



Evaluation des impacts environnementaux liés aux pratiques phytosanitaires en vergers de pommiers : approches écotoxicologique et écologique utilisant un auxiliaire des cultures, le forficule

Laure Malagnoux

► To cite this version:

Laure Malagnoux. Evaluation des impacts environnementaux liés aux pratiques phytosanitaires en vergers de pommiers : approches écotoxicologique et écologique utilisant un auxiliaire des cultures, le forficule. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2014. Français. NNT : 2014AVIG0331 . tel-01085977

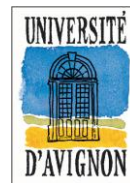
HAL Id: tel-01085977

<https://theses.hal.science/tel-01085977>

Submitted on 21 Nov 2014

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.



Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse
Institut Méditerranée de Biodiversité et d'Ecologie
Institut National de la Recherche Agronomique

Thèse de Doctorat

Date
2010 – 2014

Lieu
Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
IMBE UMR 7263 Pôle Agrosiences
Equipe « Biomarqueurs et Bioindicateurs environnementaux »

Evaluation des impacts environnementaux liés aux pratiques phytosanitaires en vergers de pommiers. Approches écotoxicologique et écologique utilisant un auxiliaire des cultures, le forficule.

présentée par

Laure Malagnoux

Ecole doctorale (ED 536) Sciences et Agrosiences

Soutenue le 06 Juin 2014 devant le jury composé de :

Eric Pinelli	Professeur, ENSAT, Toulouse	Rapporteur
Annette de Vaufleury	Maître de conférence HDR, Univ. Besançon	Rapporteur
Rita Triebkorn	Professeur, Univ. de Tübingen, Allemagne	Examineur
David Lejon	Ingénieur de recherche, pôle Ecotox, Valence	Examineur
Magali Rault	Maître de conférence, Univ. Avignon	Co-directrice
Yvan Capowiez	Chargé de Recherche, INRA, Avignon	Co-directeur
Mohamed El Maâtaoui	Professeur, Univ. Avignon	Directeur

Remerciements

Un grand merci à Mohamed El Maâtaoui pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci à Magali Rault et Yvan Capowiez pour avoir proposé ce sujet et avoir inauguré l'encadrement d'un thésard en commun.

Je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail et les membres de mon comité de pilotage pour leurs conseils.

Un sincère grand merci à Odile Mascle pour m'avoir aidé sur le terrain, pour maintenir l'élevage et pour ton soutien !

Un grand merci à mon stagiaire Romain qui m'a aidé à mettre au point le protocole du test de prédation. On a bien rigolé entre les moments où on comptait les pucerons, les soins sur l'élevage, les sorties terrain etc. Ta présence est un merveilleux souvenir et forcément dans ces souvenirs font parti les stagiaires présents à l'époque à l'INRA et qui ont partagé nos ptits délires (ma coupine bzzbzz Marie, J.B. et son ptit écureuil Squat). De très bons souvenirs aussi concernant les stagiaires avec qui j'ai partagé le bureau/labo à Agrosiences (Nana, Cécile), c'est un plaisir d'avoir des nouvelles encore aujourd'hui.

Merci également à toute l'équipe de Tübingen. J'aurais passé deux mois merveilleux entourée d'autres thésards/étudiants (Anja !, Diana, Krisztina, Andreas, Paul...) dans un cadre magnifique et agréable ! Merci Heinz, Rita, Stefie...

Un merci particulier à Gaëlle Marliac, la seule thésarde qui connaissait mes ptits forficules et les vergers étudiés pour mon étude. Ta rencontre à mon retour a été un réel point positif. Merci pour tes relectures, le partage de tes connaissances, ton écoute et merci pour les pauses où on aura pu parler de nos racines corréziennes ☺

Parce que seule, je n'y serais jamais arrivée, tous ceux qui vont suivre ont plus que compté pour boucler cette thèse. Pour commencer, mes parents et mon frère, merci pour m'avoir soutenue tout au long de ces quatre ans et face à moi dans n'importe quel état que ce soit. Vous êtes les seuls à avoir vu (et être conscients de) tous les efforts fournis dans ce travail. Votre amour et votre présence (même par téléphone/skype) sont inclassables et je ne vous remercierai jamais assez !!!

Ces remerciements s'adressent également aux personnes qui m'ont sauvé la vie, des pompiers mobilisés aux équipes médicales de la clinique Clairval (mon « Dr house » et son ptit Marius particulièrement) et de l'hôpital de Brive. J'ai été loin de la thèse pendant 9 mois mais j'aurais rencontré des gens extraordinaires, merci à tous les patients que j'ai vu se battre, pas pour finir une thèse mais pour continuer à vivre (particulièrement Katy à Marseille et Lynda à Brive, vous m'avez montré l'existence d'un courage incroyable !! merci).

Mica parce que tu as forcément compté pour le choix de cette thèse et que notre histoire m'a forcément forgée pour boucler cette thèse. Je ne vais pas m'étendre mais tu nous as appris à profiter de la vie et de tout ce qu'on trouve « démens », MERCI !

Mon doc Jedi (Florence Martin) et Peg, merci pour votre écoute dans tous les moments et vos conseils encore aujourd'hui. Les pauses « chocolat » du CEA m'auront bien manqué, sans parler de nos délires sur la paillasse avec mon doc Jedi ! C'est toujours un très grand plaisir de vous retrouver pour randonner, discuter, délirer.

Mes « Grenoblois » (Franz, Seb, Sveta, F.X., Caro, Mael, Simon, Dawan, Armin, Xavier), forcément vous avez énormément compté, surtout ces trois dernières années!! Merci pour votre soutien, votre présence jusqu'au pied de mon lit à l'hôpital ou dès ma sortie de l'hôpital dans mon pays vert. Merci pour le partage de vos conseils/aventures de thésards et surtout toutes les pauses « détente » en montagne et même en mer (merci F.X, Svet et Seb, hiiihiii).

Merci à tous les corréziens qui m'auront soutenu à distance également et/ou dès qu'on rentrait respectivement (Pierrot, Millou, Lilou, Vince, Nel, mon ptit frère Auré et ta famille). Vous faites parti de mes moments « ressourçages » ☺

Pour finir, Joris, parce que c'est toi qui as le plus subi mon stress (et tout ce qui en découle) ces derniers temps. Merci pour ton écoute, ton soutien en continu, ta patience quand je te dis « non je travaille », merci pour toutes tes bonnes attentions, merci pour ton amour ☺ ☺

Résumé

Dans le contexte européen actuel visant la réduction des risques et de l'utilisation des pesticides, le développement d'outils permettant d'évaluer les impacts environnementaux est un objectif majeur. Cette thèse recouvre approche écotoxicologique et approche écologique sous forme d'études de l'échelle tissulaire à l'échelle des populations. L'espèce modèle est un prédateur généraliste, le forficule, et le site d'étude les vergers de pommiers du Sud-est de la France. Les effets des pesticides ont été testés aussi bien en condition de laboratoire qu'en conditions réelles (en vergers). Les études en laboratoire nous ont permis de caractériser et d'étudier la localisation tissulaire des B-estérases (AChE et CbE) et d'évaluer la capacité prédatrice chez *Forficula auricularia* après exposition, sur le puceron *Dysaphis plantaginea*. Les CbE sont plus sensibles que l'AChE chez *F. auricularia* et les B-estérases des mâles sont toujours plus sensibles aux insecticides organophosphorés que celles des femelles. Ces résultats nous permettent de valider l'utilisation des B-estérases comme biomarqueurs biochimiques chez *F. auricularia*. La capacité prédatrice de *F. auricularia* est diminuée par certains insecticides avec les mâles plus impactés que les femelles. Les mesures d'activité des B-estérases ont corroboré les résultats validant le comportement de prédation comme un nouveau biomarqueur. A l'échelle de l'organisme, la reproduction et le développement des premiers stades larvaires ont été suivis grâce à un élevage mis en place à partir d'insectes prélevés dans des vergers soumis à différentes pratiques phytosanitaires (agriculture biologique, raisonnée et conventionnelle). Le nombre d'œufs par ponte est réduit et la date de ponte retardée pour les forficules provenant des vergers à agriculture « conventionnelle ». Pour évaluer l'effet des pesticides à l'échelle des populations, l'abondance et la diversité du forficule (*F. auricularia* et *F. pubescens*) ont été suivies en vergers en prenant également en compte des caractéristiques paysagères. L'impact des pratiques phytosanitaires est plus important que celui des caractéristiques paysagères. L'espèce *F. pubescens* est plus sensible que *F. auricularia*, avec la même différence de sensibilité entre sexes chez les deux espèces (mâles plus sensibles). Le forficule devient alors une espèce bioindicatrice pertinente de l'utilisation des pesticides en verger de pommiers. Cette étude soulève le besoin de biomarqueurs complémentaires capables de mettre en évidence les modifications physiologiques et comportementales qui influencent les populations d'auxiliaires et la régulation naturelle des ravageurs.

Mots clés : *Forficula auricularia*, approche multiscalaire, biomarqueurs, pesticides, lutte intégrée, *Forficula pubescens*

Abstract

In the European context which aims at reducing risk and uses of pesticides, the development of tools to evaluate environmental impacts is a major focus. This thesis uses ecotoxicological and ecological approaches, from tissue level to population level. The model species is a generalist predator, the earwig, and the study site is apple orchards in Southeastern France. Pesticides expositions were tested both in laboratory or real conditions (in orchards). Lab studies allowed us to characterize and investigate the tissular distribution of B-esterases (AChE and CbE) of *Forficula auricularia* and to study its predatory behavior on the aphid *Dysaphis plantaginea* after exposure. CbE were more sensitive than AChE and males B-esterases were more sensitive than females ones to organophosphorus pesticides. The overall results allowed us to validate the use of B-esterases as biochemical biomarkers on *F. auricularia*. The predation behavior of *F. auricularia* was impacted by some insecticides with males more sensitive than females. The behavior results were supported by inhibition of biochemical biomarkers (B-esterases) validating predation behavior as a new biomarker. Taking into account the individual level, the reproduction and development of first larval stages were carried out thanks to a breeding set up with earwigs trapped in orchards conducted under different pest management (organic, integrated and conventional management). Eggs number by clutch was reduced and clutch date was delayed for earwigs trapped in orchards conducted under conventional agriculture. To assess the impact of pesticides on population level, the abundance and diversity of earwig (*F. auricularia* and *F. pubescens*) were carried out in different orchard management considering small-scale landscape parameters. Pesticide use had clearly much higher effects on earwig abundances and diversity than landscape characteristics. *F. pubescens* was more sensitive than *F. auricularia*, with the same sensitivity difference between sex on both species (males more sensitive) making earwigs a relevant bioindicator species of pesticides use in apple orchards. This study enhances the need of complementary biomarkers able to highlight physiological and behavioral modifications which influence natural enemy populations and the natural regulation of pests.

Keywords : *Forficula auricularia*, multiscalar approach, biomarkers, pesticides, integrated pest management, *Forficula pubescens*

Sommaire

Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iv
 Chapitre I. Introduction générale.....	1
1. L'utilisation des pesticides : situation et évolutions.....	2
1.1. Marché mondial, européen et français des pesticides	3
1.2. Contexte réglementaire : différents angles d'attaque.....	4
1.3. Les différentes familles de pesticides utilisées aujourd'hui.....	7
1.4. Contamination des milieux et intérêt de l'écotoxicologie	9
2. Le cas d'étude, les vergers de pommiers du Sud-est de la France	15
2.1. Les principaux ravageurs	15
2.2. Les différents modes de protection phytosanitaire	18
2.3. Alternatives possibles aux pesticides	20
3. Espèce modèle étudiée : le forficule.	23
3.1. Cycle biologique et écologie.....	24
3.2. Régime alimentaire	27
3.3. Sensibilité aux pesticides	28
Chapitre II. Objectifs de la thèse.....	31
 Chapitre III. Caractérisation biochimique des B-estérases (AChE et CbE) chez <i>F. auricularia</i>	357
1. Introduction	38
2. Materials and methods.....	39
a. Chemicals	
b. Experimental setup, animals and sample preparation	

c. B-esterase activity assay	
d. Esterase characterization	
e. Native electrophoresis of CbE isoenzymes	
f. In vitro B-esterase inhibition by pesticides	
g. Data and statistical analysis	
3. Results	43
a. Esterase location and activity levels	
b. Characterization of esterases	
c. In vitro inhibition of B-esterases by pesticides	
4. Discussion.....	51
a. Characterization of B-esterase activities	
b. B-esterase sensitivity to pesticides	
5. Conclusions	54
 Chapitre IV. La capacité de prédation comme biomarqueur du comportement.....	55
1. Introduction	57
2. Materials and methods.....	59
a. Aphid populations	
b. Earwigs and the predation test	
c. Measurement of B-esterase activity	
d. Statistical analysis	
3. Results	63
a. Effects of insecticides on earwig predation	
b. Effects of insecticides on B-esterase activities	
4. Discussion.....	67
a. Impact of insecticides on earwig predation	
b. The impact on predation behavior is supported by B-esterases responses	
5. Conclusions	71
 Chapitre V. Les pratiques phytosanitaires influencent la fécondité et le développement hivernale du forficule <i>F. auricularia</i>	72
1. Introduction	72
2. Matériels et méthodes	74
a. Echantillonnage des forficules et mise en place de l'élevage	
b. Analyses statistiques	
3. Résultats.....	76
4. Discussion.....	78
5. Conclusion	81
 Chapitre VI. Abondance et diversité du forficule dans des vergers soumis à différentes pratiques	83
1. Introduction	85

2.	Materials and methods.....	87
	a. Field sites and characterization	
	b. Earwigs sampling	
	c. LD ₅₀ assay	
	d. Statistical analysis	
3.	Results	90
	a. Pesticide application	
	b. Earwig abundance and diversity	
	c. LD ₅₀	
4.	Discussion.....	94
5.	Conclusions	97
Chapitre VII. Bilan de la thèse.....		99
Perspectives		109
Bibliographie		111

Liste des abréviations

AB : Agriculture Biologique	IPM : Integrated Pest Management
AChE : Acétylcholinestérase	IRAC : Insecticide Resistance Action Committee
AcSCh : Acetylthiocholine	Itab : Institut Technique de l'Agriculture Biologique
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	L1, L2, L3, L4 : 1 ^{er} , 2 ^e , 3 ^e , 4 ^e stades larvaires du forficule
α NA : α -naphthyl acetate	LD ₅₀ : Lethal Median Dose
BuChE : Butyrylcholinesterase	LISA : Low Input Sustainable Agriculture
CB : Carbamate Pesticides	LMR: Limite Maximale de Résidus
CbE : Carboxylestérase	NAR : Normal Application Rate
ChE : Cholinesterase	4-NPA : 4-nitrophenyl acetate
Conv : Conventionnel	4-NPV : 4-nitrophenyl valerate
Ctifl : Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes	OILB : Organisation Internationale de la Lutte Biologique
DAR : Délai Avant Récolte	OP : Organophosphorus Pesticides
DRAAF : Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt	PCB : PolyChloroBiphényle
EC : European Commision	PFI : Production Fruitière Intégrée
FAO : Food and Agriculture Organization	TFI: Treatment Frequency Index computed on all pesticides
FRAC : Fungicide Resistance Action Committee	TFI _{fung} , TFI _{insect} , TFI _{micro} : Treatment Frequency Index computed only on fungicides, insecticides and microbial insecticides respectively
GLM : Generalized Linear Model	UIPP : Union des Industries de la Protection des Plantes
HAP: Hydrocarbure Aromatique Polycyclique	
HRAC : Herbicide Resistance Action Committee	
IFT : Indicateur de Fréquence de Traitement	

Liste des figures

Figure 1. Etat du marché des pesticides a) en 2011 au niveau mondial (en million de dollar) et b) en 2010 au niveau européen (en million d'euros) (source UIPP).....	3
Figure 2. Tonnages des substances actives vendues en France de 1998 à 2011 (source UIPP). 4	
Figure 3. Nombre de publications sur les effets des pesticides de 1985 à 2012 (Koehler and Triebkorn 2013).	9
Figure 4. Dispersion dans l'environnement d'un pesticide appliqué sur une plante (source DRAAF).	10
Figure 5. Spécificité des outils en termes de niveaux de réponse du vivant et capacité intégrative versus identification des processus (modifié à partir de Pont and Garric 2010)....	11
Figure 6. Spécificité et pertinence écologique des différentes échelles de mesures d'impact (Addison 1996).....	13
Figure 7. Tordeuse orientale en A. (<i>Cydia molesta</i>) et carpocapse en B. (<i>Cydia pomonella</i>). Photos Le Masson.	16
Figure 8. Puceron cendré en A. (<i>Disaphis plantaginea</i>), puceron lanigère en B. (<i>Eriosoma lanigerum</i>), puceron vert migrant en C. (<i>Rhopalosiphum insertum</i>), puceron vert non migrant en D. (<i>Aphis pomi</i>). Photos INRA (A.), anonyme (B.), Centre d'exploitation et de technologie horticole portugais (C. et D.).....	16
Figure 9. Pou de Saint José (<i>Diaspidiotus perniciosus</i>) en A., zeuzère (<i>Zeuzera pyrina</i>) en B. Photos INRA.	17
Figure 10. Mâle (à gauche) et femelle (à droite) <i>Forficula auricularia</i> L. (photo Pascal Goetgheluck)	23
Figure 11. Mâle <i>F. pubescens</i> en A., femelle <i>F. pubescens</i> en B. (Photos Balocchi).....	24
Figure 12. Biologie du forficule <i>F. auricularia</i> dans le Sud Est de la France.	25
Figure 13. Photos d'une femelle <i>F. auricularia</i> nettoyant ses œufs (A) et prenant soin de ses larves en pleine éclosion (B).	26
Figure 14. Schéma synthétique de la thèse.....	34
Figure 15. Location of B-esterase activities in different tissues of the earwig <i>Forficula auricularia</i> (Head ; Thorax ; Abdomen) from the crude homogenate.	45
Figure 16. Cellular distribution of B-esterase activities in females.	46
Figure 17. Effect of different eserine concentrations on acetylcholinesterase (AChE) and carboxylesterase (CbE) activities in <i>Forficula auricularia</i>	47

Figure 18. Determination of B-esterase kinetic parameters in <i>Forficula auricularia</i> , in both males and females	48
Figure 19. Effect of the organophosphate insecticide chlorpyrifos-oxon and the carbamate Sevin85®.....	49
Figure 20. The number of aphids consumed over a 24h period at 20°C by one adult <i>Forficula auricularia</i> earwig.....	63
Figure 21. Predation rates of fourth-instar <i>Forficula auricularia</i> earwigs following pesticide exposure.	64
Figure 22. Predation rates of adult <i>Forficula auricularia</i> earwigs following pesticide exposure (n=8 for each sex and treatment).....	65
Figure 23. B-esterase assays after pesticide exposure of fourth-instar <i>Forficula auricularia</i> earwigs.	66
Figure 24. B-esterase assays after pesticide exposure of adult <i>Forficula auricularia</i> earwigs (with sex distinction).....	67
Figure 25. Dispositif utilisé pour l'élevage de forficule. Boîte de Pétri de 8 cm avec une couvercle aéré, du sable humidifié pour permettre aux forficules de construire un terrier, une mangeoire remplie toutes les semaines avec des grains de pollens.	75
Figure 26. Nombre moyen d'œufs par couple pour les 3 années d'élevage. Les différentes lettres au dessus des barres d'erreur indiquent les différences significatives avec l'ANOVA deux facteurs hiérarchisés, significativité 5%.	76
Figure 27. Distribution des pontes en fonction du temps, relevée au cours des 3 années d'élevage selon la provenance des forficules.....	77
Figure 28. Nombre de L3 transférés par couple selon la nature de la protection phytosanitaire d'où proviennent les adultes forficules.	78
Figure 29. Mean (+SE) of Treatment Frequency Index for the insecticides, fungicides, microbial and all pesticides applied annually in the orchards according to their management.	91
Figure 30. Mean densities (+SE) of <i>F. auricularia</i> (a) and <i>F. pubescens</i> (b) in the orchards according to their management.	92
Figure 31. Percentage of <i>F. pubescens</i> in the orchards according to their management.	92
Figure 32. Schéma synthétique des principaux résultats, avec les liens connectant les différentes échelles d'étude.....	108

Liste des tableaux

Tableau 1. Insecticides neurotoxiques étudiés dans cette thèse.	8
Tableau 2. Récapitulatif des principaux ravageurs du pommier et de leur période de traitements.	17
Tableau 3. Tableau récapitulatif des différences observables entre <i>F. auricularia</i> et <i>F. pubescens</i> . (à partir de (Albouy and Caussanel 1990)	27
Tableau 4. Contrôle potentiel du forficule <i>F. auricularia</i> aux stades adulte ou larvaire (L3, L4) pour les principaux ravageurs du pommier dans le Sud-est de la France, en reliant la phénologie du forficule et du ravageur (modifié à partir de Gobin et al. 2008).	28
Tableau 5. Kinetic parameters ^a of AChE and CbE activities measured respectively in the head or the abdomen of males and females earwigs. ^a Kinetic parameters were obtained by fitting the experimental data points to the Michaelis-Menten equation using XLSTAT software.	48
Tableau 6. Kinetic constants and parameters for in vitro B-esterase inhibition by chlorpyrifos-oxon (OP) and Sevin85® (CB). AChE activity was measured in the head. CbE activities were measured in the abdomen. Italic results correspond to experiments carried out on whole body (wb).	50
Tableau 7. Insecticides used in this study. ⁽¹⁾ All insecticides were used at their Normal Application Rates (NAR) for apple orchards in France.	61
Tableau 8. Nombre de vergers étudiés et nombre de couples de forficules formés par type de protection phytosanitaire.	75
Tableau 9. Summary of generalized linear model (GLM) for the abundance of <i>F. auricularia</i> and <i>F. pubescens</i> and of the beta regression for the proportion of <i>F. pubescens</i> in the earwig community.	93
Tableau 10. LD ₅₀ (mg kg ⁻¹) and 95% confidence interval, NAR (normal application rate allowed in French apple orchards) and the ratio LD ₅₀ /NAR.	94
Tableau 11. Tableau récapitulatif des résultats obtenus sur le forficule pour connaître l'impact des produits phytosanitaires (avec les différentes échelles d'études et les conditions d'exposition).	100

Chapitre I. Introduction générale

Comme le titre l'indique, l'enjeu de la thèse est d'étudier l'impact des pratiques phytosanitaires en vergers de pommiers avec une approche écologique et écotoxicologique, en utilisant un auxiliaire des cultures, le forficule. L'introduction générale va donc présenter le cadre du travail et les différentes notions nécessaires.

Nous commencerons par présenter les toxiques étudiés, les pesticides, à travers la situation de consommation actuelle et les bases réglementaires qui entraînent leur mise sur le marché. Nous verrons ensuite les différentes familles de pesticides utilisées et leur mode d'action. La dernière sous partie présentera la démarche type d'une étude écotoxicologique utilisant les différents outils mis à notre disposition.

La partie suivante sera consacrée à la présentation du milieu d'étude, les vergers de pommiers du Sud-est de la France avec les principaux ravageurs à l'origine des nombreux traitements appliqués. Nous verrons ensuite les différents modes de protection phytosanitaire mis en place pour gérer ces ravageurs et enfin quelques mots sur les alternatives possibles aux pesticides. L'enjeu de cette thèse n'est pas seulement d'étudier la toxicité des substances utilisées actuellement mais aussi de proposer des outils pour évaluer les apports de nouvelles alternatives pour les remplacer.

La dernière partie présentera le forficule qui est l'espèce modèle de l'étude. Après une présentation générale des principales espèces présentes dans le Sud-est, nous présenterons le cycle biologique et l'écologie de l'espèce majoritaire *Forficula auricularia*. Nous aborderons son régime alimentaire et analyserons son rôle d'auxiliaire. Nous ferons enfin un état des lieux sur les études de sensibilité aux pesticides réalisées sur forficule, étude nécessaire pour pouvoir utiliser cet insecte comme espèce modèle pour l'étude des pratiques phytosanitaires.

1. L'utilisation des pesticides : situation et évolutions

Le terme pesticide, qui vient du latin *cida* (tuer) et *pest* (nuisible), désigne « toute substance, ou mélange de substances, destinée à inhiber, détruire ou contrôler tout organisme nuisible, incluant [...] les espèces animales et végétales indésirables entraînant des nuisances ou interférant avec la production agricole [...] » (Food and Agriculture Organization FAO, 2002). La FAO propose une définition très complète du mot pesticide mais pour des raisons de synthèse, nous l'avons limitée au contexte d'étude de cette thèse. Dans la littérature, on peut les retrouver également sous le terme de « produits phytopharmaceutiques » ou encore de « biocides ». La différence majeure entre ces deux termes réside dans l'intention dans laquelle ils sont employés. Les biocides sont définis par la directive 98/8/CE (EC, 1998) comme des substances destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles et à en prévenir l'action alors que les produits phytopharmaceutiques sont définis par le règlement N°1107/2009 (EC, 2009) comme des substances visant à protéger les végétaux contre les organismes nuisibles. Le terme « phytosanitaire » est employé dans un sens proche de « phytopharmaceutique ». Pour des raisons d'uniformité au sein de cette thèse, le terme pesticide sera adopté au sein des différentes parties.

La première utilisation de pesticides remonte à l'Antiquité avec l'usage du soufre 1000 ans avant J.C. et l'arsenic recommandé par Pline au I^{er} siècle comme insecticide (source : Observatoire des Résidus de Pesticides, Blancou 1995). L'utilisation plus généralisée des pesticides date de la deuxième moitié du 20^{ème} siècle avec l'intensification de l'agriculture. Les premiers pesticides synthétiques sont apparus dans les années 1930 entraînant des rejets massifs de résidus phytosanitaires dans l'environnement. La question de leur transfert, de leur devenir et de leur impact dans les différents compartiments environnementaux, sur la faune auxiliaire, ainsi que sur l'utilisateur et le consommateur ne s'est posée qu'à partir des années 1960 avec la prise de conscience des problèmes de santé humaine et environnementale (Carson 1962, Fournier 2007).

