n'y avait pas de différence de réponse entre les deux composés testés, le (Z)-hex-3-en-yl acetate a donc été sélectionné aléatoirement comme contrôle positif.

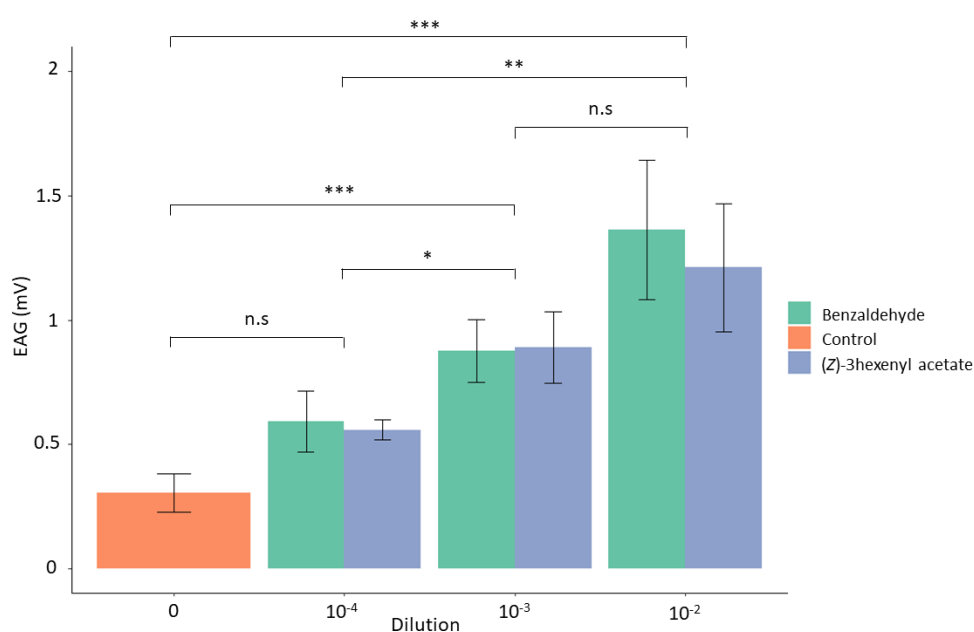


Figure 21 : Réponses moyennes (± erreurs standards) des femelles *E. amygdali* (N=7) au benzaldéhyde et au (Z)-hex-3-en-yl acetate à trois doses, comparées au contrôle (huile de paraffine). n.s : non-significatif, * : P<0.05, ** : P< 0.01, * : P<0.001.**

Pour vérifier que nous pouvions réaliser le screening de 39 COVP sur un même insecte, un test de stabilité a été réalisé avec du benzaldéhyde à 10^{-2} (Figure 22). Chaque insecte a été stimulé pendant une heure avec une stimulation de 500 ms toutes les 3 min. Un contrôle à l'huile de paraffine a été réalisé au début, à 30 min et à la fin de l'enregistrement. Les cônes maintenant la pipette de stimulation ont été changés entre deux stimulations pour éviter les contaminations.

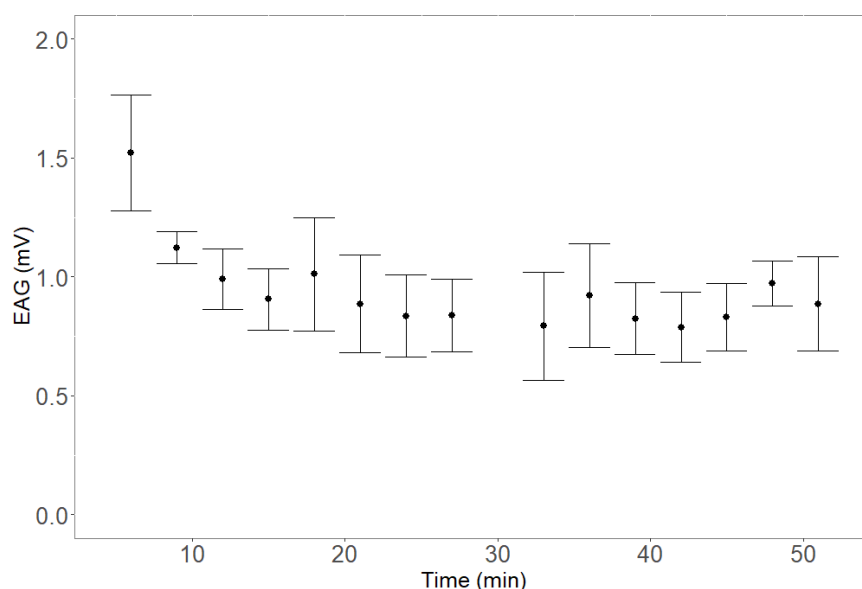


Figure 22 : Stabilité des réponses moyennes des femelles *E. amygdali* au benzaldéhyde à 10^{-2} pendant une heure. Les réponses sont données en valeur absolue. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ erreurs standards (N=5).

Nous avons observé que la première réponse à la stimulation était plus importante que les suivantes, qui se sont avérées stables au cours du temps. Cette différence peut s'expliquer par la pression de vapeur saturante qui devait être atteinte dans la pipette de stimulation au départ et qui n'a pas le temps d'être à nouveau atteinte par la suite du fait des stimuli répétés. Ces résultats ont montré que nous étions en mesure d'effectuer des stimulations sur une période d'au moins une heure, suffisante pour réaliser le screening de 39 composés.

Dans le but d'optimiser notre étude EAG sur les COVP d'amandiers en déterminant le meilleur ratio signal/bruit, nous avons comparés les réponses EAG dans différentes configurations : antenne en place, antenne isolée et antenne sur tête coupée (Tableau 1).

Tableau 1 : Rapport signal /bruit (moyenne $\pm$ erreur standard, en mV) pour les antennes isolées, têtes coupées et insectes entiers pour le benzaldéhyde à une dose de 10^{-2} (N=4).

Expérience	Signal (S)	Bruit (N)	S/N
Antenne isolée	$0,19 \pm 0,05$	0,05	3,7
Antenne sur tête coupée	$0,205 \pm 0,06$	0,05	4,1
Antenne en place	1.56 ± 0.34	0,3	5,2

L'amplitude de la ligne de base (noté « Bruit » dans le tableau 1) des enregistrements réalisés sur antenne isolée et d'antenne sur tête coupée était de 0,05 mV et il était de 0,3 mV pour les enregistrements sur insecte entier. Malgré ce niveau de bruit six fois plus important, le rapport signal/bruit était meilleur pour les enregistrements sur insecte entier (Tableau 1). De plus, avec la tête coupée ou les antennes isolées, les réponses devenaient faibles voire nulles à partir de 30 min. Sur la base de ces résultats, nous avons décidé de réaliser les enregistrements sur insecte entier, permettant de travailler dans des conditions stables.

3.2 ARTICLE 2 : DETECTION ET ATTRACTION DES FEMELLES *E. AMYGDALI* PAR LES COVP D'AMANDIER

Présentation du 2^e article : à soumettre (journal envisagé : Journal of Chemical Ecology)

Il existe actuellement plus de 600 espèces d'*Eurytoma*, dont certaines sont phytophages, mais ne sont pas ou peu étudiées. La majorité des études sur *E. amygdali* se focalisent sur sa biologie. Quelques études concernent le comportement des femelles vis-à-vis en réponse aux organes d'amandiers et à la phéromone sexuelle (Kouloussis et Katsoyannos, 1994 ; Krokos et al., 2001). A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la capacité de détection ou de réponse comportementale des femelles *E. amygdali* à des COVP.

L'objectif de cette étude est d'identifier parmi les COVP d'amandiers préalablement identifiés ceux détectés par les femelles *E. amygdali*, et à partir de ces résultats trouver un mélange attractif. Pour mener cette étude, des tests EAG ont été réalisés pour évaluer la détection des COVP émis par les différents organes de l'amandier. Parmi tous les composés identifiés au préalable, certains n'étaient pas commercialisés (majoritairement des sesquiterpènes), nous

n'avons donc pas pu étudier la réponse à la totalité des COVP. Néanmoins, la détection des femelles a été testée pour 39 COVP par EAG. Tester autant de composés en comportement n'était pas possible et nécessitait de sélectionner les COVP avec une réponse significative. Nous avons identifié 27 COVP détectés significativement par les femelles *E. amygdali* parmi les 39 testés. En parallèle, nous avons étudié l'effet de l'âge sur la détection des COVP et aucun effet a été observé entre 1 et 12 jours. Un deuxième screening EAG a été réalisé pour réduire le nombre de composés à utiliser en comportement aux dix composés déclenchant les meilleures réponses (Andersson et al., 2012). Le dispositif et les doses ont été modifiés pour comparer les COVP à la même dose délivrée à l'antenne et non la dose déposée sur le papier filtre. Ces dix COVP ont été testés individuellement et en mélange en différentes proportions à l'aide d'un olfactomètre linéaire conçu au laboratoire.

In search of an attractive lure: perception by the almond wasp, *Eurytoma amygdali*, of volatile organic compounds emitted by the almond tree

A. Leconte^{1, 3, 4*}, C. Faber¹, Y. Maarouf¹, A. Le Navenant², T. Ruivo¹, H. Duval², E. Coutagne³, M. Staudt⁴, P. Lucas^{1‡}

¹ INRAE, Sorbonne Université, CNRS, UPEC, IRD, Université P7, iEES Paris, Paris, France

² GAFL, INRAE, Montfavet, France

³ Compagnie des amandes, Aix-en-Provence, France

⁴ CEF, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

* anjelica.leconte@gmail.com

‡ philippe.lucas@inrae.fr

Abstract

Almonds hold significant global economic and nutritional value, being one of the most widely consumed nuts. *Eurytoma amygdali* End., the almond wasp, is a key pest of the almond tree, for which effective large-scale biocontrol methods are currently lacking. *E. amygdali* females are specifically attracted to as yet unidentified kairomones emitted by almond trees. Among the 39 volatile organic compounds (VOCs) that are emitted by almond trees, 27 exhibited significant electroantennography (EAG) detection by *E. amygdali* females. To reduce the number of VOCs to be assessed in olfactometry, a second EAG screening was conducted, with a modification in the dose delivery approach. Therefore, we had equivalent doses reached the antennae instead of equivalent doses at the source. The attractiveness of 10 VOCs with the strongest EAG responses was evaluated using a linear olfactometer, both individually and in various combinations. Eight VOCs and two mixtures exhibited significant attractiveness, yet three individual VOCs and one mixture appear to be promising choices for field trials. Our results have identified suitable VOCs that can be taken into consideration for the development of mass-trapping strategies.

Keywords: *Eurytoma amygdali*, volatile organic compounds, biocontrol, electroantennography, olfactory attraction, olfactometry

Introduction

The almond tree (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) holds significant economic importance globally, with a production of 4 million tons of unshelled almonds in 2021, half of which is supplied by the USA (source: FAO 2022). However, climate changes, such as the increase in drought episodes, alter the phenology of plants and insects. These modifications can induce changes in tritrophic relationships, which could promote the proliferation of pests, and pose challenges for large-scale almond cultivation (Castex et al. 2018; Skendžić et al. 2021; Moldero et al., 2022). Thus, the development of local and sustainable production methods becomes imperative to ensure a consistent almond supply.

Almond trees are susceptible to various diseases and pests, including fungi such as *Fusicoccum amygdali*, *Monilinia laxa*, and *Coryneum beijerinckii*; bacteria such as *Pseudomonas syringae*, *Xylella fastidiosa*; root-knot nematodes; insects like *Monosteira unicostata*, leafhopper, aphid and mite species, and *Eurytoma amygdali*, the almond wasp. *E. amygdali* Enderlein (Hymenoptera: Eurytomidae, 1907), is a native pest of almonds in the Middle East (Mentjelos and Atjemis 1970, Talhouk 1977). Its introduction to the southeastern region of France in 1981 (Arambourg et al. 1983) has led to yield losses of up to 80% in almond orchards (Duval and Millan 2010). Currently, only few effective methods are available for managing *E. amygdali* infestations. In France, Karate Zeon which contains the active substance lambda-cyhalothrin, a broad-spectrum neurotoxic insecticide, is the only authorized pesticide (Biondi et al., 2012; Arthidoro de Castro et al., 2022). However, insecticide resistance has emerged prompting the development of alternative methods (Hu et al., 2022). Biocontrol approaches like clay, nets, and essential oils have been tested on *E. amygdali*, but none have shown efficacy.

The biology of *E. amygdali* is well described (Plaut 1971, 1972; Plaut and Mansour 1973; Zerova and Fursov 1991). This univoltine species has sexual and parthenogenetic reproduction. Mated females lay female eggs and virgin females lay male and female eggs, with a sex ratio of around 1:2 (Plaut, 1971). Females can lay up to 100 eggs. During egg-laying, females deposit an anti-oviposition pheromone, the composition of which remains unidentified (Duval and Froment, 1998) and a single larva develops within the almond, feeding on the kernel. Larval development involves two diapauses, followed by pupation, occurring in January-February according to meteorological conditions (Tzanakakis and Veerman 1994; Margaritopoulos and Tzanakakis 2006). Adult males emerge in March-April, while females emerge in April-May, with a two-week lifespan (Plaut, 1971).

Plants release a wide range of volatile organic compounds (VOCs) serving diverse functions, including defense mechanisms (Dicke et al., 1990; Zhou et Jander, 2022), their reproduction (Holland et Fleming, 1999; Dobson 2006; Wright et Schiestl, 2009), and participating in multitrophic relationships (Turlings et Erb, 2018). Insects have developed a specialized chemosensory system to navigate complex olfactory environments and locate host plants. (Witzgall et al., 2005; Dicke and Baldwin, 2010). The specific blend and ratios of these emitted compounds significantly influence insect behavior (Wright et al., 2005; Najar-Rodriguez et al., 2010; Bruce and Pickett, 2011). Thus, insects can detect ubiquitous compounds emitted by various plant families, such as terpenes (Hansson et al., 1999; Webster et al., 2008; Raguso, 2016), or green leaf volatiles (GLV) emitted by numerous plants under stress (Ameye et al., 2017), which attract many insects (Visser and Avé, 1978; Dickens et al., 1993; Ranger et al., 2014). Conversely, specific VOCs, such as methyl esters like methyl (2*E*,4*Z*)-2,4-decadienoate (Knight and Light, 2001) or volatile derivatives such as alkaloids, remain distinctive to particular plant families (Krasnoff and Dussourd, 1989). Few studies have investigated the chemosensory system and behavior of Eurytomidae and existing research within this family has focused on sex pheromones (Krokos et al., 2001; Mazomenos et al., 2004; Yang et al., 2020). While almond wasps are known to be attracted to the VOCs emitted by almond trees (Kouloussis and Katsoyannos 1994), the identity of compounds responsible for this attraction remain unknown.

VOC detection and behavioral responses in numerous species of Lepidoptera, Diptera and Hymenoptera can be modified by physiological factors such as sexual maturity or mating status (Martel et al., 2009), circadian rhythm (Krishnan et al., 1999; Groh and Meinertzhagen, 2010) or age (Gadenne and Anton, 2000). This plasticity may also correlate with environmental factors associated with sociality (Greenwood and Chapman, 1984; Boulton and Field, 2022) or learning (Chabaud et al., 2006; Glinwood et al., 2011; Guerrieri et al., 2012). *E. amygdali* females exhibit reduced attraction and oviposition when they are less than 3 days old. In addition, females are more active from noon until 4 p.m. (Kouloussis and Katsoyannos, 1994) when almond tree emissions are highest according to our previous work (Leconte et al., 2023), although no studies have yet investigated whether this correlates to detection ability.

We identified and quantified the VOCs emitted by the vegetative and reproductive organs of almond trees (Leconte et al., 2023). The present study aims to assess the kairomonal activity of these VOCs for *E. amygdali* females. Thirty-nine VOCs were screened using EAG to identify the best-detected compounds. However, this first screening did not make it possible to select a

sufficiently small number of VOCs to behavioral experiments. This is why we carried out a second EAG screening by adjusting the doses. Indeed, airborne stimuli should be compared at similar delivered gas phase concentrations rather than at equal doses in the odor source (Mayer, 1993). The evaporation rate of VOCs depends on their physicochemical properties and can vary dramatically (Bengtsson et al., 1990; Brockerhoff and Grant, 1999; Cometto-Muniz et al., 2003). Quantification of delivered concentration by headspace sampling followed by gas chromatographic or by photoionization detector is possible but requires calibration for each VOC and is exceedingly time-consuming for a large number of odorants. Evaporation of an odorant from a filter paper introduced in a stimulus pipette depends not only on its vapor pressure but also on its affinity to the solvent, filter paper (Andersson et al., 2012) and surfaces of the odor delivery system (Barta et al., 2023). Inspired by Andersson's work, the device was adapted, and a correction was implemented to measure the dose delivered to the insect rather than the dose transmitted. The best-detected compounds were tested individually and as a blend with linear olfactometers to assess their attractiveness to female almond wasps. This study provides valuable insights into the VOCs that play a pivotal role in attracting almond wasps, holding implications for the development of pest control strategy by mass trapping.

Materials and methods

Insects

Contaminated almonds were collected from the orchards of the INRAE Amarine experimental estate (43°46'46.411" N 4°28'48.059" E) in December. Almonds were stored at 9°C. For the experiments, batches of almonds were transferred to 22°C to stimulate wasp emergence. Wasps emerged between 2 and 3 weeks after temperature increase with a male-to-female sex ratio of 1:2. They were kept by 10 in ventilated plastic boxes 8 cm in diameter and 5 cm in height with a piece of cardboard to increase the surface. They were fed with a 12% sugar solution on cotton soaked in a bottle cap.

Electroantennography

Wasps were immobilized in a 200- μ L pipette tip. The protruding head was restrained with tape and the antennae remained free. Glass electrodes were pulled (PC-100 puller, Narishige, Japan) and filled with a physiological saline solution (in g.L⁻¹ of distilled water: NaCl 9, KCl 0.2, glucose 4.36) and housed chloridized silver wires. The reference electrode was inserted between

the head and thorax using a micromanipulator (UM3C, Narishige, Japan). The recording electrode contacted the cut tip of one antenna with a manual micromanipulator (NMN-25, Narishige, Japan). The signal was amplified ($\times 100$) and low pass filtered online (5 kHz) using an EX1 amplifier with a 4002 headstage (Dagan, Minneapolis, MN). The signal was digitized at 1 kHz by a 16-bit acquisition board (Digidata 1550A) under Clampex 10.3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Data were analyzed using Clampfit (Molecular Devices).

A humidified and charcoal-filtered airflow (70 L.h^{-1}) was continuously directed to the wasp through an aluminum tube of 3 mm internal diameter. Odor stimuli consisted of blowing an air puff (500 ms, 10 L.h^{-1}) through a Pasteur pipette containing a piece of filter paper loaded with 1 μL of an odor dilution or with 1 μL of solvent (control stimuli). The air puff through the Pasteur pipette was commanded by an electrovalve (LHDA1233215H, The Lee Company, Westbrook, ME, USA). The pipette tip was inserted into a hole (2 mm in diameter and at 10 mm of its outlet) on the side of the aluminum tube focused on the wasp. The 1-mL pipette tip holding the stimulation pipettes was changed every three VOC stimuli to avoid contamination.

Generation of VOC stimuli for EAG

Thirty-nine VOCs (Supplemental Table S1), previously identified and commercially available were tested in EAG to assess their detection by female antennae. To this end, each VOC was diluted in paraffin oil except α -copaene, α -gurjunene and a mixture of cadinene isomers. The latter compounds were already available diluted in hexane and pure compounds were not commercially available. For each VOC, 1 μL of a 10^{-2} dilution (volume/volume) was deposited on a piece of filter paper ($5 \times 15 \text{ mm}$). Hexane was left to evaporate for at least 30 s before inserting the filter paper in a Pasteur pipette used to deliver stimuli in EAG. Two negative controls with 1 μL of solvent (hexane or paraffin oil) were done at the beginning of the experiment. VOCs were tested in randomized order. A control stimulus with paraffin oil was applied after every six VOCs to verify the absence of contamination of the aluminum tube used to deliver stimuli. Positive control stimuli with (Z)-hex-3-enyl acetate were applied at the beginning, middle and end of the EAG screening to verify that wasps' responses were stable during the experiment. The interval between two consecutive stimuli was at least 1 min to avoid sensory adaptation of olfactory receptor neurons.

To further reduce the number of VOCs to be tested in behavioral experiments, we selected 14 VOCs that triggered the best EAG responses for a second screening. where the EAG activity of

VOCs were compared at the same airborne concentration instead of the same dose in the source.

To obtain a comparable airborne concentration of VOCs delivered to the wasp antenna, we used the equation from Andersson *et al.* (2012):

$$\text{Log}_{10}(DR) = -0.01BP - 0.178 L + 0.519 \quad (1)$$

where DR = the depletion rate (i.e. the slope of the relationship between stimulus amount in the source and stimulus number), BP = the boiling point and L = the VOC lipophilicity. This relationship is valid for VOCs diluted in paraffin oil, deposited on a filter paper and delivered using a specific odor delivery device.

The hexane solvent α -copaene was thus evaporated and α -copaene was diluted in paraffin oil for the second screening. Cadinene was not in sufficient quantity to carry out the same process and was not tested in the second screening.

Using the boiling point and lipophilicity of VOCs, we corrected the dose loaded on the filter paper so that the airborne quantity delivered would be the same for all of them according to the following procedure.

According to Andersson *et al.* (2012, Fig. 2B and Table 1), the regression values of depletion rates for compounds in paraffin oil at the 100- μg dose on a filter paper are best described for most odorants (22 out of 27) by a log-linear function of the form:

$$\text{Log}_{10}(C) = -DR * \text{stim number} + \text{Log}_{10}(C_0) \quad (2)$$

with C = airborne quantity delivered, C_0 = airborne quantity delivered at a hypothetical puff #0, which can be approximated by airborne quantity delivered at puff #1.

DR and C_0 are not independent. From Fig. 3A in Andersson *et al.* (2012):

$$DR = 2 * 10^{-6} * C_0 \quad (3)$$

Therefore, equation (1) can be written as:

$$\text{Log}_{10}(C_0) = -0.01BP - 0.178 L + 6.218 \quad (4)$$

At equilibrium, which the system has the time to reach before the first puff, C_0 of odorant i , noted C_{0i} , depends on the initial dose of odorant i at the source on the filter paper, D_i , via

the partition coefficient of odorant i , m_i , which is defined by:

$$C_{oi} = m_i * D_i \quad (5)$$

The prediction of equation (4) for C_{oi}^* , C_o of the compound i when $D_i = 100 \mu g$, allows to estimate the partition coefficient m_i for compound i :

$$C_{oi} = C_{oi}^* * \frac{D_i}{100 \mu g} \quad (6)$$

In order to deliver the same airborne quantity (approximated here by C_{oi}) for all compounds i , we chose a reference compound j and adjusted the initial dose of odorant i at the source on the filter paper from D_i to D'_i such that $C_{oi} = C_{oj}$ for all i . This condition can be written:

$$D'_i = \frac{C_{oj}^*}{C_{oi}^*} * D_j \quad (7)$$

Nonanal was chosen as the reference odorant and the dose of other odorants was adjusted so that their airborne quantity delivered matched the one of nonanal. The EAG activity of the 14 VOCs was compared using the same odor delivery system as in Andersson *et al.* (2012). The aluminium tube was replaced with a glass tube having an internal diameter of 4 mm. For stimulation, 10 μL were deposited on Whatman paper (1.5 x 0.5 cm) for each VOC, instead of 1 μL initially. Glass tubes were changed between each test and cleaned using a heat gun (Metabo 18V solo HG 18 LTX 500, Nürtingen, Germany). During the first screening, we had a constant flow rate of 1.2 L/min to which was added 0.2 L.min⁻¹ of air during VOC stimulation. A three-way electrovalve (LHDA1233115H, The Lee Company, Westbrook, ME, USA) directed air either to the permanent flow at 1.2 L.min⁻¹ or to the EAG cartridge at 0.7 L.min⁻¹ during stimulation.

To test the effect of age on VOC detection, seven age groups have been defined: 1, 2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, and 11-12 days. We selected three VOCs that elicited large responses during the first EAG screening: benzaldehyde, (Z)-hex-3-en-yl acetate and nonanal at a 10⁻² dilution and paraffin oil (control) with 1 μL deposited on filter paper.

Olfactometry

Two types of linear olfactometers (Fig. 1) adapted from a model developed by Kouloussis and Katsoyannos (1994) were used for behavioral tests. The first type of olfactometer (Fig. 1A)

consisted of a custom-made plexiglass box and four polypropylene tubes (Corning® Gosselin™ Straight Container, L8 x Ø5.2 cm) separated by a funnel-shaped drilled mesh (1 mm), which allowed wasps to go towards the odor source but not to go back. Olfactometers were used under a hood (SPI 2020, Possémé, France) at a light intensity of 700 lux. The airflow was pushed through the device by a fan at 0.3 m.s^{-1} at the olfactometer outlet, and filtered by charcoal filter of kitchen hood. Three olfactometers were set up in parallel: one was empty and served as a control, while the other two contained in area 4 either (1) cut almond branches in water, with or without almonds, or (2) dissected almonds alone. Almonds in the developmental stages corresponding to I and J, as defined by Socias i Company *et al.* (2017), were harvested at the Amarine estate (Bellegarde, France) at the end of April. After each test, all pieces of the olfactometers were cleaned three times with ethanol, rinsed with osmosed water, and dried with paper towel before being left to air dry.