1.1. Marché mondial, européen et français des pesticides

Chaque année environ 2.5 millions tonnes de pesticides sont épandues dans le monde. Au niveau mondial, l'Europe reste le plus gros marché de pesticides (27.7%) devant l'Asie (26.4%), l'Amérique latine (22.9%) et l'Amérique du Nord (19.1%) (Fig. 1a). La France représente une part importante du marché mondial des pesticides en se plaçant au 4^{ème} rang, alors qu'elle occupe la première place au niveau européen devant l'Allemagne et l'Italie avec une consommation très importante d'herbicides et fongicides pour les grandes cultures céréalières et la viticulture (Fig. 1b) (Source Union des Industries et de la Protection des Plantes UIPP 2012).

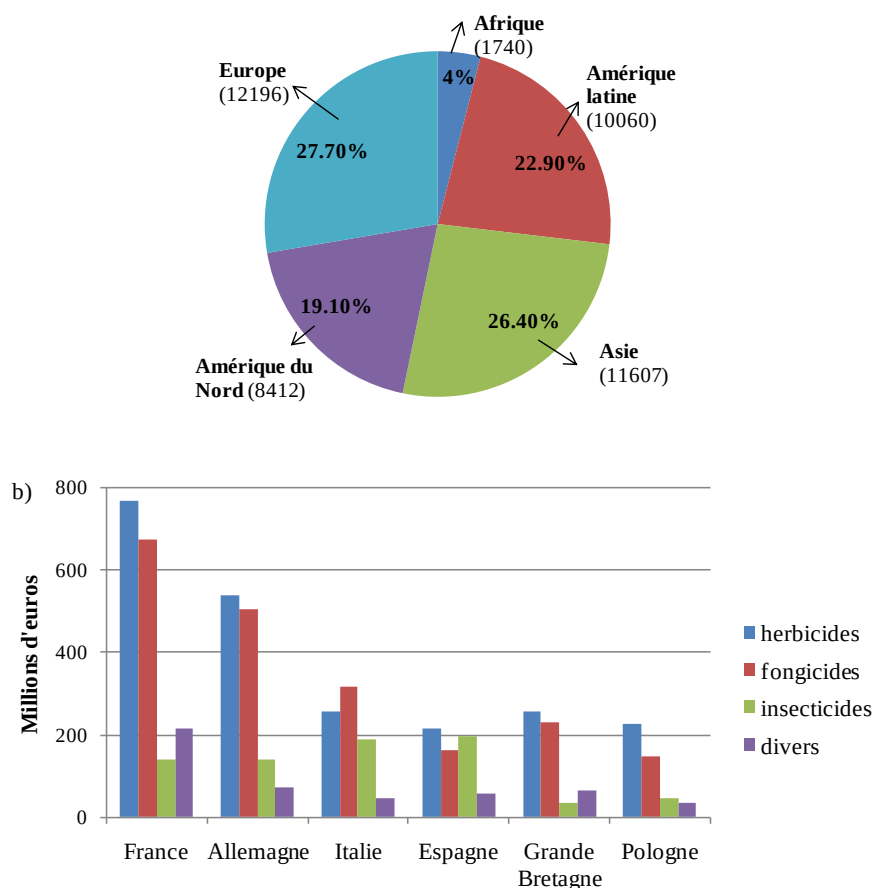


Figure 1. Etat du marché des pesticides a) en 2011 au niveau mondial (en million de dollar) et b) en 2010 au niveau européen (en million d'euros) (source UIPP).

En France, l'emploi des pesticides se répartissait en 2006 pour 67% dans les grandes cultures (hors légumes), 15% à la viticulture, 8% aux fourrages, 5% à l'arboriculture et 5% à l'horticulture et aux légumes de plein champ (Source Rica 2006, Réseau d'Information

Comptable Agricole). Outre les grandes cultures, lorsque les régions agricoles sont classées selon la surface agricole et la pression phytosanitaire (dépenses en euros par hectare), les vignobles et les cultures de pommes apparaissent à l'origine des pressions phytosanitaires les plus fortes (Indicateur de Fréquence de Traitement (IFT) moyen pour la vigne 13 et 36 pour les pommes) (Butault et al. 2011). Bien que la tendance générale de consommation de substances actives soit à la baisse en France (120500 tonnes de substances actives vendues en France en 1999) il en restait encore 63000 tonnes vendues en 2011 (Fig. 2). Parmi ces 63000 tonnes, les produits de synthèse représentaient tout de même 80% du tonnage total de substances actives vendues. La diminution de consommation concernait surtout les fongicides (-31%) et les herbicides (-19%) en 2011, il est à noter que la consommation de fongicides a réaugmenté en 2013 (+13.2%) probablement à cause des conditions climatiques humides du printemps et de l'été. La consommation en insecticides quant à elle se maintient, avec une légère diminution en 2013 (-1.5%) (Source UIPP).

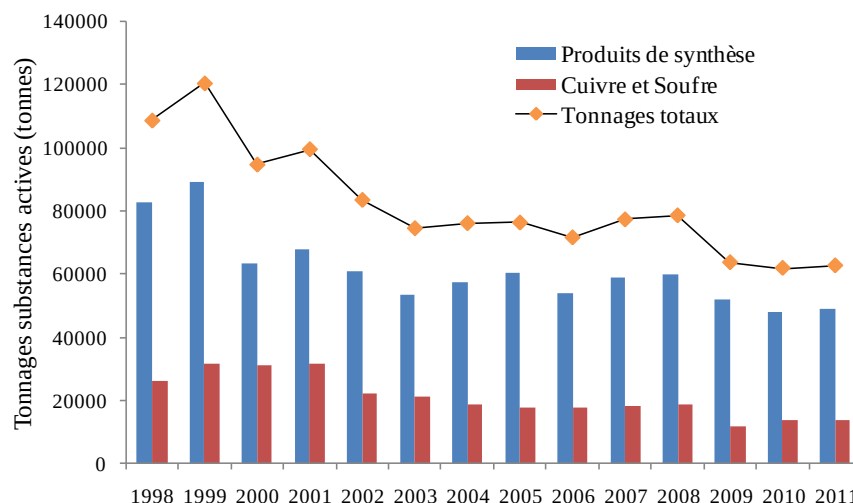


Figure 2. Tonnages des substances actives vendues en France de 1998 à 2011 (source UIPP).

1.2. Contexte réglementaire : différents angles d'attaque

L'évaluation des risques, la mise sur le marché et l'utilisation des produits phytopharmaceutiques sont régies par le règlement n°1107/2009 (EC 2009) qui définit des normes de contamination et renforce les critères toxicologiques et écotoxicologiques pour l'homologation des produits. Pour être commercialisés, les pesticides doivent obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) (une première directive a vu le jour en 1991 (91/414/CEE) puis a été abrogée par le règlement 1107/2009 en 2009). Cette autorisation

nécessite un accord pour les substances actives au niveau Européen, puis un accord des Etats membres au niveau national pour les produits commerciaux.

L'évaluation toxicologique des substances actives repose sur :

- la détermination de leurs propriétés physico-chimiques (inflammabilité, explosibilité, solubilité)
- l'évaluation de leur toxicité pour l'homme (métabolisme et cinétique, toxicité aiguë/subaiguë chez plusieurs espèces de mammifères, toxicité vis-à-vis des fonctions de reproduction, potentiel mutagène et cancérigène [chez le rat et/ou le cobaye, la souris, le lapin, le chien])
- l'évaluation des résidus des substances dans les végétaux (pour définir la Limite Maximale de Résidus LMR présents sur les produits alimentaires et le Délai Avant Récolte DAR pour chaque type de récolte)
- l'évaluation du devenir de la substance et son comportement dans l'environnement (étude de sa dégradation, évaluation du risque de sa rémanence dans l'environnement par des études en laboratoire et au champ)
- l'évaluation de la toxicité pour la faune et la flore (sur un ensemble d'organisme type vertébré et invertébré, aquatique et terrestre)

Cela est réalisé avec des tests normalisés en laboratoire mais les espèces étudiées ne sont généralement pas représentatives de la faune retrouvée dans les cultures traitées. De plus, les mélanges de substances qui peuvent se retrouver accumulées sur les zones traitées ou les effets à long terme de ces substances ne sont pas envisagés. Il est donc utile et nécessaire d'effectuer une évaluation à posteriori, après l'homologation. C'est ce constat qui a motivé le sujet de cette thèse.

L'Union Européenne a mis en place depuis Juin 2011 un « zonage des évaluations et des autorisations des produits phytopharmaceutiques ». L'Europe est depuis divisée en trois zones, regroupant les Etats membres où les conditions pédo-climatiques et agronomiques sont comparables. La France fait partie de la zone Sud comprenant aussi la Bulgarie, Chypre, la Grèce, l'Italie, Malte, l'Espagne et le Portugal. Un nouveau produit autorisé par l'un des pays de la zone peut l'être, si la demande en est faite par le pétitionnaire, dans les autres pays de la zone (sauf opposition justifiée d'un Etat membre de la zone). L'AMM d'un produit est délivrée pour une durée maximale de dix ans dans la limite de la validité de l'autorisation de la substance active. Aujourd'hui, environ 4000 produits bénéficient d'une AMM en France et

423 substances actives sont autorisées au niveau européen (Source Ministère de l'Agriculture).

Actuellement une prise de conscience des risques remet en question l'usage systématique des pesticides. Dans ce contexte et à la suite du Grenelle de l'environnement, le plan « Ecophyto 2018 » a été mis en place en France par le ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt en 2008. Il s'articule autour de huit axes :

Axe 1 : Evaluer les progrès en matière de diminution de l'usage des pesticides;

Axe 2 : Recenser et généraliser les systèmes agricoles et les moyens connus permettant de réduire l'utilisation des pesticides en mobilisant l'ensemble des partenaires de la recherche, du développement et du transfert;

Axe 3 : Innover dans la conception et la mise au point des itinéraires techniques et des systèmes de cultures économes en pesticides;

Axe 4 : Former à la réduction et à la sécurisation de l'utilisation des pesticides;

Axe 5 : Renforcer les réseaux de surveillance sur les bio-agresseurs et sur les effets non intentionnels de l'utilisation des pesticides;

Axe 6 : Prendre en compte les spécificités des DOM;

Axe 7 : Réduire et sécuriser l'usage des produits phytopharmaceutiques en zone non agricole;

Axe 8 : Organiser le suivi national du plan et sa déclinaison territoriale, et communiquer sur la réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques.

L'ensemble de ces axes visent globalement à rendre les pratiques agricoles plus respectueuses de l'environnement en réduisant si possible de 50% l'utilisation des pesticides d'ici 2018 (avec comme référence les chiffres de 2008) et en favorisant les alternatives à l'utilisation des produits chimiques en particulier en utilisant la lutte biologique, tout en maintenant un niveau élevé de production agricole. Une démarche de communication a été mise en place sur les risques et la diffusion des bonnes pratiques passe par des formations, des fermes de démonstration et des exploitations d'enseignement supérieur engagées dans la démarche Ecophyto.

1.3. Les différentes familles de pesticides utilisées aujourd'hui

Le terme « pesticides » comprend aujourd'hui trois groupes principaux de substances : les herbicides, les insecticides et les fongicides classés selon les organismes qu'elles ciblent. Ces différentes substances sont plus ou moins employées selon la région et la culture visée : les herbicides pour les grandes cultures, les fongicides majoritairement dans les régions humides et pour la viticulture, les insecticides majoritairement pour les cultures fruitières (Butault et al. 2011). Les herbicides sont les substances actives dont la propriété est de tuer les végétaux. On distingue les désherbants sélectifs, les désherbants totaux et les défanants qui détruisent la partie aérienne des végétaux (pour les pommes de terre par exemple). Les fongicides sont les substances actives qui détruisent les champignons parasites des végétaux. Les insecticides sont les substances actives utilisées pour éradiquer les insectes nuisibles. Dans le Sud-est de la France, les fongicides et les insecticides sont les traitements majoritaires avec un IFT respectif de 17.6 et 10.5 pour des cultures fruitières en agriculture « conventionnelle » (Bouvier et al. 2011, Sauphanor et al. 2012), ce qui est beaucoup plus qu'en grandes cultures ou en viticulture.

L'intensification de l'agriculture dès les années 1980 et l'apparition de résistances chez les ravageurs ont entraîné la synthèse de nombreuses substances actives avec des modes d'action différents. Des familles existent pour chaque type de substance. Nous ne détaillerons ces données que pour les insecticides vue l'espèce modèle utilisée dans notre étude.

Il existe six grands modes d'action différents sur la cible visée pour les insecticides, et pour chacun différentes familles de pesticides :

- Neurotoxiques (organophosphorés, carbamates, pyréthriinoïdes, oxadiazine, neonicotinoïdes, spinosoïdes, avermectines, pyridine)
- Régulateurs de croissance d'insectes (fénoxicarbe, pyriproxyfène , hexythiazox, etoxazole, cyromazine, diacylhydrazines)
- Inhibiteur de la mise en place de la cuticule (benzoylurés)
- Inhibiteurs de la respiration cellulaire (dérivés staniques, METI)
- Inhibiteurs de la voie de biosynthèse des lipides (dérivés des acides tetronique et tetramique)
- Inhibiteurs de la contraction musculaire (anthranilamides)

Des micro-organismes (bactéries, champignon, virus) sont également utilisés en tant qu'insecticides dits alors « microbiologiques » (les bactéries comme *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, le champignon *Beauveria* Sp. et le virus de la granulose).

Les insecticides neurotoxiques sont majoritaires et regroupent huit familles chimiques différentes (carbamates, organophosphorés, pyréthriinoïdes, oxadiazine, neonicotinoïdes, spinosoïdes, avermectins, pyridine) dont les modes d'action sont de perturber la transmission de l'influx nerveux selon la cible cellulaire visée. Le tableau 1 regroupe les insecticides étudiés dans cette thèse avec les principales substances retrouvées pour chaque famille et leur mode d'action.

Tableau 1. Insecticides neurotoxiques étudiés dans cette thèse.

Familles chimiques	Principales substances	Mode d'action Cible
carbamates	oxamyl (nématocide), pyrimicarbe	Inhibiteurs d'acétylcholine estérase <i>AChE</i>
organophosphorés	chlorpyrifos-méthyl, chlorpyrifos éthyl, diazinon, dichlorvos, diméthoate, fosphiazate, malathion, oxydemeton-methy, phosmet, pyrimiphos-méthyl	
pyréthriinoïdes, pyréthrines	acrinathrine, bifenthrine, cyfluthrine, lambda-cyhalothrine, gamma-cyhalothrine, cypermethrine, alpha-cypermethrine, zeta-cypermethrine, deltamethrine, esfenvalerate, etofenprox, tau-fluvalinate, extrait de pyrethre vegetal, tefluthrine	Modulateurs du canal sodium
neonicotinoïdes	acetamipride, clothianidine, imidaclopride, thiaclopride, thiamethoxam	Agoniste du récepteur nicotinique à acétylcholine <i>nAChR</i>
spinosoïdes	spinetoram, spinosad	Activateur allostérique du récepteur nicotinique à acétylcholine <i>nAChR</i>

Le nombre de publications traitant des effets des pesticides (Koehler and Triebkorn 2013), ne cesse d'augmenter depuis les années 1990 (Fig.3). Les familles chimiques ayant été le plus étudiées (organophosphorées, organochlorées, carbamates, pyréthriinoïdes) sont des insecticides neurotoxiques, soulevant l'importance des perturbations provoquées chez les

organismes, y compris les organismes non cibles. Si leurs effets sont bien compris en conditions de laboratoire, les limites des connaissances sur leurs impacts résident dans les difficultés à transposer au milieu naturel les résultats obtenus (Forbes 2006). D'autre part, lors de ces tests les pesticides sont souvent testés seuls et sans aucun stress environnemental associé.

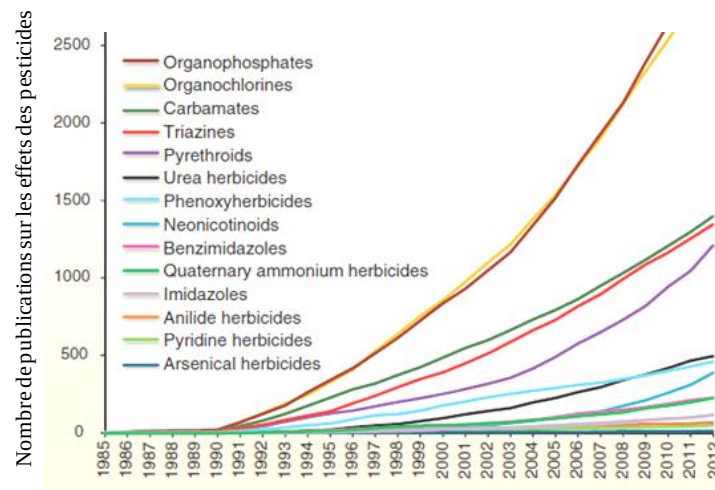


Figure 3. Nombre de publications sur les effets des pesticides de 1985 à 2012 (Koehler and Triebskorn 2013).

1.4. Contamination des milieux et intérêt de l'écotoxicologie

Si l'utilisation des pesticides est nécessaire dans un contexte de production agricole plus ou moins intensive, ils représentent néanmoins un possible risque pour l'environnement et la santé humaine. De nombreuses molécules sont présentes sur le marché et peu d'informations sont disponibles quant à leurs effets sur la santé humaine et l'environnement en dehors de leur dossier toxicologique lors de leur homologation (ces données n'étant pas toujours accessibles). Ce manque de connaissances est d'autant plus problématique que de nombreuses substances actives sont retrouvées dans les différents écosystèmes et les eaux de surface ou souterraine (Aubertot et al. 2005). La dispersion des pesticides dans l'environnement est bien connue (Fig. 4). Elle dépend de la forme sous laquelle ils sont appliqués (spray liquides, injectés dans le sol, granules).

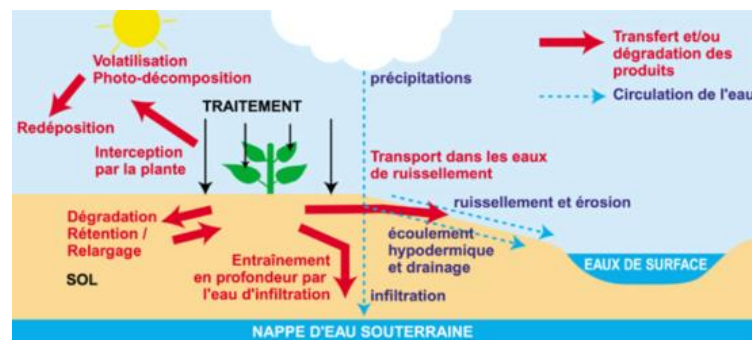


Figure 4. Dispersion dans l'environnement d'un pesticide appliqué sur une plante (source DRAAF).

Dans de nombreuses études, la quantité de pesticides appliquée qui atteint le ravageur visé est estimée à moins de 0.3%, 99.7% se retrouve donc dispersé dans l'environnement (Pimentel 1995). Les pesticides se retrouvent toujours distribués dans le sol, la surface foliaire et les eaux continentales dues aux pertes par lessivage, et entraînent des effets directs et indirects. Les effets directs des pesticides correspondent aux manifestations de la toxicité de la substance active (i.e mort de l'organisme). Les effets indirects se produisent sur toutes les espèces non ciblées et peuvent se manifester longtemps après que l'exposition ait eu lieu à cause de la rémanence des substances (Aubertot et al. 2005). Pour des espèces biologiques à intérêt environnemental, l'évaluation des impacts est à la base de l'écotoxicologie.

Comme son nom l'indique, l'écotoxicologie rassemble entre autre toxicologie et écologie. Truhaut (1977) la définit comme « la branche de la toxicologie qui étudie les effets toxiques provoqués par les substances naturelles ou les polluants d'origine synthétique sur les constituants des écosystèmes animaux (incluant l'Homme), végétaux et microorganismes dans un contexte intégré ». Il s'agit d'une science multi-disciplinaire à l'interface avec l'écologie, la toxicologie mais aussi la physico-chimie, la microbiologie et la physiologie (Ramade 1992). Les données d'ordre écotoxicologique sont indispensables pour l'évaluation des risques et la gestion de l'environnement. L'écotoxicologie tente de mesurer l'impact des substances toxiques sur les individus mais aussi sur les populations, les écosystèmes entiers et sur les équilibres dynamiques qui les caractérisent. Les outils existant pour recouvrir ces différentes échelles d'organisation biologique sont les biomarqueurs et les bioindicateurs (Fig. 5).

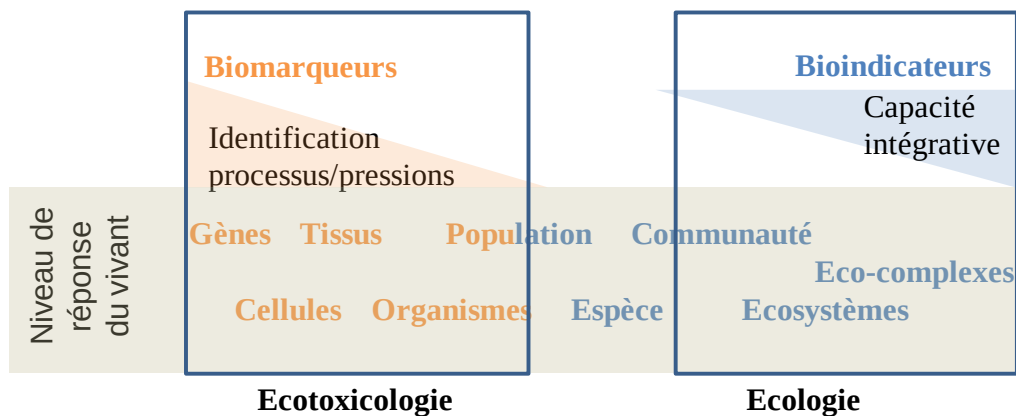


Figure 5. Spécificité des outils en termes de niveaux de réponse du vivant et capacité intégrative versus identification des processus (modifié à partir de Pont and Garric 2010)

La mesure du polluant lui-même au niveau de l'organisme n'est pas toujours possible à cause d'une part, des réactions de biotransformation qui le font disparaître, le transformant parfois en métabolites aussi toxiques et d'autre part, des réactions de détoxification mises en place pour améliorer son excrétion. Les biomarqueurs permettent d'identifier un stress de manière précoce et de comprendre son mécanisme au niveau de l'individu alors que les bioindicateurs peuvent montrer l'impact de ce stress au niveau de l'écosystème à moyen et long terme.

Un biomarqueur est défini comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition, présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et al. 1997). L'exposition déclenche au sein des organismes, une réponse qui dépend à la fois de la dose de toxique, de la durée d'exposition mais également de l'espèce, du sexe et/ou du stade de développement. Quelque soit le xénobiotique considéré, l'induction et la modification des différentes voies impliquées dans la protection et/ou le maintien des fonctions cellulaires et physiologiques constituent une source de biomarqueurs potentiels. Ces biomarqueurs « non-spécifiques » considérés comme indices généraux de l'état de santé des organismes sont capables de répondre à des molécules toxiques mais également à de nombreux stress environnementaux. Parmi ces biomarqueurs, on distingue les protéines de chocs thermiques (HSP) généralement impliquées dans la protection et le maintien des fonctions cellulaires vitales. Elles favorisent l'acquisition du repliement correct des protéines endommagées et empêchent leur agrégation (Gupta et al. 2010). Le métabolisme

énergétique (taux de nutrition, activité digestive, réserves énergétiques) (Dedourge-Geffard et al. 2012) et les mécanismes impliqués dans l'équilibre homéostatique des organismes (stress oxydatif) constituent également des biomarqueurs intéressants (Thorin-Trescases et al. 2010). Ils présentent l'avantage d'évaluer de manière plus intégrée la réponse d'un organisme vis à vis d'un ensemble de perturbations.

Les biomarqueurs « spécifiques » quant à eux, correspondent aux réponses des cibles moléculaires associées à une classe particulière de xénobiotiques. Ces cibles sont généralement des enzymes impliquées dans des voies métaboliques et/ou des processus physiologiques contre lesquels les molécules toxiques sont spécifiquement dirigées. Dans la biosynthèse de l'hème de l'hémoglobine, l'inhibition de l'acide α -aminolévulinique déshydratase (ALAD) est propre à une exposition au plomb uniquement (Wigfield et al. 1986). Concernant les pesticides et plus particulièrement les insecticides neurotoxiques, une des cibles privilégiées est l'acétylcholinestérase dont l'inhibition reflète une exposition aux insecticides organophosphorés et/ou carbamates (Hill and Fleming 1982). Ces biomarqueurs présentent l'avantage de donner un indice précoce de l'exposition des organismes à une molécule spécifique.

Enfin des biomarqueurs impliqués dans la métabolisation des toxiques jouent un rôle fondamental sur la variation de sensibilité des organismes vis à vis d'un xénobiotique. Cette induction peut faciliter la dégradation des molécules toxiques en molécules moins toxiques et leur excrétion, bien que dans certains cas une augmentation de la toxicité soit observée. C'est par exemple le cas des insecticides organophosphorés qui après oxydation par l'intermédiaire des oxydases Cytochrome-P450 dépendantes sont libérés sous une forme oxon particulièrement toxique. Les différentes voies de métabolisation peuvent être classées en deux phases distinctes : la phase I implique des réactions d'oxydation dépendantes des cytochromes P450 dans le but de favoriser la dégradation des molécules toxiques et sont inductibles de manière non spécifique, par des pesticides organophosphorés, les PCB, les dioxines et les HAP; la phase II implique des réactions de conjugaison catalysées entre autre, par la glutathion-S-transférase (GST) dont le but est d'améliorer l'élimination des molécules toxiques par conjugaison avec des métabolites endogènes (le glutathion). D'autre part, les carboxylestérases constituent une famille d'hydrolases impliquées dans la détoxification de certains pesticides. Elles sont également capables de piéger les insecticides organophosphorés et carbamates jouant un rôle fondamental dans les phénomènes d'adaptation des organismes (Wheelock et al. 2008; Sanchez-Hernandez et al. 2009).

Le choix du biomarqueur est fonction de l'organisme étudié, du polluant étudié mais aussi de l'effet de ce dernier que l'on souhaite évaluer. Si on se place au niveau moléculaire, il existe des marqueurs de génotoxicité qui permettent de voir l'intégrité de l'ADN (Comet Assay, test des micronoyaux). Au niveau cellulaire, comme on l'a vu précédemment, différentes mesures biochimiques permettent de voir des effets biologiques sur le métabolisme et les mécanismes de défense de l'organisme : les activités d'oxydation avec le cytochrome P450, les protéines de stress (HSP et métallothionéines), les activités de détoxification (CbE, GST et catalase). Au niveau de l'individu, des caractéristiques comportementales fonctionnelles peuvent servir de biomarqueur (Kaiser 2001), comme la mobilité, la capacité d'orientation, la capacité à se nourrir et/ou le comportement d'oviposition (Desneux et al. 2007). Ce type d'analyse est toutefois généralement plus difficile (variabilité, durée du test) que tous les marqueurs biochimiques cités précédemment.

Les principales limites des mesures de biomarqueurs pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes sont de discriminer entre réponses adaptatives naturelles et réponses au stress chimique ainsi que d'extrapoler des réponses d'une échelle d'organisation biologique à une autre (cellule-individu-population-communauté) (Forbes et al. 2006; Caquet 2012). Les bioindicateurs, au contraire, sont des réponses au niveau des populations/communautés. Ils permettent de tenir compte de la dimension écologique (biodiversité et fonctionnalité) et donc d'évoluer vers une démarche intégrée (Fig. 6).

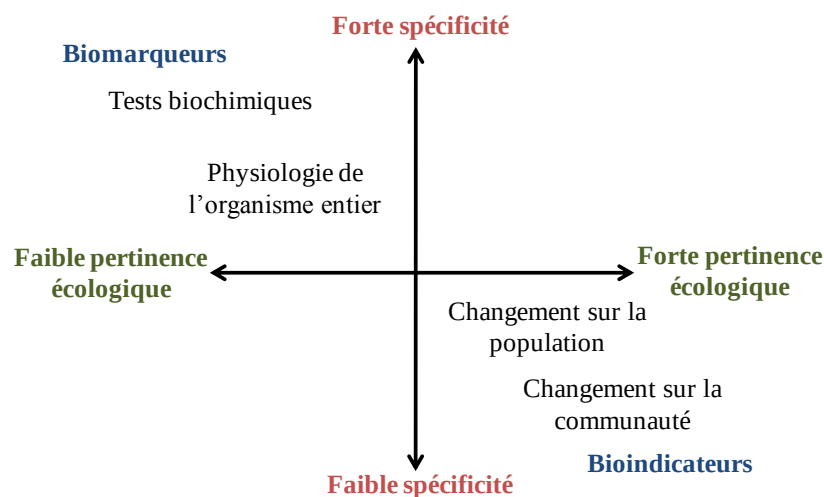


Figure 6. Spécificité et pertinence écologique des différentes échelles de mesures d'impact (Addison 1996)

Un bioindicateur est en effet défini comme un organisme ou une communauté d'organismes dont la présence (ou l'état) renseigne sur la situation et le fonctionnement d'un

écosystème. Il permet de mettre en évidence les modifications, naturelles ou provoquées à travers des effets sur les populations et les communautés et non plus au niveau de l'individu comme les biomarqueurs. Cela répond aux exigences de l'écotoxicologie d'intégrer la dimension population. Un bioindicateur doit être suffisamment répandu sur le territoire, il doit tolérer les contaminants avec des effets sublétaux et une relation de toxicité doit exister selon la concentration en polluant. La limite principale réside dans la non-spécificité des réactions de la plupart des organismes en présence d'un stress environnemental et des interactions entre les espèces.

L'écologie, qui est la science qui étudie les relations des êtres vivants avec leur environnement, prend ici pleinement sa place pour une approche intégrative de l'étude des risques. Toute disparition ou apparition d'espèce, toute modification de l'abondance relative d'une espèce peut être l'indice d'une modification de l'environnement de cette espèce. La pertinence écologique est alors beaucoup plus forte pour un bioindicateur, comparé aux biomarqueurs (Fig. 5-6).

2. Le cas d'étude, les vergers de pommiers du Sud-est de la France

La France apparaît au XXIème siècle comme encore très dépendante des pesticides. La situation est particulièrement préoccupante en arboriculture fruitière où la phytoprotection est intensive avec, en vergers de pommiers un Indice de Fréquence de Traitement (IFT) moyen de 36 traitements par an en 2006 (Sauphanor and Dirwimmer 2009). La région PACA est une région à forte activité agricole avec notamment 44 500 ha de vergers ce qui fait d'elle la première région fruitière de France. De nombreuses résistances (carpocapse, tavelure pour les principales) sont apparues et se sont développées ces dernières années ce qui a entraîné l'augmentation de la fréquence d'application des pesticides à large spectre et donc à fort impact environnemental.

Dans cette partie, nous présenterons les principaux ravageurs présents en vergers de pommiers à l'origine de la plupart des traitements phytosanitaires puis nous présenterons les différentes pratiques phytosanitaires existant en vergers de pommiers pour combattre ces ravageurs et enfin quelques alternatives possibles aux pesticides.

2.1. Les principaux ravageurs

Dans le Sud-est de la France, les plus importants ravageurs du pommier sont les tordeuses et les pucerons. Les cochenilles et les zeuzères deviennent quant à elles une préoccupation montante (Bouvier et al. 2011; Borioli et al. 2013) mais encore limitée.

Les tordeuses font parti de la famille des Tortricidae (ordre des Lépidoptères). Cette famille comprend plusieurs ravageurs (mineuses, arpeuteuses, noctuelles, tordeuses) mais ce sont principalement les carpocapses (ou tordeuses carpophages) et, de manière minoritaire, d'autres tordeuses (plus particulièrement la tordeuse orientale) qui provoquent le plus de dégâts dans le Sud-est de la France. Elles sont appelées ainsi car les chenilles de nombreuses espèces enroulent et tordent les feuilles des plantes dont elles se nourrissent. Les tordeuses orientales (*Cydia molesta*) attaquent les jeunes pousses et les fruits en fin de saison (Fig. 7A). Leurs populations ont augmenté ces dix dernières années avec le retrait du marché de certaines substances nocives et la généralisation de la confusion sexuelle. Les carpocapses (*Cydia pomonella*) attaquent les fruits au cours de la saison (Fig. 7B). Même une technique écologique telle que l'emploi du virus de la granulose montre sa limite, l'apparition de

souches résistantes de carpocapse ayant été signalée depuis quelques années, d'où l'intérêt de chercher des méthodes alternatives de lutte. La période de traitement s'étend de mi Mars à Septembre pour le carpocapse, jusqu'à Octobre pour la tordeuse (Tab. 2)

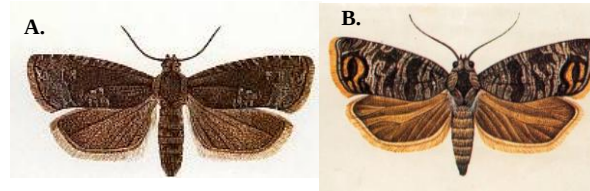


Figure 7. Tordeuse orientale en A. (*Cydia molesta*) et carpocapse en B. (*Cydia pomonella*). Photos Le Masson.

On distingue trois types de pucerons en vergers de pommiers, le puceron cendré (*Disaphis plantaginea*), le puceron lanigère (*Eriosoma lanigerum*) et le puceron vert (le puceron vert migrant *Rhopalosiphum insertum* et le non migrant *Aphis pomi*). Le puceron vert ne crée pas de dégât et n'entraîne donc pas de traitements phytosanitaires contrairement au puceron lanigère et surtout au puceron cendré principal puceron ravageur. Les pucerons (Homoptères) prélèvent la sève élaborée des plantes en transperçant la paroi du végétal grâce au stylet dont sont pourvues leurs pièces buccales. Ce mode de nutrition aura plusieurs conséquences pour la plante. D'une part des conséquences directes sont observées, avec un affaiblissement de l'hôte par le prélèvement d'une grande quantité de sève élaborée et une réaction du végétal à la salive sécrétée lors de l'insertion du stylet. D'autre part, les pucerons provoquent des conséquences indirectes, avec l'installation d'une maladie fongique (la fumagine) sur le miellat sécrété par les pucerons, ainsi que la transmission de maladies virales. Les traitements sont nécessaires de Mars à Mai. (Tab. 2)

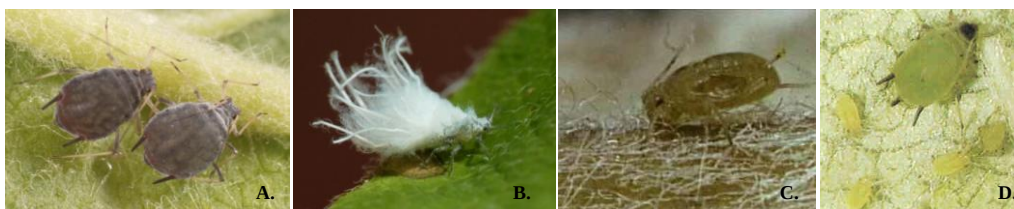


Figure 8. Puceron cendré en A. (*Disaphis plantaginea*), puceron lanigère en B. (*Eriosoma lanigerum*), puceron vert migrant en C. (*Rhopalosiphum insertum*), puceron vert non migrant en D. (*Aphis pomi*). Photos INRA (A.), anonyme (B.), Centre d'exploitation et de technologie horticole portugais (C. et D.).

D'autres ravageurs tels que les cochenilles (Homoptera : Coccoidea) et les zeuzères (Lepidoptera : Cossidae) peuvent parfois entraîner l'utilisation de pesticides certaines années (quand les conditions climatiques de l'année en cours et de l'année précédente favorisent leurs

développements). Les attaques des cochenilles représentent une préoccupation montante car les produits utilisés pour les traiter jusqu'à présent sont devenus interdits. Les cochenilles sont réparties en plusieurs familles morphologiquement différentes. Les pommiers sont touchés par les Diaspididae et les Pseudococcidae. Les Diaspididae, dont fait partie le pou de Saint José (*Diaspidiotus perniciosus*), prélèvent la sève en injectant de la salive toxique. Ceci provoque un affaiblissement des arbres au fil des ans. Les Diaspididae provoquent également des dégâts directs dus aux piqûres et à leur présence sur les fruits. Les Pseudococcidae, dont fait partie la cochenille farineuse *Pseudococcus viburni* Sign., provoquent des sécrétions de miellat sur lesquelles se développent de la fumagine qui souille les fruits et réduit la photosynthèse dans les feuilles. Les Pseudococcidae peuvent également transmettre des virus. Les zeuzères (*Zeuzera pyrina*) quant à elles peuvent entraîner des dégâts considérables sur la structure de l'arbre. Ce sont les larves qui attaquent les rameaux et les pousses, puis redescendent en s'attaquant aux organes jeunes de l'arbre. La gravité des attaques varie selon l'âge des plantations, les traitements sont systématiques sur de jeunes vergers de pommiers (une chenille suffit à tuer un arbre; des arbres de 3 ans peuvent perdre une partie de leur charpente), les arbres âgés sont gravement attaqués, particulièrement en année et terrain secs. Leur traitement a lieu en Juin avec *Bacillus thuringiensis* et/ou des pyréthrinoides.

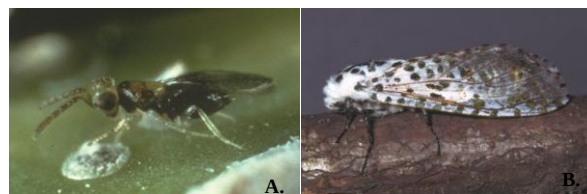


Figure 9. Pou de Saint José (*Diaspidiotus perniciosus*) en A., zeuzère (*Zeuzera pyrina*) en B. Photos INRA.

Tableau 2. Récapitulatif des principaux ravageurs du pommier et de leur période de traitements.

Ravageur	Période de traitement	Matières actives
carpocapse	fin Avril à Septembre	phéromones, chlorpyrifos éthyl (OP),
tordeuse orientale		fénoxycarbe (analogue hormone juvénile), thiaclopride (neonicotinoïde)
puceron cendré	Mars à Mai	deltaméthrine/taufuvalinate/lambda-cyhalothrine (pyréthrinoides) puis acetamipride (neonicotinoïde)
puceron lanigère	à partir de mi Mai	pyrimicarbe (carbamate), spirotétramet

Les acariens et les mouches sont des ravageurs mineurs retrouvés certaines années en vergers de pommiers, ils ne présentent pas de risque économique, des traitements préventifs suffisent à contrôler leurs populations (Ricard et al. 2012).

Pour combattre tous ces ravageurs, différentes pratiques culturales ont été mises en place. On peut distinguer différents modes de protection phytosanitaire réglementés par le Ministère de l'Agriculture et de l'Ecologie ainsi que l'apparition de méthodes alternatives (i.e pratiques culturales, gestion de l'habitat, protection physique/Filet Alt'Carpo).

2.2. Les différents modes de protection phytosanitaire

Jusqu'en 2010, il existait clairement trois grands systèmes de protection phytosanitaire en vergers de pommiers : l'agriculture biologique, l'agriculture intégrée (Production Fruitière Intégrée PFI) et l'agriculture conventionnelle. Les pesticides employés et leur intensité d'utilisation sont à l'origine de ces différentes appellations.

L'agriculture biologique (AB) est une méthode de production agricole qui se caractérise par l'absence d'usage de produits de synthèse (fertilisants, pesticides). Le terme est apparu vers 1950 par opposition au système de production agricole chimique. Les principes de l'AB sont d'assurer une gestion durable de l'agriculture, une préservation de la biodiversité et de la qualité des sols, de l'eau et de l'air (Rigby and Cáceres 2001). D'après le règlement n°889/2008 (EC 2008), les substances actives pouvant entrer dans la composition des produits phytopharmaceutiques compatibles avec le mode de production biologique des vergers de pommiers sont les substances d'origine animale et végétale, les substances produites par des micro-organismes et les micro-organismes (comme le *Bacillus thuringiensis*) et les préparations à disperser en surface entre les plantes cultivées (phosphate ferrique pour lutter contre les limaces et escargots). La confusion sexuelle est utilisée pour combattre carpocapse et tordeuse. Il s'agit d'une méthode perturbatrice de la reproduction de lépidoptères ravageurs qui repose sur la diffusion au sein des parcelles de molécules analogues aux phéromones sexuelles émises par les femelles pour attirer les mâles (Carde and Minks 1995). Les produits minéraux (cuivre, soufre, pyrèthre), les huiles végétales/minérales et/ou de paraffine sont également utilisés pour combattre les autres ravageurs (Institut Technique de l'Agriculture Biologique ITAB 2011). Aucun désherbage n'est réalisé, les adventices étant contrôlés par le travail du sol. Les opérateurs de la filière AB sont contrôlés

par des organismes certificateurs agréés par les pouvoirs français. Ils sont au nombre de huit en France : Ecocert, Agrocet, Certipaq, Bureau Véritas Certification, Certisud, Certis, Bureau Alpes Contrôles et Qualisud (Source Ministère de l'agriculture).

L'agriculture intégrée (ou Production Fruitière Intégrée PFI) était un compromis entre l'utilisation de méthodes issues de l'agriculture biologique et l'agriculture conventionnelle (Sansavini 1997). Ce concept est apparu en 1974 et une demande de certification a ensuite été demandée auprès de l'OILB en 1992. Elle est montée en puissance en France à partir des années 1990 (Jeannequin et al. 2011) et associée à l'objectif classique de qualité commerciale des fruits, un objectif de qualité écologique de leur mode de production. En Europe, la lutte intégrée est définie par la directive communautaire 91/414/CEE du 15 Juillet 1991 comme suit : « l'application rationnelle d'une combinaison de mesures biologiques, biotechnologiques, chimiques, physiques, culturelles dans laquelle l'emploi de produits chimiques phytopharmaceutiques est limité au strict nécessaire pour maintenir la présence des organismes nuisibles en dessous du seuil à partir duquel apparaissent des dommages ou une perte économiquement inacceptables ». La directive « Production Intégrée » (Directives Techniques OILB III 2002) prescrit de réserver 5 % au moins de la surface de l'exploitation à des « surfaces de compensation écologique ne recevant ni pesticides, ni engrais » pour aménager des zones « refuge » servant de réservoir aux insectes auxiliaires. Des prélèvements et piégeages sont réalisés pour repérer les moments où les insecticides sont nécessaires. Les intrants choisis sont autant que possibles des produits naturels plutôt que de synthèse pour garantir des fruits et un environnement sains et préservés. Des techniques alternatives comme les phéromones de confusion sexuelle sont appliquées en diffuseurs accrochées dans les arbres pour lutter contre carpocapses et tordeuses comme en AB. Le désherbage est deux fois moins important que dans un verger conventionnel (Borioli et al. 2013). La PFI s'accompagne d'un cahier des charges listant l'ensemble des directives de la production à la commercialisation (Toubon et al. 2001). Ce cahier des charges a pour but de développer le contrôle et la traçabilité des produits. L'ensemble de ces restrictions conduit à une moyenne de 15-20 traitements par an.

L'agriculture conventionnelle est apparue après les grandes Guerres Mondiales qui avaient développé les connaissances en chimie, ces dernières ayant abouti à une intensification de l'agriculture. Elle autorise l'utilisation de tous produits (fertilisants, pesticides) sans limite particulière, dans le but d'obtenir une productivité maximale et éviter toutes maladies ou pressions d'insectes nuisibles au risque de perturber l'écosystème (Bouvier et al. 2011). La confusion sexuelle n'est pas utilisée, il s'agit de la différence principale pour

distinguer les vergers PFI et les vergers à agriculture « conventionnelle ». Les fertilisants, fongicides, insecticides et herbicides sont appliqués pour obtenir un rendement maximal de fruits sans défaut apparents. Le nombre moyen de traitements pour les pommes en agriculture « conventionnelle » est de 36 par an, ce qui rend cette culture la culture fruitière la plus traitée en France (Sauphanor and Dirwimmer 2009).

Sur la base de l'étude des calendriers de traitements des producteurs, on constate que l'agriculture « conventionnelle » tend à disparaître dans les vergers de pommier depuis 2011. Une conscience croissante se développe à propos des problèmes que crée l'agriculture conventionnelle (baisse de biodiversité, effets irréversibles dérivés de la pratique prolongée conventionnelle) (Bengtsson et al. 2005; Crowder et al. 2010). Des systèmes alternatifs sont à l'étude allant de pratiques optimisées pour l'agriculture biologique à l'agriculture à utilisation réduite d'intrants (systèmes LISA Low Input Sustainable Agriculture) (Madden 1988; Jacquet et al. 2011).

2.3. Alternatives possibles aux pesticides

Plusieurs méthodes alternatives peuvent être mises en place pour maîtriser les ravageurs en vue de limiter l'utilisation de pesticides. Ces méthodes alternatives se réfèrent aux pratiques culturales, à l'aménagement de l'habitat et les méthodes de lutte biologique (Wyss et al. 2005; Zehnder et al. 2007).

Les pratiques culturales sur lesquelles les producteurs peuvent jouer pour diminuer l'utilisation de pesticides en vergers regroupent le choix variétal des arbres, la taille de l'arbre et le travail du sol. Les centres de recherche travaillent toujours par sélection variétale sur le développement d'idéotypes adaptés aux faibles intrants (Jeannequin et al. 2011). Il s'agit d'études pour développer des variétés résistantes aux maladies fongiques (tavelure, oïdium) pour limiter l'utilisation de fongicides. La variété « Ariane » est par exemple connue pour être résistante à la tavelure et de nouvelles variétés comme « Ariane INFEL® 6407 » sont développées pour contourner le développement de la résistance à la tavelure (Brun et al. 2008; Simon et al. 2011). D'autre part des études plus agronomiques se développent pour limiter les attaques des bioagresseurs et l'utilisation d'insecticides (Simon et al. 2011). La conduite de l'arbre est toujours à l'étude. Sur pommier, elle est importante pour optimiser la croissance végétative et le développement du fruit. Il a été démontré qu'elle peut aussi influencer le développement des bioagresseurs en modifiant l'éclairement et le microclimat, notamment

pour le puceron (Simon et al. 2006). Une conduite centrifuge (l'ensemble des ramifications est conservé) permet en effet de limiter les attaques de pucerons (Simon et al. 2012). Pour optimiser la croissance végétative et le développement du fruit, l'entretien du sol est également un facteur clé pour la nutrition hydrique et minérale de l'arbre, le fonctionnement et la vie du sol ainsi que le nombre et l'efficacité des auxiliaires.

L'aménagement de l'habitat des vergers visant à favoriser la biodiversité des auxiliaires commence également à se développer (Chisholm et al. 2014). L'objectif est d'augmenter la diversité végétale pour maintenir et pérenniser un complexe de prédateurs et de parasitoïdes à même d'être actifs sur les bioagresseurs (Landis et al. 2000). Il s'agit d'une démarche de lutte biologique par conservation (Barbosa 1999). En réponse, il est attendu une augmentation de la régulation naturelle de certains ravageurs des cultures *via* une augmentation de l'abondance et de la diversité des auxiliaires. Ces principes sont appliqués en arboriculture fruitière avec la plantation de haies composites (Debras 2007), l'enherbement de l'inter rang et sa gestion (fréquence de fauche) (Vogt and Weigel 1999), la création de bandes fleuries (Markó et al. 2013) et la création de refuges (nichoirs, abris) (Myczko et al. 2013).

La lutte biologique est définie comme l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les ravageurs. Les organismes vivants utilisés dans ce cas sont les auxiliaires. On distingue la lutte biologique par conservation, comme on a vu précédemment, et la lutte biologique inoculative ou inondative où on réalise des lâchers d'auxiliaires sur le terrain. Les insectes comme les coccinelles, les punaises, les carabes, les forficules sont autant d'auxiliaires pouvant théoriquement être lâchés en tant que prédateurs dans les vergers pour contrôler les populations de ravageurs. Rares sont les succès de cette technique en vergers, la difficulté étant de conserver la présence des auxiliaires dans les parcelles où ont été réalisés les lâchers (Dib 2010). Certains des parasites ou micro-organismes (bactéries, champignons) provoquant des maladies au sein des populations de ravageurs peuvent également être utilisés pour contrôler leurs populations. Il est important d'essayer de maintenir un habitat favorable à leur développement grâce à la présence de haies, l'enherbement de l'inter rang et la création de refuge comme on l'a vu précédemment (Carroll and Hoyt 1984; Simon et al. 2010).

Dans le Sud-est de la France, une méthode alternative de lutte physique (le filet Alt'Carpo) a été inventée en 2005 pour limiter les attaques du carpocapse (Severac and Romet 2008). Il s'agit d'une toile insect-proof recouvrant soit chaque rangée (filets « mono rang ») soit la parcelle de pommiers (filets « mono-parcelle »). Les filets représentent une double barrière, d'abord physique, en limitant le nombre de carpocapse pouvant atteindre les

pommiers et comportementale en réduisant significativement le nombre d'accouplements sous filets (Sauphanor et al. 2012). Dans le Sud-Est, utilisant majoritairement la version mono-rang, le filet Alt'Carpo permet de réduire très significativement les IFT insecticides et notamment microbiologiques (type carpovirusine et *Bacillus thuringiensis*) de 57% en AB et les insecticides de synthèse et/ou microbiologiques de 70% en mode de production PFI (Capowiez 2013).

3. Espèce modèle étudiée : le forficule.

L'espèce modèle choisie pour étudier l'impact des pesticides en vergers de pommiers est un Dermaptère, le forficule. Considéré comme ravageur dans les vergers de fruits à noyaux, il s'agit d'un auxiliaire en vergers de fruits à pépins (Dib et al. 2011; Romeu Dalmau 2012). L'ordre des Dermaptères compte 1800 espèces dans le monde et une vingtaine en France. Le forficule Européen, *Forficula auricularia* Linné (Famille des Forficulidae) est de loin l'espèce la plus répandue dans tous les pays au climat tempéré (Behura 1950), il s'agit en effet de l'espèce majoritaire dans le Sud-est de la France (Fig. 10).



Figure 10. Mâle (à gauche) et femelle (à droite) *Forficula auricularia* L. (photo Pascal Goetgheluck)

Dans la région avignonnaise, on trouve parfois également *F. pubescens* Gené (Fig. 11) (Debras et al. 2007) et plus rarement *F. decipiens* Gené, *Euborellia moesta* et *Labidura riparia* (Albouy et Caussanel 1990, Ricard et al. 2012). Nous donnerons les notions principales sur les trois dernières espèces avant de nous consacrer à *F. auricularia* et *F. pubescens* que nous avons étudiés. *F. decipiens* Gené est retrouvé dans le Sud (surtout en région méditerranéenne) et l'Ouest du pays, sa biologie est pratiquement inconnue. *Euborellia moesta* (Famille des Anisolabididae, ex Carcinophoridae) est présent dans le quart Sud du pays, sur les plages, dans les garrigues, les zones cultivées, les jardins et les vergers. Il est actif aussi bien la nuit que le jour mais ne reste qu'au niveau du sol. Il présente un régime omnivore avec un comportement nettement prédateur (Dauta-Dupuy 1978). *Labidura riparia* (Famille des Labiduridae) est commun en France mais retrouvé dans des milieux très particuliers sur les plages maritimes et bords de rivière (Caussanel 1966). Avec un régime carnivore, il est considéré comme auxiliaire possible dans les cultures américaines de céréales et de coton pour maîtriser les insectes ravageurs (Shepard et al. 1973).

Quelque soit l'espèce, la distinction entre un mâle et une femelle forficule s'effectue visuellement grâce au dimorphisme de leurs cerques à l'état adulte. Les cerques sont droits chez la femelle, ils sont courbés chez le mâle (Fig. 10-11A). Aucune distinction visuelle n'est possible aux stades larvaires chez *F. auricularia* (distinction possible chez *Labidura riparia* dès le 3^e stade larvaire (Caussanel 1966)). La forme des cerques est très souvent caractéristique d'une espèce (Albouy et Caussanel 1990). La base des cerques de *F. pubescens* est droite sur plus de la moitié de leur longueur totale (Fig. 11A) alors que la courbe commence plus tôt chez *F. auricularia* (Fig. 10 à gauche). Les cerques participent activement à la capture des proies, à la parade nuptiale et à l'accouplement.