In the second olfactometer type (Fig. 1B), a pressurized airflow (1.9 bar) was filtered on charcoal (Refillable Hydrocarbon Traps, Restek™, Lisses, France), adjusted to 4.2 L.min^{-1} with an electronic flowmeter (PFM7, SMC, Bussy-Saint-Georges, France) and humidified before entering a series of five *Drosophila* culture tubes (25 x 95 mm, Dutscher, Bernolsheim, France). Tubes were slightly heated beforehand to allow them to be nested and their bottom was removed. They were separated by a funnel-shaped drilled mesh (1 mm). Four olfactometers were used in parallel. The airflow was maintained at 4.2 L.min^{-1} to have an outlet airflow of $0.1\text{-}0.2 \text{ m.s}^{-1}$. A suction pipe was placed in front of the outlet of each olfactometer to avoid contamination. Two lamps (Gdansk Inspire LED 42 W, 60 x 60 cm) were placed above the olfactometers providing an illumination of 1200 lux. A black curtain surrounded the device to avoid visual bias for the insects. For each test, one olfactometer was used as a control and the other three contained a VOC or a mixture of VOCs, applied on a Whatman filter paper (1.5 x 1.5 cm). Individual VOCs and the blends ABCD and Mix10 were tested at 10 and 50 μg doses. ABCD corresponds to the mixture with the best EAG responses: benzaldehyde, linalool, ethyl benzoate and (*Z*)-hex-3-enyl acetate 2-methylbutanoate. Mix10 corresponds to the mixture of 10 VOCs. The other mixtures were tested at the following ratios: ACDE (benzaldehyde/ethyl benzoate/(*Z*)-hex-3-enyl acetate 2-methylbutanoate/(*E*)-DMNT at 5:1:5:5; ACE (benzaldehyde/ethyl benzoate/(*E*)-DMNT) at 5:1:5; AC (benzaldehyde/ethyl benzoate) at 5:1; AE (benzaldehyde/(*E*)-DMNT) at 1:1 and CE (ethyl benzoate/(*E*)-DMNT) at 1:5. The selection of blends was guided by the EAG responses of the insects. Moreover, mixtures were randomly tested in parallel with the individual VOCs to avoid the risk of having a bias linked to the measurement period. The

placement of odors and control was randomized. After each test, the tubes and funnel-shaped drilled meshes were decontaminated in an oven (60° C for 30 min) with a constant flow of charcoal-filtered air passing through.

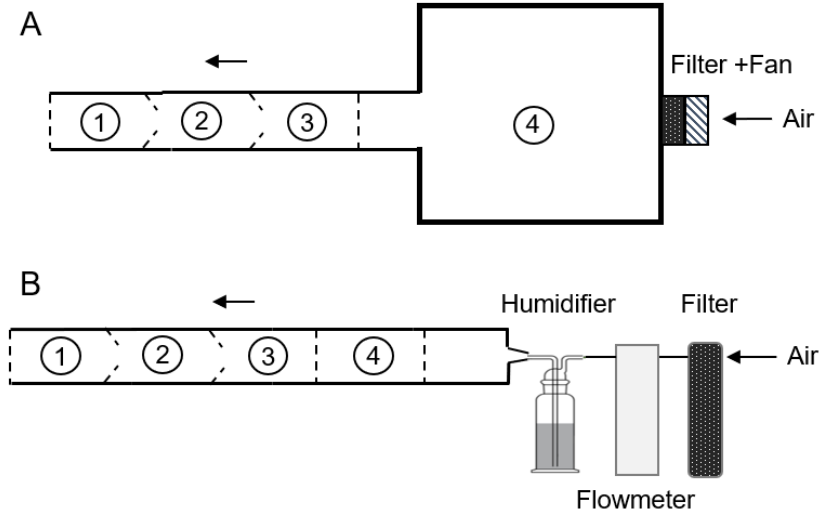


Fig. 1: Linear olfactometers used to quantify the attraction of organs of almond trees (A) and VOCs (B). Four sections were separated by grids (dotted): acclimatization and starting zone (1), trapping areas (2, 3) and zone where plants (A) and VOCs (B) were deposited (4). Airflow is indicated by the black arrows.

For both devices, the almond tree organs, VOCs, and controls were randomly assigned to the olfactometers for each test. Tests were carried out at room temperature (20-22°C). Ten females were tested in each olfactometer. Wasps were acclimatized for 1 h in zone 1 of the olfactometer and tests lasted 30 min. The number of individuals in each zone was counted every minute. For devices A and B, female wasps were 3 to 5 and 2 to 9 days old, respectively. The age of the females was randomized so that all VOCs were tested on wasps of the same average age. For device B, females were reused every two days to prevent habituation or learning.

The attractiveness index for device A was calculated as:

$$\frac{\text{number of females in zones 2 and 3}}{\text{total number of females}} \times 100 \quad (1)$$

And the index for device B was:

$$\frac{\frac{1}{3} \text{females in zone 2} + \frac{2}{3} \text{females in zone 3}}{\text{total number of females}} \times 100 \quad (2)$$

Equation (2) assigns a score of 1 to females that moved to chamber 2 and a score of 2 to females that moved to chamber 3.

The tests were conducted between 11 a.m. and 4 p.m. to mitigate potential biases and align with existing literature, considering that wasp activity was minimal or negligible outside of these specified hours.

Statistical analysis

Data processing was conducted using RStudio with R version 4.2.1. A Student's t-test with a Welch correction for unequal variances was used to compare EAG responses to the 39 VOCs with the controls (hexane or paraffin). To evaluate whether EAG responses vary with age, a permutation ANOVA was performed. The responses to three VOCs were compared to the control to ensure that the females detected them. A Kruskal-Wallis test was used to compare the responses of the 14 VOCs tested in the second EAG screening with the control, followed by pairwise comparisons using Dunn's test.

For behavioral experiments, a Fisher's exact test was used, followed by a post hoc pairwise test to compare attraction to a VOC or branch with the control (A). Two approaches were used to process the behavior data (B). (1) The number of females that reached chamber 3 at the end of the 30 min test was analyzed using a Kruskal-Wallis test. Subsequently, a Dunn's test with Abbott's correction was applied to perform pairwise comparisons. (2) The latency of wasp movement was analyzed using two separate Cox regressions, one for the passage from chamber 1 to chamber 2 and one for the passage from chamber 1 to chamber 3.

Results

Effect of age on VOC detection

The influence of almond wasp age on the detection of VOCs by EAG was investigated with benzaldehyde, (Z)-hex-3-enyl acetate and nonanal (N=11), based on their significant responses during preliminary EAG screening. The response of each VOC was compared between different age groups, and no significant effect of age on VOC detection was observed ($P>0.05$, Fig. 2).

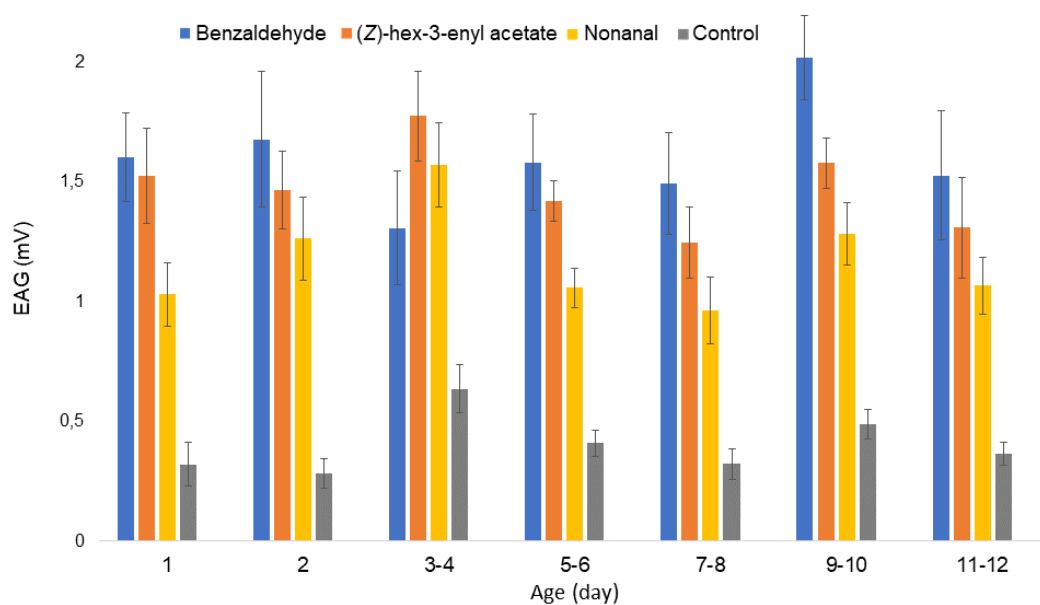


Fig. 2: The amplitude of the responses in EAG (mV) did not vary with age between 1 and 11-12 days for three VOCs Data are mean $\pm$ standard error. Control is paraffin oil.

Screening of VOCs

Of the 39 COVs tested (N=13), 12 did not show a significant difference in response compared to controls (Fig. 3). The VOCs with the best responses to stimuli were nonanal, methyl salicylate linalool and 1,4-dimethoxybenzene with an average of 1.3 mV.

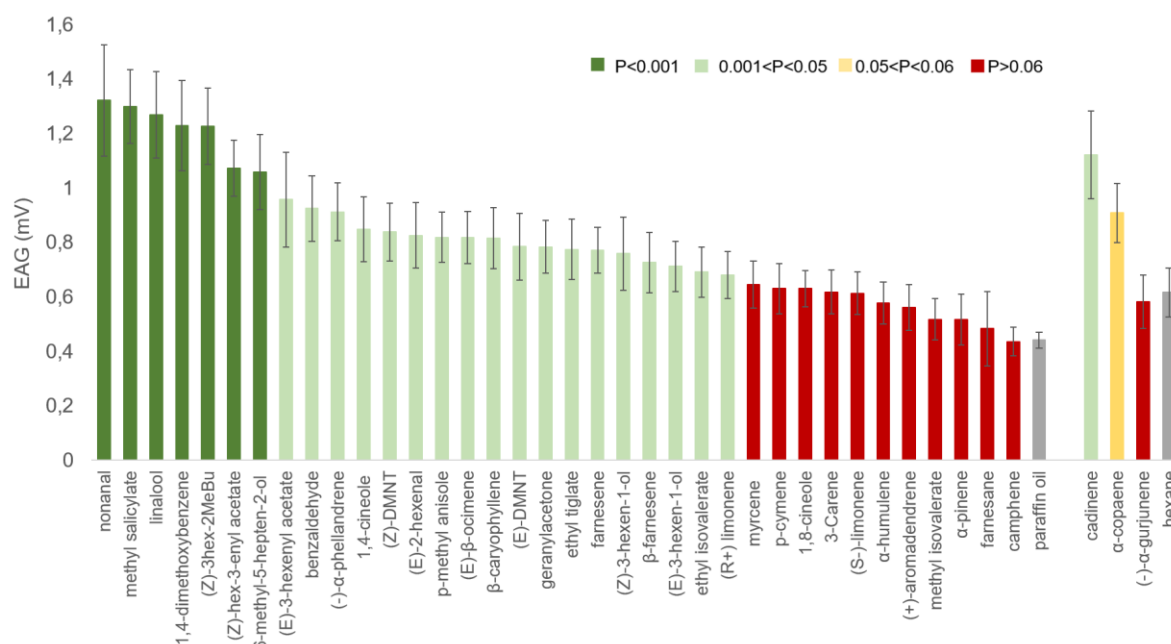


Fig. 3: The amplitude of EAG responses (mV) of *E. amygdali* females to 39 VOCs compared to controls (paraffin oil, hexane). Cadinene, α -copaene and (-)- α -gurjunene were compared to hexane and the other 36 VOCs to paraffin oil. Data are means $\pm$ standard errors. Bars of the significantly detected VOCs are in green, at the limit of significance in yellow and non-significance in red.

VOC selection in EAG for olfactometry experiments

Due to practical considerations, the number of VOCs that could be tested in subsequent behavioral assays needed to be reduced. We thus carried out a second screening with the 12 best-detected VOCs in the first screening EAG (Fig. 3). We also added ethyl benzoate and octanal in the second screening because they were not detected in our previous study on VOC (Leconte et al., 2023) but they were identified in Beck *et al.* (2009 and 2011). We adjusted the dose applied to the filter paper to ensure that equivalent doses were delivered to antenna. Among the 14 VOCs tested at a similar airborne concentration, three did not show a different response from the control: (R)- α -phellandrene, β -ocimene and α -copaene. Consequently, these VOCs have not been tested in behavior. The best-detected compounds were benzaldehyde, linalool and (Z)-hex-3-enyl acetate (N=12; Fig.4).

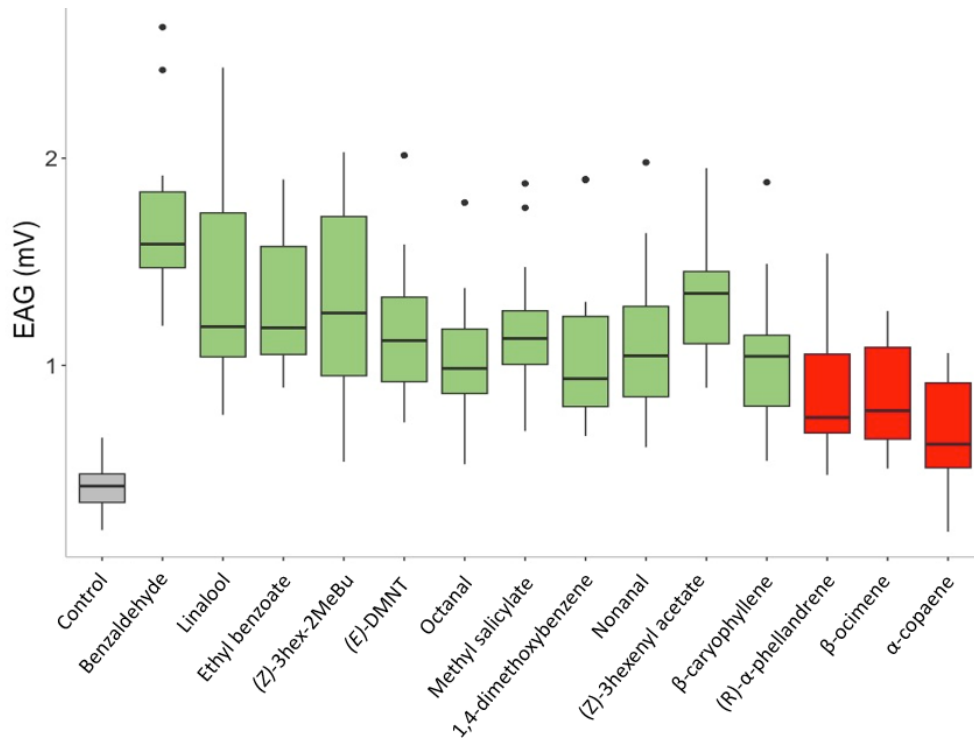


Fig. 4: The amplitude of EAG responses of *E. amygdali* females to 14 VOCs compared to the control (paraffin oil). Doses of VOCs were adjusted to deliver the same airborne quantity of for all compounds. Data are mean $\pm$ standard errors. Green: significant p-values ($P < 0.05$), red: non-significant p-values ($P > 0.05$).

Attractiveness of almond twigs

The first behavioral experiments showed that almond branches attract *E. amygdali* females (Fig. 5). Branches with leaves were the most attractive with 75 % attractiveness ($P < 0.001$). The branches with almonds and leaves showed also a significant attractiveness ($P < 0.03$) of around 50 %. On the other hand, almonds alone exerted only a tendency of attraction to *E. amygdali* females ($P = 0.1$).

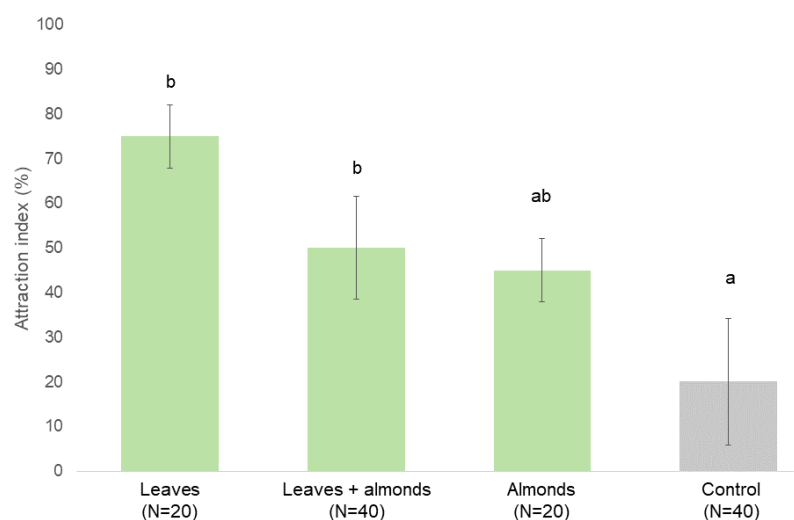


Fig. 5 : Attraction of females in the presence of branches with leaves, with or without almonds, or almonds alone. Data are means $\pm$ standard errors.

In the presence of almonds alone, we consistently observed at least two females out of the batch of ten showing an oviposition behavior. This behavior has never been observed in the presence of leaves only.

Attractiveness of VOCs

Doses of 10 and 50 μ g were chosen based on a preliminary test using ethyl benzoate at 10, 100, and 1000 μ g (Supplementary Fig. S1). Among these, only ethyl benzoate at 10 μ g exhibited significant attractiveness. To explore a range of doses, we opted for 50 μ g as an intermediate dose between 10 and 100 μ g. The attractiveness of 10 individual VOCs at both 10 and 50 μ g was assessed. Eight compounds were attractive to females and all of these compounds were attractive at a dose of 10 μ g, except for compound (Z)-hex-3-enyl 2-methylbutanoate, which exhibited attraction at 50 μ g (Figure 6). Octanal at 10 μ g is the compound that has shown the strongest attractiveness. Additionally, the attractiveness of two mixtures was tested at both 10 and 50 μ g doses and five mixtures containing variable proportions of the tested VOCs. Two mixtures demonstrated significant attractiveness: the ABCD mixture at 50 μ g, exhibiting the highest level of attractiveness, and CE at 10 μ g.

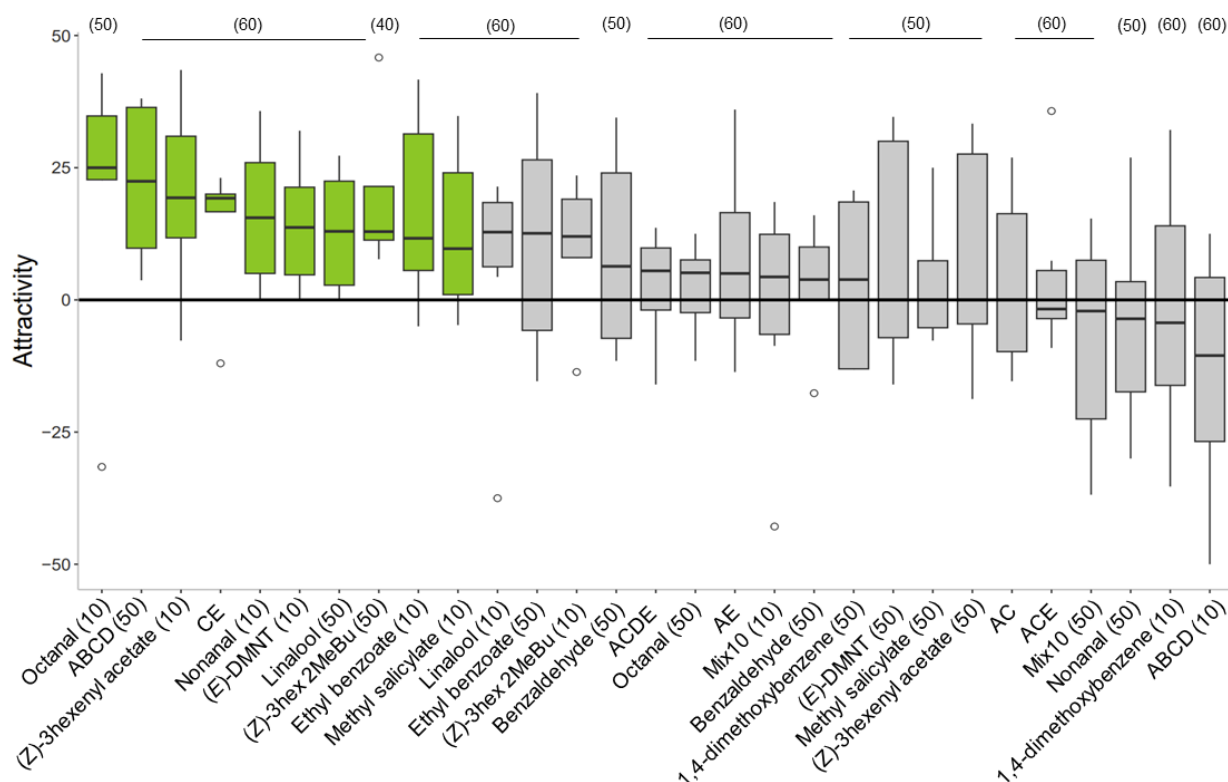


Fig. 6: Attractiveness of *E. amygdali* females for VOCs alone and in mixtures, assessed in the last chamber (area 3) at the end of each test. The doses at 10 and 50 µg are indicated in parentheses. Data are means $\pm$ standard errors. Means were corrected relative to the control (Abbott's correction). The black line is the control. Significant values are in green, and non-significant values are in grey. Abbreviations: (Z)-3hex 2MeBu: (Z)-hex-3-enyl acetate 2-methylbutanoate; ABCD: benzaldehyde, linalool, ethyl benzoate and (Z)-hex-3-enyl acetate 2-methylbutanoate; ACDE: benzaldehyde, ethyl benzoate, (Z)-hex-3-enyl acetate 2-methylbutanoate and (E)-DMNT; Mix10: mixture of 10 VOCs; ACE: benzaldehyde, ethyl benzoate and (E)-DMNT; AE: benzaldehyde and (E)-DMNT; AC: benzaldehyde and ethyl benzoate; CE: ethyl benzoate and (E)-DMNT.

The analysis of wasp locomotion revealed that the mixture ABCD at 50 µg was the most attractive. During the transition from chamber 1 to chamber 2, 10 of the tested VOCs exhibited attractiveness to the females (Supplemental Fig. S2 A). Subsequently, when the wasps had moved from chamber 2 to 3, eight VOCs continued to show attractiveness (Supplemental Fig. S2B). Compounds B and F at 50 µg no longer exhibited a significant difference from the control.

For the most attractive compounds, up to 70% of the female wasps exhibited a probability of reaching chamber 3. On the other hand, the control group of females that were exposed to non-attractive conditions still showed an arrival rate of approximately 40% in chamber 3. This difference suggests an attraction of around 30% towards the tested VOCs.

Discussion

Age on VOC detection

Research on age-related olfactory plasticity primarily focuses on the detection of pheromones, while studies on the plasticity of plant VOCs detection are limited (Gadenne et al., 2016). There are few studies reporting the effects of insect age on EAG responses to plant VOCs. For example, *Spodoptera littoralis* exhibited an age-related increase in responses within the peripheral olfactory system (Martel et al., 2009). In *Agrotis ipsilon*, olfactory responses increase with age in the central olfactory system but do not exhibit the same age-dependence in the peripheral olfactory system (Gadenne et al., 1993; Anton and Gadenne, 1999). We did not find a significant impact of age on VOC detection in *E. amygdali* females from 1 to 12 days. This is why we used wasps aged 1 to 12 days. In contrast, the effect of age has been widely documented on the behavior of many insect pests showing an increase in VOC detection with age (Mechaber et al., 2002; Addesso and McAuslane, 2009). Kouloussis and Katsoyannos (1994) demonstrated that 1-to-2-day-old *E. amygdali* females were not drawn to almond extracts for aggregation and oviposition, unlike females aged 3 to 14 days. Thus, for behavioral investigations, we used females between 2 and 9 days old.

EAG responses of *E. amygdali* females

In the first screening, we identified 27 VOCs that were detected by *E. amygdali* females. To reduce the number of VOCs to be tested in behavior, we conducted a second EAG screening where VOCs were tested at the same concentration. We extended the model described in Anderson *et al.* (2012) to compare for the first time the detection of VOCs delivered at the same concentration. This correction enabled us to retain the 10 best-detected VOCs in the behavioral experiments. These VOCs are commonly found in flowers and leaves, and are widespread across various plant families (Knudsen et al., 2006; Whitman and Eller, 1990; Jones et al., 2022). In the first screening, cadinene had shown significant responses but the insufficient quantities did not allow us to evaluate the response with a corrected dose. It could be interesting to test the cadinene with the correction, and depending on the result, add it to the behavioral tests. However, in our experiments, cadinene was present as a mixture of three isomers, and only one of these isomers, δ -cadinene, is commercially available.

Behavior

Females exhibited a strong attraction to leaves, and our observations revealed that oviposition behavior occurred when almonds were present. These observations suggest that *E. amygdali* females may be attracted to the VOCs emitted by leaves as a means of locating egg-laying sites from a distance. The stimulation of oviposition in *E. amygdali* is probably linked to signals present on the almond surface cues, as observed in other pests like *Lobesia botrana* and *Drosophila melanogaster* (Tasin et al., 2011; Dweck et al., 2013). However, in *E. amygdali*, the compounds responsible for stimulating oviposition have not yet been identified. Additionally, it is unknown whether these compounds are detected through olfaction or taste.

All of the tested VOCs in behavior were ubiquitous and found in numerous plant species. However, some compounds, such as linalool, can have a repellent or attractive effect depending on the species (Borg-Karlson et al., 2002; Kheloul et al., 2019). While the most emitted VOCs by the almond tree are terpenoids, the VOCs that demonstrated attractiveness are primarily fatty acid derivatives and benzoids. The most attractive VOCs were predominantly emitted from leaves and fruits, with the exception of benzaldehyde, which is primarily emitted by flowers. Interestingly, we also detected benzaldehyde in leaf emissions. This observation might explain the wasps' attraction to flowers, as benzaldehyde alone was not attractive, but when included in a mixture, it exhibited attractiveness.

However, due to the very short flowering period, we were unable to assess the impact of flowers on behavior. Given that certain VOCs have floral origins and previous research by Kouloussis and Katsoyannos (1994) has shown attraction by flower extracts, it would indeed be valuable to investigate the attraction to flowers within our experimental setup. Indeed, this insight could help to refine the selection of compounds and their respective proportions. If both flowers and leaves exhibit attractiveness, it suggests that compounds shared by both sources might be worthwhile to investigate.

The second olfactometer enabled the identification of eight VOCs and two mixtures that exhibited attractiveness. While there were differences in the latency between the passage from chamber 1 to 2 and the passage from chamber 2 to 3, the attractive VOCs exhibited a consistent pattern overall. Thus, when considering all of our results, octanal, ethyl benzoate and (Z)-hex-3-enyl acetate at 10 µg emerge as the most interesting to retain. The ABCD mixture at 50 µg, comprising VOCs with the best EAG responses, was the most attractive mixture. The CE

mixture had lower attractiveness than ABCD but also a lower variability. However, the analysis of the wasp movement latency did not show attraction, unlike the ABCD mixture. These results suggest that the ABCD mixture at 50 µg should be tested in the field. However, octanal and (Z)-hex-3-enyl acetate at 10 µg were as attractive as the ABCD mixture at 50 µg. The attractiveness of VOCs was dose-dependent, and broadening the range of tested doses for both individual VOCs and mixtures could provide the opportunity to optimize their attractiveness.

A synergistic effect was observed in the VOC mixtures, as shown for the ABCD and ACDE mixtures. Specifically, when linalool was replaced by (*E*)-DMNT, which had shown stronger individual attraction, the mixture lost its attractiveness. This observation highlights the difficulty of making predictions, and the need to continue testing different mixtures.

The attractiveness of an odorant mixture depends on the nature of the compounds, their relative proportions, and the overall quantity of these compounds, as observed in other species such as *Maconellicoccus hirsutus* or Japanese beetle species (Wojtasek et al., 1998; Zhang et al., 2006). Therefore, it is imperative to persist in the study of behavior using the most attractive compounds already identified in mixtures with varying combinations and proportions. It is also important to evaluate mixtures consisting of, for instance, three compounds, as well as two compounds, in order to prevent the observation of redundant effects, and to avoid using mixtures containing unnecessary VOCs. This redundancy has already been shown in different species such as *L. botrana* (Tasin et al., 2007) and *Rhagoletis pomonella* (Nojima et al., 2003).

Our devices enabled us to observe attraction in response to VOCs but did not yield conclusive evidence of repellent effects. It would be valuable to explore female behavior in other olfactometers, such as the four-way olfactometer, to identify potential repellent compounds.

Apart from olfactory signals, visual signals may also play a role (Giurfa and Menzel, 1997). To our knowledge, no studies have investigated the role of visual cues in the behavior of wasps from the *Eurytoma* genus but in the Eurytomidae family, the behavior was influenced by colors (Kamm et al., 1991). Using VOCs for large-scale trapping presents a promising option that could yield effective results. Combining the kairomone-based trapping method with other approaches could indeed be a promising strategy to effectively limit infestation. Employing female sex pheromones combined with VOCs to attract males for long-term trapping could mitigate female numbers (Nehme et al., 2010; Barofio et al., 2018). Diverse species utilize long-range olfactory cues to locate an oviposition site and can act in synergy with non-volatile

contact compounds (Renwick and Radke, 1983; Braccini et al., 2015). Thus, identifying the anti-oviposition pheromone of *E. amygdali* that inhibits egg-laying should be considered.

Conclusion

E. amygdali females were detected and were attracted to ubiquitous VOCs emitted by almond trees. We identified three attractive VOCs at 10 µg each (octanal, ethyl benzoate, and (Z)-hex-3-enyl acetate), as well as a mixture containing benzaldehyde, linalool, ethyl benzoate, and (Z)-hex-3-enyl 2-methylbutanoate at 50 µg. While these VOCs hold promise for field testing, it is essential to continue olfactometry experiments to evaluate the attractiveness of additional mixtures.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest

Aknowledgement

We thank Matthieu Dacher for his help in the choice of statistical analysis methods.

References

- Addesso, K. M., and H. J. McAuslane. 2009. Pepper Weevil Attraction to Volatiles from Host and Nonhost Plants. *Environ Entomol.* 38: 216–224.
- Ameye, M., S. Allmann, J. Verwaeren, G. Smagghe, G. Haesaert, R. C. Schuurink, and K. Audenaert. 2018. Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis. *New Phytol.* 220: 666–683.
- Andersson, M. N., F. Schlyter, S. R. Hill, and T. Dekker. 2012. What Reaches the Antenna? How to Calibrate Odor Flux and Ligand-Receptor Affinities. *Chem Senses.* 37: 403–420.
- Arambourg Y., Fauvel G., and Chevin H. 1983. *Eurytoma amygdali* END. et sa présence en France, un nouveau chalcidien ravageur de l'amandier. *Protection du verger.* 358: 27–28.
- Arthidoro De Castro, M. B., L. C. Martinez, J. F. S. Cossolin, R. S. Serra, and J. E. Serrão. 2020. Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. *Chemosphere.* 248: 126075.
- Baroffio, C.A., Sigsgaard, L., Ahrenfeldt, E.J., Borg-Karlson, A.-K., Bruun, S.A., Cross, J.V., *et al.* (2018). Combining plant volatiles and pheromones to catch two insect pests in the same trap: Examples from two berry crops. *Crop Prot.* 109, 1–8.
- Nehme, M.E., Keena, M.A., Zhang, A., Baker, T.C., Xu, Z. & Hoover, K. (2010). Evaluating the Use of Male-Produced Pheromone Components and Plant Volatiles in Two Trap Designs to Monitor *Anoplophora glabripennis*. *Environ Entomol.* 39, 169–176.
- Barta T., Monsempès C., Demondion E., Chatterjee A., Kostal L., Lucas P. 2022. Stimulus duration encoding occurs early in the moth olfactory pathway. *bioRxiv*: 2022.2007.2021.501055. DOI: 10.1101/2022.07.21.501055
- Beck, J. J., B. S. Higbee, W. S. Gee, and K. Dragull. 2011. Ambient orchard volatiles from California almonds. *Phytochem Lett.* 4: 199–202.
- Beck, J. J., G. B. Merrill, B. S. Higbee, D. M. Light, and W. S. Gee. 2009. In Situ Seasonal Study of the Volatile Production of Almonds (*Prunus dulcis*) Var. 'Nonpareil' and Relationship to Navel Orangeworm. *J Agric Food Chem.* 57: 3749–3753.
- Bengtsson, M., Liljefors T., Hansson B. S., Löfstedt C., and Copaja S. V. 1990. Structure-activity relationships for chain-shortened analogs of (Z)-5-decenyl acetate, a pheromone component of the turnip moth, *Agrotis segetum*. *J Chem Ecol.* 16: 667–684.
- Biondi, A., V. Mommaerts, G. Smagghe, E. Viñuela, L. Zappalà, and N. Desneux. 2012. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods: Effects of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Manag Sci.* 68: 1523–1536.
- Borg-Karlson, A.-K., J. Tengö, I. Valterová, C.R. Unelius, T. Taghizadeh, T. Tolasch, *et al.* 2003. (S)-(+)-Linalool, a Mate Attractant Pheromone Component in the Bee *Colletes cunicularius*. *J Chem Ecol.* 29, 1–14.

- Boulton, R. A., and J. Field. 2022. Sensory plasticity in a socially plastic bee. *J Evol Biol.* 35: 1218–1228.
- Braccini, C. L., A. S. Vega, M. V. Coll Aráoz, P. E. Teal, T. Cerrillo, J. A. Zavala, and P. C. Fernandez. 2015. Both Volatiles and Cuticular Plant Compounds Determine Oviposition of the Willow Sawfly *Nematus oligospilus* on Leaves of *Salix* spp. (Salicaceae). *J Chem Ecol.* 41: 985–996.
- Brockerhoff, E. G., and Grant, G. G. 1999. Correction for Differences in Volatility among Olfactory Stimuli and effect on EAG Responses of *Dioryctria Abietivorella* to Plant Volatiles. *J Chem Ecol.* 25: 1353–1367.
- Bruce, T. J. A., and Pickett J. A. 2011. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – Finding the right mix. *Phytochem.* 72: 1605–1611.
- Castex, V., M. Beniston, P. Calanca, D. Fleury, and J. Moreau. 2018. Pest management under climate change: The importance of understanding tritrophic relations. *Sci Total Environ.* 616–617: 397–407.
- Chabaud, M.-A., J.-M. Devaud, M.-H. Pham-Delègue, T. Preat, and L. Kaiser. 2006. Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A.* 192: 1335–1348.
- Cometto-Muniz, J. E., Cain W. S., and Abraham M. H. 2003. Quantification of Chemical Vapors in Chemosensory Research. *Chem Senses.* 28: 467–477.
- Dicke, M., and I. T. Baldwin. 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the ‘cry for help’. *Trends Plant Sci.* 15: 167–175.
- Dicke, M., T. A. Van Beek, M. A. Posthumus, N. Ben Dom, H. Van Bokhoven, and A. De Groot. 1990. Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions Involvement of host plant in its production. *J Chem Ecol.* 16: 381–396.
- Dickens, J. C., J. W. Smith, and D. M. Light. 1993. Green leaf volatiles enhance sex attractant pheromone of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lep.: Noctuidae). *Chemoecology.* 4: 175–177.
- Dobson, H. E. M. 2006. “Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator,” in *Biology of Floral Scent*. (eds. N. Dudareva and E. Pichersky), Boca Raton, FL: CRC Press, 147–198
- Duval H., Millan M.M. Emergence dates of *Eurytoma amygdali* Enderlein adults in the south-east of France and control strategy. In: Zakynthinos G. (ed.). XIV GREMPA Meeting on Pistachios and Almonds. Zaragoza: CIHEAM / FAO / AUA / TEI Kalamatas / NAGREF, 2010. p. 175–180 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 94).
- Dweck, H. K. M., S. A. M. Ebrahim, S. Kromann, D. Bown, Y. Hillbur, S. Sachse, B. S. Hansson, and M. C. Stensmyr. 2013. Olfactory Preference for Egg Laying on Citrus Substrates in *Drosophila*. *Curr Biol.* 23: 2472–2480.

- Enderlein, G. 1907. *Eurytoma amygdali*, ein neuer Chalcidier aus Mandelkernen. (Hym.). *Z Hymenopt Dipt.* 7: 303–305.
- FAO. 2022. Agricultural production statistics. 2000-2021. FAOSTAT. [<https://www.fao.org/faostat/en/>]
- Gadenne, C., M. Renou, and L. Sreng. 1993. Hormonal control of pheromone responsiveness in the male black cutworm *Agrotis ipsilon*. *Experientia*. 49: 721–724.
- Gadenne, C., and S. Anton. 2000. Central processing of sex pheromone stimuli is differentially regulated by juvenile hormone in a male moth. *J Insect Physiol.* 46: 1195–1206.
- Gadenne, C., R. B. Barrozo, and S. Anton. 2016. Plasticity in Insect Olfaction: To Smell or Not to Smell? *Annu Rev Entomol.* 61: 317–333.
- Giurfa, M., and R. Menzel. 1997. Insect visual perception: complex abilities of simple nervous systems. *Curr Opin Neurobiol.* 7: 505–513.
- Glinwood, R., E. Ahmed, E. Qvarfordt, and V. Ninkovic. 2011. Olfactory learning of plant genotypes by a polyphagous insect predator. *Oecologia*. 166: 637–647.
- Greenwood, M., and R. F. Chapman. 1984. Differences in numbers of sensilla on the antennae of solitary and gregarious *Locusta migratoria* L. (Orthoptera: Acrididae). *Int J Insect Morphol Embryol.* 13: 295–301.
- Greiner, B. 2002. Central Processing of Plant Volatiles in *Agrotis ipsilon* Males is Age-independent in Contrast to Sex Pheromone Processing. *Chem Senses*. 27: 45–48.
- Groh, C., and I. A. Meinertzhagen. 2010. Brain plasticity in Diptera and Hymenoptera. *Front Biosci.* S2: 268–288.
- Guenther, A. 1997. Seasonal and spatial variations in natural volatile organic compound emissions. *Ecol Appl.* 7: 34–35.
- Guerrieri, F., C. Gemenio, C. Monsempes, S. Anton, E. Jacquin-Joly, P. Lucas, and J.-M. Devaud. 2012. Experience-dependent modulation of antennal sensitivity and input to antennal lobes in male moths (*Spodoptera littoralis*) pre-exposed to sex pheromone. *J Exp Biol.* 215: 2334–2341.
- Hansson, B. S., M. C. Larsson, and W. S. Leal. 1999. Green leaf volatile-detecting olfactory receptor neurones display very high sensitivity and specificity in a scarab beetle. *Physiol Entomol.* 24: 121–126.
- Holland, J. N., and T. H. Fleming. 1999. Mutualistic Interactions Between *Upiga virescens* (Pyrilidae), a Pollinating Seed-Consumer, and *Lophocereus schottii* (Cactaceae). *Ecology*. 80: 2074–2084.
- Hu, C., Liu J.-Y., Wang W., Mota-Sanchez D., He S., Shi Y., and Yang X.-Q. 2022. Glutathione S -Transferase Genes are Involved in *Lambda* -Cyhalothrin Resistance in *Cydia pomonella* via Sequestration. *J Agric Food Chem.* 70: 2265–2279.

- Jones, A. C., Cofer, T. M., Engelberth J., and Tumlinson J. H. 2022. Herbivorous Caterpillars and the Green Leaf Volatile (GLV) Quandary. *J Chem Ecol.* 48: 337–345.
- Kamm, J. A., C. E. Fairchild, W. E. Gavin, and T. M. Cooper. 1992. Influence of celestial light on visual and olfactory behavior of seed chalcids (Hymenoptera: Eurytomidae). *J Insect Behav.* 5: 273–287.
- Kheloul, L., A. Kellouche, D. Bréard, M. Gay, C. Gadenne, and S. Anton. 2019. Trade-off between attraction to aggregation pheromones and repellent effects of spike lavender essential oil and its main constituent linalool in the flour beetle *Tribolium confusum*. *Entomol Exp Appl*, 167, 826–834.
- Knight, A. L., and D. M. Light. 2001. Attractants from Bartlett pear for codling moth, *Cydia pomonella* (L.), larvae. *Naturwissenschaften.* 88: 339–342.
- Knudsen, J. T., R. Eriksson, J. Gershenzon, and B. Ståhl. 2006. Diversity and Distribution of Floral Scent. *Bot Rev.* 72: 1–120.
- Kouloussis, N. A., and B. I. Katsoyannos. 1991. Host discrimination and evidence for a host marking pheromone in the almond seed wasp, *Eurytoma amygdali*. *Entomol Exp Appl.* 58: 165–174.
- Kouloussis, N. A., and B. I. Katsoyannos. 1994. Adult response of the almond seed wasp, *Eurytoma amygdali*, to chemicals from its host and certain nonhosts. *Entomol Exp Appl.* 73: 211–220.
- Krasnoff, S. B., and D. E. Dussourd. 1989. Dihydropyrrolizine attractants for arctiid moths that visit plants containing pyrrolizidine alkaloids. *J Chem Ecol.* 15: 47–60.
- Krishnan, B., S. E. Dryer, and P. E. Hardin. 1999. Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature.* 400: 376–378.
- Krokos, F. D., M. A. Konstantopoulou, and B. E. Mazomenos. 2001. Alkadienes and Alkenes, Sex Pheromone Components of the Almond Seed Wasp. *J Chem Ecol.* 27: 2169–2181
- Leconte A., Barthes N., Buatois B., Coutagne E., Duval H., Lucas P., Staudt M. (2023). Volatile organic compound emissions from almond shoots during spring — dissociation between reproductive and vegetative organs. *C. R. Chimie Online first*:1-16. DOI: 10.5802/crchim.241
- Margaritopoulos, J. T., and M. E. Tzanakakis. 2006. Diapause completion in the almond seed wasp, *Eurytoma amygdali* (Hymenoptera: Eurytomidae) following early low temperature treatment. *Eur J Entomol.* 103: 733–742.
- Martel, V., P. Anderson, B. S. Hansson, and F. Schlyter. 2009. Peripheral modulation of olfaction by physiological state in the Egyptian leaf worm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Insect Physiol.* 55: 793–797.
- Mayer MS. 1993. Responses of three antennal specialist neurons of male *Trichoplusia ni* (Hübner) to sex pheromone components at and above naturally emitted levels. *J Insect Physiol.* 39: 401–412.

- Mazomenos, B. E., C. G. Athanassiou, N. Kavallieratos, and P. Milonas. 2004. Evaluation of the Major Female *Eurytoma amygdali* Sex Pheromone Components, (Z,Z)-6,9 Tricosadiene and (Z,Z)-6,9-Pentacosadiene for Male Attraction in Field Tests. *J Chem Ecol.* 30: 1245–1255.
- Mechaber, W. L., C. T. Capaldo, and J. G. Hildebrand. 2002. Behavioral responses of adult female tobacco hornworms, *Manduca sexta*, to hostplant volatiles change with age and mating status. *J Insect Sci.* 2: 1–8.
- Mentjelos, J., and A. Atjemis. 1970. Studies on the Biology and Control of *Eurytoma amygdali* in Greece. *J Econ Entomol.* 63: 1934–1936.
- Moldero, D., Á. López-Bernal, L. Testi, I. J. Lorite, E. Fereres, and F. Orgaz. 2022. Almond responses to a single season of severe irrigation water restrictions. *Irrig Sci.* 40: 1–11.
- Najar-Rodriguez, A. J., Galizia C. G., Stierle J., and Dorn. S. 2010. Behavioral and neurophysiological responses of an insect to changing ratios of constituents in host plant derived volatile mixtures. *J Exp Biol.* 213: 3388–3397.
- Nojima, S., C. Linn, B. Morris, A. Zhang, and W. Roelofs. 2003. Identification of host fruit volatiles. *J Chem Ecol.* 29: 321–336.
- Plaut, H. N. 1971. On the biology of the adult of the almond wasp, *Eurytoma amygdali* End. (Hym., Eurytomidae), in Israel. *Bull Entomol Res.* 61: 275–281.
- Plaut, H. N. 1972. On the biology of the immature stages of the almond wasp, *Eurytoma amygdali* End. (Hym. Eurytomidae) in Israel. *Bull Entomol Res.* 61: 681–687.
- Plaut, H. N., and F. Mansour. 1973. Studies of the behaviour, dispersal, and damage potential of the almond wasp, *Eurytoma amygdali*. *Entomol Exp App.* 16: 415–421.
- Raguso, R. A. 2016. More lessons from linalool: insights gained from a ubiquitous floral volatile. *Curr Opin Plant Biol.* 32: 31–36.
- Ranger, C. M., P. C. Tobin, and M. E. Reding. 2014. Ubiquitous volatile compound facilitates efficient host location by a non-native ambrosia beetle. *Biol Invasions.* 17: 675–686.
- Renwick, J. A. A., and C. D. Radke. 1983. Chemical Recognition of Host Plants for Oviposition by the Cabbage Butterfly, *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *Environ Entomol.* 12: 446–450.
- Skendžić, S., M. Zovko, I. P. Živković, V. Lešić, and D. Lemić. 2021. The Impact of Climate Change on Agricultural Insect Pests. *Insects.* 12: 1-31.
- Socias i Company R., José M. Ansón J.M. & Espiau M.T. 2017. Taxonomy, Botany and Physiology. In Botany, Production and Uses, pp.33-122. Boston, MA: CABI.
- Talhok, A. S. 1977. Contributions to the knowledge of almond pests in East Mediterranean countries. *Z Angew Entomol.* 83: 145–154.
- Tasin, M., A.-C. Bäckman, M. Coracini, D. Casado, C. Ioriatti, and P. Witzgall. 2007. Synergism and redundancy in a plant volatile blend attracting grapevine moth females. *Phytochem.* 68: 203–209.

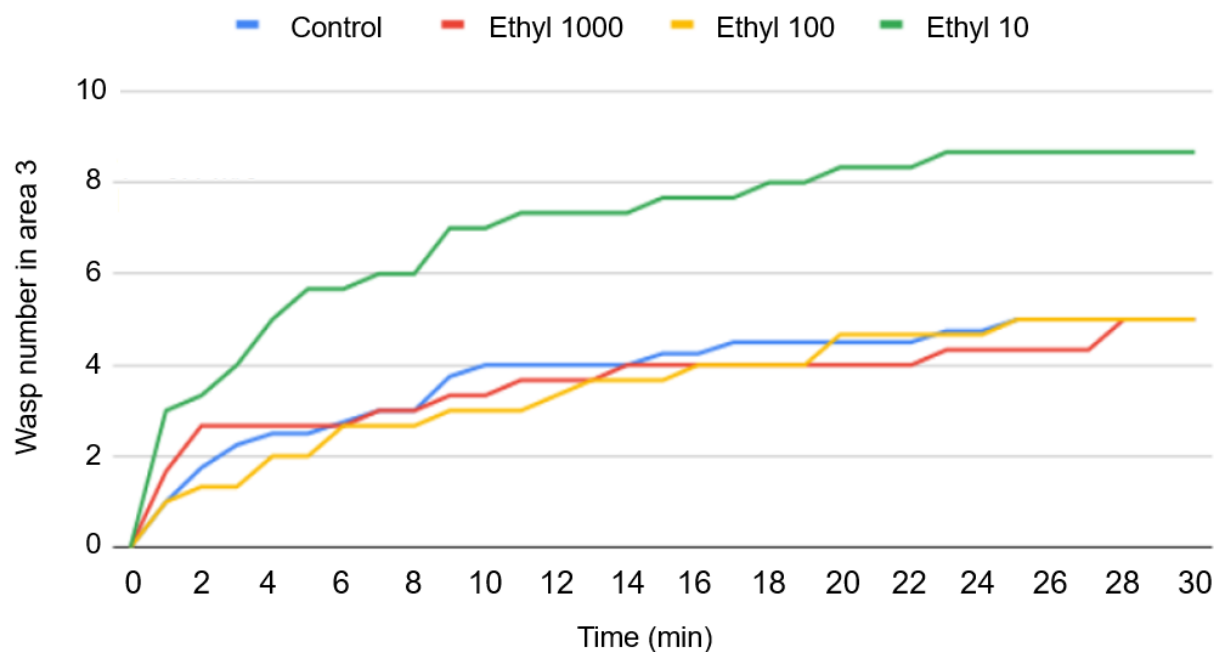
- Tasin, M., A. Lucchi, C. Ioriatti, M. Mraihi, A. De Cristofaro, Z. Boger, and G. Anfora. 2011. Oviposition Response of the Moth *Lobesia botrana* to Sensory Cues from a Host Plant. *Chem Senses*. 36: 633–639.
- Turlings, T. C. J., and M. Erb. 2018. Tritrophic Interactions Mediated by Herbivore-Induced Plant Volatiles: Mechanisms, Ecological Relevance, and Application Potential. *Annu Rev Entomol*. 63: 433–452.
- Tzanakakis, M. E., and A. Veerman. 1994. Effect of temperature on the termination of diapause in the univoltine almond seed wasp *Eurytoma amygdali*. *Entomol Exp Appl*. 70: 27–39.
- Visser, J. H., and D. A. Avé. 1978. General Green Leaf Volatiles in the Olfactory Orientation of the Colorado Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomol Exp Appl*. 24: 738–749.
- Webster, B., T. Bruce, J. Pickett, and J. Hardie. 2008. Olfactory recognition of host plants in the absence of host-specific volatile compounds: Host location in the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Commun Integr Biol*. 1: 167–169.
- Whitman, D. W., and Eller, F. J. 1990. Parasitic wasps orient to green leaf volatiles. *Chemoecology*. 1: 69–76.
- Witzgall, P., L. Ansebo, Z. Yang, G. Angeli, B. Sauphanor, and M. Bengtsson. 2005. Plant volatiles affect oviposition by codling moths. *Chemoecology*. 15: 77–83.
- Wojtasek, H., B. S. Hansson, and W. S. Leal. 1998. Attracted or Repelled? A Matter of Two Neurons, One Pheromone Binding Protein, and a Chiral Center. *BBRC*. 250: 217–222.
- Wright, G. A., and F. P. Schiestl. 2009. The evolution of floral scent: the influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards. *Funct Ecol*. 23: 841–851.
- Wright, G. A., Lutmerding, A., Dudareva N., and Smith B. H. 2005. Intensity and the ratios of compounds in the scent of snapdragon flowers affect scent discrimination by honeybees (*Apis mellifera*). *J Comp Physiol A*. 191: 105–114.
- Yang, C. Y., K. Mori, J. Kim, and K. B. Kwon. 2020. Identification and field bioassays of the sex pheromone of *Eurytoma maslovskii* (Hymenoptera: Eurytomidae). *Sci Rep*. 10: 10281.
- Zerova M.D. and Fursov V.N. 1991. The Palearctic species of *Eurytoma* (Hymenoptera: Eurytomidae) developing in stone fruits (Rosaceae: Prunoideae). *Bull Entomol Res*. 81: 209–219.
- Zhang, A. 2006. Olfactory Discrimination among Sex Pheromone Stereoisomers: Chirality Recognition by Pink Hibiscus Mealybug Males. *Chem Senses*. 31: 621–626.
- Zhou, S., and G. Jander. 2022. Molecular ecology of plant volatiles in interactions with insect herbivores. *J Exp Bot*. 73: 449–462.