Figure 11. Mâle *F. pubescens* en A., femelle *F. pubescens* en B. (Photos Balocchi)
NB : ne pas tenir compte des couleurs des photos qui ont été prises dans des conditions de luminosité différente

A travers la présentation de la biologie du forficule et de son cycle évolutif, nous verrons qu'il est exposé aux pesticides (sol, surface, surface foliaire) tout au long de sa vie. Nous verrons que des études ont justement été menées pour caractériser la sensibilité du forficule aux pesticides à travers le monde. Une synthèse en fin de partie récapitule les caractéristiques qui font, *a priori*, du forficule une bonne espèce modèle pour étudier l'impact des pesticides en vergers de pommiers.

3.1. Cycle biologique et écologie

Nous présentons ici le cycle biologique et l'écologie de *F. auricularia* qui est l'espèce la plus commune et la plus étudiée à travers le monde depuis le début du XX^e siècle (Worthington 1926). Il s'agit d'une espèce univoltine, i.e elle ne possède qu'une génération par an qui peut être issue de plusieurs portées (printemps, été) selon les régions (Moerkens 2010). La première vitellogenèse (accumulation de vitellus pour former les oeufs) est induite par le raccourcissement de la photopériode (Lenfant and Sauphanor 1992). Les accouplements ont lieu au cours de l'automne et plusieurs pontes se succèdent dans le Sud-est de la France, déposées à partir de Novembre pour la première, et en Mars-Avril pour la seconde (Fig. 12).

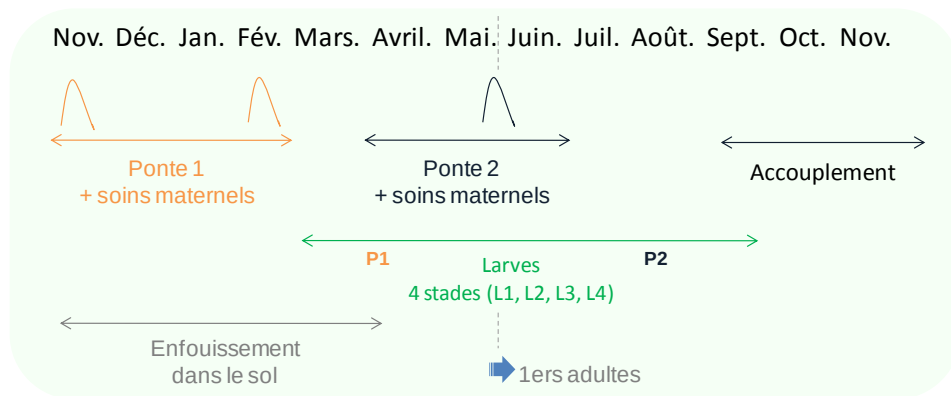


Figure 12. Biologie du forficule *F. auricularia* dans le Sud Est de la France.

Une troisième ponte en Mai-Juin est possible pour certaines femelles. Les spermatozoïdes accumulés dans la spermathèque des femelles lors des accouplements de l'automne suffisent à assurer la fécondation de l'ensemble de ces pontes. Dès la première ponte, la femelle chasse le mâle pour éviter le cannibalisme sur les œufs (Lamb 1976; Vancassel and Foraste 1980). La femelle possède un instinct maternel très développé et étudié (Rankin et al. 1997; Mas and Kölliker 2008). Outre de chasser le mâle du terrier, elle nettoie ses œufs avec ses mandibules pour éviter le développement de champignons et les déplace dans les meilleures conditions de température et d'humidité (Fig.13). Pendant cette période de soin maternel, la femelle ne s'alimente pas. Les durées d'incubation des œufs sont fonction de la température et peuvent varier d'une dizaine de jours à plus de 3 mois suivant la date de la ponte. Le développement de *F. auricularia* comprend quatre stades larvaires (L1, L2, L3, L4). Chaque stade nécessite une vingtaine de jour de développement selon la température (moins de 20 jours s'il fait plus chaud). La femelle présente des soins envers ses larves jusqu'au 2-3^e stade larvaire, les conduisant à proximité de nourriture et les défendant contre toutes attaques (Mas and Koelliker 2011a). Mas and Kölliker (2008 et 2011b) montrent également l'importance de signaux (hormones et/ou phéromones) pour réguler le comportement maternel et le développement larvaire en conditions de laboratoire.

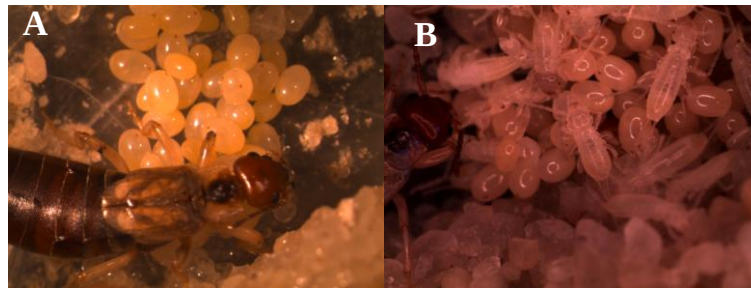


Figure 13. Femelle *F. auricularia* nettoyant ses œufs (A) et prenant soin de ses larves en pleine éclosion (B).

Le mâle et la femelle construisent donc un terrier pour passer l'hiver. Le forficule est présent au sol en hiver, pendant la reproduction. La femelle reste sous terre avec ses larves jusqu'au 2-3^{ème} stade larvaire (Mars-Avril). On les trouve ensuite en période estivale dans les habitats les plus variés : habitations, jardins, vergers, cultures annuelles, haies, bois, plantes herbacées. En verger, les larves gagnent la surface du sol dès le 3^{ème} stade larvaire (Avril-Mai), puis la surface foliaire aux 3^{ème} et 4^{ème} stades larvaires (Mai-Juin) (Köl liker and Vancassel 2007; Dib 2010). Le forficule est doté d'ailes protégées par des élytres; ces ailes sont tellement fines qu'elles ne lui permettent pas de voler (Albouy and Caussanel 1990) limitant donc ces déplacements au sol et à la surface foliaire *via* le tronc et les branches des arbres.

Les forficules sécrètent une phéromone d'agrégation qui provoque des regroupements d'individus en nombre parfois très important (Sauphanor 1992). Le forficule étant actif la nuit, ces regroupements ont lieu dans des endroits à l'abri de la lumière dans la journée (dans des crevasses, sous l'écorce). Il fuit la lumière la journée et se nourrit donc préférentiellement la nuit.

F. auricularia peut être retrouvé en compagnie de *F. pubescens* dans certains vergers de la région avignonnaise (Debras et al. 2007). Le tableau 3 récapitule les différences principales entre *F. auricularia* et *F. pubescens*. A l'œil nu, la distinction morphologique est claire pour les mâles selon la forme de leurs cerques comme on l'a vu précédemment. Pour les femelles cette distinction est plus délicate bien que *F. pubescens* soit plus petit en taille et plus foncé. Le nombre d'œufs pondus par *F. pubescens* est inférieur à celui de *F. auricularia* et *F. pubescens* présente un stade larvaire de plus que *F. auricularia* dont la durée de développement est fonction du sexe du futur adulte.

Tableau 3. Tableau récapitulatif des différences observables entre *F. auricularia* et *F. pubescens*. (à partir de (Albouy and Caussanel 1990))

	<i>F. pubescens</i>	<i>F. auricularia</i>
Adultes	antennes 12 articles	antennes 14 articles
	élytres tronqués, ailes entièrement cachées	élytres bruns à jaunes, écailles des ailes dépassant des élytres
	base des branches des cerques des mâles égale à plus de la moitié de leur longueur totale, crenelée irrégulièrement sur le bord interne et terminée par une dent	cerques des mâles à branches crenelées sur le bord interne à la base, courbes à l'apex; il existe 2 formes, l'une très développée dite "macrobia", l'autre plus réduite nommée "cyclobia"
	cerques des femelles à branches presque droites	cerques des femelles à branches légèrement élargies à la base, presque droites et crenelées sur le bord interne
	longueur totale 6-12 mm cerques mâle: 4-9 mm, femelle 3-4,5 mm	longueur totale mâle 14-21 mm, femelle 12,5-17,5 mm cerques mâle: 3-3,5 mm, femelle 1,5-2 mm
Nombre d'œufs	20-40	30 - 50
Larves	5 stades	4 stades
	1er stade: très court, première mue accompagne ou suit immédiatement l'éclosion	1er stade: 15 à 31 jours selon t°C
	2e stade: 22 jours à 17°C	2e stade: 12 à 22 jours selon t°C
	3e stade: 17 jours à 17,5°C	3e stade: 12 à 28 jours selon t°C
	4e stade: 15 jours à 19,5°C	4e stade: 16 à 30 jours selon t°C
	5e stade: 18 jours pour femelles et 20 jours pour mâles à 20,5°C	

3.2. Régime alimentaire

Les forficules de la famille des Forficulidae sont omnivores, leurs pièces buccales de type broyeur les rendent aptes à un régime alimentaire très varié. Ils se nourrissent de petits insectes, lichens, champignons et de divers végétaux (Lamb and Wellington 1975; Burnip et al. 2002; Hansen et al. 2006). Bien que *F. auricularia* puisse se nourrir de tissus végétaux et des fruits mûrs dans les vergers de fruits à noyaux (Bradley and Mayer 1994), sa préférence pour des proies animales et son action dans le contrôle des ravageurs surpassent cet inconvénient dans les vergers de fruits à pépins (Carroll and Hoyt 1984; Solomon et al. 2000; Romeu Dalmau 2012; Suckling et al. 2006). Il est considéré comme un prédateur généraliste significatif en Europe, Amérique du Nord, Nouvelle Zélande et Australie sur pommiers et poiriers (Carroll and Hoyt 1984; Mueller et al. 1988; Nicholas et al. 2005; Dib et al. 2011). *F. auricularia* se nourrit d'œufs et de stades actifs d'une large gamme de ravageurs (Buxton and Madge 1976). Il est décrit comme potentiellement actif sur les psylles des poiriers (Sauphanor et al. 1993), sur les acariens en conditions de laboratoire (Weiss and McDonald 1998), sur des œufs de Lépidoptères en vergers de pêcheurs et de pommiers (Solomon et al. 2000), sur diverses espèces de pucerons, aussi bien sur le puceron lanigère *Eriosoma lanigerum* (Asante

1997), que le puceron vert non migrant *Aphis pomi* (de Geer) (Carroll and Hoyt 1984, Piñol et al. 2009), et le puceron cendré *Disaphis plantaginea* (Miñarro et al. 2005, Dib et al. 2010). Une autre espèce de Forficulidae (*Doru luteipes*) est également connue prédatrice sur les œufs d'un Lépidoptère (*Diatraea saccharalis*) de grandes cultures (maïs, canne à sucre) en Argentine (Fenoglio and Trumper 2007). *F. pubescens* a été moins étudié que *F. auricularia* mais possède également un régime alimentaire polyphage et une capacité prédatrice envers les pucerons et psylles (Debras et al. 2007).

Le tableau 4 récapitule les principaux ravageurs du pommier sur lesquels le forficule *F. auricularia* peut exercer de la prédation en reliant la phénologie du forficule et du ravageur. Dès qu'il gagne la surface foliaire (au stade L3), le forficule peut exercer de la prédation (Dib 2010). Dans les vergers d'agrumes, Piñol et al. (2009) ont montré que *F. auricularia* est plus efficace que les coccinelles et les Hétéroptères prédateurs pour diminuer la densité de pucerons.

Tableau 4. Contrôle potentiel du forficule *F. auricularia* aux stades adulte ou larvaire (L3, L4) pour les principaux ravageurs du pommier dans le Sud-est de la France, en reliant la phénologie du forficule et du ravageur (modifié à partir de Gobin et al. 2008).

Principaux ravageurs	Présence des nuisances	Contrôle potentiel du forficule	
<i>Cydia molesta</i> (tordeuse orientale)	1ère génération: Avril 2è génération: Juillet	oui oui	Début de présence des adultes et des premières L3 Présence des adultes, L3, L4
<i>Dysaphis plantaginea</i> (puceron cendré)	Mars à Mai	oui	Début de présence des adultes et des premières L3
<i>Cydia pomonella</i> (carpocapse)	Mai à Septembre	Faible	Seulement les œufs et les larves juste écloses peuvent être atteints par le forficule
<i>Eriosoma lanigerum</i> (puceron lanigère)	reprise activité: Mars migration principale: Mai	non O/N	Forficules sous terre Forficules (adultes, L3) présents en faible proportion

3.3. Sensibilité aux pesticides

Nous avons vu que la présence des ravageurs entraîne l'utilisation d'une grande quantité de pesticides auxquels le forficule peut être exposé (sous forme de résidus ou vapeur) tout au long de sa vie. La sensibilité aux pesticides de *F. auricularia* a commencé à être étudiée dans les années 1980 en Angleterre avec French-Constant et Vickerman (1985) en conditions de laboratoire (exposition par contact avec un sol pollué), puis en France avec Sauphanor aussi bien en conditions de laboratoire (Sauphanor et al. 1992) que sur le terrain (Sauphanor et Staübli 1994). Déjà, *F. auricularia* était montré sensible aux substances OP et

pyréthrinoïde (Sauphanor et al. 1992 1993, Sauphanor and Staübli 1994). Mais les produits testés à l'époque, ne sont plus sur le marché ou presque plus utilisés pour la plupart.

La diversité des forficules à travers le monde fait que des études de sensibilité aux pesticides ont également été réalisées sur des espèces absentes du territoire français. Au Mexique, Cisneros et al. (2002) ont montré que le spinosad et le chlorpyrifos ont une forte toxicité sur *Doru taeniatum* (Famille des Forficulidae) en condition de laboratoire et sur le terrain (91-95% mortalité avec exposition sur des plantes traitées par des granules Spinosad de 200-2000 ppm respectivement). Au Brésil, Campos et al. (2011) ont réalisé des DL₅₀ et étudié les déplacements de *Doru luteipes* après exposition en condition de laboratoire (OP, carbamate, pyrethriné et spinosin) et montre que le chlorpyrifos est peu sélectif avec une forte toxicité et que le spinosad réduit la locomotricité. A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible sur la sensibilité de *F. pubescens*.

Concernant *F. auricularia*, des études récentes ont été réalisées à travers le monde mais pour la plupart en conditions de laboratoire et nous donnent des résultats de létalité. Aucune étude préalable n'a été réalisée sur l'effet de ces pesticides au niveau moléculaire au sein de l'organisme. De plus, la dimension écologique n'a pas été souvent prise en compte. Au regard de ce manque d'approche, il est donc nécessaire d'étudier l'impact des pesticides sur différents biomarqueurs (biochimiques, comportementaux) du forficule et de prendre en compte les conditions d'exposition du terrain.

Nous pouvons synthétiser les caractéristiques qui font de *F. auricularia* un prédateur généraliste intéressant à utiliser comme espèce modèle pour étudier l'impact des pesticides en vergers de pommiers :

- sa distribution mondiale, son abondance naturellement élevée
- la longue période où il reste actif en verger (Avril-Novembre) qui correspond à la période des traitements phytosanitaires
- sa grande polyphagie qui lui permet de maintenir des effectifs importants même en absence de proies
- sa mobilité, sa capacité de prospection et sa potentialité prédatrice qui le rendent efficace pour la régulation biologique
- sa quasi-absence de vol qui assure sa permanence dans un verger
- son cycle univoltin, plusieurs pontes possibles dans le Sud-est de la France mais regroupées en une génération par an
- le comportement maternel qui garantit la protection des œufs et la survie de nombreuses larves
- l'existence d'une phéromone d'agrégation et l'utilisation possible de pièges artificiels permettant de les maintenir en vergers et de les piéger.
- sa sensibilité aux pesticides

Chapitre II. Objectifs de la thèse

Dans le contexte européen actuel visant la réduction des risques et de l'utilisation des pesticides, le développement d'outils permettant d'évaluer les impacts environnementaux et le développement de méthodes alternatives sont des objectifs majeurs. L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'impact des pesticides utilisés en vergers de pommiers à plusieurs échelles pour intégrer le maximum de réponses biologiques. L'espèce modèle choisie est le forficule Européen (*F. auricularia*), connu comme prédateur généraliste en vergers de fruits à pépins. Il s'agit d'un auxiliaire efficace pouvant servir d'alternative à certains pesticides. Ce travail s'articule autour de différents niveaux d'organisation biologique, de l'échelle cellulaire avec des biomarqueurs biochimiques à l'échelle des populations de forficules présentes en vergers de pommiers (approche bioindicateur).

Pour pouvoir évaluer les impacts des pesticides à l'échelle cellulaire, différents types de biomarqueurs biochimiques sont analysés.

Dans un premier temps nous avons étudié les B-estérases, biomarqueurs biochimiques, dont l'acétylcholinestérase (AChE) et les carboxylestérases (CbE). L'AChE, enzyme cible des insecticides organophosphorés et carbamates, est inhibée en présence de ces pesticides. Elle joue un rôle fondamental dans la régulation de l'influx nerveux en hydrolysant le neurotransmetteur acétylcholine, provoquant l'arrêt des impulsions nerveuses. Les CbE constituent une famille d'iso-enzymes impliquées dans la détoxification des pesticides (organophosphoré et pyréthrinoloïde) et sont également inhibées par la présence d'insecticides organophosphorés et carbamates. La connaissance de leur activité seuil, mesurée en absence de pesticide aide d'une part, à la compréhension des désordres comportementaux observés après exposition et d'autre part, elle est nécessaire si on veut utiliser ces biomarqueurs sur des organismes issus du terrain. Cela nous amène à formuler les questions de recherche suivantes :

- *Quelles sont les caractéristiques des B-estérases du forficule en terme de localisation tissulaire et d'activité seuil?*

- Existe-t-il une sensibilité différentielle entre les activités AChE et CbE après une exposition *in vitro* aux pesticides?
- Existe-t-il des différences d'inhibition des B-estérases entre mâles et femelles chez le forficule ?

Ce travail fait l'objet du chapitre 3 et correspond à un article accepté avec révisions mineures, soumis à Chemosphere en Novembre 2013, intitulé « Tissue distribution, characterization and *in vitro* inhibition of B-esterases in the earwig *Forficula auricularia* ».

Prenant avantage du statut d'auxiliaire du forficule, nous avons ensuite voulu savoir si nous pouvions mettre au point un biomarqueur fonctionnel. Nous avons élargi l'étude à l'échelle de l'organisme et nous avons suivi la capacité prédatrice du forficule (au 4^e stade larvaire et à l'âge adulte) en conditions de laboratoire après exposition à différentes familles de pesticides. Pour comprendre et valider les résultats obtenus sur le comportement, nous avons mesuré l'activité des B-estérases sur les individus utilisés pour les tests de prédation. Cela nous amène à formuler les questions de recherche suivantes :

- L'activité de prédation de *F. auricularia* est-elle altérée par une exposition aux pesticides ?
- Existe-t-il des différences d'impact selon le sexe et le stade de développement du forficule ?
- Existe-t-il une corrélation entre biomarqueur du comportement et biomarqueur biochimique ?
- Le comportement de prédation peut-il être utilisé comme biomarqueur fonctionnel ?

Ce travail fait l'objet du chapitre 4 et correspond à un article soumis à Ecotoxicology en Février 2014, intitulé « Exposure to insecticides at normal application rates can alter the predation behavior of *F. auricularia* ».

La capacité prédatrice étant altérée par les pesticides, le régime alimentaire du forficule est modifié. Nous avons cherché à savoir si ces altérations pouvaient avoir des répercussions à l'échelle des populations soit directement au niveau des abondances (moindre survie) soit indirectement au niveau de la fécondité et donc voir si les expositions aux pesticides entraînent des effets plurigénérationnels. Le forficule étant univoltin et pour tenir compte des conditions d'exposition du terrain, un élevage a été mis en place chaque année à partir

d'adultes (mâles et femelles) prélevés directement dans des vergers soumis à différents modes de protection phytosanitaire (AB, PFI, agriculture « conventionnelle »). Nous avons suivi la fécondité et le développement des premiers stades larvaires. Il s'agit ici d'une étude à l'échelle de l'organisme qui permettrait éventuellement d'évaluer des observations à l'échelle populationnelle. Cela nous amène à formuler les questions de recherche suivantes :

- *Les différentes pratiques phytosanitaires modifient-elles la reproduction et la fertilité du forficule *F. auricularia* ?*
- *Existe-t-il une corrélation entre pratiques phytosanitaires et développement des stades larvaires*

Ce travail fait l'objet du chapitre 5 et correspond à un article en préparation.

Pour prendre en compte les conditions environnementales des expositions, un suivi terrain des populations de forficules a été réalisé dans des vergers soumis aux différents modes de protection phytosanitaire (AB, PFI, faibles intrants, abandonnés). Les vergers soumis à une agriculture « conventionnelle » ne sont ici pas représentés par absence d'une quantité suffisante de forficule dans ces vergers et par disparition progressive de ce mode de protection au cours de la thèse. L'abondance et la diversité des espèces de forficules présentes ont été suivies en tenant compte des caractéristiques propres à chaque verger. Cela nous amène à formuler les questions de recherche suivantes :

- *Quels sont les impacts des pesticides employés au terrain sur les populations de forficules en termes d'abondance et de diversité ?*
- *Quelles sont les facteurs, protection phytosanitaire ou caractéristiques paysagères, qui influencent le plus les populations de forficule ?*
- *Le forficule représente t-il un bioindicateur pertinent ?*

Ce travail fait l'objet du chapitre 6 et correspond à un article en préparation, à soumettre à Science of the Total Environment en 2014, intitulé « The abundance and diversity of earwigs in apple orchards are influenced by pesticide management strategy ».

Nous avons étudié l'impact des pesticides utilisés en vergers de pommiers sur un arthropode bénéfique au niveau cellulaire, au niveau de l'organisme (comportement et reproduction) et au niveau populationnel en intégrant des caractéristiques écologiques et environnementales (Fig. 14). Les résultats de ce travail permettent donc d'obtenir des informations complémentaires pour le développement d'une approche intégrative.

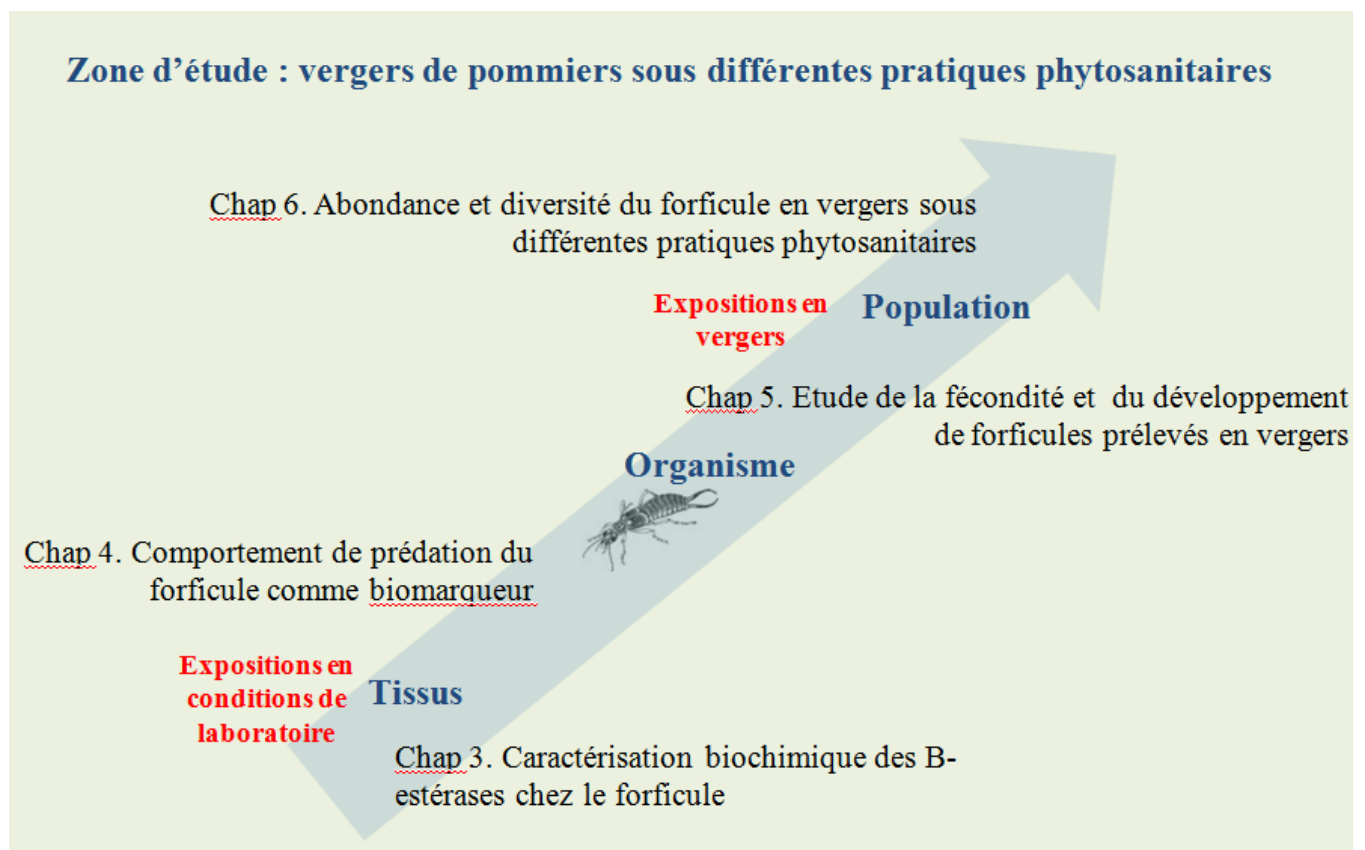


Figure 14. Schéma synthétique de la thèse.

Chapitre III. Caractérisation biochimique des B-estérases (AChE et CbE) chez *F. auricularia*

L'abondance du forficule, sa facilité de capture et son exposition aux pesticides tout au long de sa vie en vergers font de lui une espèce modèle de qualité pour étudier l'impact des pesticides sur la faune auxiliaire en vergers de pommiers. Nous avons vu dans l'introduction, qu'une large gamme de biomarqueurs existent pour étudier l'impact d'un polluant mais pour étudier l'impact des pesticides les B-estérases sont couramment employées (Barata et al. 2004; Pundir and Chauhan 2012). AChE et CbE sont des hydrolases classées parmi les B-estérases, sensibles aux composés organophosphorés.