Supplemental Table S1: synthetic VOCs used in EAG.

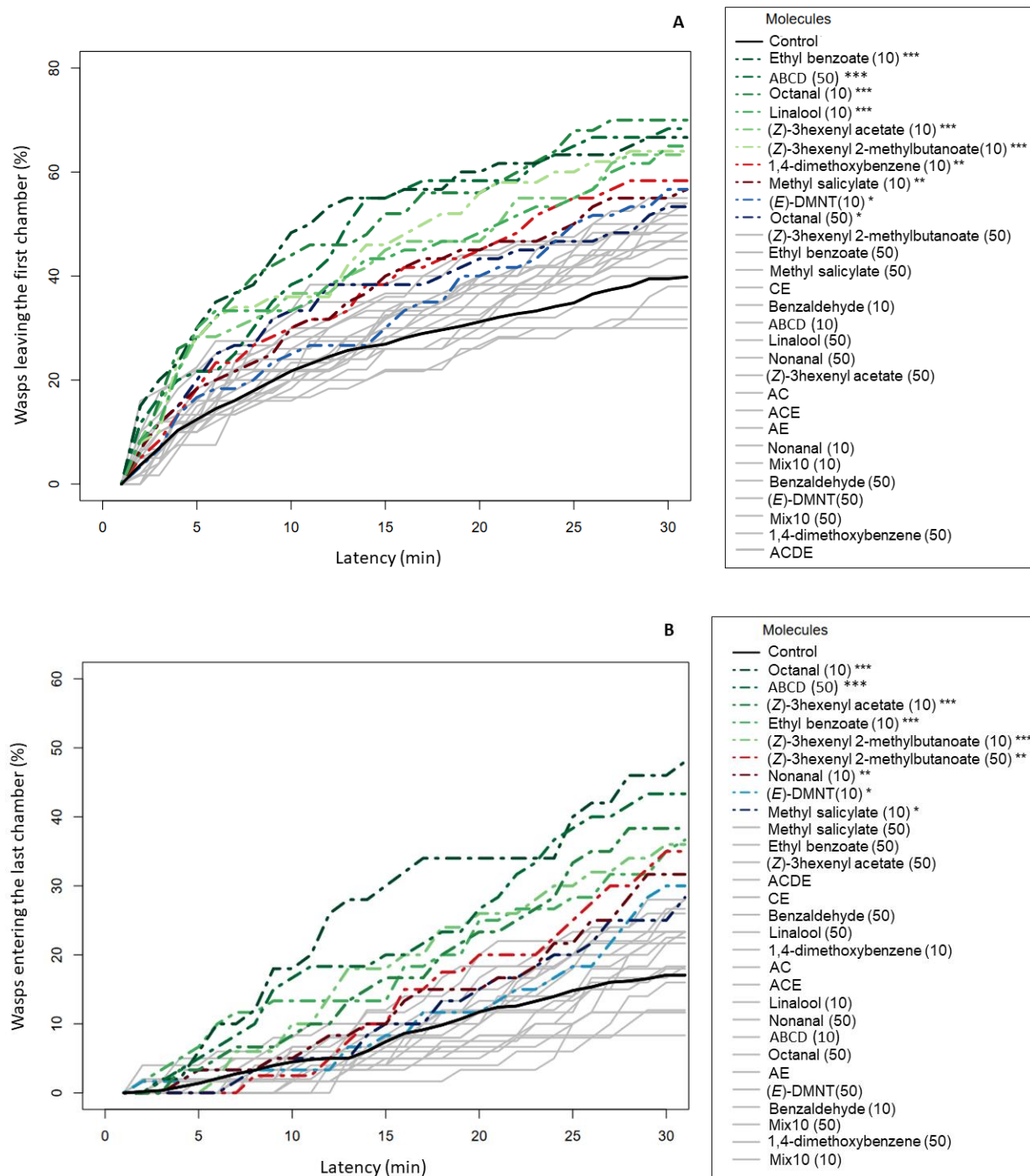
VOC	Molecular weight	CAS	Supplier	Purity (%)
nonanal	142.24	124-19-6	Sigma-Aldrich	95
linalool	154.25	78-70-6	Sigma-Aldrich	97
methyl salicylate	152.15	119-36-8	Sigma-Aldrich	NA
(Z)-hex-3-enyl-2-methylbutanoate	184.27	53398-85-9	Sigma-Aldrich	≥97
1,4-dimethoxybenzene	138.16	150-78-7	Aldrich	99
cadinene ¹	204.35	mixture of isomeres	NA	NA
6-methyl-5-hepten-2-ol	128.21	1569-60-4	Sigma-Aldrich	≥98
(Z)-hex-3-enyl acetate	142.20	3681-71-8	Sigma-Aldrich	≥98
(E)-hex-3-enyl acetate	142.20	3681-82-1	Sigma-Aldrich	≥95
(R)- α -phellandrene	204.35	4221-98-1	Fluka	50
1,4-cineole	154.25	470-67-7	Sigma-Aldrich	95
benzaldehyde	106.12	100-52-7	SAFC	≥98
p-methyl anisole	122.16	104-93-8	Aldrich	NA
(Z)-DMNT	150.26	21214-62-0	Pherobank	>97
(E)-DMNT	150.26	19945-61-0	Pherobank	>97
α -copaene ¹	204.35	3856-25-5	NA	NA
β -caryophyllene	204.35	87-44-5	Sigma-Aldrich	≥80
(E)- β -ocimene	136.23	3779-61-1	Sigma-Aldrich	≥90
ethyl tiglate	128.17	5837-78-5	Lancaster	98
(E)-hex-3-en-1-ol	100.16	544-12-7	Sigma-Aldrich	98
(Z)-hex-3-en-1-ol	100.16	928-96-1	Sigma-Aldrich	>98
(E)-2-hexenal	98.14	6728-26-3	Aldrich	98
farnesene	204.35	mixture isomere	SAFC	NA
geranyl acetone	194.31	3796-70-1	Fluka	≥98
β -farnesene	204.35	18794-84-8	Chemtech BV	NA
(R)-(+)-limonene	136.23	5989-27-5	Sigma-Aldrich	>96
(S)-(-)-limonene	136.23	5989-54-8	Sigma-Aldrich	>96
Myrcene	136.23	123-35-3	Aldrich	NA
1,8-cineole	154.25	470-82-6	NA	NA
ethyl isovalerate	130.18	108-64-5	Aldrich	98
p-cymene	134.21	99-87-6	Sigma-Aldrich	99
(-)- α -gurjunene ¹	204.35	489-40-7	Fluka	97
3-carene	136.23	13466-78-9	Fluka	≥90
α -humulene	204.35	6753-98-6	Aldrich	96
(+)-aromadendrene	204.35	489-39-4	Aldrich	≥98
farnesane	212.41	3891-98-3	Aldrich	NA
methyl isovalerate	116.16	556-24-1	Sigma-Aldrich	≥98
α -pinene	136.23	80-56-8	Aldrich	98
camphene	136.23	79-92-5	Sigma-Aldrich	95

¹ VOC not available pure, existing in dilution in hexane² DMNT: 4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatriene

Supplemental Figure S1: Monitoring the latency of the wasps passing from chamber 2 to 3 for the selection of doses to be used for behavioral tests, using calibration with ethyl benzoate at 10, 100 and 1000 μg (N=30). Ethyl benzoate at 10 μg (green line) is the only dose significantly different from the control (blue line).



Supplemental Figure S2: Monitoring the latency of wasps passing from chamber 1 to 2 (A) and wasps passing from chamber 2 to 3 (B). Control is the black line, non-significant VOCs are the grey lines, and significant VOCs are the dotted lines. The VOCs are ranked in decreasing order of significance. Abbreviations: ABCD: benzaldehyde, linalool, ethyl benzoate and (Z)-hex-3-enyl acetate 2-methylbutanoate; ACDE: benzaldehyde, ethyl benzoate, (Z)-hex-3-enyl acetate 2-methylbutanoate and (E)-DMNT; Mix10: mixture of 10 VOCs; ACE: benzaldehyde, ethyl benzoate and (E)-DMNT; AC: benzaldehyde/ethyl benzoate; AE: benzaldehyde/(E)-DMNT; CE: ethyl benzoate/(E)-DMNT.



3.3 CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE – ELECTROANTENNODETECTION

INTRODUCTION

Nous avons précédemment utilisé l'EAG pour évaluer la capacité des femelles *E. amygdali* à détecter des COVP connus. La GC-EAD (Figure 23) couple la chromatographie en phase gazeuse (GC) pour la séparation de composés présents dans un mélange, avec la détection par EAG (EAD). Après la séparation des constituants du mélange dans la colonne du GC, le flux est divisé en deux, une partie est dirigée vers l'antenne de l'insecte et l'autre vers le détecteur à ionisation de flamme (FID). Le signal FID doit être amplifié avant d'être acquis et numérisé en parallèle du signal EAG. Cette méthode permet de tester sans a priori la détection de COVP présents dans un mélange, et de connaître approximativement la dose délivrée à l'antenne. Un autres des avantages de la GC-EAD est de pouvoir déterminer l'effet d'impuretés qui peuvent altérer les réponses des NRO (Paoli et al., 2017). L'objectif de l'utilisation de la GC-EAD serait d'identifier dans des huiles essentielles des COVP détectés, notamment des composés que nous n'avons pas trouvés dans le commerce.

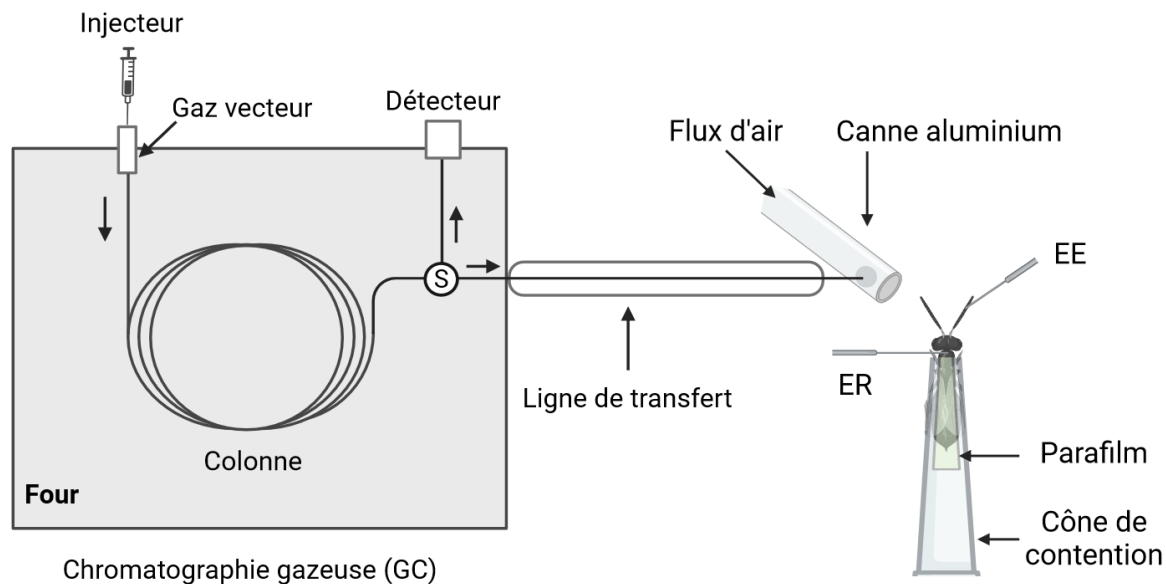


Figure 23 : Principe de la GC-EAD. EE : électrode d'enregistrement, ER : électrode de référence, S : Deans switch. Les composés sont séparés dans la colonne, une fraction allant au détecteur et l'autre à l'antenne (flèche noire).

MATERIEL ET METHODE

Les insectes ne sont pas sensibles aux concentrations des odeurs mais aux taux de changement des concentrations (Marion-Poll et Thiéry, 1996). Pour éviter une adaptation de l'insecte à une odeur et obtenir une bonne réponse EAG, il est nécessaire d'avoir une dynamique de stimulation rapide. Pour obtenir cette dynamique, il a été montré que moduler le signal permet d'augmenter les réponses EAG (Gouinguéné et al., 1998). C'est pourquoi une électrovanne pneumatique a été ajoutée (Deans switch, Figure 23). Nous avons adapté son fonctionnement selon Myrick et Baker (2018) pour la faire fonctionner à une fréquence de 1 Hz, c'est-à-dire que les analytes sont envoyés 500 ms vers le FID, 500 ms vers l'insecte. La fréquence d'échantillonnage est de 500 Hz.

Pour le traitement des réponses, nous avons utilisé la transformation en ondelette de Morlet à une dimension (R, package Rwave). Cette transformation permet de démoduler le signal en définissant l'échelle comme le rapport de la fréquence d'échantillonnage (500 Hz) sur la fréquence du Deans' switch (1 Hz). La fréquence de l'ondelette prend pour valeur la fréquence d'oscillation ($2\pi\omega_0$). Ce traitement améliore le rapport signal/bruit.

Nous avons utilisé deux types de cannes d'aluminium pour délivrer les COVP vers l'insecte. Le diamètre interne de la première canne était de 3 mm avec un trou de 2 mm situé à 10 mm de l'extrémité de sortie d'air. Le diamètre interne de la deuxième canne était de 2 mm avec un trou d'entrée de 1 mm également situé à 10 mm de l'extrémité. Après chaque test la canne était changée. Les cannes étaient nettoyées dans une étuve à 80 °C avec un flux d'air permanent les traversant. Pour étudier la détection des COVP par GC-EAD, nous avons utilisé le même dispositif qu'en EAG. Les femelles étaient âgées de 2 à 4 jours. Les composés ont été dilués dans l'hexane. Nous avons testé un mélange avec les dix COVP déclenchant les meilleures réponses au 1^{er} screening EAG à des dilutions à 0,1 ; 1 et 10 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. Le nonanal et le (Z)-hex-3-en-yl acetate ont été testés comme contrôle positif à 1 et 10 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$.

RESULTATS ET DISCUSSION

Aucune réponse n'a été obtenue pour le mélange de 10 COVP, ainsi que pour le (Z)-hex-3-en-yl acetate avec la première canne en GC-EAD. Avec le second dispositif, nous avons observé une réponse pour le nonanal à 1 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ (N=3) et pour le (Z)-hex-3-en-yl acetate à 10 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ (Figure 24). Cependant, seules deux femelles sur trois ont répondu au nonanal, et

une sur quatre au (Z)-hex-3-en-yl acetate. Ces expériences ont montré que le dispositif avec la deuxième canne fonctionne. Ces réponses ont été enregistrées chez des femelles à la fin du mois de mai, ce qui représente une période tardive en termes d'émergence. A partir de cette période, les femelles présentent une mortalité élevée, avec une espérance de vie inférieure à une semaine. En réalisant des enregistrements lors de la période optimale des femelles *E. amygdali* (de février à début mai), il est probable que les réponses soient plus fortes et présentent moins de variabilité interindividuelle.

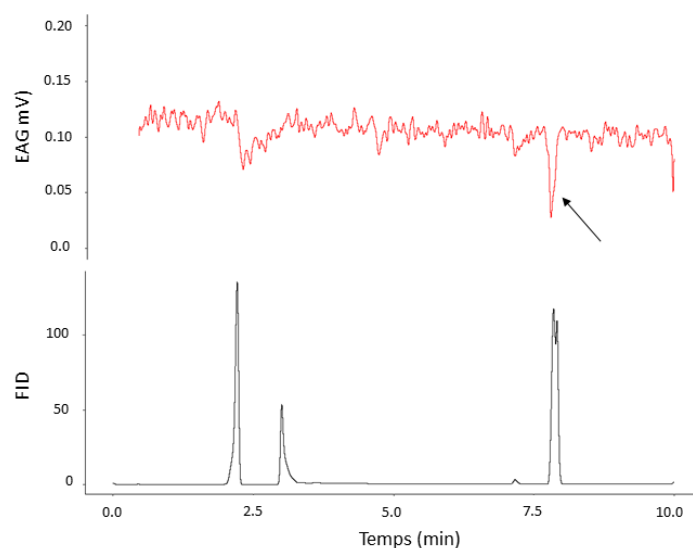


Figure 24 : Réponse au (Z)-hex-3-en-yl acetate à 10^{-2} en GC-EAD (flèche noire) après amélioration du ratio signal/bruit (N=4). Les deux premiers pics du signal FID (en bas) correspondent à l'hexane. La présence de deux pics au lieu d'un est liée à un biais de démodulation du signal qui remet la ligne de base à zéro lorsque le signal arrive à saturation.

Il est plausible que le dispositif avec la première canne n'ait pas donné de résultats probants en raison de son diamètre plus important. En effet, en réduisant le diamètre de la canne, le flux d'air est mieux focalisé vers l'antenne, ce qui limite la dilution des COVP. De plus, cela permet d'avoir une surface d'adsorption réduite, ce qui permet une meilleure dynamique de stimulation. Malheureusement, nous avons été limités dans le nombre de COVP que nous avons pu tester en raison de la fin de la période de disponibilité des insectes et problèmes techniques qui ont empêché l'utilisation du GC-EAD.

CONCLUSION

Bien que l'utilisation de la GC-EAD ait été limitée, nos expériences ont permis d'ajuster le dispositif à notre modèle. Par la suite, l'utilisation de la GC-EAD pourra permettre de tester

la détection de composés en mélanges et ne pas perdre de temps à tester par EAG des COVP qui ne seraient pas détectés la guêpe. De plus, les composés qui n'étaient pas disponibles dans le commerce mais qui pourraient être présents dans des huiles essentielles pourront être testés. Ces composés pourraient par ailleurs avoir un effet répulsif ou masquant.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET BILAN GENERAL

Mes travaux de thèse ont permis de répondre à une partie des objectifs prévus initialement (Figure 25) qui consistaient à :

- Identifier et quantifier les COVP émis par des amandiers.
- Tester la détection de ces composés par les femelles *E. amygdali*.
- Tester l'attractivité des COVP seuls et en mélange par olfactométrie.

Toutefois, pour trouver le mélange optimal, des études supplémentaires seront nécessaires.

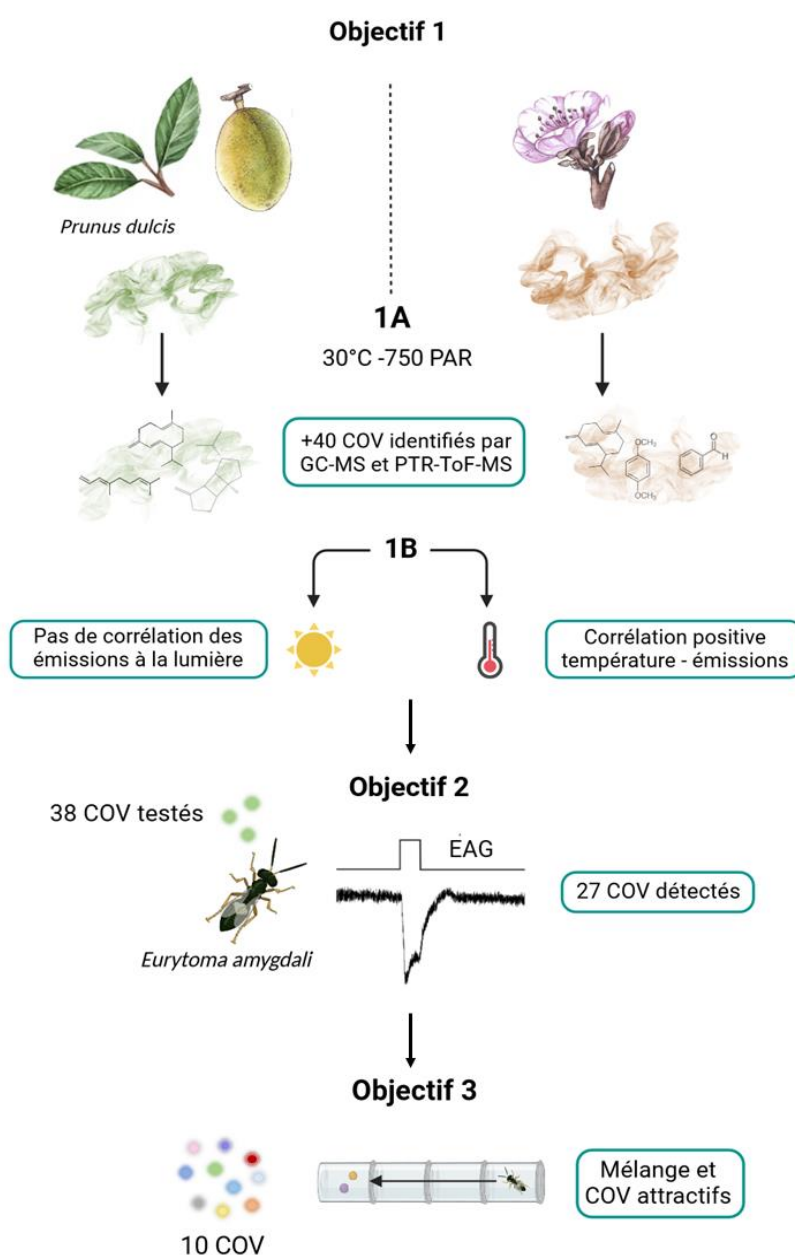


Figure 25 : Schéma des objectifs et résultats de la thèse

4.1 EMISSIONS DE COV D'AMANDIERS AU PRINTEMPS

Notre étude a eu pour premier objectif de caractériser les émissions de COVP chez les amandiers, et ce, en vue d'explorer leur détection par les femelles *E. amygdali*, ainsi que leur potentielle attractivité. Nous avons identifié et quantifié 40 COVP en conditions environnementales contrôlées, en distinguant ceux émis par les fleurs de ceux émis par les feuilles et les fruits au printemps. Nous avons également identifié des composés supplémentaires provenant d'amandes détachées. En effet, il était difficile de discriminer les composés émis par les feuilles de ceux émis par les fruits, bien que les émissions puissent être biaisées en créant une blessure mécanique lors du détachement de l'amande. Il est notable que la majorité des composés identifiés sont ubiquistes, tels que le benzaldehyde et le 1,4-dimethoxybenzene émis par les fleurs, ainsi que les nombreux sesquiterpènes retrouvés dans les émissions foliaires. Ces composés sont également émis par d'autres espèces de *Prunus* (Winer et al., 1992 ; Beck et al., 2008 ; Najar-Rodriguez et al., 2013), et de Rosaceae (Ferreira et al ; 2009).