L'AChE, avec son rôle fondamental sur le fonctionnement du système nerveux, est la cible des OP et carbamates. Son utilisation est possible sur tous types d'organisme (aquatique ou terrestre). Frasco et al. (2006) ont caractérisé les cholinestérases chez la crevette (*Palaemon serratus*) avant d'étudier sa sensibilité aux OP et aux carbamates; Gagnaire et al. (2008) ont caractérisé les cholinestérases de deux escargots (*Potamopyrgus antipodarum*, *Valvata piscinalis*). Les caractérisations chez les insectes ravageurs sont courantes pour comprendre les mécanismes de résistance. Lang et al. (2010) ont trouvé deux acétylcholinestérases avec des caractéristiques biochimiques différentes chez un lépidoptère. Azevedo-Pereira et al. (2011) ont fait le lien entre l'activité de l'AChE et deux comportements (déplacement, ventilation) chez le chironome, un insecte omniprésent, après exposition à de l'imidaclopride. Des études génomiques sur les estérases des insectes sont également disponibles (Oakeshott et al. 2005) pour comprendre les mécanismes de résistances qu'ils développent.

Les CbE ont quant à elles un rôle dans la détoxification des organophosphorés et pyrethrinoïdes, pouvant alors assurer un rôle de protection vis-à-vis de l'AChE. Le niveau d'activité carboxylestérase et la présence de différentes isoformes permettent d'évaluer la toxicité des OP chez un organisme, selon le degré d'inhibition des CbE par les OP. Maxwell (1992) avait commencé à étudier cette capacité protectrice chez le rat exposé à différents pesticides. Il avait mis en évidence une capacité protectrice plus forte pour les OP les plus toxiques. Chanda et al. (1997) avaient également étudié la capacité protectrice des CbE chez

le rat exposé à un OP (chlorpyrifos) et montré que le nombre de molécules de CbE joue un rôle dans la détoxification. Coppin et al. (2012) ont réalisé une analyse moléculaire chez la mouche (*Lucilia cuprina*) pour repérer les mutations des CbE les plus efficaces dans la détoxification de pyréthrianoïde.

La caractérisation biochimique de ces enzymes est nécessaire pour connaître leurs niveaux de base d'activité sur des échantillons témoins (jamais exposés). Ces valeurs seuils permettent également de discriminer entre des variations liées à l'impact de l'exposition à un insecticide et des variations liées à des facteurs biologiques ou environnementaux de type saison, sexe, ou autre. D'autre part, l'étude réalisée en conditions contrôlées favorise la compréhension des mécanismes d'inactivation des enzymes par les insecticides. La connaissance de ces mécanismes facilite l'évaluation des impacts observés et permettent la validation et l'utilisation de ces biomarqueurs en condition de terrain.

Tissue distribution, characterization and *in vitro* inhibition of B-esterases in the earwig *Forficula auricularia*.

Accepté à Chemosphere

Malagnoux Laure ^{a,*}, Capowiez Yvan ^b, Rault Magali ^a

^a Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse UMR 7263 CNRS-IRD, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE), 301 rue Baruch de Spinoza BP21239 F-84916 Avignon Cedex 09, France

^b INRA, UR 1115, Plantes et Systèmes de culture Horticoles, Site Agroparc, F-84914 Avignon Cedex 09, France

Abstract

Earwigs are important natural enemies of numerous pests in pome fruit orchards worldwide. Studying the effects of agricultural practices on these biological control agents is important for understanding its vulnerability in the field. The aim of this study was to characterize the B-esterase activities in the European earwig *Forficula auricularia* and to evaluate *in vitro* its sensitivity to organophosphate and carbamate pesticides. Acetylcholinesterase (AChE) activity was mainly measured with 1.5 mM acetylthiocholine as the substrate in the microsomal fraction of earwig heads (70% of total AChE activity). Carboxylesterase (CbE) activities were measured with three substrates [5mM 4-nitrophenyl acetate (4-NPA), 1mM 4-nitrophenyl valerate (4-NPV), and 2mM α -naphthyl acetate (α -NA)] to examine different isoenzymes, which were present mainly in the cytosolic fraction (about 70 to 88% of total activities) of all earwig tissues. CbE activity was higher than AChE activity, especially with α -NA, then 4-NPA and lastly 4-NPV. Chlorpyrifos-oxon an organophosphate, and carbaryl a carbamate pesticide, inhibited AChE and CbE activities in a concentration-dependent manner. Earwig CbE activities showed a stronger sensitivity to organophosphate than AChE, with the strongest effect for chlorpyrifos-oxon on male carboxylesterase activities. CbE and AChE showed about the same sensitivity to carbamate pesticides regardless of sex. These results suggest that B-type esterases in the European earwig *Forficula auricularia* are suitable biomarkers of pesticide exposure.

Keywords: acetylcholinesterase, carboxylesterase, organophosphorus pesticides, carbamate pesticides, male, female

Abbreviations: ChE cholinesterase, AChE acetylcholinesterase, BuChE butyrylcholinesterase, CbE carboxylesterases, OP organophosphorus pesticides, CB carbamate pesticides

1. Introduction

Earwigs are common insects in agro-ecosystems worldwide. The most common species is the European earwig *Forficula auricularia* L. (Dermaptera: Forficulidae). Omnivorous (Albouy and Caussanel, 1990), *F. auricularia* is frequently studied as a key predator of pests and/or as a pest in its own right. As an insectivore, the European earwig is considered a key biological control agent in pome fruit orchards because it has proven to be an effective predator of several pests such as aphids, leaf rollers and psyllids (Debras et al., 2007; Dib et al., 2010; Romeu-Dalmau et al., 2012). Most studies on the European earwig focused on its ecological role in orchards (Sauphanor and Sureau, 1993; Kölliker and Vancassel, 2007), but very few data are available on the mortality of this biological control agent due to pesticides (Lenfant and Sauphanor, 1992). Sub-lethal effects of insecticides on non-target species are of prime importance in pest management programs (Desneux et al., 2007). In order to determine the total impact of pesticides, sub-lethal effects must be taken into account. Sub-lethal pesticide doses can affect the physiology and behavior of the biological control agent. Few studies have been conducted on biocontrol agents; Campos et al. (2011) studied the behavioral locomotory response of the earwig *Doru luteipes* as a biomarker which led to the development of a time-mortality bioassay; Junges et al. (2010) estimated the predation rate between eels and tadpoles before measuring AChE and BuChE activities to explore whether fenitrothion (OP) affects predator and prey differentially. The *F. auricularia* B-esterases has never been characterized biochemically and it is necessary to determine if these enzymes could be efficient biochemical biomarkers. In addition, studying biomarkers in a natural enemy is interesting from both an ecological and ecotoxicological point of view to better understand the effects of pesticides and to be able to determine which pesticides are less harmful. Those pesticides should be favored in the context of Integrated Pest Management.

Organophosphorus (OP) and carbamate (CB) pesticides are still widely used in modern agriculture. Even though these pesticides persist in the environment for a relatively short time, they show highly acute toxicity that may represent a serious hazard for wildlife. These pesticides are neurotoxic and their main action mechanism is via acetylcholinesterase inhibition.

Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) is a key enzyme in the cholinergic system that regulates the levels of the neurotransmitter acetylcholine and terminates nerve impulses by catalyzing the hydrolysis of acetylcholine in the synaptic cleft. The mechanism of acute toxicity, i.e., inhibition of AChE in the nervous system, is the basis of the most popular biomarker of OP and CB pesticide exposure in many vertebrate and invertebrate species

(Rault et al., 2007; Vioque-Fernández et al., 2007; Kang et al., 2012). Mammalian cholinesterases (ChEs) are classified into two major groups, true acetylcholinesterases, and pseudocholinesterases such as butyrylcholinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8). Invertebrate ChEs appear to be a group of related enzymes with varying properties. Despite the fact that the main function of AChE is well known, the role of BuChE remains unclear (Massoulié et al., 1993; Nunes 2011). BuChE is found in plasma, liver, muscle and other tissues in vertebrates and invertebrates. In vertebrates several criteria are used to distinguish AChE from BuChE, and in most cases these could be extended to the distinction of ChE in invertebrates (Toutant, 1989; Massoulié et al., 1993). AChE preferentially hydrolyses acetylcholine, is very sensitive to eserine inhibition and is selectively inhibited by 1,5-bis(4-allyldimethylammonimphenyl)pentan-3-one dibromide (BW284c51) but not by tetraisopropyl pyrophoramide (iso-OMPA). The use of selective substrates and inhibitors makes it possible to distinguish between AChE and BuChE activities when both enzymes occur in the same target tissue. Carboxylesterases (CbE, EC3.1.1.1) are key enzymes in pesticide detoxification (Wheelock et al., 2008; Sogorb and Vilanova, 2002). AChE and CbE belong to the group of hydrolases classified as B-type esterases (Aldridge, 1953). These B-esterases are inhibited by OP or CB insecticides binding to the enzyme active site, in contrast to A-type esterases which are able to hydrolyze OP compounds and C-type esterases which do not interact with them. The successful application of biochemical biomarkers for environmental risk assessment in a new model organism requires good knowledge of its physiological and biochemical properties. B-esterases are of particular importance since AChE is the target of CB and OP insecticides still the most used worldwide (Kohler & Triebskorn 2013), and CbE are involved in pesticides detoxification.

The aim of this study was to characterize the location and properties of *F. auricularia* B-esterases and their *in vitro* sensitivity to OP and CB insecticides in both male and female earwigs to determine if they could be used as biomarkers.

2. Materials and methods

a. Chemicals

The following chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France): Acetylthiocholine iodide (AcSCh), butyrylthiocholine iodide (BuSCh), 4-nitrophenyl acetate (4-NPA), 4-nitrophenyl valerate (4-NPV), α -naphthyl acetate (α -NA), α -naphthol, DTNB, Fast Garnet, protease inhibitors and eserine sulfate. Commercial formulation of

carbaryl (Sevin85®), a CB pesticide, was supplied by Certis whereas the OP pure molecule Chlorpyrifos-ethyl-oxon (*O,O*- diethyl *O*-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphate) was purchased from Cluzeau Info Lab (France).

b. Experimental setup, animals and sample preparation

Earwigs (males and females separately) were collected from a reference orchard (not treated since 8 years), frozen and stored at -20 °C until analysis. The head, thorax and abdomen were dissected and weighed (by group of five). For measurements on the whole body, earwigs were weighed individually. Eight samples consisting of five of each tissue types, or single whole organism, were used for biochemical analysis. Tissue samples were homogenized on ice, in 10% (w/v) low-salt buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.3), 10 mM NaCl supplemented with a cocktail of protease inhibitors (aprotinin, leupeptin and pepstatin = 5 µg.mL⁻¹, antipain = 1 µg.mL⁻¹, trypsin inhibitor = 1 mg.mL⁻¹) using a homogenizer (Ultra Turrax IKA T18 basic at 14000 rpm). Tissue homogenates were centrifuged at 3000 g for 10 min at 4 °C and the supernatants were stored at -20 °C until analysis with 10% glycerol as an enzyme stabilizing agent. To determine B-esterase activities in different fractions of the crude homogenate and separate the cytosolic or soluble fraction from the microsomal fraction, the crude extract was centrifuged at 100 000 g for 1 h, at 4 °C. Total protein content was determined using the Lowry method modified according to Markwell et al. (1978), with bovine serum albumin as a standard.

c. B-esterase activity assay

All the enzyme activities were measured spectrophotometrically using a microplate reader (synergy HT, Bio-Tek). Localization of ChE and CbEs activities was realized in the crude homogenate of each type of tissue. ChE activity was monitored at 412 nm and 25 °C according to Ellman et al. (1961) in a reaction medium (0.2 mL final volume) containing 4 µL of extract, 0.375 mM DTNB, 1.5 mM of substrate AcSCh for Acetylcholinesterase (AChE) activity and 1.5 mM of substrate BuSCh for Butyrylcholinesterase (BuChE) activity, in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7).

CbE activities were assayed using three different substrates to characterize multiple CbE isoenzymes. CbE activity using α -NA as the substrate was determined according to Gomori (1953), as adapted by Bunyan and Jennings (1968). The reaction medium (0.2 mL final volume) contained 25 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ (pH=7.6) and 2 µL of extract diluted 1/20.

The reaction was initiated by adding α -Na 2 mM final concentration for 10 min at 25 °C, and stopped by the addition of 50 μ L 2.5% SDS with 0.1% Fast Garnet in 2.5% Triton X-100. The solutions were left to stand for 10 min at room temperature in the dark, and the absorbance of the naphthol-Fast Garnet complex was read at 530 nm. Enzyme activity was calculated from a standard curve ($A_{530}=f([\alpha\text{-naphthol}])$) containing pure α -naphthol as standard, in the same conditions.

Hydrolysis of 4-NPV and 4-NPA was determined as described by Carr and Chambers (1991) and Chanda et al. (1997), respectively. The reaction mixture (250 μ L final volume including 2 μ L of enzyme extract) contained 1 mM 4-NPV and 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) for assaying CbE activity towards 4-NPV, or 5 mM 4-NPA, 20 mM Tris-HCl (pH 8) and 1mM EDTA (to inhibit Ca^{2+} dependent phosphotriesterases) when 4-NPA was used as substrate. In both methods, the formation of 4-nitrophenol was monitored for 5 min at 405 nm, 25 °C and quantified using a 4-nitrophenol standard curve.

Blanks (reaction mixture free of enzyme sample) were checked for non-enzymatic hydrolysis of the different substrates used to measure AChE, BuChE and CbE activities.

All enzyme assays were run at least in triplicate and expressed as units per milligram of total protein ($\text{U}.\text{mg}^{-1}\text{protein}$). One unit of enzyme activity was defined as one micromole of substrate hydrolyzed per minute under the experimental conditions described above.

d. Native electrophoresis of CbE isoenzymes

Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed on a Bio-Rad electrophoresis unit (Bio-Rad, USA). Tissue homogenates obtained from whole body, head, thorax and abdomen (20 μ L) were loaded on 4% stacking and 12.5% resolving 0.75 mm polyacrylamide gel (25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3 as running buffer), and electrophoresed at a constant voltage of 30 V for 30 min and then 150 V until bromophenol blue tracking dye reached the bottom of the gel. Protein bands were visualized by incubation (2-3 min at room temperature) of the gels with a staining solution containing 100 mM Na-phosphate buffer (pH 6.4), 0.5 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$ α -NA and 0.025 g of Fast Blue RR salt, which was prepared and filtered immediately before use.

e. Esterase characterization

AChE activity was characterized using the earwig head pellet extract. CbE activities were investigated in the soluble fractions of earwig abdomen and on whole body. We examined the effect of the concentration of the substrates AcSCh, 4-NPV, α Na and 4-NPA (range of tested concentrations 0-10 mM). The kinetic parameters K_M and V_{max} associated with substrate-mediated modulation of B-esterase activities were estimated using the Michaelis-Menten equation.

The sensitivity of AChE and CbE activities was investigated by incubating the sample in the absence of substrate for 10 min at 25 °C with varying concentrations (5×10^{-10} - 5×10^{-3} M) of inhibitors. Eserine (a selective ChE inhibitor), BW284c51 (a selective inhibitor of AChE) and iso-OMPA (a selective inhibitor of pseudocholinesterase) were prepared as 5×10^{-2} M stock solutions in 10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl (pH 7.3), containing 10% ethanol. The concentration of ethanol was always below 0.2% in the incubation medium. B-esterase activities were assayed by adding the appropriate substrate. The percentage of esterase inhibition was calculated from the control free of inhibitors, which were incubated under the same experimental conditions as inhibitor-spiked samples.

f. In vitro B-esterase inhibition by pesticides

We studied the sensitivity of AChE and CbE activities with the commercial CB formulation of carbaryl (Sevin85®) and chlorpyrifos-ethyl-oxon, a pure OP molecule. The oxon form of the OP chlorpyrifos-ethyl was used for *in vitro* inhibition of B-esterases instead of its commercial formulation because *in vivo* OP pesticides are only activated after being metabolized.

Samples were incubated in the presence of serial dilutions of pesticides (5×10^{-10} – 5×10^{-3} M) for 30 min at 25 °C. Stock solutions (5×10^{-3} M) were prepared in water for Sevin85® and in cyclohexane for chlorpyrifos-ethyl-oxon and then dilutions were made in distilled water. Controls (no pesticides) were run in the same conditions for initial activity measurements. After the incubation period, the enzymatic reaction was initiated by the addition of the substrate. All measurements were run at least in triplicate. Because the target of OP pesticides is the insect AChE activity, we used the IC_{50} value obtained for AChE, in the presence of chlorpyrifos-ethyl-oxon as a reference. An esterase susceptibility ratio (SRe) was then calculated by dividing the IC_{50} value obtained for the AChE in the presence of OP by the IC_{50} value obtained for the other esterase activities either in the presence of OP or CB, for each sex independently. In order to compare the sensitivity of one esterase activity in males and

females, a sex susceptibility ratio (SRs) was calculated by dividing the female IC_{50} by the male IC_{50} for a considered activity and a given pesticide. The increase or decrease in sensitivity is indicated by values greater or less than one, respectively.

g. Data and statistical analysis

To estimate the apparent K_M and V_{max} , specific activity was plotted against substrate concentration and data were fitted to the Michaelis-Menten equation:

$$V_0 = (V_{max} \cdot [S]) / (K_M + [S]) \quad (\text{eq. 1})$$

where V_0 is the initial velocity and $[S]$ is the substrate concentration.

The concentration of inhibitor that inhibited 50% of enzyme activity (IC_{50}) under our specific experimental conditions (pH, temperature, time, protein concentration) was calculated using the logistic curve from the library of non-linear regressions of the XLSTAT software:

$$y = E_0 \cdot e^{(-b \times [I])} + E_{res} \quad (\text{eq. 2})$$

where E_0 is the total activity, E_{res} the residual activity, $b = k_i \times t$ (k_i inhibition kinetic constant, t the time in min) and $IC_{50} = \ln(2)/b$.

Comparisons of concentrations, differences between body parts, differences between sex and differences between supernatant and pellet were analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey HSD post-hoc comparison test using XLSTAT software (version 2013.3.01).

3. Results

a. Esterase location and activity levels

The tissue distribution of B-esterases showed that AChE activity is mostly located in the head (about 70% of total AChE activity) with means and standard deviations of 52.6 ± 15.1 mU.mg⁻¹ protein for females and 66.5 ± 12.6 mU.mg⁻¹ protein for males (Fig. 15A). The BuChE activity measured in the different earwig body tissues was very low, also preferentially located in the head and represented only $14.6 \pm 5.8\%$ and $13.8 \pm 3.7\%$ of the total ChE for females and males respectively. BuChE activity was undetectable in the abdomen. CbE activity was found in all tissues (head, thorax, abdomen) irrespective of the substrate used for enzyme assay (Fig. 15B, C, D). Regardless of the tissue investigated or earwig sex, maximum CbE specific activities were obtained in the presence of α -NA as substrate (321.9 ± 40.7 to 646.9 ± 88.0 mU.mg⁻¹ protein) followed by 4-NPA (129.7 ± 13.0 to 186.8 ± 36.9 mU.mg⁻¹ protein) and 4-NPV which had the lowest activity (51.3 ± 11.5 to 82.2

$\pm 9.3 \text{ mU.mg}^{-1} \text{ protein}$). CbE specific activities did not show a preferential tissue distribution pattern. However, the highest total CbE activity appeared to be in the abdomen, whatever the substrate used (70% of the total CbE activity was recorded in the abdomen). Native PAGE revealed multiple esterase isozymes in the different tissues either in males and females (Fig. 15E). We distinguished up to eight protein bands in the native gel of female extracts and four protein bands in the native gel of male extract, according to their relative mobility. The isozyme abundance and staining intensity varied markedly with the body region for females, but the same isoforms were found in the different body parts. Abdomen and whole body extracts showed three main bands that had the same relative mobility. Those bands displayed a high hydrolytic activity. A similar staining intensity, and the same isozymes were obtained in the different parts of the male body. Those bands had the same relative mobility than four of the eight observed in the female extracts. Among them, two main bands were identically observed in the different tissues for the male.

Whatever the tissue investigated, or the substrate used, the distribution of B-esterases between soluble or microsomal fraction was unchanged (data not shown). After ultracentrifugation, AChE activity was mainly located in the microsomal fraction of the head (67% of total AChE activity) while only 33% of total AChE activity could be attributed to a soluble (or cytosolic) enzyme (Fig. 16). BuChE activity was equally represented in the cytosolic and microsomal fractions. CbE activities were preferentially located in the cytosolic fraction of the abdomen (88% of total CbE activity with 4-NPA or 4-NPV substrate and 70% with α -NA).

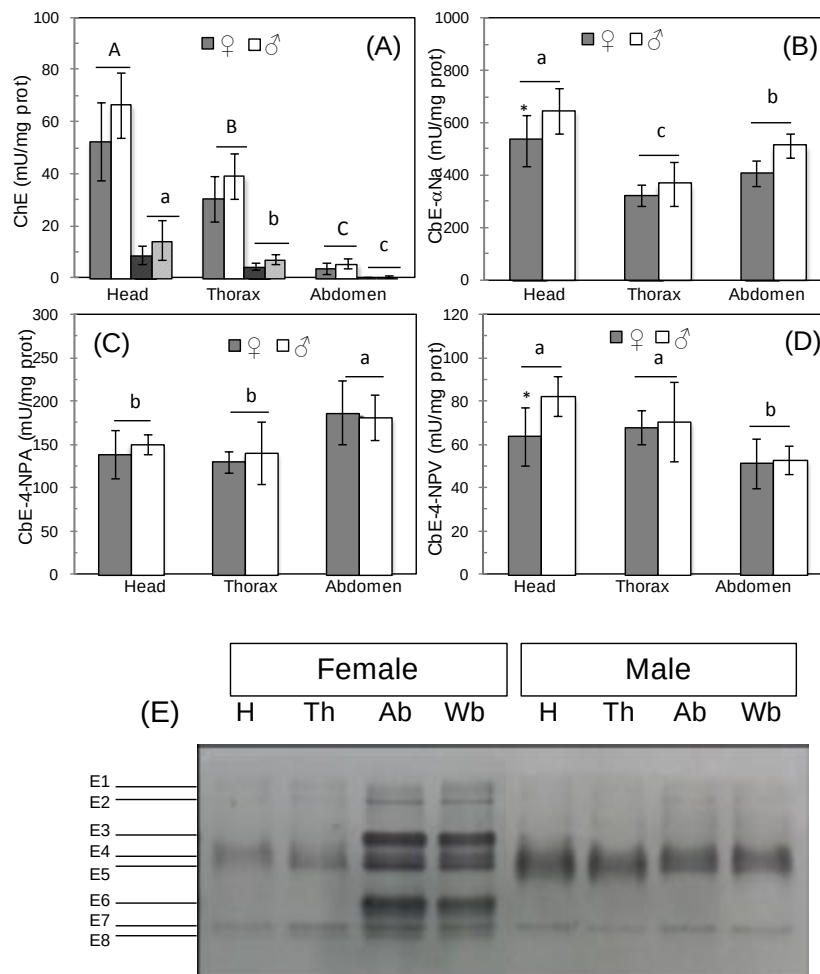


Figure 15. Location of B-esterase activities in different tissues of the earwig *Forficula auricularia* (Head ; Thorax ; Abdomen) from the crude homogenate. Enzyme activities (Means $\pm$ standard deviation) were measured either in males or females according to the experimental procedure. (A) Cholinesterase (ChE) activities were measured using the substrates acetylthiocholine (AcSCh) (clear bars) or butyrylthiocholine (BuSCh) (hatched bars); carboxylesterase (CbE) activities were measured using the substrates (B) 1-naphtyl acetate (α -NA); (C) 4-nitrophenyl acetate (4-NPA) and (D) 4-nitrophenyl valerate (4-NPV). A star indicates a significant difference between males and females for the given body part. Different letters indicate the significant difference among body parts based on ANOVA tests at the 5% significance level. (E) Native PAGE of CbE on the crude homogenate from the different tissues. 20 μ l of each tissue homogenates were loaded on the gel. Protein bands were detected and stained using α -NA/Fast Blue RR. E depicts the esterase bands visualized in the gel.

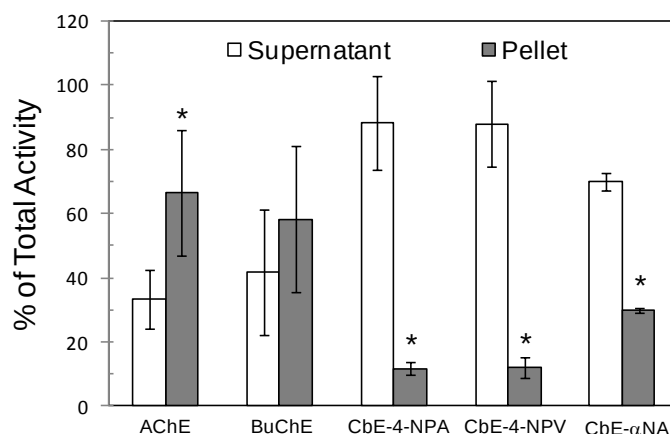


Figure 16. Cellular distribution of B-esterase activities in females.

Enzyme contents were measured in the cytosolic and microsomal fractions of the head for Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BuChE) or in the abdomen for Carboxylesterase (CbE) activities using 1-naphtyl-acetate (α -NA), 4-nitrophenyl acetate (4-NPA) or 4-nitrophenyl valerate (4-NPV) as substrates. The same results were obtained for males and females, whatever the tissue investigated. A star indicates a significant difference between the microsomal and cytosolic fraction for the given enzyme activity.

b. Characterization of esterases

Earwig AChE activity decreased in a dose dependent manner with eserine, a specific inhibitor of ChE, or BW284c51, a specific inhibitor of AChE activity, and reached 90% inhibition with 10^{-6} M for both inhibitors either in male or female earwigs (Fig. 17). In the presence of iso-OMPA, a specific inhibitor of pseudo-cholinesterase activity, both male and female earwigs kept 100% of their initial AChE activity. No effect was observed on CbE activity in the presence of eserine (Fig. 17), which confirms that esterase activity was due to ChE activity and not due to other non-specific esterases.