Le suivi de la cinétique des émissions a révélé une corrélation positive entre la température et les émissions d'amandiers, mais pas entre la lumière et les émissions. Ces résultats n'ont jamais été obtenus auparavant pour *P. dulcis*, et à notre connaissance, quasiment aucune étude n'a été publiée chez les *Prunus*. Récemment, l'étude de Ahn *et al.* (2022) a montré que les émissions de monoterpènes chez *P. sargentii* sont affectées par la température et la lumière, mais qu'il n'y avait pas d'effet clairement défini sur les émissions d'isoprène. De nombreuses études se sont intéressées aux effets des facteurs abiotiques et biotiques sur les émissions de COVP constitutifs, et quelques unes sur les HIPV (Gouinguéné et Turlings, 2002 ; Peñuelas et Staudt, 2009). Ces recherches sont principalement focalisées sur l'effet de la lumière et de la température dans le cas des facteurs abiotiques, et sur l'herbivorie pour les facteurs biotiques. Il a également été montré que l'effet des facteurs pouvait varier selon les COVP (Holopainen et Gershenzon, 2010), ce que nous avons constaté par exemple pour les GLV qui n'étaient pas impactés par les variations de température.

La modélisation de l'influence des facteurs abiotiques sur la cinétique des émissions a surtout été réalisée sur des feuilles matures (par exemple Guenther et al., 1991), et reste très peu explorée pour les émissions provenant des fleurs, des fruits et des jeunes feuilles en développement. En observant la cinétique d'émission des feuilles d'amandiers matures, nous avons constaté une augmentation plus ou moins continue avec la température, sans influence

significative de la lumière. Selon les schémas décrits dans la littérature (figure 4 ; Laothawornkitkul et al., 2009), cela indique que l'amandier dispose de structures de stockage suffisamment grandes pour que les taux d'émission ne dépendent pas d'une biosynthèse dans les chloroplastes directement couplée à la photosynthèse (comme pour l'isoprène). Dans ce cas, la réponse positive à la température serait uniquement liée à une augmentation de la diffusion des COVP à partir des structures de stockage, due à une augmentation de leur pression de vapeur. Or, à notre connaissance, l'amandier ne possède pas de grandes structures de stockage des COVP, comme c'est le cas pour les plantes aromatiques ou les conifères. Une explication alternative serait que leur biosynthèse ait lieu dans des tissus non photosynthétiques ou dans des tissus "puits" en croissance. Dans ce cas, leur biosynthèse pourrait être découplée de la lumière et de la photosynthèse, car elle est soumise au stockage, à la mobilisation et à la distribution des produits photosynthétiques dans la plante. Cependant, cette hypothèse nécessite des études pour la confirmer.

Les émissions florales résultent d'une biosynthèse impliquant différents gènes (Qiao et al., 2021) exprimés dans des organes et des tissus spécifiques, regroupés sous le nom d'osmophore (Effmert et al., 2006). Ces émissions augmentent avec la température, et peuvent dépendre de la lumière selon les espèces (Hansted et al., 1994 ; Mulhemann et al., 2014). Nous n'avons pas pu étudier l'impact de la lumière sur la cinétique des émissions florales, en raison de la courte période de disponibilité du matériel végétal. Cependant, nos résultats ont confirmé l'augmentation des émissions avec la température. Bien que les émissions florales et foliaires soient largement décrites dans la littérature, les émissions de fruits restent moins étudiées (El Hadi et al., 2013 ; Aprea et al., 2015) et se focalisent principalement aux Tephritidae, les mouches des fruits (mouche du melon *Siderhusrt* et Jang, 2010 ; mouche de l'olive *Liscia* et al., 2013 ; Biasazin et al., 2018). Cela pourrait s'expliquer du fait que les études des émissions de fruits sont majoritairement liées à un besoin de développer des moyens de biocontrôle, et s'orientent souvent sur l'utilisation de phéromones sexuelles et non de COVP. Les prélèvements réalisés sur des rameaux n'ont pas permis de discriminer les émissions issues des fruits et des feuilles, nous n'avons donc pas pu investiguer l'effet de la température, la lumière et le rythme journalier sur les amandes. Une possibilité serait de retirer les feuilles au préalable étant donné qu'il y a peu de rameaux possédant uniquement des fruits. Cependant, cette méthode entrainerait un biais des émissions par la blessure mécanique causée et nécessiterait d'attendre la cicatrisation complète de la branche.

En plus de l'effet de la température, nous avons constaté une influence de la variété sur le profil

de COVP. Étant donné que tous nos arbres ont été infestés de manière similaire, cette piste n'a pas été explorée. Cependant, il serait intéressant d'examiner si de telles variations existent entre les variétés françaises et des variétés étrangères, afin de déterminer si les taux d'infestation diffèrent.

Cette première partie de la thèse a permis de valider et d'enrichir les connaissances portant sur les émissions de l'amandier. Notre étude fait partie des rares études à quantifier les émissions chez *P. dulcis*. En effet, l'étude menée par Nawade *et al.* (2019) se basait sur des composés retrouvés à partir de matériel végétal broyé. L'étude de Beck *et al.* (2008) utilisait des fibres SPME, qui ne permettent pas de quantifier les émissions. La comparaison entre les études sur les émissions de COVP n'est donc pas possible étant donné qu'il n'existe pas de méthode de quantification normalisée. En effet, les valeurs d'émissions peuvent être exprimées en fonction du poids frais, du poids sec ou de la surface de la plante. Il apparaît comme nécessaire de développer une unité de mesure commune afin de pouvoir comparer les émissions de plantes entre les différentes études. Au-delà des connaissances apportées, l'identification des COVP d'amandiers était une étape clé pour savoir quels composés pourraient être détectés par les guêpes et pourraient avoir une activité kairomonale. En étudiant la cinétique des émissions, nous souhaitons identifier les COVP qui pourraient être émis lorsque les femelles sont les plus actives en journée. Tous les composés organiques volatils à base de carbone (COVP) ont été émis indépendamment de la température et de l'exposition à la lumière. Cependant, les seules variations observées concernaient les quantités émises, et non la présence ou l'absence de certains COVP. Par conséquent, il n'a pas été possible de tirer des conclusions définitives sur l'identité des composés potentiellement les plus impliqués dans l'attraction des femelles, mais nous disposons de nombreux COVP à tester en électrophysiologie et en comportement.

4.2 DETECTION DES COVP PAR LES FEMELLES *E. AMYGDALI*

De nombreuses études ont répertorié la capacité des insectes à détecter des COVP ubiquistes. Jusqu'à présent, les recherches portant sur le comportement d'*E. amygdali* n'avaient pas exploré la nature des composés détectés et responsables de l'attraction. Les études sur les ravageurs sont largement répandues chez les Lépidoptères, et les Coléoptères, tandis que chez les Hyménoptères, ce sont principalement les insectes sociaux qui font l'objet de recherches approfondies. De plus, chez d'autres espèces d'Eurytomidae comme *Bephratelloides pomorum* (Leal et al., 1997) ou *E. maslovskii* (Yang et al., 2020) les études se concentrent sur la détection de phéromones sexuelles. Ainsi, pour la première fois nous avons identifié les COVP d'amandiers biologiquement actifs chez les femelles.

En raison de la courte disponibilité des insectes, le nombre de COVP à évaluer en comportement devait être réduit. Ainsi, nous avons testé 39 composés en EAG pour éliminer les composés qui ne seraient pas détectés. Tous les COVP identifiés dans la première partie de la thèse n'ont pas pu être testés, en raison de leur indisponibilité sur le marché, notamment certains sesquiterpènes communs considérés comme obsolètes. Etant donné que l'objectif est d'utiliser des pièges à coût abordable et facilement accessibles, synthétiser les COVP indisponibles n'a pas été envisagé en raison du coût élevé et du délai pour les obtenir. Les résultats de l'EAG ont mis en évidence la détection significative de 27 COVP parmi les 39 testés. Tester ces 27 composés individuellement et en différentes combinaisons n'était pas réalisable. Ainsi, nous avons réalisé un second screening EAG en ajustant les doses déposées en prenant en compte la volatilité de chaque composé pour avoir des doses délivrées équivalentes, permettant ainsi de mieux comparer les activités des COV testés. A notre connaissance, aucune étude auparavant n'a travaillé dans ces conditions en EAG. Ce screening nous a permis de sélectionner 10 COVP déclenchant les plus fortes réponses en EAG. Les composés détectés par *E. amygdali* sont tous des COVP ubiquistes et sont retrouvés chez plusieurs familles de plantes (Knudsen et al., 2006). Actuellement, aucune étude n'a été publiée sur la détection des COVP chez des espèces d'*Eurytoma*. Toutefois, au sein de la famille des Eurytomidae, *Bruchophagus roddi* est attiré par des COVP de plantes hôtes (le trèfle des prés et la luzerne cultivée) tels que des terpènes et des GLV (Light et al., 1991).

Parallèlement aux tests EAG, des essais en GC-EAD ont été réalisés pour étudier la détection des COVP en mélange, sans a priori. Cette méthode a été utilisée dans des recherches antérieures pour étudier la détection de COVP par des ravageurs, tels que le sphynx du tabac

ou la mouche de la carotte (Guerin et al., 1983 ; Fraser et al., 2003). Nos essais ont permis de mettre en place un dispositif fonctionnel qui pourra être utilisé pour tester des huiles essentielles ultérieurement. En effet, les huiles essentielles peuvent avoir un effet masquant ou répulsif et sont plus facilement autorisées que les COV de synthèse. De plus, nous n'avons pas la certitude que la sensibilité des insectes en GC-EAD soit suffisante pour obtenir des réponses à des collectes d'effluves, tandis que nous pouvons injecter les huiles essentielles à des concentrations plus élevées.

L'objectif serait de tester l'effet des huiles essentielles contenant des COVP d'intérêt sur le comportement des femelles et d'identifier les composés biologiquement actifs par GC-EAD (Tableau 2).

Tableau 2: liste des huiles essentielles (HE) constituées de COVP émis par les amandiers.

HE	Nom	COVP d'intérêt
Cyprès	<i>Cupressus sempervirens</i>	cadinene (α,δ,γ); germacrene D; Δ -3-carene
Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i>	(<i>E,E</i>)- α -farnesene; aciphyllene
Geranium	<i>Pelargonium graveolens</i>	β -bourbonene; α -copaene; (<i>Z</i>)-muurola-4(14),5-diene
Copaiba/baume de copahu	<i>Copaifera officinalis</i>	allo-aromadendrene; α -cubebene; cadinene; α -copaene; germacrene D; (<i>E</i>)- α -bergamotene; bicyclogermacrene
Giroflier	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Tests de répulsion en verger
Ylang ylang complète	<i>Cananga odorata var genuina</i>	Isomères de Muurola
Poivre noir	<i>Piper nigrum</i>	α -gurjunene; nombreux sesquiterpènes
Rhododendron	<i>Rhododendron anthopogon</i>	(<i>Z</i>)-Muurola-3,5-diene ; sesquiterpènes
Helichrysum splendidum	<i>Helichrysum splendidum</i>	Isomères de Muurola ; sesquiterpènes
Jasmin absolut	<i>Jasminum sambac</i>	Esters

En envisageant des perspectives futures, il serait intéressant de considérer les facteurs environnementaux qui pourraient influencer la perception olfactive des insectes. De plus, la caractérisation moléculaire approfondie des récepteurs olfactifs aux COVP chez *E. amygdali* pourrait contribuer à une compréhension plus approfondie des mécanismes sous-jacents à la détection olfactive chez cette espèce.

4.3 ATTRACTION DES FEMELLES PAR LES EMISSIONS D'AMANDIERS

Ce dernier axe de la thèse a montré pour la première fois l'attraction des femelles *E. amygdali* par des composés seuls et en mélange. Huit COVP ont montré une attractivité et trois d'entre eux semblent être de bons candidats pour être testés sur le terrain. Deux mélanges ont été identifiés comme attractifs mais le mélange ABCD à 50 µg, composé des COVP déclenchant les réponses les plus fortes en EAG, est le plus attractif. Bien que l'ethyl benzoate, le (Z)-hex-3-enyl acetate et l'octanal à 10 µg, ainsi que le mélange ABCD à 50 µg aient montré une attractivité significative, l'exploration de combinaisons alternatives est nécessaire pour identifier la composition optimale. De plus, il est important de tester différentes combinaisons par la suite pour éviter le phénomène de redondance et de concevoir un piège qui intègre uniquement des composés essentiels, minimisant ainsi les coûts associés. L'utilisation de COVP pour des pièges est encore relativement peu répandue, les préférences se tournant souvent vers les phéromones sexuelles. Toutefois, il convient de mentionner que cette approche a été adoptée avec succès chez la bruche de la féverolle par Agriodor, soulignant le potentiel de cette stratégie dans le domaine de la lutte antiparasitaire.

Pour s'assurer que les COVP soient bien des composés qui déclenchent une activité locomotrice orientée plutôt que de simples activateurs déclenchant un mouvement, nous pourrions placer les insectes dans une boîte en présence de l'odeur afin d'étudier le comportement déclenché.

Nous avons confirmé que les COVP issus des feuilles et des amandes étaient attractifs, contrairement à la littérature qui montre que les feuilles ne sont pas attractives. Parmi ces composés, nous avons montré que le benzaldehyde, un composé largement émis par les fleurs, était attractif en mélange, mais pas seul. Toutefois, nous n'avons pas la certitude que ce composé soit indispensable au mélange. Nous pouvons supposer que si les fleurs s'avèrent attractives, cela pourrait être dû à la présence de certains COVP qui seraient également émis par les feuilles et les amandes. Malheureusement, l'attractivité des fleurs n'a pas pu être évaluée en raison du faible nombre de fleurs produites par les amandiers, lié aux conditions météorologiques et à la courte période de floraison. Bien que l'émergence de nos guêpes ne coïncident pas avec la période de floraison, il serait intéressant de pouvoir tester l'attractivité des fleurs pour confirmer les résultats obtenus dans l'étude de Kouloussis et Katsoyannos (1994). En effet, si l'attraction des guêpes par les fleurs est confirmée, cela pourrait nous aider à mieux cibler le mélange optimal qui comprendrait probablement des COVP communs aux fleurs et aux feuilles.

Les essais menés avec différentes doses ont révélé que la dose de 10 µg semble adaptée aux tests d'olfactométrie de nos COVP, bien que nous ne puissions pas généraliser ce résultat à tous les composés. De plus, il est important de noter que l'ajustement des doses devra être réalisé sur le terrain, car les tests peuvent différer considérablement des expériences en laboratoire. En effet, les modifications quantitatives des COVP ubiquistes présents dans l'environnement peuvent interférer dans la détection et l'orientation des insectes vers une plante hôte (Conchou et al., 2019). Ainsi, la complexité du paysage olfactif pourrait impacter la détection et la perception du mélange kairomonal attractif par les guêpes.

Nous avons développé des olfactomètres linéaires facilement reproductibles, basés sur des modèles issus de la littérature. Cependant, nos dispositifs n'étaient pas conçus pour évaluer le pouvoir répulsif de nos composés. L'introduction d'autres types d'olfactomètres, tels que l'olfactomètre en Y ou à quatre voies (Giles et al., 1996 ; Camara Siqueira da Cunha et al., 2022), pourrait s'avérer judicieuse pour évaluer une potentielle répulsivité des COVP qui ont montré des valeurs d'attraction inférieures à celles du témoin dans nos analyses. De plus, ces dispositifs pourraient également permettre de tester d'éventuels composés actifs en GC-EAD issus d'huiles essentielles. En effet, l'utilisation de composés répulsifs pourrait se révéler pertinente dans le contexte d'une stratégie push-pull. À notre connaissance, une telle stratégie n'a jamais été implémentée pour des espèces d'*Eurytoma* ni pour d'autres membres de la superfamille des Chalcidoidea. Cependant, des études récentes portent sur des guêpes parasitoïdes, comme *Cotesia glomerata*, en vue de mettre en œuvre ce type de stratégie (Blažytė-Čereškienė et al., 2022).

En complément des expérimentations en laboratoire, la prédiction de ces mélanges pourrait être abordée par le biais d'une approche statistique appelée "mixture design" (Anderson et Whitcomb, 1998). Cette approche est utilisée dans divers domaines, allant de l'agroalimentaire (Santos et al., 2018) au développement de matériaux (Ghafari et al., 2015). Elle pourrait également être appliquée pour élaborer des mélanges optimaux à tester en olfactométrie (Zhang et al., 2021). Cependant, il est important de noter que cette méthode est initialement conçue pour des mélanges de trois composés.

Nos résultats ont montré que les COVP émis par les amandiers, principalement les composés foliaires, sont attractifs à distance, bien que cette distance de détection soit inconnue. Cependant, les composés impliqués dans l'acceptation du site de ponte restent inconnus et nous ne savons pas si les composés sont détectés par olfaction ou par gustation. Nous pouvons supposer que

les composés identifiés spécifiques de l'amande seraient impliqués dans cette acceptation. Toutefois, les phéromones anti-oviposition déposées lors de la ponte dans une amande jouent un rôle dans le choix des femelles et pourrait constituer une piste supplémentaire pour mettre en place une méthode de lutte biologique.

L'ensemble des COVP identifiés comme attractifs sont des composés communs retrouvés chez d'autres *Prunus* ainsi que d'autres familles de plantes. Or *E. amygdali* est un insecte spécialisé de l'amandier n'ayant aucun autre *Prunus* comme hôte. Identifier les COVP émis par les autres *Prunus*, notamment le pêcher *P. persica*, proche génétiquement de l'amandier (Velasco et al., 2016), pourrait être un indicateur des composés qui seraient présents uniquement chez *P. dulcis*. De plus, certains composés comme les lactones sont principalement présents chez le pêcher et l'abricotier (Mohammed et al., 2021). Il est probable que les COVP des plantes non hôtes jouent également un rôle dans l'orientation d'*E. amygdali* dans son environnement. Nous pourrions reproduire nos expériences d'olfactométrie en testant des parties de pêcher (feuilles, fruits) afin de voir si les femelles sont attirées ou non.

Pour conclure, à partir de l'ensemble de nos connaissances nous avons des pistes prometteuses pour poursuivre nos expérimentations et débiter des essais sur le terrain. Toutefois, des nombreuses autres connaissances pourraient s'avérer très pertinentes pour cibler au mieux les COVP impliqués dans l'orientation des femelles dans leur environnement.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces trois années de thèse ont permis d'identifier pour la première fois les COVP émis par les amandiers, responsables de l'attraction des femelles *E. amygdali*. Néanmoins, tous les composés identifiés n'ont pas pu être testés en électrophysiologie et en comportement. Ces travaux soulignent l'importance de continuer les investigations pour améliorer l'attractivité des COVP et de les tester dans les vergers.

Par la suite, les mélanges identifiés pourront être testés dans les vergers d'amandiers dans des pièges. Il existe néanmoins de nombreux facteurs et d'obstacles à prendre en compte. Nous avons réalisé toutes les expérimentations en laboratoire, dans des conditions contrôlées. Or, dans un verger, l'environnement olfactif est complexe, et les pièges diffusant le mélange attractif doivent être compétitifs avec l'odeurs des amandiers.

La stratégie de piégeage serait de retirer toutes les amandes infestées au sein du verger, qui restent sur les amandiers et sont reconnaissables par leur couleur noire. Ensuite, les pièges seraient disposés autour des vergers, afin que les guêpes n'atteignent pas les amandiers du verger sain. En effet, les amandiers sauvages sont un moyen de propagation. Il faut également s'assurer que les pièges sont spécifiques et ne capturent pas d'autres espèces. Un des moyens pour rendre les pièges plus spécifiques, l'emplacement et le diamètre du trou d'entrée sont deux paramètres à prendre en compte. L'objectif étant de développer des pièges compétitifs avec les amandiers, il est primordial de trouver le bon mélange avec les ratios précis et de les diffuser continuellement, avec par exemple des techniques d'encapsulation individuelle. Le coût et le nombre de pièges à utiliser par hectare sont un facteur économique majeur à prendre en compte pour les agriculteurs. Un obstacle peut également provenir du fait que pour réaliser les essais en vergers, certaines parcelles devront ne pas être traitées, risquant une perte de récolte. En dehors de l'efficacité du mélange de COVP, d'autres signaux peuvent intervenir, tels que des signaux visuels (couleur) ou la forme des pièges à utiliser, qui sont connus pour modifier l'attractivité dans les cultures de cacaoyer (Zhang et al., 2008). Il est également nécessaire de s'assurer que les pièges n'attirent pas des espèces non-ciblées, étant donné que les composés émis par les amandiers sont très communs.

L'efficacité des pièges n'atteint jamais 100 % (Jaffe et al., 2018 ; Morrison et al., 2018) et combiner les approches pourrait augmenter l'efficacité de biocontrôle. Dans notre cas, d'autres études sont réalisées en parallèle dans le cadre du projet LEVEAB (LEver les VErrous de

l'Agriculture Biologique), qui a pour objectif de réduire la pression exercée par *E. amygdali*. Ainsi, en plus du développement d'un piège attractif, des essais avec de l'argile et des huiles essentielles sont en cours. La phéromone anti-oviposition émise par les femelles lors de la ponte est également en cours d'identification. Il existe différents parasites naturels d'*E. amygdali*, dont *Adontomerus amygdali* (Hymenoptera, Torymidae) présent en Iraq et en Jordanie dont le taux de parasitisme n'atteint pas plus de 40% (Doğanlar et al., 2006 ; Abdul-Rassoul et Mohammed, 2017). Ces parasites pourraient être envisagés au Moyen-Orient où ce parasitoïde est naturellement présent, mais cette solution pourrait être plus difficile à développer en France puisqu'il s'agit d'introduire une espèce dans un écosystème où elle n'est pas présente. En effet, pour introduire un auxiliaire, il faut que celui-ci s'acclimate au nouvel environnement, n'impacte pas la biodiversité, et ce processus nécessite des autorisations¹.

Un facteur à prendre en compte est que l'utilisation de pesticides peut altérer l'efficacité des méthodes de biocontrôle. Par exemple lors de la prise alimentaire de parasitoïdes dans les champs de coton traités, l'interaction avec les insecticides réduit leur espérance de vie et modifie leur comportement (Stapel et al., 2000). Pour avoir une méthode de lutte avec une efficacité optimale, il est important de savoir exactement à quelle période la déployer (Pertot et al., 2016). Dans le cas d'*E. amygdali*, les périodes d'émergences sont bien connues des agriculteurs et permettront d'optimiser l'utilisation des pièges. Pour conclure, l'ensemble des résultats ont permis d'identifier pour la première fois les COVP émis par les amandiers qui sont détectés par les femelles *E. amygdali*, dont certains sont attractifs, seuls et en mélange. Ce projet nécessite d'être poursuivi pour optimiser l'efficacité en laboratoire, ainsi que de tester les composés attractifs sur le terrain.

¹ Arrêté du 28/06/12 relatif aux demandes d'autorisation d'entrée sur le territoire et d'introduction dans l'environnement de macro-organismes non indigènes utiles aux végétaux, notamment dans le cadre de la lutte biologique (consultable sur [Legifrance](#)).

Références

A

- Abdul-Rassoul, M. & Mohammed, S. (2017). First record of *Adontomerus amygdali* (Bouce, 1958) (Hymenoptera, Torymidae): a parasitoid of the almond fruit wasp, *Eurytoma amygdali* Enderlein, 1907 (Hymenoptera, Eurytomidae) in Erbil Province, Iraq. *Bull Iraq nat Hist Mus*, 14, 301–306.
- Abrieux, A., Mhamdi, A., Rabhi, K.K., Egon, J., Debernard, S., Duportets, L., *et al.* (2016). An Insecticide Further Enhances Experience-Dependent Increased Behavioural Responses to Sex Pheromone in a Pest Insect. *PLoS ONE*, 11, e0167469.
- Achhami, B.B., Reddy, G.V.P., Hofland, M.L., Sherman, J.D., Peterson, R.K.D. & Weaver, D.K. (2021). Plant Volatiles and Oviposition Behavior in the Selection of Barley Cultivars by Wheat Stem Sawfly (Hymenoptera: Cephidae). *Environ Entomol*, 50, 940–947.
- Ahn, J.-W., Dinh, T.-V., Park, S.-Y., Choi, I.-Y., Park, C.-R. & Son, Y.-S. (2022). Characteristics of biogenic volatile organic compounds emitted from major species of street trees and urban forests. *Atmos Pollut Res*, 13, 101470.
- Allmann, S. & Baldwin, I.T. (2010). Insects Betray Themselves in Nature to Predators by Rapid Isomerization of Green Leaf Volatiles. *Science*, 329, 1075–1078.
- Allmann, S., Späthe, A., Bisch-Knaden, S., Kallenbach, M., Reinecke, A., Sachse, S., *et al.* (2013). Feeding-induced rearrangement of green leaf volatiles reduces moth oviposition. *eLife*, 2, e00421.
- Ameye, M., Allmann, S., Verwaeren, J., Smagghe, G., Haesaert, G., Schuurink, R.C., *et al.* (2018). Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis. *New Phytol*, 220, 666–683. DOI: 10.1111/nph.14671
- Anderson, M.J. & Whitcomb, P.J. (1998). Find the Optimal Formulation for Mixtures. *Chem Eng Progr*, 94, 63–67.
- Andersson, M.N., Schlyter, F., Hill, S.R. & Dekker, T. (2012). What Reaches the Antenna? How to Calibrate Odor Flux and Ligand-Receptor Affinities. *Chemical Senses*, 37, 403–420.
- Anton S. & Homberg U. (1999). Antennal lobe structure. Insect olfaction. B.S. Hansson, Springer, Berlin: 97–124
- Anton, S. & Rössler, W. (2021). Plasticity and modulation of olfactory circuits in insects. *Cell Tissue Res*, 383, 149–164.
- Apra, E., Biasioli, F. & Gasperi, F. (2015). Volatile Compounds of Raspberry Fruit: From Analytical Methods to Biological Role and Sensory Impact. *Molecules*, 20, 2445–2474.
- Arambourg, Y., Fauvel, G. & Chevin, H. (1983). *Eurytoma amygdali* END. et sa présence en France, un nouveau chalcidien ravageur de l'amandier. *Protection du verger*, 358, 27–28.
- Arenas, A., Giurfa, M., Sandoz, J.C., Hourcade, B., Devaud, J.M. & Farina, W.M. (2012). Early olfactory experience induces structural changes in the primary olfactory center of an insect brain: Structural changes in the primary olfactory center. *Eur J Neurosci*, 35, 682–690.

Arimura, G., Tashiro, K., Kuhara, S., Nishioka, T., Ozawa, R. & Takabayashi, J. (2000). Gene Responses in Bean Leaves Induced by Herbivory and by Herbivore-Induced Volatiles. *BBRC*, 277, 305–310.

Arthidoro De Castro, M.B., Martinez, L.C., Cossolin, J.F.S., Serra, R.S. & Serrão, J.E. (2020). Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. *Chemosphere*, 248, 126075.

Ayelo, P.M., Pirk, C.W.W., Yusuf, A.A., Chailleux, A., Mohamed, S.A. & Deletre, E. (2021). Exploring the Kairomone-Based Foraging Behaviour of Natural Enemies to Enhance Biological Control: A Review. *Front Ecol Evol*, 9, 641974.

Azzouz, H., Giordanengo, P., Wäckers, F.L. & Kaiser, L. (2004). Effects of feeding frequency and sugar concentration on behavior and longevity of the adult aphid parasitoid: *Aphidius ervi* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae). *Biol Control*, 31, 445–452.

B

Bajwa, W.I. & Kogan, K. (2004). Cultural Practices: Springboard to IPM. In: *Integrated pest management: potential, constraints and challenges*. CABI Publishing, UK, 21–38.

Balcke, G.U., Bennewitz, S., Bergau, N., Athmer, B., Henning, A., Majovsky, P., *et al.* (2017). Multi-Omics of Tomato Glandular Trichomes Reveals Distinct Features of Central Carbon Metabolism Supporting High Productivity of Specialized Metabolites. *Plant Cell*, 29, 960–983.

Baraldi, R., Rapparini, F., Rossi, F., Latella, A. & Ciccoli, P. (1999). Volatile Organic Compound Emissions from Flowers of the Most Occurring and Economically Important Species of Fruit Trees. *Phys Chem Earth*, 24, 729–732.

Barbet-Massin, M., Salles, J.-M. & Courchamp, F. (2020). The economic cost of control of the invasive yellow-legged Asian hornet. *NeoBiota*, 55, 11–25.

Barragán-Fonseca, K.Y., Loon, J.J.A., Dicke, M. & Lucas-Barbosa, D. (2020). Use of visual and olfactory cues of flowers of two brassicaceous species by insect pollinators. *Ecol Entomol*, 45, 45–55.

Barrozo, R.B., Gadenne, C. & Anton, S. (2010). Switching attraction to inhibition: mating-induced reversed role of sex pheromone in an insect. *J Exp Biol*, 213, 2933–2939.

Beck, J.J., Higbee, B.S., Merrill, G.B. & Roitman, J.N. (2008). Comparison of volatile emissions from undamaged and mechanically damaged almonds. *J Sci Food Agric*, 88, 1363–1368.

Bertea, C.M., Casacci, L.P., Bonelli, S., Zampollo, A. & Barbero, F. (2020). Chemical, Physiological and Molecular Responses of Host Plants to Lepidopteran Egg-Laying. *Front Plant Sci*, 10, 1768.

Biasazin, T.D., Larsson Herrera, S., Kimbokota, F. & Dekker, T. (2019). Translating olfactomes into attractants: shared volatiles provide attractive bridges for polyphagy in fruit flies. *Ecology Letters*, 22, 108–118.

Biondi, A., Mommaerts, V., Smagghe, G., Viñuela, E., Zappalà, L. & Desneux, N. (2012). The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods: Effects of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Manag Sci*, 68, 1523–1536.

- Blanch, J.-S., Peñuelas, J. & Llusià, J. (2007). Sensitivity of terpene emissions to drought and fertilization in terpene-storing *Pinus halepensis* and non-storing *Quercus ilex*. *Physiol Plant*, 131, 211–225.
- Bland, R.G. (1991). Antennal and Mouthpart Sensilla of Tetrigidae (Orthoptera). *Ann Entomol Soc Am*, 84, 195–200.
- Bland, R.G. & Rentz, D.C.F. (1994). External Morphology and Abundance of Antennal Sensilla in Australian Gryllacrididae. *J Morphol*, 222, 11–18.
- Blaney, W.M. (1977). The ultrastructure of an olfactory sensillum on the maxillary palps of *Locusta migratoria* (L.). *Cell Tissue Res*, 184, 397–409.
- Blažytė-Čereškienė, L., Aleknavičius, D., Apšegaitė, V. & Būda, V. (2022). Response of Parasitic Wasp *Cotesia glomerata* L. (Hymenoptera: Braconidae) to Cabbage Plants of Two Varieties: Olfactory Spectra of Males and Females. *J Econ Entomol*, 115, 1464–1471.
- Blight, M.M., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. & Woodcock, C.M. (1995). Antennal perception of oilseed rape, *Brassica napus* (Brassicaceae), volatiles by the cabbage seed weevil *Ceutorhynchus assimilis* (Coleoptera, Curculionidae). *J Chem Ecol*, 21, 1649–1664.
- Blum, M.S. (1969). Alarm Pheromones. *Annu Rev Entomol*, 14, 57–80.
- Borden, J.H. (1997). Disruption of Semiochemical-Mediated Aggregation in Bark Beetles. In: *Insect Pheromone Research* (eds. Cardé, R.T. & Minks, A.K.). Springer US, Boston, MA, pp. 421–438.
- Bösković, R., Tobutt, K.R., Batlle, I., Duval, H., Martinez-Gomez, P. & Gradziel, T.M. (2003). Styral ribonucleases in almond: correlation with and prediction of incompatibility genotypes. *Plant Breed*, 122, 70–76.
- Boulton, R.A. & Field, J. (2022). Sensory plasticity in a socially plastic bee. *J Evol Biol*, 35, 1218–1228.
- Bourtsoukidis, E., Kawaletz, H., Radacki, D., Schütz, S., Hakola, H., Hellén, H., et al. (2013). Impact of flooding and drought conditions on the emission of volatile organic compounds of *Quercus robur* and *Prunus serotina*. *Trees*, 28, 193–204.
- Brodmann, J., Twele, R., Francke, W., Yi-bo, L., Xi-qiang, S. & Ayasse, M. (2009). Orchid Mimics Honey Bee Alarm Pheromone in Order to Attract Hornets for Pollination. *Curr Biol*, 19, 1368–1372.
- Bruce, T.J.A. & Pickett, J.A. (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – Finding the right mix. *Phytochem*, 72, 1605–1611.
- Bruce, T.J.A. (2015). Interplay between insects and plants: dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds. *J Exp Biol*, 66, 455–465.
- Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D., Hecker, E. (1959). Über den sexuallockstoff den seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und konstitution. *Z Nat forsh*, 14b, 283–284.
- Byers, K.J.R.P., Bradshaw, H.D. & Riffell, J.A. (2014). Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (*Mimulus*). *J Exp Biol*, 217, 614–623.

C

- Cakmak, I., Janssen, A., Sabelis, M.W. & Baspinar, H. (2009). Biological control of an acarine pest by single and multiple natural enemies. *Biol Control*, 50, 60–65.
- Calatayud, P.-A., Marion-Poll, F. & Thiéry, D. (2013). Chapitre 8. La réception sensorielle chez les insectes. In: *Interactions insectes-plantes* (eds. Calatayud, P.-A., Marion-Poll, F., Sauvion, N. & Thiéry, D.). IRD Éditions, pp. 137–149.
- Camara Siqueira da Cunha, J., Swoboda, M.H. & Sword, G.A. (2022). Olfactometer Responses of Convergent Lady Beetles *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) to Odor Cues from Aphid-Infested Cotton Plants Treated with Plant-Associated Fungi. *Insects*, 13, 157.
- Cappellin, L., Karl, T., Probst, M., Ismailova, O., Winkler, P.M., Soukoulis, C., *et al.* (2012). On Quantitative Determination of Volatile Organic Compound Concentrations Using Proton Transfer Reaction Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Environ Sci Technol*, 46, 2283–2290.
- Carrasco, D., Larsson, M.C. & Anderson, P. (2015). Insect host plant selection in complex environments. *Curr Opin Insect Sci*, 8, 1–7.
- Cervantes, D.E., Eigenbrode, S.D., Ding, H.-J. & Rez, N.A.B.-P. (2002). Oviposition Responses by Hessian Fly, *Mayetiola destructor*, to Wheats Varying in Surface Waxes. *J Chem Ecol*, 28, 193–210.
- Ceuppens, B., Ameye, M., Van Langenhove, H., Roldan-Ruiz, I. & Smagghe, G. (2015). Characterization of volatiles in strawberry varieties ‘Elsanta’ and ‘Sonata’ and their effect on bumblebee flower visiting. *Arthropod Plant Interact*, 9, 281–287.
- Cha, D.H., Nojima, S., Hesler, S.P., Zhang, A., Linn, C.E., Roelofs, W.L., *et al.* (2008). Identification and Field Evaluation of Grape Shoot Volatiles Attractive to Female Grape Berry Moth (*Paralobesia viteana*). *J Chem Ecol*, 34, 1180–1189.
- Chabaud, M.-A., Devaud, J.-M., Pham-Delègue, M.-H., Preat, T. & Kaiser, L. (2006). Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A*, 192, 1335–1348.
- Chapman, R.F. (2003). Contact Chemoreception in Feeding by Phytophagous Insects. *Annu Rev Entomol*, 48, 455–484.
- Chen, C., Song, Q., Proffit, M., Bessière, J.-M., Li, Z. & Hossaert-McKey, M. (2009). Private channel: a single unusual compound assures specific pollinator attraction in *Ficus semicordata*. *Funct Ecol*, 23, 941–950.
- Choi, W.-I., Lee, S.-G., Park, H.-M. & Ahn, Y.-J. (2004). Toxicity of Plant Essential Oils to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). *J Econ Entomol*, 97.
- Clyne, P., Grant, A., O’Connell, R. & Carlson, J.R. (1997). Odorant response of individual sensilla on the *Drosophila antenna*. *Invert Neurosci*, 3, 127–135.
- Conchou, L., Lucas, P., Meslin, C., Proffit, M., Staudt, M. & Renou, M. (2019). Insect Odorscapes: From Plant Volatiles to Natural Olfactory Scenes. *Front Physiol*, 10, 1–20.
- Cook, S.M., Khan, Z.R. & Pickett, J.A. (2007). The Use of Push-Pull Strategies in Integrated Pest Management. *Annu Rev Entomol*, 52, 375–400.

Copolovici, L. & Niinemets, Ü. (2010). Flooding induced emissions of volatile signalling compounds in three tree species with differing waterlogging tolerance: Volatile emissions during waterlogging. *Plant Cell Environ*, 33, 1582–1594.

Corbet, S.A. (1973). Oviposition Pheromone in Larval Mandibular Glands of *Ephestia kuehniella*. *Nature*, 243, 537–538.

Couzin-Fuchs, E. & Ayali, A. (2021). The social brain of ‘non-eusocial’ insects. *Curr Opin Insect Sci*, 48, 1–7.

D

Das, B., Ahmed, N. & Singh, P. (2011). *Prunus* diversity- early and present development: A review. *Int J Biodivers Conserv*, 3, 721–734.

Daussy, J. & Staudt, M. (2020). Do future climate conditions change volatile organic compound emissions from *Artemisia annua*? Elevated CO₂ and temperature modulate actual VOC emission rate but not its emission capacity. *Atmos Environ: X*, 7, 100082. DOI : 10.1016/j.aeaoa.2020.100082

De Bruyne, M., Clyne, P.J. & Carlson, J.R. (1999). Odor Coding in a Model Olfactory Organ: The *Drosophila* Maxillary Palp. *J Neurosci*, 19, 4520–4532.

Delory, B.M., Delaplace, P., Fauconnier, M.-L. & Du Jardin, P. (2016). Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions? *Plant Soil*, 402, 1–26.

Delplancke, M., Alvarez, N., Benoit, L., Espíndola, A., Joly, H.I, Neuenschwander, S., *et al.* (2013). Evolutionary history of almond tree domestication in the Mediterranean basin. *Mol Ecol*, 22, 1092–1104.

Desneux, N., Pham-Delègue, M.-H. & Kaiser L. (2003). Effects of sub-lethal and lethal doses of lambda-cyhalothrin on oviposition experience and host-searching behaviour of a parasitic wasp, *Aphidius ervi*. *Pest Manag Sci*, 60, 381–389.

Desneux, N., Decourtye, A. & Delpuech, J.-M. (2007). The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annu Rev Entomol*, 52, 81–106.

Dhillit-Lemonnier C., Jaloto P., Leveque A. & Schneyder L. (2020). Recensement de l’impact et des méthodes de lutte du ravageur de l’amandier *Eurytoma amygdali* (guêpe de l’amande). Projet d’élèves ingénieurs n°9. Montpellier SupAgro. 80 pages

Diagne, C., Leroy, B., Vaissière, A.-C., Gozlan, R.E., Roiz, D., Jarić, I., *et al.* (2021). High and rising economic costs of biological invasions worldwide. *Nature*, 592, 571–576.

Dicenta, F., Ortega, E., Canovas, J.A. & Egea, J. (2002). Self-pollination vs. cross-pollination in almond: pollen tube growth, fruit set and fruit characteristics. *Plant Breed*, 121, 163–167.

Dicke, M., Van Beek, T.A., Posthumus, M.A., Ben Dom, N., Van Bokhoven, H. & De Groot, Ae. (1990). Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions Involvement of host plant in its production. *J Chem Ecol*, 16, 381–396.

Dicke, M. (1994). Local and Systemic Production of Volatile Herbivore-induced Terpenoids: Their Role in Plant-carnivore Mutualism. *J Plant Physiol*, 143, 465–472.

- Dicke, M. & Baldwin, I.T. (2010). The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends Plant Sci*, 15, 167–175.
- Dickens, J.C., Jang, E.B., Light, D.M. & Alford, A.R. (1990). Enhancement of insect pheromone responses by green leaf volatiles. *Naturwissenschaften*, 77, 29–31.
- Diesner, M., Gallot, A., Binz, H., Gaertner, C., Vitecek, S., Kahnt, J., *et al.* (2018). Mating-Induced Differential Peptidomics of Neuropeptides and Protein Hormones in *Agrotis ipsilon* Moths. *J. Proteome Res.*, 17, 1397–1414.
- Dobson, H.E.M. (2006). Relationship between Floral Fragrance Composition and Type of Pollinator. In: *Biology of Floral Scent* (eds. Dudareva N. & Pichersky E.). Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 147–198.
- Doğanlar, O., Yıldırım, A. E. & Doğanlar O. (2006). Natural Enemy Complex of *Eurytoma amygdali* Enderlein, 1907 (Hymenoptera, Eurytomidae) in Eastern Mediterranean Region of Turkey; Notes on Their Interaction and Effectiveness. *J agric biol sci*, 2, 282–286.
- Domingue, M.J., Roelofs, W.L., Linn, C.E. & Baker, T.C. (2006). Effects of egg-to-adult development time and adult age on olfactory neuron response to semiochemicals in European corn borers. *J Insect Physiol*, 52, 975–983.
- Dormont, L., Fort, T., Bessière, J.-M., Proffit, M., Garcia Hidalgo, E., Buatois, B., *et al.* (2020). Sources of floral scent variation in the food-deceptive orchid *Orchis mascula*. *Acta Oecol*, 107, 103600. DOI: 10.1016/j.actao.2020.103600.
- Dubuisson, C., Nicolè, F., Buatois, B., Hossaert-McKey, M. & Proffit, M. (2022). Tropospheric Ozone Alters the Chemical Signal Emitted by an Emblematic Plant of the Mediterranean Region: The True Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.). *Front Ecol Evol*, 10, 795588.
- Dudareva, N., Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiol*, 135, 1893–1902.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J.K. & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol*, 198, 16–32.
- Dunley, J.E. & Welter, S.C. (2000). Correlated Insecticide Cross-Resistance in Azinphosmethyl Resistant Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J Econ Entomol*, 93, 955–962.
- Duval, H. & Froment P. (1998) Evaluation Agronomique. Variétés et Porte-Greffe de l'amandier. *Arboriculture Fruitière*, 514, 57–62.
- Duval H., Millan M.M. Emergence dates of *Eurytoma amygdali* Enderlein adults in the south-east of France and control strategy. In: Zakynthinos G. (ed.). XIV GREMPA Meeting on Pistachios and Almonds. Zaragoza : CIHEAM / FAO / AUA / TEI Kalamatas / NAGREF, 2010. p. 175-180. (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens ; n. 94). 14. GREMPA Meeting on Pistachios and Almonds, 2008/03/30-2008/04/04, Athens (Greece).
- Dweck, H.K.M., Ebrahim, S.A.M., Kromann, S., Bown, D., Hillbur, Y., Sachse, S., *et al.* (2013). Olfactory Preference for Egg Laying on Citrus Substrates in *Drosophila*. *Curr Biol*, 23, 2472–2480.

E

- Eban-Rothschild, A. & Bloch, G. (2012). Social Influences on Circadian Rhythms and Sleep in Insects. In: *Advances in Genetics*. Elsevier, 1–32.
- Effmert, U., Buss, D., Rohrbeck, D. & Piechulla, B. (2006). Synthesis and Emission of Scent Compounds Within the Flower. In: *Biology of Floral Scent*. (eds. Dudareva N. & Pichersky E.), pp. 105–123.
- El Hadi, M., Zhang, F.-J., Wu, F.-F., Zhou, C.-H. & Tao, J. (2013). Advances in Fruit Aroma Volatile Research. *Molecules*, 18, 8200–8229.
- El-Sayed, A.M., Mitchell, V.J., Manning, L.-A.M. & Suckling, D.M. (2011). New Sex Pheromone Blend for the Lightbrown Apple Moth, *Epiphyas postvittana*. *J Chem Ecol*, 37, 640–646.
- El-Sayed, A.M., Sporle, A., Colhoun, K., Furlong, J., White, R. & Suckling, D.M. (2018). Scents in orchards: floral volatiles of four stone fruit crops and their attractiveness to pollinators. *Chemoecology*, 28, 39–49.
- Enderlein, G. (1907). *Eurytoma amygdali*, ein neuer Chalcidier aus Mandelkernen. (Hym.). *Z Hymenopt Dipt*, 7, 303–305.

F

- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J. & Peñuelas, J. (2013). Floral volatile organic compounds: Between attraction and deterrence of visitors under global change. *Perspect Plant Ecol Evol Syst*, 15, 56–67.
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J. & Peñuelas, J. (2016). Bidirectional Interaction between Phyllospheric Microbiotas and Plant Volatile Emissions. *Trends Plant Sci*, 21, 854–860.
- Feng, B., Qian, K. & Du, Y.-J. (2017). Floral Volatiles from *Vigna unguiculata* Are Olfactory and Gustatory Stimulants for Oviposition by the Bean Pod Borer Moth *Maruca vitrata*. *Insects*, 8, 60.
- Fenske, M.P., Hewett Hazelton, K.D., Hempton, A.K., Shim, J.S., Yamamoto, B.M., Riffell, J.A., *et al.* (2015). Circadian clock gene *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* directly regulates the timing of floral scent emission in *Petunia*. *PNAS*, 112, 9775–9780.
- Ferreira, L., Perestrelo, R., Caldeira, M. & Câmara, J.S. (2009). Characterization of volatile substances in apples from *Rosaceae* family by headspace solid-phase microextraction followed by GC-qMS. *J. Sep. Science*, 32, 1875–1888.
- Fiche technique n°13 : Argiles (kaolinite calcinée). Guide pour la conception de systèmes de production fruitière économes en produits phytosanitaire. *Ecophytopic*, 67-71.
- Finch, S. (1978). Volatile Plant Chemicals and their Effect on Host Plant Finding by the Cabbage Root Fly (*Delia Brassicae*). *Entomol Exp Appl*, 24, 350–359.
- Fineschi, S., Loreto, F., Staudt, M., & Peñuelas, J. (2013). Diversification of Volatile Isoprenoid Emissions from Trees: Evolutionary and Ecological Perspectives. In *Biology, Controls and Models of Tree Volatile Organic Compound Emissions*. Tree Physiology. Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 1-20.

Fraser, A.M., Mechaber, W.L. & Hildebrand, J.G. (2003). Electroantennographic and behavioral responses of the sphinx moth *Manduca sexta* to host plant headspace volatiles. *J Chem Ecol*, 29, 1813–1833.

French, A., Moutaz, A.A., Mitra, A., Yanagawa, A., Sellier, M.-J. & Marion-Poll, F. (2015). *Drosophila* Bitter Taste(s). *Front Integr Neurosci*, 9, 1–13.

Friis, E.M., Pedersen, K.R. & Crane, P.R. (2006). Cretaceous angiosperm flowers: Innovation and evolution in plant reproduction. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol*, 232, 251–293.

Fuentes, J.D., Gu, L., Lerdau, M., Atkinson, R., Baldocchi, D., Bottenheim, J.W., *et al.* (2000). Biogenic Hydrocarbons in the Atmospheric Boundary Layer: A Review. *Bull Amer Meteor Soc*, 81, 1537–1575.

G

Gadenne, C., Barrozo, R.B. & Anton, S. (2016). Plasticity in Insect Olfaction: To Smell or Not to Smell? *Annu Rev Entomol*, 61, 317–333.

Gadenne, C., Barrozo, R.B. & Anton, S. (2016). Plasticity in Insect Olfaction: To Smell or Not to Smell? *Annu Rev Entomol*, 61, 317–333.

Garcin A. (2009). L'argile kaolinite, une nouvelle méthode de lutte par barrière minérale protectrice contre le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* Sulz. *Innov Agron*, 4, 107–113.

Gentner, D.R., Ormeño, E., Fares, S., Ford, T.B., Weber, R., Park, J.-H., *et al.* (2014). Emissions of terpenoids, benzenoids, and other biogenic gas-phase organic compounds from agricultural crops and their potential implications for air quality. *Atmos Chem Phys*, 14, 5393–5413.

Geron, C.D., Guenther, A.B. & Pierce, T.E. (1994). An improved model for estimating emissions of volatile organic compounds from forests in the eastern United States. *J Geophys Res*, 99, 12773–12791.

Gershenzon, J. & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol*, 3, 408–414.

Ghafari, E., Costa, H. & Júlio, E. (2015). Statistical mixture design approach for eco-efficient UHPC. *Cem Concr Comp*, 55, 17–25.

Gehlbach, F. R., Watkins, J. F. & Kroll, J. C. (1971). Pheromone Trail-Following Studies of Typhlopidae, Leptotyphlopidae, and Colubrid Snakes. *Behaviour*, 282–294

Giles, D.K., Heinz, K.M. & Parrella, M.P. (1996). Quantitative Assessment of Insect Olfactometer Performance by Experimental Flow Analysis. *Biol Control*, 7, 44–47.

Giurfa, M. & Sandoz, J.-C. (2012). Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learn Mem.*, 19, 54–66.

Glinwood, R., Ahmed, E., Qvarfordt, E. & Ninkovic, V. (2011). Olfactory learning of plant genotypes by a polyphagous insect predator. *Oecologia*, 166, 637–647.

Gradziel T.M. (2017). History of Cultivation. In *Botany, Production and Uses*, Boston, MA: CABI, pp.123–188.