B-esterase kinetics examined with increasing substrate concentrations showed that AChE activity was inhibited at substrate concentrations higher than 2 mM (Fig. 18). These findings suggest that AChE must be the predominant enzymatic form. CbE activity showed a Michaelis-Menten kinetic regardless of substrate (Fig. 18). The apparent K_M and V_{max} of AChE and CbE with the three substrates tested are shown in Table 1.

The substrates 4-NPA, 4-NPV and α -NA were more efficiently hydrolyzed by esterases in female extracts compared to males (V_{max} female higher than V_{max} male). Concerning the affinity towards the different substrates, the K_M showed a close relationship with both sexes except for α -NA for which males showed a higher affinity (K_M male lower than K_M female for this substrate). Thus, the best catalytic specificity estimated as the V_{max}/K_M ratio was obtained for CbE activity with α -NA as substrate (Table 5).

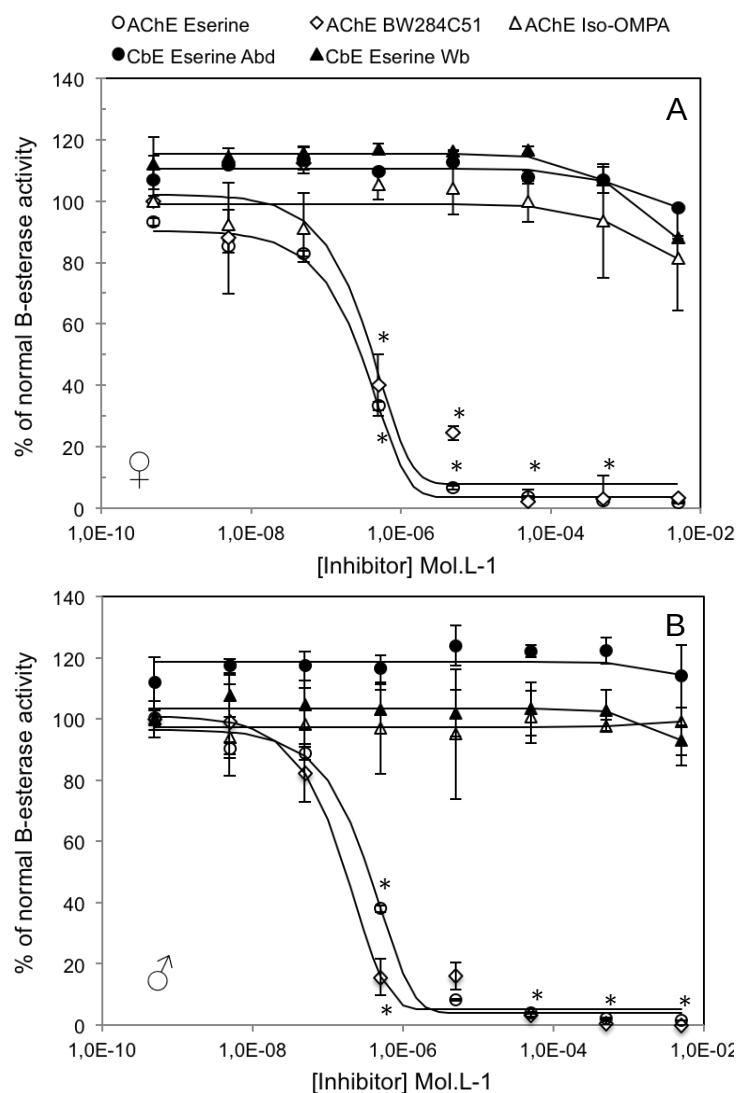


Figure 17. Effect of different inhibitors concentrations on acetylcholinesterase (AChE) and carboxylesterase (CbE) activities in females (A) and males (B) *Forficula auricularia*.

AChE activity was measured in the head in the presence of eserine (○), BW284c51 (◇) and iso-OMPA (Δ) whereas CbE activity was determined in the presence of eserine either in the abdomen (●) or the whole body (▲) using the substrate 4-nitrophenyl acetate (4-NPA). Each point corresponds to the mean of three independent assays ($\pm$ standard deviation). For the sake of clarity, values for AChE measured in whole body or for CbE measured with α -NA or 4-NPV as substrates are not shown since they were very close respectively to those of head-AChE activity and CbE-4-NPA activity. Asterisks denote significant differences compared to control assays.

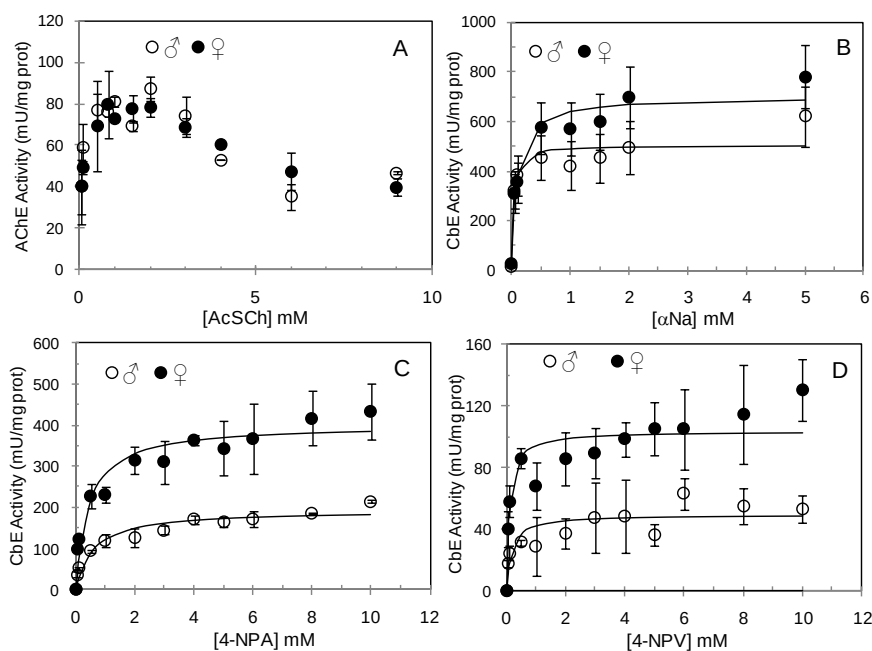


Figure 18. Determination of B-esterase kinetic parameters in *Forficula auricularia*, in both males and females for AChE from head microsomal fraction (A) and CbE from abdomen cytosolic fraction using 1-naphtyl-acetate (α -NA), 4-nitrophenyl acetate (4-NPA) or 4-nitrophenyl valerate (4-NPV) as substrates (B, C, D respectively). Kinetic parameters (apparent K_m and V_{max}) were estimated by fitting the data to the Michaelis-Menten equation. Each point corresponds to the mean of three independent assays ($\pm$ standard deviation). Kinetic parameters are shown in table 5.

Tableau 5. Kinetic parameters^a of AChE and CbE activities measured respectively in the head or the abdomen of males and females earwigs. ^a Kinetic parameters were obtained by fitting the experimental data points to the Michaelis-Menten equation using XLSTAT software.

Esterase	Earwig sex	V_{max} (mU/mg) (mean $\pm$ SD)	K_M (μ M) (mean $\pm$ SD)	V_{max}/K_M (mL.min ⁻¹ .mg ⁻¹)
AChE	♂	82 $\pm$ 3	46 $\pm$ 13	1.78
	♀	80 $\pm$ 2	55 $\pm$ 8	1.45
α -NA	♂	506 $\pm$ 30	32 ^a $\pm$ 14	15.81
	♀	695 $\pm$ 36	85 ^b $\pm$ 25	8.18
4-NPA	♂	193 $\pm$ 11	590 $\pm$ 180	0.33
	♀	399 $\pm$ 21	429 $\pm$ 135	0.93
4-NPV	♂	49 ^a $\pm$ 4	172 $\pm$ 111	0.28
	♀	104 ^b $\pm$ 6	100 $\pm$ 45	1.04

c. *In vitro* inhibition of B-esterases by pesticides

We examined the sensitivity of male and female earwig B-esterase activities to OP and CB pesticides in the different body region as well as in the whole body. For the sake of clarity, only results obtained on head for AChE and on abdomen for CbE are shown, as no significant differences were observed depending on body parts for a given pesticide (Fig. 19). Both AChE and CbE were inhibited in a concentration-dependent manner by chlorpyrifos-ethyl-oxon (OP) and Sevin85® (CB). Inhibition of AChE and CbE activities by OP and CB followed a sigmoidal concentration response model with IC_{50} varying from 10^{-5} to 10^{-9} M (Fig. 19, Table 6). CbE is more sensitive than ChE for OP and not for CB. Chlorpyrifos-ethyl-oxon had a stronger inhibitory potential compared to Sevin85® for both AChE and CbE activities and both sexes. Considering CbE activities, males always appeared to be more sensitive than females to OP with a sex susceptibility ratio (SRs) 400 times higher for male considering α -NA and 4-NPA activities. AChE sensitivity was only slightly higher for males, both pesticides having very similar IC_{50} values.

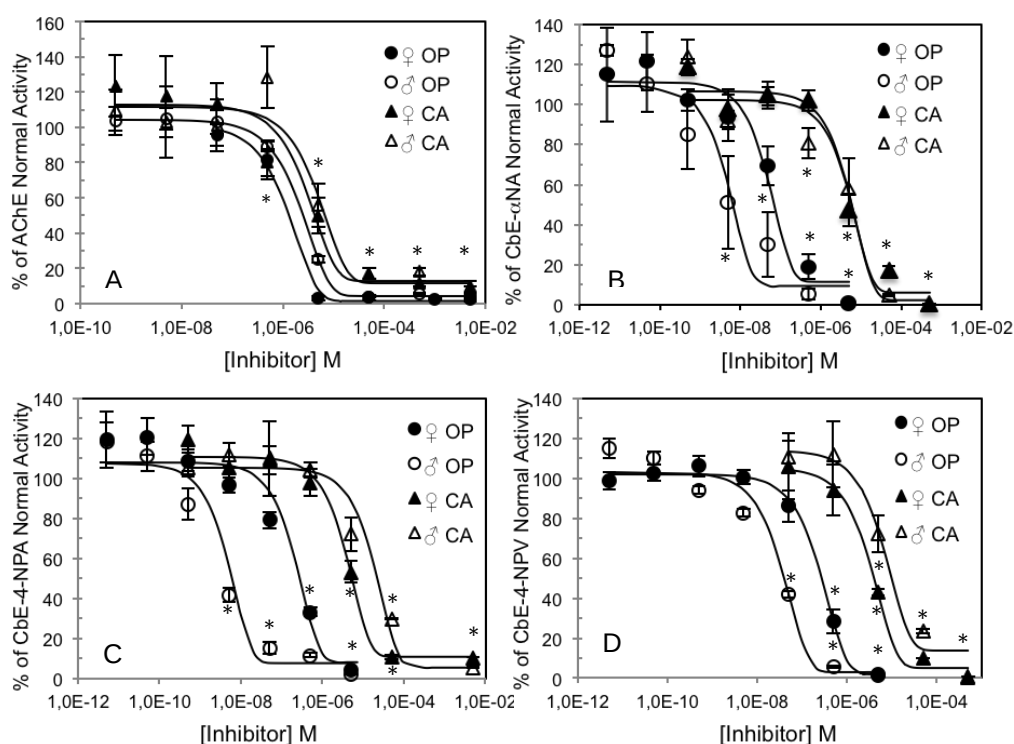


Figure 19. Effect of the organophosphate insecticide chlorpyrifos-oxon and the carbamate Sevin85® on female (●/▲) or male (○/△) *Forficula auricularia*. (A) Acetylcholinesterase and carboxylesterase activities measured using (B) 1-naphtyl acetate (α -NA); (C) 4-nitrophenyl acetate (4-NPA) and (D) 4-nitrophenyl valerate (4-NPV). Each point corresponds to the mean of three independent assays ($\pm$ standard deviation). Asterisks denote significant differences compared to control assays. IC_{50} values are shown in table 6.

Tableau 6. Kinetic constants and parameters for *in vitro* B-esterase inhibition by chlorpyrifos-oxon (OP) and Sevin85® (CB). AChE activity was measured in the head. CbE activities were measured in the abdomen. *Italic results correspond to experiments carried out on whole body (wb).*

Esterase	Pesticides	Earwig sex	IC ₅₀ ^a (M) (mean±SD)	k _i ^b (mM ⁻¹ .min ⁻¹)	SR _e ^c	SR _s ^c
AChE	OP	♂	(2.19 ± 0.16) 10 ⁻⁶	10.54	-	0.57
	OP	♀	(1.24 ± 0.21) 10 ⁻⁶	18.59	-	-
	CB	♂	(4.81 ± 1.36) 10 ⁻⁶	4.80	0.46	0.61
	CB	♀	(2.95 ± 0.73) 10 ⁻⁶	7.84	0.42	-
α-NA	OP	♂	(5.00 ± 0.00) 10 ⁻⁹	4620	438	10
		(♂ <i>wb</i>)	(5.58 ± 1.24) 10 ⁻⁹	4140	393	9.7
	OP	♀	(5.00 ± 0.00) 10 ⁻⁸	462	24.8	-
		(♀ <i>wb</i>)	(5.42 ± 1.62) 10 ⁻⁸	427	23	-
	CB	♂	(5.42 ± 0.00) 10 ⁻⁶	4.26	0.4	0.9
		(♂ <i>wb</i>)	(8.08 ± 2.8) 10 ⁻⁶	2.86	0.27	0.5
	CB	♀	(4.91 ± 0.00) 10 ⁻⁶	4.71	0.25	-
		(♀ <i>wb</i>)	(4.06 ± 1.24) 10 ⁻⁶	5.68	0.31	-
4-NPA	OP	♂	(4.72 ± 0.79) 10 ⁻⁹	4893	464	45
		(♂ <i>wb</i>)	(4.51 ± 0.34) 10 ⁻⁹	5122	486	36
	OP	♀	(2.14 ± 0.31) 10 ⁻⁷	107	5.79	-
		(♀ <i>wb</i>)	(1.62 ± 0.18) 10 ⁻⁷	143	7.68	-
	CB	♂	(1.91 ± 0.47) 10 ⁻⁵	1.21	0.11	0.21
		(♂ <i>wb</i>)	(0.61 ± 0.18) 10 ⁻⁵	3.76	0.36	2.3
	CB	♀	(3.95 ± 0.57) 10 ⁻⁶	5.85	0.31	-
		(♀ <i>wb</i>)	(14.2 ± 2.2) 10 ⁻⁶	1.63	0.09	-
4-NPV	OP	♂	(3.67 ± 0.00) 10 ⁻⁸	628	59.63	6.98
	OP	♀	(2.57 ± 0.26) 10 ⁻⁷	90	4.84	-
	CB	♂	(6.78 ± 2.09) 10 ⁻⁶	3.40	0.32	0.51
	CB	♀	(3.49 ± 0.76) 10 ⁻⁶	6.61	0.36	-

^a Molar concentrations of pesticides to yield *in vitro* 50% of enzyme inhibition (IC₅₀).

^b Inhibition kinetic constants (*k_i*) calculated from *in vitro* inhibition experiments at fixed period of time (30min).

^c SR_e corresponds to an esterase susceptibility ratio calculated by dividing IC₅₀ value obtained for AChE inhibited by OP (used as a reference) to the IC₅₀ value of other esterase inhibited either by OP or CB. SR_s corresponds to a sex susceptibility ratio calculated by dividing IC₅₀(female)/IC₅₀(male) for a given esterase. Increase in sensitivity is given by value higher than 1.

4. Discussion

a. Characterization of B-esterase activities

In many organisms, total ChE activity is frequently due to the presence of both AChE and BuChE activities co-existing in the same tissue (Monteiro et al., 2005). Both ChE activities can be distinguished on the basis of their catalytic properties on specific substrates (AcSCh and BuSCh) and inhibitors (Frasco et al., 2006; Nunes 2011). In invertebrates, the cholinesterase activity is due to “true” AChE if defined by the following criteria: (i) faster hydrolysis of AcSCh than other choline esters such as BuSCh, (ii) inhibition by excess substrate with AcSCh, (iii) inhibition by 10^{-5} M eserine, 10^{-5} M BW284c51 and insensitivity to iso-OMPA (Toutant, 1989). Using this strategy, we found that most of the total ChE activity in earwig was related to AChE because all the criteria mentioned above which are typical properties of AChE are fully respected: (i) the substrate AcSCh was preferentially hydrolyzed, (ii) earwig AChE measured in the presence of acetylthiocholine, was inhibited by excess substrate and (iii) AChE was inhibited by 10^{-5} M eserine and by 10^{-5} M BW284c51 while AChE was insensitive to iso-OMPA. Moreover, the AChE activity was localized to the microsomal fraction of earwig head tissue supporting the main role of this enzyme in the nervous system. All these observations suggest that ChE activity in earwigs can be considered as a true AChE activity. The catalytic efficiency of earwig AChE determined in this study (1.45 to $1.78 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ respectively for female and male) is higher than those found for the snail *Xeropicta derbentina* ($0.49 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) (Laguerre et al., 2008) or the earthworm *Eisenia andrei* ($0.29 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) (Caselli et al., 2006). As we observed similar BuChE activity in the cytosolic and microsomal fractions, this enzyme appears to be a non-specific cholinesterase. In many vertebrate species, BuChEs are present in various tissues and have a protective function by sequestering circulating OP compounds, decreasing the toxic effect of these compounds on brain AChE (Allon et al., 1998). In our study, due to its weak activity, the BuChE activity does not appear to be sufficient for such a purpose and cannot be the basis of a useful biomarker of pesticide exposure. In addition, invertebrate esterases occur in various forms with distinct substrate specificity and inhibition sensitivities (Domingues et al., 2010; Thompson, 1999). ChEs can be distinguished from other esterases in that they exhibit a preference for hydrolyzing choline esters rather than other carboxylic esters and they are generally inhibited by eserine at concentrations in the range of 10^{-5} M (Nunes 2011). Considering our results, the predominant form present in the head of *F. auricularia* is a cholinesterase rather than a non-specific esterase, mainly identified as AChE.

CbE activity was measured in the cytosolic fraction of all earwig tissues. Multiple isoenzymes were found in the crude *F. auricularia* homogenate, with the highest CbE activities obtained with α -NA and 4-NPA as substrates. Multiple CbE isozymes occur also in other species (Vioque-Fernandez et al., 2007; Sanchez-Hernandez et al., 2009), and it has been suggested that tissue-specific expression of CbE could play an important role depending on their specificity. Marked differences were observed between male and female regarding the presence of multiple isozymes observed in native electrophoresis, in the crude extract of *F. auricularia*. Up to eight bands were electrophoretically separated on female, while four bands were separated on male. Tissue distribution of the CbE suggested that the same isozymes were found in the different body part of *F. auricularia* for each sex independently. None of them were preferentially distributed. The value of the $V_{\max}/K_M$ ratio obtained for earwig CbE activity followed the order α -NA>4-NPA>4-NPV, as was previously observed for the snail *X. derbentina* (Laguerre et al., 2008) and the gut contents of the earthworm *L. terrestris* (Sanchez-Hernandez et al., 2009). It is of particular interest to note that with α -NA the ratio was about ten to fifty times higher than that obtained with 4-NPA or 4-NPV suggesting that this reaction could play an important role in pesticide metabolism in earwigs.

b. B-esterase sensitivity to pesticides

Pesticide sensitivity was measured on samples after ultra-centrifugation (head microsomal fraction for AChE, abdomen and whole body cytosolic fraction for CbE). We found marked differences in the inhibition of earwig B-esterase activity by chlorpyrifos-ethyl-oxon and carbaryl depending on the esterase type, pesticide type and earwig sex. From the SRe and SRs ratios calculated (Table 6), CbE activities appear to be more sensitive than AChE to *in vitro* inhibition by chlorpyrifos-ethyl-oxon, both in males and females, but with a much higher sensitivity for males (SRe more than 400- times higher for CbE with α -NA and 4-NPA substrates, SRs 10- or 45-times higher with CbE α -NA or CbE 4-NPA respectively for males). On the other hand, Sevin85® had approximately the same effect on CbE and AChE activity. The finding that chlorpyrifos-ethyl-oxon was more potent than carbaryl agrees well with data from an *in vitro* bioassay conducted on the western corn rootworm (Gao et al., 1998) where the rank order of the bimolecular reaction constant (k_i) from the best to the least effective inhibitor of AChE was chlorpyrifos-methyl oxon > carbaryl. Considered independently, each earwig B-esterase activity was more sensitive to OP than CB and followed the same order: chlorpyrifos-methyl oxon > carbaryl, with more significant differences on CbE than AChE.

As mentioned by Gao et al. (1998), the potency of OP compounds can be due to either a high affinity of the OP for the enzyme, associated with high phosphorylation activity compared to the carbamylation by CB inhibitors, or to CB having a lower affinity than the OP. It is generally assumed that CbEs have the potential to sequester available OP and CB pesticides, hence protecting AChE from being inhibited (Barata et al., 2004). Based on this hypothesis, the stronger inhibitory effect of OP on CbE would enhance its buffering capacity towards OP. The irreversible inhibition of CbE activity by OP can be considered as an efficient detoxification pathway, because OP binds stoichiometrically to CbE, thereby reducing its impact on nervous system AChE activity, the main target for acute OP toxicity (Maxwell and Brecht, 2001; Sogorb and Vilanova, 2002). Furthermore, it has been suggested that high levels of CbE activity and isoenzymes abundance can contribute to the tolerance of the organisms to toxic effects from anti-ChE insecticides (Wheelock et al., 2008). Conversely, considering the weaker differences observed between B-esterase sensitivity to CB, it could be assumed that the capacity of CbE to protect AChE against CB is not as effective as its protective effect against OP. The different CbE isozymes found depending on sex could support this. In particular, male exhibited only two major bands (E4 and E5) that could be affected by chlorpyrifos-ethyl-oxon compared to 4 major bands (E3; E4; E6; E7) on female tissues. Moreover, the highest level of CbE isoenzymes found in the abdomen of female supported the predominant role of CbE in detoxifying pathways in this sex. Nevertheless, further experiments with *F. auricularia* are still necessary to reveal the role of CbE activity in CB and OP detoxification, and to know whether IC_{50} outcomes really reflect the *in vivo* toxicity of these pesticides.

The CbE in male earwigs was more sensitive to chlorpyrifos-ethyl-oxon than that of females regardless of substrate. Although IC_{50} can be a predictive factor of species-specific differences in the *in vivo* sensitivity to OP and CB pesticides, many extrinsic factors related to the incubation conditions of the sample with the pesticide can modify the *in vitro* inhibition of B-esterases, which makes it difficult to compare different studies. Temperature, pH, incubation time and dilution of the enzyme in the reaction medium are among the potential factors affecting *in vitro* inhibition of B-esterases by pesticides (Mortensen et al., 1998). This result suggests that both males and females sampled in the field should be monitored because of the increased differences in sensitivity observed with CbE regardless of substrate.

5. Conclusions

This study is the first characterization of both ChE and CbE activities in the European earwig *F. auricularia*. The results indicate that ChE activity is mainly due to AChE activity essentially located in the head as a membrane-bound enzyme. Multiple CbE isoenzymes were found in different tissues, either in male and female, with more different isozymes in female tissues, preferentially distributed in abdomen for this sex. The main CbE activity was obtained for α -NA as substrate. OP and CB inhibit both AChE and CbE in a concentration-dependent manner. Our results show that *in vitro*, chlorpyrifos-ethyl-oxon had the strongest inhibitory effect on CbE. Different effects of the pesticide on CbE, but not AChE, activities were observed between males and females. Thus overall, the differences observed in terms of the sensitivity of CbE activities to OP and CB pesticides and the occurrence of different multiple isoenzymes depending on sex suggest that CbEs are suitable biomarkers of pesticide exposure in european earwigs and must be used as a complementary biomarker.

In order to investigate whether these differences observed *in vitro*, could influence earwig populations in orchards, further investigations should be conducted to determine the toxicological effects of pesticides *in vivo* both under controlled exposure, as well as under field conditions. A suite of biomarkers involving molecular, biochemical, histological and behavioral responses is highly recommended to assess pollution effects in the field (Triebkorn, 2005). Nevertheless for this purpose, because of its tiny size, the earwig head (less than 4mg each), which exhibited the highest AChE specific activity, may not be practical for processing a large number of samples. In addition, the atypical BuChE appears to be a very weak fraction of the total ChE activity, therefore a negligible influence of its presence on biomonitoring results is expected. Moreover same CbE isozymes are present in the different tissue, avoiding any underestimation of their role in assessment of pesticide effects. Thus, for ecotoxicological purposes, a careful analysis of field data should be performed on whole body samples rather than on separated body parts. In line with this, the measurement of both AChE and CbE activities in *F. auricularia* under a multibiomarker scheme is a good approach for a better evaluation of pesticide effects in field situations.

Acknowledgments

L. Malagnoux is grateful to the Provence-Alpes-Côte d'Azur Region (France) for her doctoral fellowship.

Chapitre IV. La capacité de prédation comme biomarqueur du comportement

Nous avons vu dans l'introduction que moins de 0.3% des pesticides appliqués atteignent le ravageur visé, 99.7% se retrouvent dispersés dans l'environnement. Toute la faune présente dans le verger est menacée. L'impact des traitements phytosanitaires sur la faune utile comme l'auxiliaire *Forficula auricularia* présente un intérêt pour l'amélioration de la gestion environnementale. Le forficule étant actif la nuit, il ne reçoit pas de traitements directement mais il est exposé à tous les résidus de pesticides aussi bien dans le sol que sur la surface foliaire. Des effets sublétaux, i.e. effets avant la mort de l'individu, sont à redouter et à déterminer pour la faune auxiliaire bénéfique d'un verger (Desneux et al. 2007). Notre étude sur l'impact des insecticides sur les B-estérases en est un exemple.