- Graus, M., Müller, M. & Hansel, A. (2010). High resolution PTR-TOF: Quantification and formula confirmation of VOC in real time. *J Am Soc Mass Spectrom*, 21, 1037–1044.
- Greenwood, M. & Chapman, R.F. (1984). Differences in numbers of sensilla on the antennae of solitary and gregarious *Locusta migratoria* L. (Orthoptera: Acrididae). *Int J Insect Morphol Embryol*, 13, 295–301.
- Gregg, P.C., Del Socorro, A.P. & Landolt, P.J. (2018). Advances in Attract-and-Kill for Agricultural Pests: Beyond Pheromones. *Annu Rev Entomol*, 63, 453–470.
- Greiner, B. (2002). Central Processing of Plant Volatiles in *Agrotis ipsilon* Males is Age-independent in Contrast to Sex Pheromone Processing. *Chem Senses*, 27, 45–48.
- Grillet, M., Darteville, L. & Ferveur, J.-F. (2006). A *Drosophila* male pheromone affects female sexual receptivity. *Proc R Soc B*, 273, 315–323.
- Grisson-Pigé, L., Re, J.-M.B. & Hossaert-Mckey, M. (2002). Specific Attraction of Fig-Pollinating Wasps: Role of Volatile Compounds Released by Tropical Figs. *J Chem Ecol*, 28, 283–295.
- Guenther, A.B., Monson, R.K. & Fall, R. (1991). Isoprene and monoterpene emission rate variability: Observations with eucalyptus and emission rate algorithm development. *J Geophys Res.*, 96, 10799.
- Guenther, A., Zimmerman, P. & Wildermuth, M. (1994). Natural volatile organic compound emission rate estimates for U.S. woodland landscapes. *Atmos Environ*, 28, 1197–1210.
- Guenther, A., Hewitt, C.N., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Graedel, T., *et al.* (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. *J Geophys Res*, 100, 8873.
- Guenther, A. (1997). Seasonal and spatial variations in natural volatile organic compound emissions. *Ecol Appl*, 7, 12.
- Guerin, P.M., Städler, E. & Buser, H.R. (1983). Identification of host plant attractants for the carrot fly, *Psila rosae*. *J Chem Ecol*, 9, 843–861.
- Guerrieri, F., Gemenio, C., Monsempes, C., Anton, S., Jacquín-Joly, E., Lucas, P., Devaud J. -M. (2012). Experience-dependent modulation of antennal sensitivity and input to antennal lobes in male moths (*Spodoptera littoralis*) pre-exposed to sex pheromone. *J Exp Biol*, 215, 2334–2341.
- Guo, Y., Jud, W., Weigl, F., Ghirardo, A., Junker, R.R., Polle, A., *et al.* (2021). Volatile organic compound patterns predict fungal trophic mode and lifestyle. *Commun Biol*, 4, 673.
- Gouinguéné, S., De Cruz, I., Van Der Pers, J., Wadhams, L. & Marion-Poll, F. (1998). A New Method to Improve Olfactory Responses to GC Effluents. *Chem Senses*, 23, 647–652.
- Gouinguéné, S.P. & Turlings, T.C.J. (2002). The Effects of Abiotic Factors on Induced Volatile Emissions in Corn Plants. *Plant Physiol*, 129, 1296–1307.

H

- Hallberg, E. & Hansson, B.S. (1999). Arthropod sensilla: Morphology and phylogenetic considerations. *Microsc Res Tech*, 47, 428–439.

- Hallem, E.A., Dahanukar, A. & Carlson, J.R. (2006). Insect Odor and Taste Receptors. *Annu Rev Entomol*, 51, 113–135.
- Halligan, J.P. (1975). Toxic Terpenes from *Artemisia Californica*. *Ecology*, 56, 999–1003.
- Hansel, A., Jordan, A., Holzinger, R., Prazeller, P., Vogel, W. & Lindinger, W. (1995). Proton transfer reaction mass spectrometry: on-line trace gas analysis at the ppb level. *Int J Mol Sci*, 149–150, 609–619.
- Hansson B.S. & Anton S. (2000). Function and morphology of the antennal lobe: new developments. *Annu Rev Entomol*, 45: 203–231.
- Hansson, B. & Wicher, D. (2016). Chemical Ecology in Insects. In: *Chemosensory Transduction*. Elsevier, pp. 29–45.
- Hansted, L., Jakobsen, H.B. & Olsen, C.E. (1994). Influence of temperature on the rhythmic emission of volatiles from *Ribes nigrum* flowers *in situ*. *Plant Cell Environ*, 17, 1069–1072.
- Hawkins, N.J., Bass, C., Dixon, A. & Neve, P. (2019). The evolutionary origins of pesticide resistance: The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biol Rev*, 94, 135–155.
- Heidel-Fischer, H.M. & Vogel, H. (2015). Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds. *Curr Opin Insect Sci*, 8, 8–14.
- Heisswolf, A., Gabler, D., Obermaier, E. & Müller, C. (2007). Olfactory versus Contact Cues in Host Plant Recognition of a Monophagous Chrysomelid Beetle. *J Insect Behav*, 20, 247–266.
- Hemmerlin, A., Harwood, J.L. & Bach, T.J. (2012). A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Prog Lipid Res*, 51, 95–148.
- Henselek, Y., Eilers, E.J., Kremen, C., Hendrix, S.D. & Klein, A.-M. (2018). Pollination Requirements of Almond (*Prunus dulcis*): Combining Laboratory and Field Experiments. *J Econ Entomol*, 111, 1006–1013.
- Hewitt, C.N., Ashworth, K., Boynard, A., Guenther, A., Langford, B., MacKenzie, A.R., *et al.* (2011). Ground-level ozone influenced by circadian control of isoprene emissions. *Nat Geosci*, 4, 671–674. DOI: 10.1038/NGEO1271
- Holland, J.N. & Fleming, T.H. (1999). Mutualistic interactions between *Upiga virescens* (Pyralidae), a pollinating seed-consumer, and *Lophocereus schottii* (Cactaceae). *Ecology*, 80, 2074–2084.
- Holopainen, J.K. & Gershenzon, J. (2010). Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci*, 15, 176–184.
- Honda, K. (1995). Chemical Basis of Differential Oviposition by Lepidopterous Insects. *Arch Insect Biochem Physiol*, 30, 1–23.
- Hora, K.H. & Roessingh, P. (1999). Oviposition in *Yponomeuta cagnagellus*: the importance of contact cues for host plant acceptance. *Physiol Entomol*, 24, 109–120.
- Hudgins, J.W., Christiansen, E. & Franceschi, V.R. (2004). Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. *Tree Physiol*, 24, 251–264.
- Hung, R., Lee, S. & Bennett, J.W. (2013). *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of Trichoderma volatile organic compounds. *Fungal Ecol*, 6, 19–26.

I

Insam, H. & Seewald, M.S.A. (2010). Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biol Fertil Soils*, 46, 199–213.

J

Jaffe, B.D., Avanesyan, A., Bal, H.K., Feng, Y., Grant, J., Grieshop, M.J., *et al.* (2018). Multistate Comparison of Amtrractants and the Impact of Fruit Development Stage on Trapping *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Raspberry and Blueberry. *Environ Entomol*, 47, 935–945.

Jenks, M., & Ashworth, E. N. (1999). Plant epicuticular waxes: function, production, and genetics. *Hortic Rev*, 23, 1–68.

Joris Huguenin, UMR 5175 CEFE, CNRS, University of Montpellier. provoc: analyze data of VOC by PTR-ToF-MS Vocus. DOI : 10.5281/zenodo.6642830.

Juan A., Jaumot J. & Tauler R. (2014). Multivariate Curve Resolution (MCR). Solving the mixture analysis problem. *Anal Methods*. 14, 1–29. DOI : 10.1039/C4AY00571F.

K

Kadala, A., Charreton, M., Charnet, P., Cens, T., Rousset, M., Chahine, M., *et al.* (2019). Voltage-gated sodium channels from the bees *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* are differentially modulated by pyrethroid insecticides. *Sci Rep*, 9, 1078.

Kaissling, K.-E. (1980). Action of chemicals, including (+)-trans-Permethrin and DDT, on insect olfactory receptors. Proceedings/Insect Neurobiology and Pesticide Action (Neurotx 79), Society of Chemical Industry Symposium, University of York, GBR; London: Society of Chemical Industry; Da. pp.351–358. ISBN 0-90100-161-9 351–358.

Karlson, P. & Butenandt, A. (1959). Pheromones (Ectohormones) in Insects. *Annu Rev Entomol*, 4, 39–58.

Kegge, W., Weldegergis, B.T., Soler, R., Eijk, M.V., Dicke, M., Voeselek, L.A.C.J., *et al.* (2013). Canopy light cues affect emission of constitutive and methyl jasmonate-induced volatile organic compounds in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 200, 861–874.

Kellenberger, R.T., Schlüter, P.M. & Schiestl, F.P. (2016). Herbivore-Induced DNA Demethylation Changes Floral Signalling and Attractiveness to Pollinators in *Brassica rapa*. *PLoS ONE*, 11, e0166646.

Kerr, J.L., Kelly, D., Bader, M.K.-F. & Brockerhoff, E.G. (2016). Olfactory Cues, Visual Cues, and Semiochemical Diversity Interact During Host Location by Invasive Forest Beetles. *J Chem Ecol*, 43, 17–25.

Kesselmeier, J. & Staudt, M. (1999). Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology. *J Atmos Chem*, 33, 23–88.

Kimbaris, A.C., Papachristos, D.P., Michaelakis, A., Martinou, A.F. & Polissiou, M.G. (2010). Toxicity of plant essential oil vapours to aphid pests and their coccinellid predators. *Biocontrol Sci Technol*, 20, 411–422.

Khanmohamadi, F., Khajehali, J. & Izadi, H. (2016). Diapause and Cold Hardiness of the Almond Wasp, *Eurytoma amygdali* (Hymenoptera: Eurytomidae), Two Independent Phenomena. *J Econ Entomol*, 109, 1646–1650.

Knauer, A.C., Bakhtiari, M. & Schiestl, F.P. (2018). Crab spiders impact floral-signal evolution indirectly through removal of florivores. *Nat Commun*, 9, 1367.

Knight, A.L. & Light, D.M. (2001). Attractants from Bartlett pear for codling moth, *Cydia pomonella* (L.), larvae. *Naturwissenschaften*, 88, 339–342.

Knudsen, J.T., Eriksson, R., Gershenzon, J. & Ståhl, B. (2006). Diversity and Distribution of Floral Scent. *Bot Rev*, 72, 1–120.

Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish, C.M. & Dudareva, N. (2001). Regulation of Circadian Methyl Benzoate Emission in Diurnally and Nocturnally Emitting Plants. *Plant Cell*, 13, 2333–2347.

Koul, O. (2008). Phytochemicals and Insect Control: An Antifeedant Approach. *Crit Rev Plant Sci*, 27, 1–24.

Kouloussis, N.A. & Katsoyannos, B.I. (1991). Host discrimination and evidence for a host marking pheromone in the almond seed wasp, *Eurytoma amygdali*. *Entomol Exp Appl*, 58, 165–174.

Kouloussis, N.A. & Katsoyannos, B.I. (1994). Adult response of the almond seed wasp, *Eurytoma amygdali*, to chemicals from its host and certain nonhosts. *Entomol Exp Appl*, 73, 211–220.

Koureas, M., Tsakalof, A., Tsatsakis, A. & Hadjichristodoulou, C. (2012). Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicol Lett*, 210, 155–168.

Krasnoff, S.B. & Dussourd, D.E. (1989). Dihydropyrrolizine attractants for arctiid moths that visit plants containing pyrrolizidine alkaloids. *J Chem Ecol*, 15, 47–60.

Krishnan, B., Dryer, S.E. & Hardin, P.E. (1999). Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 400, 375–378.

Krokos, F.D., Konstantopoulou, M.A. & Mazomenos, B.E. (2001). Alkadienes and Alkenes, Sex Pheromone Components of the Almond Seed Wasp. *J Chem Ecol*, 27, 2169–2181.

L

Lalouette, L., Pottier, M.-A., Wycke, M.-A., Boitard, C., Bozzolan, F., Maria, A., *et al.* (2016). Unexpected effects of sublethal doses of insecticide on the peripheral olfactory response and sexual behavior in a pest insect. *Environ Sci Pollut Res*, 23, 3073–3085.

Laothawornkitkul, J., Taylor, J.E., Paul, N.D. & Hewitt, C.N. (2009). Biogenic volatile organic compounds in the Earth system. *New Phytol*, 183, 27–51.

Leal, W.S., Moura, J.I.L., Bento, J.M.S., Vilela, E.F. & Pereira, P.B. (1997). Electrophysiological and Behavioral Evidence for a Sex Pheromone in the Wasp *Bephratelloides pomorum*. *J Chem Ecol*, 23, 1281–1289.

Li, Y., Grotewold, E. & Dudareva, N. (2023). Enough is enough: feedback control of specialized metabolism. *Trends Plant Sci*, online, 1-10. DOI: 10.1016/j.tplants.2023.07.012.

Light, D. M., Kamm, J. A. & Buttery, R. G. (1992). Electroantennogram Response of Alfalfa Seed Chalcid, *Bruchophagus Roddi* (Hymenoptera: Eurytomidae) to Host- and Nonhost-Plant Volatiles. *J Chem Ecol*, 18, 333–352.

Light, D.M., Flath, R.A., Buttery, R.G., Zalom, F.G., Rice, R.E., Dickens, J.C., & Jang, E. B. (1993). Host-plant green-leaf volatiles synergize the synthetic sex pheromones of the corn earworm and codling moth (Lepidoptera). *Chemoecology*, 4, 145–152.

Lin, Y.-H., Silven, J.J.M., Wybouw, N., Fandino, R.A., Dekker, H.L., Vogel, H., *et al.* (2023). A salivary GMC oxidoreductase of *Manduca sexta* re-arranges the green leaf volatile profile of its host plant. *Nat Commun*, 14, 1-17.

Liscia, A., Angioni, P., Sacchetti, P., Poddighe, S., Granchietti, A., Setzu, M.D., *et al.* (2013). Characterization of olfactory sensilla of the olive fly: Behavioral and electrophysiological responses to volatile organic compounds from the host plant and bacterial filtrate. *J Insect Physiol*, 59, 705–716.

Litvak, M.E. & Monson, R.K. (1998). Patterns of induced and constitutive monoterpene production in conifer needles in relation to insect herbivory. *Oecologia*, 114, 531–540.

Lo Giudice, D., Riedel, M., Rostás, M., Peri, E. & Colazza, S. (2011). Host Sex Discrimination by an Egg Parasitoid on Brassica Leaves. *J Chem Ecol*, 37, 622–628.

Loreto, F. & Velikova, V. (2001). Isoprene Produced by Leaves Protects the Photosynthetic Apparatus against Ozone Damage, Quenches Ozone Products, and Reduces Lipid Peroxidation of Cellular Membranes. *Plant Physiol*, 127, 1781–1787.

Loreto, F., Dicke, M., Schnitzler, J.-P. & Turlings, T.C.J. (2014). Plant volatiles and the environment: Plant volatiles and the environment. *Plant Cell Environ*, 37, 1905–1908.

Loughrin, J.H., Manukian, I.A., Heath, R. & Tumlinson, H. (1995). Volatiles emitted by different cotton varieties damaged by feeding beet armyworm larvae. *J Chem Ecol*, 21, 1217–1227.

Lucas, P. & Renou, M. (1992). Electrophysiological study of the effects of deltamethrin, bioresmethrin, and DDT on the activity of pheromone receptor neurones in two moth species. *Pestic Biochem Phys*, 43, 103–115.

Lucas P., Montagné N. & Jacquin-Joly E. (2020) Anatomie et fonctionnement du système chimiosensoriel des insectes. Chapitre 16. In : *Biocontrôle. Éléments pour une protection agroécologique des cultures*. (eds. Fauvergue, X., Rusch, A., Barret, M., Bardin, M., Jacquin-Joly, E., Malausa, T., Lannou, C.), Edition Quae, Versailles, pp. 209-220.

M

Maeda, H. & Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Biol*, 63, 73–105.

- Maffei, M.E. (2010). Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *S Afr J Bot*, 76, 612–631.
- Maia, A.C.D., Grimm, C., Schubert, M., Etl, F., Gonçalves, E.G., Do Amaral Ferraz Navarro, D.M., *et al.* (2019). Novel Floral Scent Compounds from Night-Blooming Araceae Pollinated by *Cyclocephaline* Scarabs (Melolonthidae, Cyclocephalini). *J Chem Ecol*, 45, 204–213.
- Mansour, R. & Biondi, A. (2021). Releasing natural enemies and applying microbial and botanical pesticides for managing *Tuta absoluta* in the MENA region. *Phytoparasitica*, 49, 179–194.
- Margaritopoulos, J.T. & Tzanakakis, M.E. (2006). Diapause completion in the almond seed wasp, *Eurytoma amygdali* (Hymenoptera: Eurytomidae) following early low temperature treatment. *Eur J Entomol*, 103, 733–742.
- Marion-Poll, F.C., Guillaumin, D. & Masson, C. (1992). Sexual dimorphism of tarsal receptors and sensory equipment of the ovipositor in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Cell Tissue Res*, 267, 507–518.
- Marion-Poll, F.C. & Thiéry D. (1996). Dynamics of EAG responses to host-plant volatiles delivered by a gas chromatograph. *Entomol Exp App*, 80, 120–123
- Markó, V., Blommers, L.H.M., Bogya, S. & Helsen, H. (2008). Kaolin particle films suppress many apple pests, disrupt natural enemies and promote woolly apple aphid. *J Appl Entomology*, 132, 26–35.
- Martel, V., Anderson, P., Hansson, B.S. & Schlyter, F. (2009). Peripheral modulation of olfaction by physiological state in the Egyptian leaf worm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Insect Physiol*, 55, 793–797.
- Matsui, K. (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr Opin Plant Biol*, 9, 274–280. DOI:10.3390/ijms140917781.
- Matthews, G. A. (2018). Pesticides in the Early Part of the 20th century. In: *A History of Pesticides*. (eds. Niinemets, Ü. & Monson, R.K.), Boston, MA : CABI, pp. 1-27.
- Mazomenos, B.E., Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N. & Milonas, P. (2004). Evaluation of the Major Female *Eurytoma amygdali* Sex Pheromone Components, (Z,Z)-6,9-Tricosadiene and (Z,Z)-6,9-Pentacosadiene for Male Attraction in Field Tests. *J Chem Ecol*, 30, 1245–1255.
- McCall, P.J., Turlings, T.C.J., Lewis, W.J. & Tumlinson, J.H. (1993). Role of plant volatiles in host location by the specialist parasitoid *Microplitis croceipes* cresson (Braconidae: Hymenoptera). *J Insect Behav*, 6, 625–639.
- McCall, P.J. & Cameron, M.M. (1995). Oviposition pheromones in insect vectors. *Parasitology Today*, 11, 352–355.
- McCall, A.C. & Karban, R. (2006). Induced defense in *Nicotiana attenuata* (Solanaceae) fruit and flowers. *Oecologia*, 146, 566–571.
- McConkey, M.E., Gershenzon, J. & Croteau, R.B. (2000). Developmental Regulation of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomes of Peppermint. *Plant Physiol*, 122, 215–224.

Mccormick, C.A., Gershenzon, J. & Unsicker, S.B. (2014). Little peaks with big effects: establishing the role of minor plant volatiles in plant-insect interactions: Minor plant volatiles. *Plant Cell Environ*, 37, 1836–1844.

Mentjelos, J. & Atjemis, A. (1970). Studies on the Biology and Control of *Eurytoma amygdali* in Greece. *J Econ Entomol*, 63, 1934–1936.

Merlin, C., Lucas, P., Rochat, D., François, M.-C., Maibèche-Coisne, M. & Jacquin-Joly, E. (2007). An Antennal Circadian Clock and Circadian Rhythms in Peripheral Pheromone Reception in the Moth *Spodoptera littoralis*. *J Biol Rhythms*, 22, 502–514.

Mohammed, J., Belisle, C.E., Wang, S., Itle, R.A., Adhikari, K. & Chavez, D.J. (2021). Volatile Profile Characterization of Commercial Peach (*Prunus persica*) Cultivars Grown in Georgia, USA. *Horticulturae*, 7, 516.

Monson, R.K., Weraduwege, S.M., Rosenkranz, M., Schnitzler, J.-P. & Sharkey, T.D. (2021). Leaf isoprene emission as a trait that mediates the growth-defense tradeoff in the face of climate stress. *Oecologia*, 197, 885–902.

Morgan, D.E. (2009). Trail pheromones of ants. *Physiol Entomol* 34, 1–17.

Morrison, W.R., Blaauw, B.R., Short, B.D., Nielsen, A.L., Bergh, J.C., Krawczyk, G., et al. (2018). Successful management of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in commercial apple orchards with an attract-and-kill strategy. *Pest Manag Sci*, 75, 104–114.

Moukhtar, S., Couret, C., Rouil, L. & Simon, V. (2006). Biogenic Volatile Organic Compounds (BVOCs) emissions from *Abies alba* in a French forest. *Sci Total Environ*, 354, 232–245.

Muhlemann, J.K., Klempien, A. & Dudareva, N. (2014). Floral volatiles: from biosynthesis to function: Floral volatiles. *Plant Cell Environ*, 37, 1936–1949.

Musmeci, S., Ciccoli, R., Di Gioia, V., Sonnino, A. & Arnone, S. (1997). Leaf effects of wild species of *Solanum* and interspecific hybrids on growth and behaviour of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zeller. *Potato Res*, 40, 417–430.

Myrick, A.J. & Baker, T.C. (2018). Increasing Signal-to-Noise Ratio in Gas Chromatography - Electroantennography Using a Deans Switch Effluent Chopper. *J Chem Ecol*, 44, 111–126.

N

Najar-Rodriguez, A., Orschel, B. & Dorn, S. (2013). Season-Long Volatile Emissions from Peach and Pear Trees *in situ*, Overlapping Profiles, and Olfactory Attraction of an Oligophagous Fruit Moth in the Laboratory. *J Chem Ecol*, 39, 418–429.

Navarro-Llopis, V., Primo, J. & Vacas, S. (2013). Efficacy of attract-and-kill devices for the control of *Ceratitis capitata*. *Pest Manag Sci*, 69, 478–482.

Nawade, B., Yahyaa, M., Reuveny, H., Shaltiel-Harpaz, L., Eisenbach, O., Faigenboim, A., et al. (2019). Profiling of volatile terpenes from almond (*Prunus dulcis*) young fruits and characterization of seven terpene synthase genes. *Plant Sci*, 287, 110187.

Ndah, F., Valolahti, H., Schollert, M., Michelsen, A., Rinnan, R. & Kivimäenpää, M. (2022). Influence of increased nutrient availability on biogenic volatile organic compound (BVOC) emissions and leaf anatomy of subarctic dwarf shrubs under climate warming and increased cloudiness. *Ann Bot*, 129, 443–455.

Nguyen, H.N., Lee, I.J., Kim, H.J. & Hong, K.-J. (2022). Temperature-Dependent Development of the Post-Diapause Periods of the Apricot Seed Wasp *Eurytoma maslovskii* (Hymenoptera: Eurytomidae): An Implication for Spring Emergence Prediction Models. *Insects*, 13, 722.

Nieto, K.F. & Frankenberger, W.T. (1990). Influence of adenine, isopentyl alcohol and *Azotobacter chroococcum* on the growth of *Raphanus sativus*. *Plant Soil*, 127, 147–156.

Niinemets, Ü., Tenhunen, J.D., Harley, P.C. & Steinbrecher, R. (1999). A model of isoprene emission based on energetic requirements for isoprene synthesis and leaf photosynthetic properties for *Liquidambar* and *Quercus*. *Plant Cell Environ*, 22, 1319–1335.

Niinemets, U. (2002). Stomatal Constraints May Affect Emission of Oxygenated Monoterpenoids from the Foliage of *Pinus pinea*. *Plant Physiol*, 130, 1371–1385.

Niinemets, Ü., Loreto, F. & Reichstein, M. (2004). Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trends Plant Sci*, 9, 180–186.

Nojima, S., Linn, C., Morris, B., Zhang, A. & Roelofs, W. (2003). Identification of Host Fruit Volatiles. *J Chem Ecol*, 29, 321–336.

Nottingham, S.F., Hardie, J., Dawson, G.W., Hick, A.J., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., *et al.* (1991). Behavioral and electrophysiological responses of Aphids to host and nonhost plant volatiles. *J Chem Ecol*, 17, 1231–1242.

Nowińska, A. & Brožek, J. (2021). The variability of antennal sensilla in *Naucoridae* (Heteroptera: Nepomorpha). *Sci Rep*, 11, 19651.

Núñez, L., Plaza, J., Pérez-Pastor, R., Pujadas, M., Gimeno, B.S., Bermejo, V., *et al.* (2002). High water vapour pressure deficit influence on *Quercus ilex* and *Pinus pinea* field monoterpene emission in the central Iberian Peninsula (Spain). *Atmos Environ*, 36, 4441–4452.

O

Ômura, H. & Honda, K. (2009). Behavioral and electroantennographic responsiveness of adult butterflies of six nymphalid species to food-derived volatiles. *Chemoecology*, 19, 227–234.

Ormeño, E., Fernandez, C. & Mévy, J.-P. (2007). Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochem*, 68, 840–852.

Ormeño, E. & Fernandez, C. (2012). Effect of Soil Nutrient on Production and Diversity of Volatile Terpenoids from Plants. *Curr Bioact Compd*, 8, 71–79.

Owen, S.M. & Peñuelas, J. (2005). Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. *Trends Plant Sci*, 10, 420–426.

P

- Paoli, M., Münch, D., Haase, A., Skoulakis, E., Turin, L. & Galizia, C.G. (2017). Minute Impurities Contribute Significantly to Olfactory Receptor Ligand Studies: Tales from Testing the Vibration Theory. *eNeuro*, 4, 1–10.
- Park, D.-Y. & Lee, S. (2021). A new species of *Eurytoma* (Hymenoptera, Chalcidoidea, Eurytomidae) from South Korea, feeding on seeds of *Prunus tomentosa* Thunb. (Rosaceae). *JHR*, 85, 1–9.
- Peakall, R. & Beattie, A.J. (1996). Ecological and genetic consequences of pollination by sexual deception in the orchid *Caladenia tentaculata*. *Evolution*, 50, 2207–2220.
- Peñuelas, J. & Lluisà J. (2001). The complexity of factors driving volatile organic compounds emissions by plants. *Biol Plant*, 44, 481–487.
- Peñuelas, J. & Filella, I. (2001). Herbaria century record of increasing eutrophication in Spanish terrestrial ecosystems. *Glob Change Biol*, 7, 427–433.
- Peñuelas, J. & Staudt, M. (2010). BVOCs and global change. *Trends Plant Sci*, 15, 133–144.
- Pérez de los Cobos, F., Martínez-García, P.J., Romero, A., Miarnau, X., Eduardo, I., Howad, W., *et al.* (2021). Pedigree analysis of 220 almond genotypes reveals two world mainstream breeding lines based on only three different cultivars. *Hortic Res*, 8, 11.
- Pertot, I., Caffi, T., Rossi, V., Mugnai, L., Hoffmann, C., Grando, M.S., *et al.* (2016). A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. *Crop Prot*, 97, 70–84.
- Picazo-Aragón, J., Terrab, A. & Balao, F. (2020). Plant Volatile Organic Compounds Evolution: Transcriptional Regulation, Epigenetics and Polyploidy. *Int J Mol Sci*, 21, 8956.
- Pichersky, E., Noel, J.P. & Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. *Science*, 311, 808–811.
- Pickett, J.A., Woodcock, C.M., Midega, C.A. & Khan, Z.R. (2014). Push–pull farming systems. *Curr Opin Biotech*, 26, 125–132.
- Piel, J., Atzorn, R., Gäbler, R., Kühnemann, F. & Boland, W. (1997). Cellulysin from the plant parasitic fungus *Trichoderma viride* elicits volatile biosynthesis in higher plants via the octadecanoid signalling cascade. *FEBS Letters*, 416, 143–148.
- Pimentel, D. (1971). Chapitre 6: an Evaluation and Summary. In: *Ecological Effect of Pesticides on Non-Target Species*, Office of Science and Technology, U.S. Govt. Print. Off., Washington, pp. 177–182.
- Plaut, H.N. (1971). On the biology of the adult of the almond wasp, *Eurytoma amygdali* End. (Hym., Eurytomidae), in Israel. *Bull Entomol Res*, 61, 275–281.
- Plaut, H.N. (1972). On the biology of the immature stages of the almond wasp, *Eurytoma amygdali* End. (Hym. Eurytomidae) in Israel. *Bull Entomol Res*, 61, 681–687.
- Ponzio, C., Gols, R., Pieterse, C.M.J. & Dicke, M. (2013). Ecological and phytohormonal aspects of plant volatile emission in response to single and dual infestations with herbivores and phytopathogens. *Funct Ecol*, 27, 587–598.

Possell, M. & Loreto, F. (2013). Chapter 8. The Role of Volatile Organic Compounds in Plant Resistance to Abiotic Stresses: Responses and Mechanisms. In: *Biology, Controls and Models of Tree Volatile Organic Compound Emissions*, Tree Physiology 5 (eds. Niinemets, Ü. & Monson, R.K.). Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 209–235.

Q

Qiao, Z., Hu, H., Shi, S., Yuan, X., Yan, B. & Chen, L. (2021). An Update on the Function, Biosynthesis and Regulation of Floral Volatile Terpenoids. *Hortic*, 7, 1-22.

R

Rabhi, K.K., Esancy, K., Voisin, A., Crespín, L., Le Corre, J., Tricoire-Leignel, H., *et al.* (2014). Unexpected Effects of Low Doses of a Neonicotinoid Insecticide on Behavioral Responses to Sex Pheromone in a Pest Insect. *PLoS ONE*, 9. DOI: 10.1371/journal.pone.0114411.

Rabhi, K.K., Deisig, N., Demondion, E., Le Corre, J., Robert, G., Tricoire-Leignel, H., *et al.* (2016). Low doses of a neonicotinoid insecticide modify pheromone response thresholds of central but not peripheral olfactory neurons in a pest insect. *Proc R Soc B*, 283, 20152987.

Ramya, M., Jang, S., An, H.-R., Lee, S.-Y., Park, P.-M. & Park, P.H. (2020). Volatile Organic Compounds from Orchids: From Synthesis and Function to Gene Regulation. *Int J Mol Sci*, 21, 1160.

Ranger, C.M., Tobin, P.C. & Reding, M.E. (2014). Ubiquitous volatile compound facilitates efficient host location by a non-native ambrosia beetle. *Biol Invasions*, 17, 675–686.

Rasmann, S., Köllner, T.G., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., *et al.* (2005). Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434, 732–737.

Reddy, G.V.P. & Guerrero, A. (2000). Behavioral Responses of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*, to Green Leaf Volatiles of *Brassica oleracea* Subsp. *capitata*. *J Agric Food Chem*, 48, 6025–6029.

Regnier, F.E. (1971). Semiochemicals—Structure and Function. *Biol Reprod*, 4, 309–326.

Reisenman, C.E., Riffell, J.A., Bernays, E.A. & Hildebrand, J.G. (2010). Antagonistic effects of floral scent in an insect–plant interaction. *Proc R Soc B*, 277, 2371–2379.

Renou, M. & Anton, S. (2020). Insect olfactory communication in a complex and changing world. *Curr Opin Insect Sci*, 42, 1–7.

Renwick, J.A.A. & Radke, C.D. (1988). Sensory cues in host selection for oviposition by the cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *J Insect Physiol*, 34, 251–257.

Requier, F., Fournier, A., Pointeau, S., Rome, Q. & Courchamp, F. (2022). Economic Costs of the Invasive Asian Hornet on Honey Bees. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4280914>

Revadi, S., Vitagliano, S., Rossi Stacconi, M.V., Ramasamy, S., Mansourian, S., Carlin, S., *et al.* (2015). Olfactory responses of *Drosophila suzukii* females to host plant volatiles. *Physiol Entomol*, 40, 54–64.

Rochat, D., Nagnan-Le Meillour, P., Esteban-Duran, J.R., Malosse, C., Perthuis, B., Morin, J.-P., *et al.* (2000). Identification of Pheromone Synergists in American Palm Weevil, *Rhynchophorus Palmarum*, and Attraction of Related *Dynamis borassi*. *J Chem Ecol*, 26, 155–187.

Rodríguez-Cruz, S., Jones, J.E. & Bending, G.D. (2006). Field-scale study of the variability in pesticide biodegradation with soil depth and its relationship with soil characteristics. *Soil Biol Biochem*, 38, 2910–2918.

Rousse, P., Gourdon, F., Roubaud, M., Chiroleu, F. & Quilici, S. (2009). Biotic and Abiotic Factors Affecting the Flight Activity of *Fopius arisanus*, an Egg-Pupal Parasitoid of Fruit Fly Pests. *Environ Entomol*, 38, 896–903.

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>.

Ruckebusch, C. & Blanchet, L. (2013). Multivariate curve resolution: A review of advanced and tailored applications and challenges. *Anal Chim Acta*, 765, 28–36.

S

Saeidi, Z. (2021). Resistance of different almond cultivars/genotypes to almond fruit wasp, *Eurytoma amygdali* (Hymenoptera: Eurytomidae). *J Crop Prot*, 10, 11.

Sakar, E.H., El Yamani, M., Boussakouran, A. & Rharrabti, Y. (2019). Codification and description of almond (*Prunus dulcis*) vegetative and reproductive phenology according to the extended BBCH scale. *Sci Hortic*, 247, 224–234.

Salmon, S., Rebuffat, S., Prado, S., Sablier, M., D’Haese, C., Sun, J.-S. & Ponge J.-F. (2019). Chemical communication in springtails: a review of facts and perspectives. *Biol Fertil Soils*, 55, 425–438.

Santos, F.G., Fratelli, C., Muniz, D.G. & Capriles, V.D. (2018). Mixture Design Applied to the Development of Chickpea-Based Gluten-Free Bread with Attractive Technological, Sensory, and Nutritional Quality. *J Food Sci*, 83, 188–197.

Sauphanor, B. (1992). Une phéromone d’agrégation chez *Forficula auricularia*. *Entomol Exp Appl*, 62, 285–291.

Schillmiller, A., Shi, F., Kim, J., Charbonneau, A.L., Holmes, D., Daniel Jones, A., *et al.* (2010). Mass spectrometry screening reveals widespread diversity in trichome specialized metabolites of tomato chromosomal substitution lines: Solanum trichome chemistry. *Plant J*, 62, 391–403.

Schuh, G., Heiden, A. C., Hoffman, Th., Kahl, J., Rockel, P., Rudolph, J. & Wildt, J. (1997). Emissions of Volatile Organic Compounds from Sunflower and Beech: Dependence on Temperature and Light Intensity. *J Atmos Chem*, 27, 291–318.

Schuman, M.C., Allmann, S. & Baldwin, I.T. (2015). Plant defense phenotypes determine the consequences of volatile emissions for individuals and neighbors. *eLife*, 4, e04490.

Seabrook, W.D., Hirai, K., Shorey, H.H. & Gaston, L.K. (1979). Maturation and senescence of an insect chemosensory response. *J Chem Ecol*, 5, 587–594.

Shorey, H.H. & Gerber, R.G. (1996). Use of Puffers for Disruption of Sex Pheromone Communication Among Navel Orangeworm Moths (Lepidoptera: Pyralidae) in Almonds, Pistachios, and Walnuts. *Environ Entomol*, 25, 1154–1157.

Siderhurst, M.S. & Jang, E.B. (2010). Cucumber Volatile Blend Attractive to Female Melon Fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). *J Chem Ecol*, 36, 699–708.

Simon, S., Komlan, F.A., Adjaito, L., Mensah, A., Coffi, H.K., Ngouajio, M., *et al.* (2014). Efficacy of insect nets for cabbage production and pest management depending on the net removal frequency and microclimate. *Int J Pest Manag*, 60, 208–216.

Smith, C.M. & Clement, S.L. (2012). Molecular Bases of Plant Resistance to Arthropods. *Annu Rev Entomol*, 57, 309–328.

Socias i Company R., José M. Ansón J.M. & Espiau M.T. (2017). Taxonomy, Botany and Physiology. In *Botany, Production and Uses*. Boston, MA: CABI, pp.33-122

Socias i Company, R. (2017). Pollen-Style. In *Compatibility: Development of Autogamous Cultivars*, Company, R.S.I., Gradziel, T.M., Eds.; CABI Publishing-C A B Int: Wallingford, pp. 188–208. ISBN 978-1-78064-355-7.

Stapel, J.O., Cortesero, A.M. & Lewis, W.J. (2000). Disruptive Sublethal Effects of Insecticides on Biological Control: Altered Foraging Ability and Life Span of a Parasitoid after Feeding on Extrafloral Nectar of Cotton Treated with Systemic Insecticides. *Biol Control*, 17, 243–249.

Staudt, M. & Seufert, G. (1995). Light-dependent Emission of Monoterpenes by Holm Oak (*Quercus ilex* L.). *Naturwissenschaften*, 82, 89–92.

Staudt, M., Ennajah, A., Mouillot, F. & Joffre, R. (2008). Do volatile organic compound emissions of Tunisian cork oak populations originating from contrasting climatic conditions differ in their responses to summer drought? *Can J For Res*, 38, 2965–2975.

Staudt, M., Jackson, B., El-aouni, H., Buatois, B., Lacroze, J.-P., Poessel, J.-L. & Sauge, M.-H. (2010). Volatile organic compound emissions induced by the aphid *Myzus persicae* differ among resistant and susceptible peach cultivars and a wild relative. *Tree Physiol*, 30, 1320–1334.

Staudt, M., Bourgeois, I., Al Halabi, R., Song, W. & Williams, J. (2017). New insights into the parametrization of temperature and light responses of mono - and sesquiterpene emissions from Aleppo pine and rosemary. *Atmos Environ*, 152, 212–221.

Steinbrecht, R.A. (2007). Structure and Function of Insect Olfactory Sensilla. In: *Novartis Foundation Symposia* (eds. Bock, G.R. & Cardew, G.). John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, pp. 158–183.

Sugimoto, K., Matsui, K., Iijima, Y., Akakabe, Y., Muramoto, S., Ozawa, R., *et al.* (2014). Intake and transformation to a glycoside of (Z)-3-hexenol from infested neighbors reveals a mode of plant odor reception and defense. *Proc Natl Acad Sci*, 111, 7144–7149.

T

Taghizadeh, M., Lotfaliadeh, H., Shirdel, D. & Dejampour, J. (2022). Study on the resistance of different

almond varieties to *Eurytoma amygdali* Enderlein (Hymenoptera: Eurytomidae). *J Entomol Soc Iran*, 42, 91–100.

Takai, H., Ozawa, R., Takabayashi, J., Fujii, S., Arai, K., Ichiki, R.T., *et al.* (2018). Silkworms suppress the release of green leaf volatiles by mulberry leaves with an enzyme from their spinnerets. *Sci Rep*, 8, 1–14.

Takeoka, G.R., Flath, R.A., Mon, T.R., Teranishi, R. & Guentert, M. (1990). Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca*). *J Agric Food Chem.*, 38, 471–477.

Takken, W., Van Loon, J.J.A. & Adam, W. (2001). Inhibition of host-seeking response and olfactory responsiveness in *Anopheles gambiae* following blood feeding. *J Insect Physiol*, 47, 303–310.

Talhok, A.S. (1977). Contributions to the knowledge of almond pests in East Mediterranean countries: V. The fruit-feeding insects, *Eurytoma amygdali* End., and *Anarsia lineatella*. *Z Angew Entomo*, 83, 145–154.

Tan, K.-H. & Nishida, R. (2000). Mutual reproductive benefits between a wild orchid, *Bulbophyllum patens*, and Bactrocera fruit flies via a floral synomone. *J Chem Ecol*, 26, 533–546.

Tasin, M., Bäckman, A.-C., Coracini, M., Casado, D., Ioriatti, C. & Witzgall, P. (2007). Synergism and redundancy in a plant volatile blend attracting grapevine moth females. *Phytochem*, 68, 203–209.

Tasin, M., Lucchi, A., Ioriatti, C., Mraihi, M., De Cristofaro, A., Boger, Z., *et al.* (2011). Oviposition Response of the Moth *Lobesia botrana* to Sensory Cues from a Host Plant. *Chem Senses*, 36, 633–639.

Tatarko, A.R., Leonard, A.S. & Mathew, D. (2023). A neonicotinoid pesticide alters *Drosophila* olfactory processing. *Sci Rep*, 13, 1–8.

Thiéry, D. (2008). Les Tordeuses nuisibles à la vigne. In : *Les ravageurs de la vigne*, (eds. Kreiter S.), 2^e édition, Féret, Bordeaux. DOI : 10.13140/2.1.4968.7364

Tissier, A., Morgan, J.A. & Dudareva, N. (2017). Plant Volatiles: Going 'In' but not 'Out' of Trichome Cavities. *Trends Plant Sci*, 22, 930–938.

Tomasi, P., Dyer, J.M., Jenks, M.A. & Abdel-Haleem, H. (2018). Characterization of leaf cuticular wax classes and constituents in a spring *Camelina sativa* diversity panel. *Ind Crops Prod*, 112, 247–251.

Ton, J., D'Alessandro, M., Jourdie, V., Jakab, G., Karlen, D., Held, M., *et al.* (2006). Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize: Protective mechanisms of VOC-induced priming. *Plant J*, 49, 16–26.

Touzeau, J. (1980). Use of Pheromone Traps in Agricultural Warning Systems. *EPPO Bulletin*, 10, 97–104.

Trematerra, P., Athanassiou, C.G., Sciarretta, A., Kavallieratos, N.G. & Buchelos, C. Th. (2013). Efficacy of the auto-confusion system for mating disruption of *Ephestia kuehniella* (Zeller) and *Plodia interpunctella* (Hübner). *J Stored Prod Res*, 55, 90–98.

Tumlinson, J.H., Klein, M.G., Doolittle R.E., Ladd, T.L. & Proveaux, A.T. (1977). Inhibition of Male Response by an Enantiomer. *Science*, 197, 789–792.

Turlings, T.C.J. & Erb, M. (2018). Tritrophic Interactions Mediated by Herbivore-Induced Plant Volatiles: Mechanisms, Ecological Relevance, and Application Potential. *Annu Rev Entomol*, 63, 433–452.

Tzanakakis, M.E., Karakassis, E.J., Tsaklidis, G., Karabina, E.Ch., Argalavini, I.Ch. & Arabatzis, I.G. (1991). Diapause termination in the almond seed wasp, *Eurytoma amygdali* Enderlein (Hym., Eurytomidae), in northern Greece and under certain photoperiods and temperatures. *J Appl Entomol*, 111, 86–98.

Tzanakakis, M.E. & Veerman, A. (1994). Effect of temperature on the termination of diapause in the univoltine almond seed wasp *Eurytoma amygdali*. *Entomol Exp Appl*, 70, 27–39.

V

Vallat, A., Gu, H. & Dorn, S. (2005). How rainfall, relative humidity and temperature influence volatile emissions from apple trees in situ. *Phytochem*, 66, 1540–1550.

Vanderplanck, M., Lapeyre, B., Brondani, M., Opsommer, M., Dufay, M., Hossaert-McKey, M. & Proffit M. (2021). Ozone Pollution Alters Olfaction and Behavior of Pollinators. *Antioxidants*, 10, 636.

Vandermoten, S., Mescher, M.C., Francis, F., Haubruge, E. & Verheggen, F.J. (2012). Aphid alarm pheromone: An overview of current knowledge on biosynthesis and functions. *Insect Biochem Mol Biol*, 42, 155–163.

Velasco, D., Hough, J., Aradhya, M. & Ross-Ibarra, J. (2016). Evolutionary Genomics of Peach and Almond Domestication. *G3-Genes Genom Genet*, 6, 3985–3993.

Verschut, T.A., Ng, R., Doubovetzky, N.P., Le Calvez, G., Sneep, J.L., Minnaard, A.J., *et al.* (2023). Aggregation pheromones have a non-linear effect on oviposition behavior in *Drosophila melanogaster*. *Nat Commun*, 14, 1544.

W

Wäckers, F.L. (1994). The effect of food deprivation on the innate visual and olfactory preferences in the parasitoid *Cotesia rubecula*. *J Insect Physiol*, 40, 641–649.

Warlop, F. (2012). Recherche de produits naturels efficaces contre la guêpe de l'amandier *Eurytoma amygdali*. GRAB, [\[Lien\]](#).

Webster, B., Bruce, T., Pickett, J. & Hardie, J. (2010). Volatiles functioning as host cues in a blend become nonhost cues when presented alone to the black bean aphid. *Anim Behav*, 79, 451–457.

Whitman, D.W. & Eller, F.J. (1990). Parasitic wasps orient to green leaf volatiles. *Chemoecology*, 1, 69–76.

Winer, A.M., Arey, J., Atkinson, R., Aschmann, S.M., Long, W.D., Morrison, C.L., *et al.* (1992). Emission rates of organics from vegetation in California's Central Valley. *Atmos Environ. Part A. General Topics*, 26, 2647–2659.

Wintermantel, D., Odoux, J.-F., Decourtye, A., Henry, M., Allier, F. & Bretagnolle, V. (2020). Neonicotinoid-induced mortality risk for bees foraging on oilseed rape nectar persists despite EU moratorium. *Sci Total Environ*, 704, 135400.

Witzgall, P., Ansebo, L., Yang, Z., Angeli, G., Sauphanor, B. & Bengtsson, M. (2005). Plant volatiles affect oviposition by codling moths. *Chemoecology*, 15, 77–83.

Wojtasek, H., Hansson, B.S. & Leal, W.S. (1998). Attracted or Repelled? A Matter of Two Neurons, One Pheromone Binding Protein, and a Chiral Center. *BBRC*, 250, 217–222.

Wood, T.J. & Goulson, D. (2017). The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ Sci Pollut Res*, 24, 17285–17325.

Wright, G.A. & Schiestl, F.P. (2009). The evolution of floral scent: the influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards. *Funct Ecol*, 23, 841–851.

X

Xie, L., Bai, X., Zhang, H., Qiu, X., Jian, H., Wang, Q., *et al.* (2023). Loss of Rose Fragrance under Chilling Stress Is Associated with Changes in DNA Methylation and Volatile Biosynthesis. *Genes*, 14, 1–14.

Xu, H. & Turlings, T.C.J. (2018). Plant Volatiles as Mate-Finding Cues for Insects. *Trends Plant Sci*, 23, 100–111.

Y

Yamagata, N., Nishino, H. & Mizunami, M. (2006). Pheromone-sensitive glomeruli in the primary olfactory centre of ants. *Proc R Soc B*, 273, 2219–2225.

Yang, C.Y., Mori, K., Kim, J. & Kwon, K.B. (2020). Identification and field bioassays of the sex pheromone of *Eurytoma maslovskii* (Hymenoptera: Eurytomidae). *Sci Rep*, 10, 10281.

Ye, M., Veyrat, N., Xu, H., Hu, L., Turlings, T.C.J. & Erb, M. (2018). An herbivore-induced plant volatile reduces parasitoid attraction by changing the smell of caterpillars. *Sci Adv*, 4, 1–8.

Yiğit, T., Özgen, İ., Canbay, A. & Koç, İ. (2020). Infestation Rate of Almond Seed Wasp (*Eurytoma Amygdali* Enderlein, Hymenoptera: Eurytomidae) on Important Commercial Almond Varieties in Malatya Province (Turkey). *Int J Innov Eng Appl*, 4, 9–12.

Yuan, J.S., Himanen, S.J., Holopainen, J.K., Chen, F. & Stewart, C.N. (2009). Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds. *Trends Ecol Evol*, 24, 323–331.

Yuan, X., Feng, Z., Hu, C., Zhang, K., Qu, L. & Paoletti, E. (2021). Effects of elevated ozone on the emission of volatile isoprenoids from flowers and leaves of rose (*Rosa* sp.) varieties. *Environ Pollut*, 291, 1–11.

Z

Zeng, L., Wang, X., Kang, M., Dong, F. & Yang, Z. (2017). Regulation of the Rhythmic Emission of Plant Volatiles by the Circadian Clock. *Int J Mol Sci*, 18, 1–11. DOI: 10.3390/ijms18112408.

Zerova, M. D. & Fursov V. N. (1991). The Palearctic species of *Eurytoma* (Hymenoptera: Eurytomidae) developing in stone fruits (Rosaceae: Prunoideae). *Bull Entomol Res*, 81, 209–219.

Zerova, M.D. & Seryogina, L.Ya. (2009). A review of Palaearctic species of the *Eurytoma cynipsea* group

- (Hymenoptera, Eurytomidae) with a description of a new species from Iran. *Entomol Rev*, 89, 721–729.
- Zhang, Q.-H. & Schlyter, F. (2004). Olfactory recognition and behavioural avoidance of angiosperm nonhost volatiles by conifer-inhabiting bark beetles. *Agric Forest Ent*, 6, 1–20.
- Zhang, A. (2006). Olfactory Discrimination among Sex Pheromone Stereoisomers: Chirality Recognition by Pink Hibiscus Mealybug Males. *Chem Senses*, 31, 621–626.
- Zhang, A., Kuang, L.F., Maisin, N., Karumuru, B., Hall, D.R., Virdiana, I., *et al.* (2008). Activity Evaluation of Cocoa Pod Borer Sex Pheromone in Cacao Fields. *Environ Entomol*, 37, 719–724.
- Zhang, Y.M., Gates, M.W. & Shorthouse, J.D. (2017). Revision of Canadian Eurytomidae (Hymenoptera, Chalcidoidea) associated with galls induced by cynipid wasps of the genus *Diplolepis* Geoffroy (Hymenoptera, Cynipidae) and description of a new species. *JHR*, 61, 1–29.
- Zhang, L., Mao, H., Zhuang, Y., Wang, L., Liu, L., Dong, Y., *et al.* (2021). Odor prediction and aroma mixture design using machine learning model and molecular surface charge density profiles. *Chem Eng Sci*, 245, 116947.
- Zhang, L., Su, Q., Wang, L., Lv, M., Hou, Y. & Li, S. (2023). Linalool: A ubiquitous floral volatile mediating the communication between plants and insects. *J Syst Evol*, 61, 538–549.
- Zhou, S. & Jander, G. (2022). Molecular ecology of plant volatiles in interactions with insect herbivores. *J Exp Bot*, 73, 449–462.
- Zouba, A. & Mahjoubi, K. (2010). Biological Control of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) with Release of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Tomato Greenhouse in Tunisia. *Afr J Plant Sci Biotech*, 2, 82–85.