En vergers de fruits à pépins, la capacité de prédation du forficule a été démontrée sur de nombreux ravageurs à travers le monde (Buxton and Madge 1976; Carroll and Hoyt 1984; Nicholas et al. 2005; Dib et al. 2011; Romeu-Dalmau et al. 2012). Il est donc judicieux de contrôler que cette capacité prédatrice ne soit pas altérée par les insecticides appliqués contre les ravageurs. Le comportement est souvent un biomarqueur peu spécifique mais il est réputé très sensible (Azevedo-Pereira et al. 2011). Pour contourner le problème de spécificité, nous nous sommes limités à une étude en laboratoire.

Le comportement de prédation du forficule au 4ème stade larvaire et stade adulte a été étudié après des expositions réalisées en conditions de laboratoire, à des pesticides en concentrations connues. Les mesures des B-estérase ont été effectuées sur les individus du test de prédation pour évaluer la neurotoxicité des produits (Dell'Omo 2002). Les mesures biochimiques des B-estérases nous donnent une mesure d'exposition, le comportement de prédation nous montre un effet biologique de ces expositions. Cette étude nous permet également de classer les insecticides testés pour éviter les plus toxiques dans les cahiers des charges des productions AB et PFI.

Exposure to insecticides at normal application rates can alter the predation behavior of *Forficula auricularia*

Soumis à Ecotoxicology

Malagnoux Laure ^{a,*}, Capowiez Yvan ^b, Rault Magali ^a

^a Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse UMR 7263 CNRS-IRD, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE), 301 rue Baruch de Spinoza BP21239 F-84916 Avignon Cedex 09, France

^b INRA, UR 1115, Plantes et Systèmes de culture Horticoles, Site Agroparc, F-84914 Avignon Cedex 09, France

Abstract

The European earwig *Forficula auricularia* is an effective predator in pome-fruit orchards. It is therefore crucial to study whether insecticides affect this natural pest control agent. Predation behavior, i.e. the number of aphids eaten in 24h under laboratory conditions, was assessed after exposure of fourth-instar larvae and adult earwigs to widely applied insecticides. Inhibition of B-esterase activities (acetylcholinesterase and carboxylesterase) was also investigated. Earwig larvae predation was significantly decreased by 62% and 98% for Success4® and Pyrinex®, respectively. AChE and CbE activities were also decreased. Success4® had a stronger effect on AChE whereas Pyrinex® affected CbE activity preferentially. Adult earwig behavior was significantly affected by Success4®, Supreme® and Pyrinex® with a respective 20%, 28% and 66% decrease in predation for males, which were more sensitive than females. These decreases of adult predation behavior were also supported by significant inhibition of classical biochemical markers validating predation behavior as a new biomarker.

Keywords: earwig, insecticides, sublethal effect, predation, aphid, B-esterases

Abbreviations: AChE acetylcholinesterase, CbE carboxylesterases, OP organophosphorus pesticides, NAR normal application rate

1. Introduction

Earwigs (Insecta: Dermaptera) are very common in many agro-ecosystems (Albouy and Caussanel 1990). They are key insects in pome-fruit orchards where they are effective generalist predators of several pests such as aphids, leafrollers and psyllids (Dib et al. 2010). Generalist predators can significantly reduce pest numbers, and in some cases, reduce or prevent crop damage (Symondson et al. 2002). Earwigs are omnivores and can sometimes have negative effects on plants by feeding on leaves, flowers and soft fruits but they are harmless in citrus and apple orchards, and are thus considered as natural enemies of important pests in these systems (Romeu-Dalmau et al. 2012; Debras et al. 2007).

Since earwigs are arthropods living and feeding inside orchards, agricultural practices have a strong impact on their populations. Pesticide use in particular is expected to have a significant influence on their density (French-Constant and Vickerman 1985). Thus, one of the current challenges for producers is to either reduce pesticide usage or choose selective pesticides so that populations of generalist predators increase before the outbreak of pest infestations. However, the presence alone of these predators is not sufficient, it is necessary to ensure that even after exposure to pesticides, they are still able to find and handle their prey, allowing efficient predation.

Commercial apple orchards are highly manipulated crops in which a large amount of pesticides are used to increase productivity. In France, approximately 54,000 ha of apple orchards are sprayed with pesticides making apples the most intensely agrochemical-treated crop in the country (Codron et al. 2003). These treatments are fungicides (mainly against apple scab), acaricides (against red mites) and insecticides (mainly against the codling moth (Sauphanor et al. 2006)). Three pest control strategies are used in apple orchards: (1) conventional, (2) integrated pest management (IPM) and (3) organic farming. The first two management strategies use a vast variety of synthetic pesticides throughout the year. Among these, organophosphorus, neonicotinoid and pyrethroid compounds are the most sprayed. Organic farming replaces the usage of synthetic fertilizers with biological pest control, organic and botanical insecticides. Spinosyn, a naturally occurring mixture of two active components, spinosyn A and spinosyn D, produced by the soil actinomycete *Saccharopolyspora spinosa*, is permitted in organic orchards. All these different compounds are toxic to arthropods (de Castro et al. 2013; Martinou et al. 2014).

Acute pesticide toxicity (lethal effects) and selectivity were previously examined on generalist predators such as earwigs (Sauphanor et al. 1993). However, in addition to their lethal effect, pesticides can also induce various sublethal physiological or behavioral effects.

These effects are defined as negative effects on individuals that survive pesticide exposure. They can occur following exposure to a dose or concentration that is either sublethal or lethal (Desneux et al. 2007). In a recent review in aquatic ecotoxicology, Melvin and Wilson (2013) suggested that behavioral markers are favorable endpoints for assessing the impact of environmental contaminants on the organism and its ecology and are generally more sensitive than classical markers based on lethality, development or reproduction. Behavioral responses generally provide information that is better connected to integrated whole organism responses and broader ecological concerns (Little and Finger 1990) than the usual lethality biomarkers. Indeed, one of the major challenges in ecotoxicology is to trace the effects and side effects of chemicals from their cellular targets to communities of species and ecosystem functioning (Koehler and Triebskorn 2013). As the cellular targets of insecticides are commonly nervous system enzymes as well as metabolic pathways involved in detoxification, studying correlations between behavioral and biochemical biomarkers is of particular importance.

Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) is a key enzyme in the cholinergic system, which catalyzes the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine and terminates nerve impulses in the synaptic cleft. Because OP insecticides inhibit AChE, when animals are exposed to this class of agrochemicals, it is expected to accumulate in the synaptic cleft and lead to a subsequent over-excitation of the postsynaptic cell. At the whole-individual level, these pesticides can affect locomotion due to disruption of AChE-mediated neurobehavioral mechanisms (Scott and Sloman 2004). Several authors have investigated both behavioral endpoints (like locomotion) and biochemical biomarkers (such as acetylcholinesterase). No correlation was observed in earthworms (Capowiez et al. 2003), whereas a cause-effect relationship between AChE activity inhibition and behavioral impairments was found for some insects (Azevedo-Pereira et al. 2011) and aquatic organisms (García-de la Parra et al. 2006; Tilton et al. 2011).

Carboxylesterases (CbE, EC3.1.1.1) are key enzymes involved in pesticide detoxification (Sogorb and Vilanova 2002; Wheelock et al. 2008). These esterases detoxify organophosphate (OP) pesticides and synthetic pyrethroids by either hydrolyzing the ester bond or binding the pesticide (OP) to their active site and are considered an efficient protective mechanism against acute toxicity by OP pesticides in mammals (Sanchez-Hernandez 2011).

The aim of this study was to investigate the feasibility and quality of a new sublethal marker, based on the assessment of the predation efficiency of *Forficula auricularia*, a widespread generalist predator in pome-fruit orchards. We first evaluated the effect of four insecticides from four different pesticides families on the predation behavior of the earwig

(fourth-instar larvae and adults with distinction of males and females) on aphids under laboratory conditions. We then examined the effects of these pesticides on the biochemical biomarkers, AChE and CbE, on the same exposed earwigs. These data allowed us to classify the insecticides studied according to their toxicity towards earwigs with the aim of optimizing IPM strategies or organic strategies.

2. Materials and methods

a. Aphid populations

A rosy apple aphid colony was collected from an apple tree (Golden Delicious cultivar) in an orchard located in Noves, near Avignon (south-eastern France). Aphids were mass raised on detached plantain leaves (*Plantago lanceolata* L. (Lamiales: Plantaginaceae)) stuck to agar medium in plastic Petri dishes (15 cm wide and 3 cm high) with a 4 cm ventilation hole covered with an insect-proof net in the center of each lid. *P. lanceolata* is the secondary host plant of aphids during summer (Blommers et al. 2004). Plantain leaves were gathered in insecticide-free orchards. To set up a stock population, aphids were allowed to reproduce via parthenogenesis in a growth chamber at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ relative humidity, a L16:D8 h (Light/Dark) photoperiod and light intensity of approximately 5000 lux.

The experimental design for the predation test was adapted from Dib et al. (2011). Plastic Petri dishes were used as experimental arenas in all studies. A 3 cm wide hole was made in the center of each Petri dish lid and covered with plastic gauze for ventilation. Plantain leaf petioles were inserted into Eppendorf tubes containing from the bottom to the top: 1 ml of distilled water (to keep leaves fresh), a piece of cotton wool (as a separating middle layer) and a stopper layer of agar medium (to prevent aphids hiding in the water-saturated cotton ball).

First aphid instar nymphs were used in this study. Adult apterous vivipares were not used because they would have continued to produce young during the experimental period, which may have prevented the accurate estimation of predation rate. Only synchronized nymphs with a uniform age structure of about 24h old were used in all experiments. For this purpose, aphid adults were transferred randomly from stock cultures, using a wet smooth paintbrush, and allowed to produce offspring on detached plantain leaves stuck to agar medium. After 24h, the adults were removed and nymphs were counted.

b. Earwigs and the predation test

Male and female adults as well as fourth-instar *Forficula auricularia* earwigs were caught in early summer using cardboard traps placed on apple tree branches from an abandoned orchard (pesticide free for eight years).

All experiments were conducted in a climate controlled chamber at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ relative humidity and with a L16:D8 h photoperiod (approximately 5000 lux). These conditions were shown to be optimal for earwig predation by Dib et al. (2011). Earwigs (either control or exposed) were sequentially subjected to 24h acclimatization, 24h starvation and 24h predation. Prior to pesticide exposure and for the habituation stage, earwigs were placed with aphids of various ages for 24h to accustom them to this type of feeding. The earwigs were then left to starve for 24h to standardize predation conditions. During this starvation period, the earwigs were unexposed for the first 12h and then exposed to insecticides for the last 12h (overnight, i.e. when the earwig is active in orchards). Five earwigs were exposed per Petri dish covered by an airy lid to avoid escape. No food or shelter were provided during the exposure period. After 12h exposure, earwigs were transferred to a clean Petri dish with a known number of first instar aphid larvae (between 40 and 100), a shelter and a drinking trough. The European earwig is nocturnal and hides in shelters during the day (Sauphanor and Sureau 1993). After 24h predation at 20°C , the number of aphids which had been consumed was then recorded by counting the remaining aphids (live or dead) in each Petri dish using a binocular microscope. The earwig status (alive, moribund or dead) was noted and only live earwigs were frozen at -20°C for biochemical dosage of B-esterases. Earwigs were noted moribund when they were unable to walk but had moving legs or antenna when subjected to physical stimulus given by a paintbrush.

Four insecticides from four different families were tested independently: Success4® (spinosad) from Dow AgroSciences and permitted in organic orchards, Supreme® (acetamiprid from Certis), Decis Expert® (deltamethrin from Bayer) and Pyrinex® (chlorpyrifos-ethyl from Philagro) also common insecticides used in French apple orchards (except organic). Insecticide solutions were the commercial formulation purchased in specialized stores. They were diluted with distilled water to obtain solutions at the normal application rate (NAR) allowed in French apple orchards (Table 7). Control earwigs were exposed to water in the same conditions. Eight cm petri dishes were used for the insecticide exposure step by adapting the method described by Sauphanor et al. (1992), which used a Burgerjon type Potter-tower (Burgerjon 1956). Potter-towers are calibrated to apply 1.7 mg cm^{-2} of insecticide solution to mimic commercial sprayers, the insecticide volume used here

was calculated for the area of the petri dish surface. 115 μL of pesticide solution was thus applied with a pre-moistened paintbrush. The insecticide was allowed to evaporate for 30 min under an extractor hood to avoid direct exposure of earwigs to the liquid pesticides.

In the case of fourth-instar larvae, exposure with the insecticide Pyrinex® was carried out at half the NAR because mortality with the NAR was too high (85% mortality).

For each treatment (exposed and control), 15 fourth-instar larvae and 16 adult earwigs (eight males, eight females) were used.

Table 7. Insecticides used in this study. ⁽¹⁾All insecticides were used at their Normal Application Rates (NAR) for apple orchards in France.

Trade name	Active ingredient	Chemical family	Mode of action	NAR ⁽¹⁾
Success4	Spinosad	Spinosyn	Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) allosteric modulator	9.6 g.hl ⁻¹
Supreme	Acetamiprid	Neonicotinoid	Nicotinic acetylcholine receptor agonist	5 g.hl ⁻¹
Pyrinex	Chlorpyrifos-ethyl	Organophosphorus	Acetylcholinesterase inhibitor	50 g.hl ⁻¹
Decis Expert	Deltamethrin	Pyrethroid	Sodium channel modulator	0.75 g.hl ⁻¹

c. Measurement of B-esterase activity

The following chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France): Acetylthiocholine iodide (AcSCh), 4-nitrophenyl acetate (4-NPA), α -naphthyl acetate (α -NA), α -naphthol, DTNB, Fast Garnet and protease inhibitors. Biochemical measurements were only carried out on earwig samples for which a significant decrease in predation behavior was recorded (Success4®, Supreme®, Pyrinex® for adults; Success4® and Pyrinex® for larvae). Each earwig was homogenized individually on ice, in 10% (w/v) low-salt buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.3), 10 mM NaCl supplemented with a cocktail of protease inhibitors (aprotinin, leupeptin and pepstatin = 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, antipain = 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, trypsin inhibitor = 1 mg.mL^{-1}) using a homogenizer (Ultra Turrax IKA T18 basic at 14000 rpm). Tissue homogenates were centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C and the supernatants were stored in 10% glycerol as an enzyme stabilizing agent at -20°C until analysis. Total

protein content was determined using the Lowry method according to Markwell et al. (1978), using bovine serum albumin as a standard.

All enzyme activities were monitored spectrophotometrically using a microplate reader (synergy HT, Bio-Tek). AChE activity was monitored at 412 nm and 25°C according to Ellman et al. (1961) in a reaction medium (0.2 mL final volume) containing 4 µL of extract, 0.375 mM DTNB, 1.5 mM of substrate AcSCh in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7).

Carboxylesterase activity was assayed using two different substrates (α -NA and 4-NPA). CbE activity, using α -NA as the substrate, was determined according to Gomori (1953) as adapted by Bunyan et al. (1968). The reaction medium (0.2 mL final volume) contained 25 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ (pH=7.6) and 2 µL of extract diluted 1/20. The reaction was initiated by adding α -Na at a final concentration of 2 mM for 10 min at 25°C, and stopped with 50 µL 2.5% SDS with 0.1% Fast Garnet in 2.5% Triton X-100. The solutions were then left to stand for 10 min at room temperature in the dark, and the absorbance of the naphthol-Fast Garnet complex was read at 530 nm. The enzyme activity was calculated from a standard curve ($A_{530}=f([\alpha\text{-naphtol}])$) of pure α -naphtol, in the same conditions.

Hydrolysis of 4-NPA was determined as described by Chanda et al. (1997). The reaction mixture (250 µL final volume including 2 µL of enzyme extract) contained 2 mM 4-NPA, 20 mM Tris-HCl (pH 8) and 1mM EDTA (to inhibit Ca²⁺ dependent phosphotriesterases). The formation of 4-nitrophenol was monitored for 5 min at 405 nm, 25°C and quantified using a 4-nitrophenol standard curve.

Blanks (reaction mixture free of enzyme sample) were checked for non-enzymatic hydrolysis of the different substrates used to measure AChE and CbE activities.

All enzyme assays were run at least in triplicate and expressed as units per milligram of total proteins (U.mg⁻¹protein). One unit of enzyme activity is defined as one micromole of substrate hydrolyzed per minute under the experimental conditions described above.

d. Statistical analysis

We first studied the relationship between the number of aphids offered and the number of aphids consumed. For the range of aphids provided (between 40 and 100), we found that the relationship was linear for both adults and fourth-instar larvae and thus in the following we analyzed the proportion of aphids consumed. The effect of exposure to insecticides on the proportion of aphids consumed was analyzed using a generalized linear model (GLM) with a binomial error distribution and the logit link function (Fenoglio and Trumper 2007). We

tested the difference between each pesticide and the control. For adults and for each pesticide, the difference between males and females was assessed the same way. All these computations were done using R statistical software (version 2.15.3).

For the different B-esterases, differences between exposed and control larvae were analyzed with one-way ANOVA followed by a Tukey HSD post-hoc comparison test using XLSTAT software (version 2013.3.01). For adults, B-esterases were compared using a two-way ANOVA with sex and treatment as factors. Since the interaction between the two factors was significant, each sex was treated independently (i.e. the effect of each pesticide was assessed for males and females separately).

3. Results

a. Effects of insecticides on earwig predation

The relationship between the number of aphids eaten in 24h and the number of aphids provided to the earwigs was linear for adults and for fourth-instar larvae (Fig. 20; $R^2=0.76$; $p<0.01$). For the range studied (40 to 100 aphids), the mean proportion of aphids consumed was 78% for adults and 73% for fourth-instar larvae for unexposed earwigs.

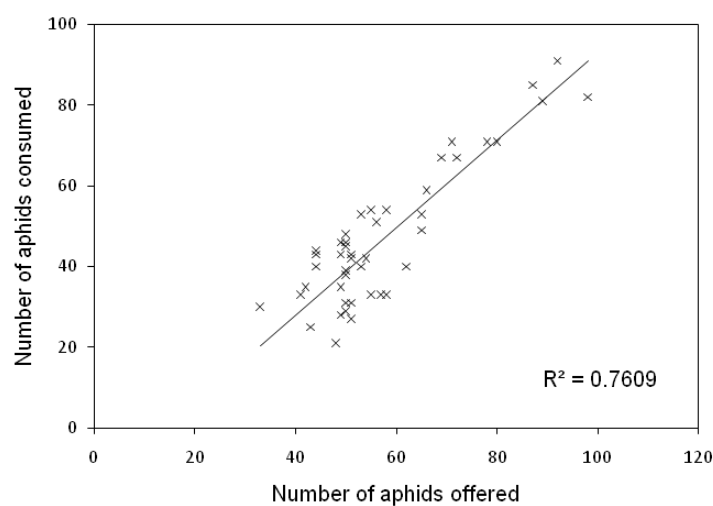


Figure 20. The number of aphids consumed over a 24h period at 20°C by one adult *Forficula auricularia* earwig. The plain line is the estimated linear regression ($R^2=0.76$, $p<0.01$).

In general, the insecticides investigated did not induce mortality in the experimental conditions described above (NAR and 12 h exposure). The exception was for fourth-instar earwigs exposed to Pyrinex® NAR, which exhibited 85% mortality (data not shown). Thus, to observe sublethal effects, we then applied this insecticide at half its NAR. Rates of

predation by fourth-instar larvae earwigs exposed to Success4® (at NAR) were significantly lower than the control (62% loss of predation behavior) as were those following Pyrinex® exposure at both full and half NAR, with 38% and 98% loss of predation behavior respectively ($p < 0.01$, Fig. 21). No significant difference in predation was observed between control fourth-instar earwigs and those exposed to Decis Expert® or Supreme® (Fig. 2).

The rates of predation of adult earwigs showed marked and significant decreases compared to controls after exposure to Supreme® and Pyrinex® ($p < 0.01$ for both pesticides) and a significant but smaller decrease after exposure to Success4® ($p < 0.05$) (Fig. 22). Predation was affected differently in males and females with a decrease of 66% and 40% for males and females, respectively, exposed to Pyrinex®, and a decrease of 28% and 5% for males and females, respectively, exposed to Supreme®, compared to their respective control. Thus, predation rates were significantly lower for males than for females after exposure to Supreme® and Pyrinex®.

Among the insecticides investigated, Pyrinex® had the strongest impact on predation behavior in both larvae and adults (males and females). Interestingly, Supreme® was more toxic to male adults than larvae (28% loss of predation for male adults while no significant effect was observed for larvae). Regarding their effect on adult earwig predation rates, the different insecticides ranked in the following order: Decis Expert® < Success4® ~ Supreme® < Pyrinex®.

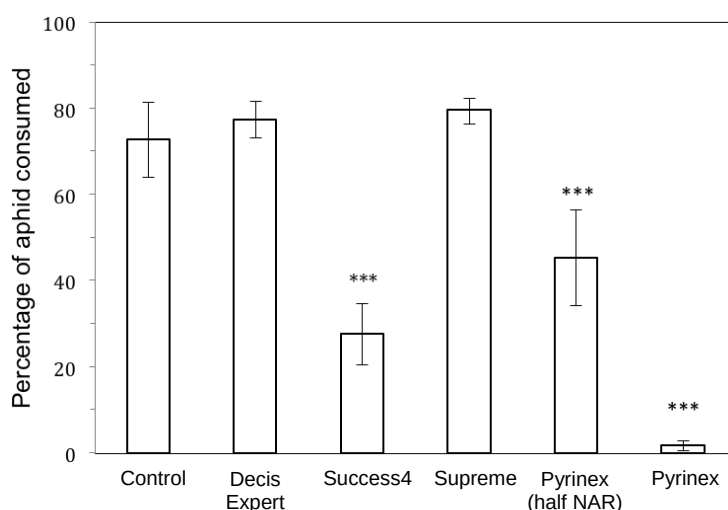


Figure 21. Predation rates of fourth-instar *Forficula auricularia* earwigs following pesticide exposure. Stars indicate significant differences between controls and treatments with the various insecticides $p < 0.001$ ($n=15$ except for Pyrinex® full NAR for which $n=4$).

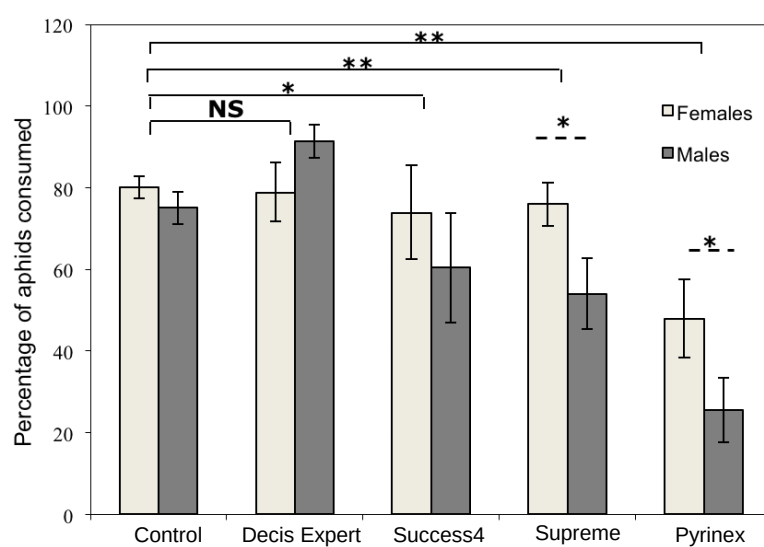


Figure 22. Predation rates of adult *Forficula auricularia* earwigs following pesticide exposure (n=8 for each sex and treatment).
A star above a dotted line indicates a significant difference between males and females for the given insecticide.
A star above a solid line indicates a significant difference between control and the insecticide regardless of sex (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

b. Effects of insecticides on B-esterase activities

The insecticides also affected earwig B-esterase activities to various degrees, depending on earwig stage and the insecticide applied. Success4® and Pyrinex® (used at half NAR) significantly inhibited AChE activity in fourth-instar earwigs with a loss of 33% and 25%, respectively, compared to the control (Fig. 23a). CbE activity was more sensitive to Pyrinex® (used at NAR dose) than AChE, regardless of the substrate used. Exposure to Pyrinex® inhibited 59% and 55% of CbE activities in larvae, using 4-NPA and α -NA as substrate, respectively, while exposure to Success4® and Pyrinex® (at half the NAR) led to a decrease of approximately 30% of larval CbE activities (Fig. 23b,c).

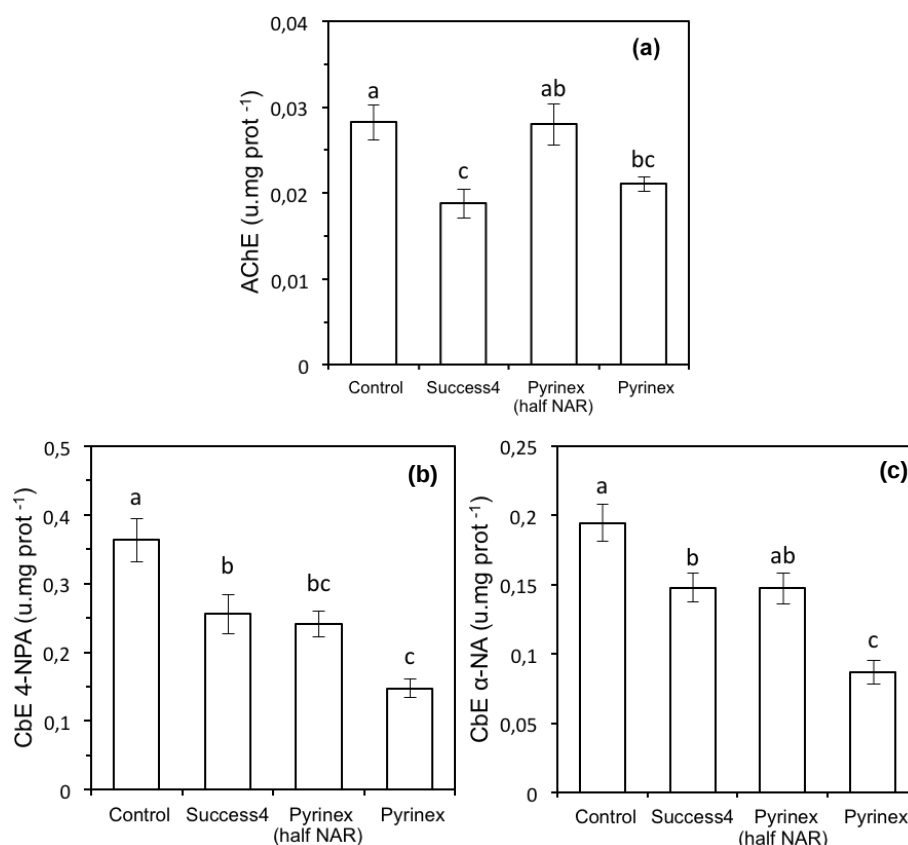


Figure 23. B-esterase assays after pesticide exposure of fourth-instar *Forficula auricularia* earwigs. (a) AChE activity, (b) CbE 4-NPA, (c) CbE α -NA. (n=15 except for Pyrinex® full NAR for which n=4) Different letters indicate the significant difference among insecticide treatments based on ANOVA tests at the 5% significance level.

The effects of pesticides on adult B-esterases were significantly different depending on earwig sex and the pesticide used. AChE activity decreased significantly for males exposed to

all of the pesticides (28%, 44% and 60% decrease after Success4®, Pyrinex® and Supreme® exposure respectively) while females were only sensitive to Supreme® and Pyrinex® (with 37% and 58% decrease respectively) (Fig. 24a). CbE activity, measured with 4-NPA as the substrate (Fig. 24b), was significantly inhibited for both sexes exposed to Pyrinex® (67% and 54% decrease for females and males respectively), and to a lesser extent following exposure to Supreme® (33% decrease for both sexes). The same effects were observed with α -NA as the substrate (Fig. 24c). Regardless of sex, exposure to Success4® had no significant effect.

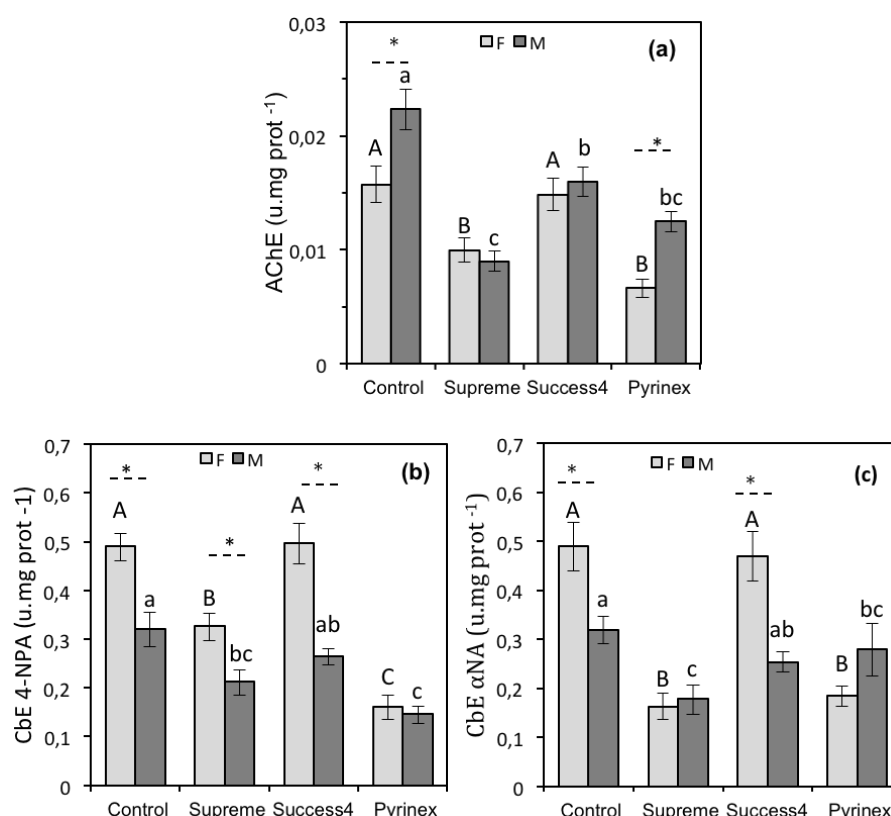


Figure 24. B-esterase assays after pesticide exposure of adult *Forficula auricularia* earwigs (with sex distinction). (A) AChE activity, (B) CbE 4-NPA, (C) CbE α NA (n=8 for each sex and treatment). Different letters indicate the significant difference among insecticide treatments based on ANOVA two-way tests (with sex and treatment as factors) at the 5% significance level, capital letter for females, small letter for males. Dotted lines with a star indicate a significant difference between males and females for the given insecticide exposure.

4. Discussion

a. Impact of insecticides on earwig predation

One of the crucial elements in evaluating the biocontrol potential of a predator is predation rate. The relationship between an individual predator's consumption rate and prey

density is termed ‘the functional response’ and this is a key factor regulating the population dynamics of predator-prey systems. In our study, we found that the mean proportion of aphids consumed compared to the number of aphids provided was between 70 and 80%, which are values similar to those found by Dib et al. (2011) and confirms the reproducibility of the lab conditions used. Significant decrease in predation rates ranged from 10 to 70% depending on the pesticide and earwig state of development. Considering that the growth of aphid populations could be modeled with an exponential growth model (Costamagna et al. 2007), even small decreases in aphid consumption can have drastic consequences on its biocontrol efficiency. To design an IPM strategy maximizing predator contributions, the factors affecting their activity must first be identified. Our study of the impact of currently used insecticides on earwig predation behavior revealed that fourth-instar earwigs were affected to varying degrees by Success4® and Pyrinex® and adults earwigs by Supreme®, Pyrinex® and Success4®.

A recent study on *Forficula auricularia* exposed to different insecticides showed that OP and pyrethroid insecticides are highly toxic (Romeu Dalmau et al. 2012). Chlorpyrifos (OP) and beta-cyfluthrin (pyrethroid) induced 60% and 100% mortality, respectively, following two days exposure, while acetamiprid and Success4® caused only 20% mortality after 14 days exposure. However, using Seduce bait® (another spinosyn formulation) they observed 90% and 100% mortality after two and 14 days exposure. These results confirmed the lethality of chlorpyrifos against earwigs (Campos et al. 2011; Romeu Dalmau et al. 2012) and other insect natural enemies (Desneux et al. 2004; Tirello et al. 2013) and highlighted the acute toxicity of spinosyn compounds.

In our study, the sublethal effect of Success4® (spinosad) on predation was more pronounced on larvae than adults (19% or 7% decrease for adult males and females respectively compared to 62% for fourth-instar larvae). Peusens et al. (2009) previously reported this higher sensitivity of European earwig larvae. The difference could be associated with the thinner and more permeable cuticle of immature stages which has a lower chitin content than that of adults, in addition to less active enzymatic detoxifying processes compared to adults (Stark et al. 2004). Salgado (1998) studied the mode of action of spinosad on insect toxicity and its symptoms and causes. He showed that, at very high concentrations, spinosad enhanced neuromuscular transmission stimulating nerve activity. This hyper stimulation may induce various nervous disorders in the organism. For the earwig predator *Doru luteipes*, even if spinosad is only classified as moderately toxic, it reduced its locomotor capacity (Campos et al. 2011). Spinosad was classified as moderately harmful until seven days after treatment on the predator *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) with the

highest recommended rates for tomato crops even though it induced high levels of mortality and reduced offspring size (Biondi et al. 2012). Miles and Dutton (2003) tested the effects of spinosad on predatory mites in laboratory, extended laboratory, semi-field and field studies and concluded that spinosad was highly selective against most predatory mite species and that effects noted in tier laboratory studies did not translate to higher tiers of testing or use in the field. All these different observations, as well as our own results, emphasized the toxicity of spinosyn insecticides. Because even organic pesticides can have a greater negative impact on natural enemy species in laboratory conditions (Bahlai et al. 2010), more studies are needed on spinosad to clarify its effects on non-target arthropods.

Pyrethroid insecticides are generally regarded as very toxic to natural enemies (Badji et al. 2004) but in our study, Decis expert® was not toxic to earwigs, and did not decrease their predation behavior or lead to mortality.

The neonicotinoid-based agrochemicals are very popular due to their high specificity, high efficacy and relatively low toxicity to mammals and the environment. These insecticides are considered as a good alternative to OP insecticides (EPA 2012). However, a number of studies on their biological impacts showed that they are toxic to invertebrates (Capowiez et al. 2003; Azevedo-Pereira et al. 2011; He et al. 2012; Henry et al. 2012; Fogel et al. 2013; Rahmani and Bandani 2013). In our study, only the predation rate of males was significantly reduced following exposure to Supreme®. One possible explanation is that neonicotinoid is metabolized more effectively in fourth-instars and females than in males. As already mentioned, larvae are generally more sensitive than adults (Peusens et al. 2009). Thus, because the sex of fourth-instar stage is undifferentiated at this stage, most of the fourth-instar larvae used in this experiment may have been females, supporting the existence of an efficient detoxifying pathway in this sex.

Very few studies investigating the impacts of pesticides took into account sex-dependent responses. In our study we showed that male earwig predation behavior was significantly more sensitive to insecticide exposure than female behavior (except with Decis Expert®). For the spider *Hylliphantes graminicola* males also exhibited a lower predation rate after exposure to methamidophos (OP) (Deng et al. 2007).

Despite the lengthiness of our test (four days) and the large quantity of material needed (aphids and predators), we have demonstrated that predation behavior is a useful biomarker for observing sublethal effects caused by insecticide exposure. Although many other factors (biotic and abiotic) can influence the potential of earwig pest predation under natural conditions, such as temperature, crop structure and the presence of other non-pest prey

(Fenoglio and Trumper 2007), predation behavior as a biomarker should serve as a basis to evaluate the influence of insecticides in the field.

b. The impact on predation behavior is supported by B-esterases responses

The significant decline in AChE activity in fourth-instar larvae and males exposed to Success4® could contribute to the decreased predation behavior. Impacts on both AChE and nicotinic receptors affect several physiological and behavioral response processes and may have consequences on the organism's locomotor activity and thus feeding capacity, identification and spatial orientation. Therefore predator behavior could be altered because sophisticated nervous activity is required in the process of prey detection and handling (Dell'Omo 2002). Decreased levels of behavioral and biochemical biomarkers equal to or greater than 50% are generally considered to induce irreversible effects, while changes below this value are considered reversible, assuming that organisms are able to recover their normal functions after the toxic insult (Peakall 1992). In the present study, regardless of sex or development stage, Pyrinex® always induced the strongest decrease in predation rates compared to the other pesticides investigated, which confirms its toxicity to invertebrates (Campos et al. 2011). It was the only pesticide which caused mortality and at least 50% inhibition of both predation behavior and B-esterase activities. Supreme® and Success4® showed sublethal effects which were not directly irreversible in the short-term but could be irreversible indirectly in the long-term by leading to neural and behavioral injuries important for vital functions such as food searching and prey capture.

CbE activities in both fourth-instar and adults were more sensitive to Pyrinex® than AChE activity. As suggested by Wheelock et al. (2008), the irreversible inhibition of CbE activity by OP can be considered as a protective mechanism, thereby reducing its impact on nervous system AChE activity, i.e., the main target for acute OP toxicity. This process could explain the lack of inhibition of AChE activity in fourth-instar larvae exposed to Pyrinex® at half NAR, even if predation behavior was significantly reduced. Furthermore, despite the strong inhibition of female AChE, female predation rates remained higher than those of males.

Inhibition of AChE is probably not the only factor influencing earwig behavior. It is noteworthy to point out that predation rates decreased more significantly when both AChE and CbE are reduced. This is particularly interesting regarding the impact of Supreme® and Pyrinex® on females. Those two pesticides had the same inhibitory effect on AChE activity,

while predation rate mainly decreased after exposure to Pyrinex® but not after Supreme® exposure. Looking at the decrease in CbE activities measured with 4-NPA as substrate, a stronger impact was observed after Pyrinex® compare to Supreme® exposure. A decrease of CbE activities associate two different mechanisms (i) a protective function of AChE, as already mentioned, and (ii) a possible impact on CbE-depending metabolic pathways that can't be neglected. This latter effect could involve an extra energetic cost for new detoxification pathways development to face pesticide exposure (Medina et al. 2007). Our results suggest that other mechanisms linked to energetic costs or physiological adaptation may also modulate behavior (Dell'Omo 2002).

5. Conclusions

In the present study, we observed significant changes in earwigs exposed to classical insecticides at NAR with reduced predation behavior and lower B-esterase activities. Many cellular, biochemical, and ecological processes are essential to an organism's survival and reproduction. The correlated responses of B-esterases and behavior biomarkers in individual organisms showed the link between the effects measured at these two levels of biological organization. Biochemical biomarkers gave us measures of exposure and predation behavior showed us one of the biological effects. In addition, this study provided information for optimizing IPM programs. Whenever possible, the OP Pyrinex®, the neonicotinoid Supreme® and to a lesser extent the spinosad Success4®, should be avoided in apple orchards to promote the activity of natural enemies such as earwigs.

Acknowledgments We would like to thank Odile Mascle for maintaining aphid breeding and Hazem Dib who developed the predation protocol before returning to Syria. L. Malagnoux is grateful to the Provence-Alpes-Côte d'Azur Region (France) for her doctoral fellowship.

Chapitre V. Les pratiques phytosanitaires influencent la fécondité et le développement hivernal du forficule *F. auricularia*

Nous avons vu, en condition de laboratoire, que certains pesticides ont un impact sur les B-estérases et le comportement de prédation du forficule. Nous avons ensuite mené des études en conditions de terrain, à partir d'insectes prélevés dans des vergers commerciaux. Il est alors difficile d'isoler l'effet d'un traitement ou d'un pesticide en particulier. Les comparaisons vont donc se faire entre modes de protection phytosanitaires. Des effets sur la reproduction des individus pourraient entraîner des modifications importantes sur les populations de forficule. Nous avons suivi l'impact des traitements réalisés en vergers dans la région d'Avignon sur la fécondité et le développement du forficule *F. auricularia*. Pour cela, nous avons mis en place un élevage chaque année à partir de forficules prélevés au début de l'automne dans des vergers soumis à différentes pratiques (AB, PFI, agriculture « conventionnelle »). Ce type d'élevage vise à prendre en compte les potentiels effets sur la descendance à venir de l'exposition des forficules avant et pendant la phase reproductive. Cet élevage nous a permis de suivre le nombre d'œufs pondus par femelle selon la provenance des adultes, la durée de développement des œufs et le développement des premiers stades larvaires. Ces paramètres sont très difficiles à suivre sur le terrain vu que les forficules passent l'hiver sous terre (ponte et développement des premiers stades larvaires), cet élevage facilite l'acquisition de ces informations.

1. Introduction

Le forficule (Insecta : Dermaptera : Forficulidae) est un prédateur généraliste de nombreux ravageurs en vergers de fruits à pépins (Buxton 1974; Phillips 1981). Il existe 1800 espèces dans le monde. *Forficula auricularia*, l'espèce majoritaire présente dans le Sud-est de la France, est l'espèce la plus étudiée en terme de biologie, phénologie, habitudes alimentaires (Albouy and Caussanel 1990; Wirth et al. 1998; Moerkens et al. 2009; Moerkens et al. 2010;

Moerkens et al. 2011). De par sa biologie et sa phénologie, le forficule est soumis aux différents niveaux d'exposition des pesticides (sol, surface foliaire) tout au long de sa vie en verger de pommiers.

Le forficule est une espèce univoltine vulnérable à tous types de stress. Les accouplements ont lieu dès la fin de l'été. La femelle possède une spermathèque qui lui permet de stocker les spermatozoïdes après la copulation. Les adultes construisent ensuite un terrier pour passer l'hiver. La femelle y dépose ses œufs et chasse le mâle pour éviter le cannibalisme (Lamb 1976). Les femelles *F. auricularia* peuvent avoir jusqu'à 3-4 pontes dans le Sud-est de la France de Novembre à Mars-Avril (Sauphanor et al. 1990). Insecte présocial, les femelles forficules présentent un comportement maternel très développé et de ce fait souvent étudié (Köllicker and Vancassel 2007; Mas et al 2009; Meunier and Koelliker 2012; Wong and Koelliker 2012; Gomez and Koelliker 2013). Elles prennent soin de leurs œufs, les plaçant dans les meilleures conditions de température et d'humidité, les nettoient avec leur mandibule pour éviter le développement de champignons. Au cours des deux premiers stades larvaires la femelle reste près de ses larves les plaçant à proximité de nourriture et les défendant en cas d'attaque (Albouy and Caussanel 1990). Ce comportement maternel permet un fort taux de survie des larves (Köllicker and Vancassel 2007). *F. auricularia* possède quatre stades larvaires. Les deux premiers stades larvaires restent dans le terrier avec leur mère, les larves en fin de deuxième stade larvaire commencent à remonter en surface où elles muent en 3^{ème} stade larvaire (Avril-Mai). Les larves gagnent la surface foliaire des arbres en Mai-Juin aux 3^{ème}-4^{ème} stades larvaires (Köllicker and Vancassel 2007). Le forficule étant actif la nuit, il est peu exposé directement aux traitements mais aux résidus et vapeurs tout au long de sa vie. Il couvre donc trois niveaux d'exposition : le sol lors des deux premiers stades larvaires, la surface et les parties aériennes à partir du 3^{ème} stade larvaire.

Les vergers de pommiers sont la culture fruitière la plus traitée en France, avec un IFT (Indice de Fréquence de Traitement) moyen de 36 (Codron et al. 2003). Les traitements s'effectuent de Janvier au mois de Septembre pour combattre tous les ravageurs et maladies (tordeuses, carpocapse, pucerons, cochenilles, zeuzère, oïdium, tavelure). On distingue trois modes de protection phytosanitaire : une protection dite conventionnelle (CONV), la Production Fruitière Intégrée (PFI) et l'agriculture biologique (AB). Les trois se distinguent par l'intensité de traitements et la nature des produits autorisés. L'AB n'autorise que des produits « naturels », la protection conventionnelle autorise toute substance « naturelle » ou de synthèse sans limite de fréquence. Le mode de production PFI se distingue de la protection

conventionnelle par l'usage de la confusion sexuelle contre le carpocapse des pommes ce qui se traduit par un usage moindre des insecticides de synthèses (Bouvier et al. 2011).

L'ensemble de ces traitements a entraîné des cas d'adaptation chez les organismes présents en vergers. On parle d'adaptation lorsque les traits de caractères qui se sont ajustés aux variations environnementales sont transmissibles génétiquement. De nombreux cas de résistance se sont développés chez les populations d'insectes ravageurs exposés de manière répétée à des molécules insecticides. En verger de pommiers, c'est le cas pour le carpocapse qui développe depuis quelques années des résistances aux insecticides organophosphorés et au virus de la granulose (Bouvier et al 2005; Sauphanor et al. 2006). Ces adaptations sont aussi possibles sur les organismes non cibles qui subissent également les traitements répétés. Cependant, le développement de ces résistances ou tolérances a un coût énergétique pouvant influencer sur les réserves énergétiques des organismes et sur l'état de santé général des populations (Posthuma and Van Straalen 1993). Ces derniers auteurs montrent que l'énergie utilisée pour lutter contre les substances toxiques (comportement d'évitement, réponses physiologiques en augmentant les voies de détoxification/séquestration des molécules toxiques) réduit l'énergie nécessaire aux autres processus physiologiques et comportementaux (reproduction, développement).

Des informations sur la biologie et l'écologie de *F. auricularia*, ont été données dans de nombreux pays aux conditions climatiques et environnementales différentes, e.g. en Belgique (Moerkens et al. 2009), aux Pays Bas (Helsen et al. 1998), en Angleterre (Phillips 1981) et en Nouvelle Zélande (Burnip et al. 2002). En revanche peu d'informations sont disponibles sur la fécondité et le développement des stades larvaires du forficule soumis à différentes pratiques phytosanitaires. Nous avons mis en place un élevage à partir de forficules prélevés directement sur le terrain dans les trois systèmes de protections phytosanitaires existants. Le but est de voir si la fécondité des femelles et le développement des premiers stades larvaires sont altérés. Sur les trois années d'études, la date de ponte, le nombre d'œufs par ponte et le nombre de larves atteignant le stade L3 ont été suivis et comparés en fonction des différentes pratiques phytosanitaires.

2. Matériels et méthodes

a. Echantillonnage des forficules et mise en place de l'élevage

Les males et femelles *F. auricularia* ont été capturés en octobre les trois années d'études (2011, 2012, 2013) en utilisant des bandes cartonnées enroulées autour des troncs

des pommiers. Les pièges ont été placés dans des vergers conduits sous une protection phytosanitaire AB, PFI et « conventionnelle ». Tous les adultes ont été isolés indépendamment pour chaque verger. Au moins dix couples ont été formés par verger en novembre et placés dans des boîtes de Pétri de 8 cm avec du sable humidifié comme substrat, des grains de pollen comme nourriture et un couvercle aéré (Fig.25 ; Tab. 7).

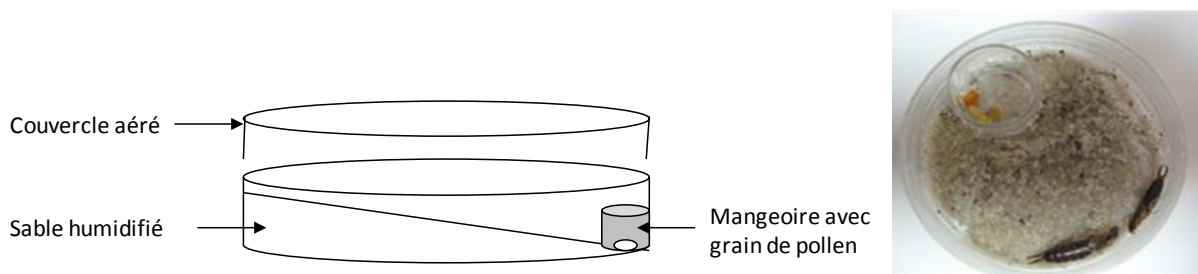


Figure 25. Dispositif utilisé pour l'élevage de forficule. Boîte de Pétri de 8 cm avec une couvercle aéré, du sable humidifié pour permettre aux forficules de construire un terrier, une mangeoire remplie toutes les semaines avec des grains de pollens.

Toutes les semaines, le sable est ré-humidifié, la mangeoire réapprovisionnée et l'état des forficules contrôlé. Dès que la première ponte a lieu, la date est notée, le mâle retiré pour éviter le cannibalisme et les œufs comptés. Seulement la première ponte a été prise en compte et la semaine d'éclosion de cette ponte enregistrée. Le taux d'éclosion des pontes a été calculé, il correspond au nombre d'œufs qui ont éclos, i.e où des larves ont été observées. Dès le 3^{ème} stade larvaire, les larves sont transférées dans des boîtes de stockage indépendamment pour chaque verger. Les survivants sont dénombrés au cours de ce transfert. Toute l'étude s'est déroulée sous un abri extérieur avec les conditions extérieures de température, d'humidité et de luminosité.

Tableau 8. Nombre de vergers étudiés et nombre de couples de forficules formés par type de protection phytosanitaire.

	Nombre de vergers			Nombre de couples		
	2011	2012	2013	2011	2012	2013
CONV	4	2	3	30	25	39
PFI	9	11	12	72	104	103
AB	7	11	16	51	72	121

b. Analyses statistiques

Pour comparer statistiquement les données sur le nombre d'œufs pondus par femelle lors de la première ponte, la date de ponte et le nombre de L3 survivants, des analyses ANOVA à

2 facteurs hiérarchisés ont été réalisées. Le facteur principal est le mode de protection phytosanitaire et le facteur subordonné est le verger.

3. Résultats

Le nombre moyen d'œufs par ponte est fonction de la provenance des parents (Fig. 26). Il a été significativement moins élevé pour les forficules provenant des vergers soumis à une agriculture « conventionnelle » au cours des trois années d'élevage. Nous observons également une forte variabilité inter-annuelle. Les valeurs vont de 58 œufs par ponte pour des forficules provenant de vergers AB en 2011 à 31 œufs par ponte pour des forficules provenant de vergers à agriculture « conventionnelle » en 2013. Le nombre moyen d'œufs par ponte pour des forficules provenant de vergers PFI est de 41 en prenant en compte les 3 années d'élevage.

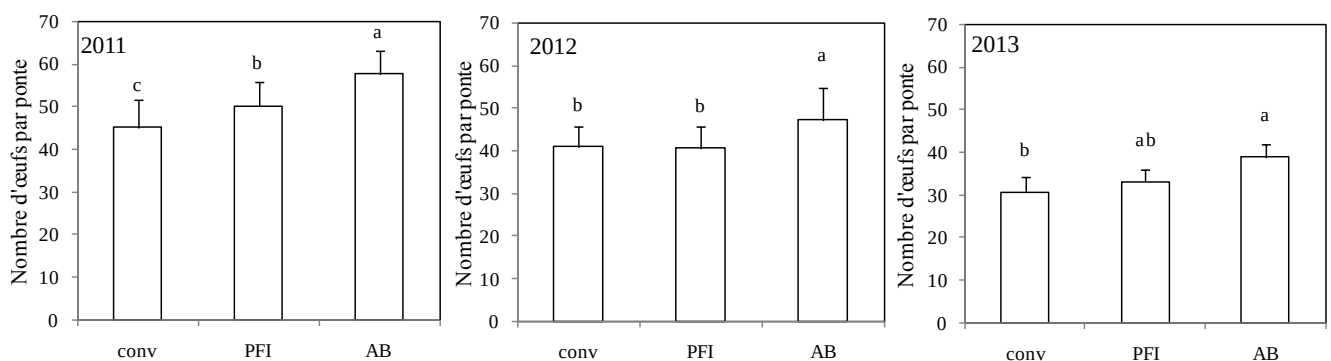


Figure 26. Nombre moyen d'œufs par couple pour les 3 années d'élevage. Les différentes lettres au dessus des barres d'erreur indiquent les différences significatives avec l'ANOVA deux facteurs hiérarchisés, significativité 5%.

La date de ponte des femelles est plus tardive pour les forficules provenant de vergers à agriculture « conventionnelle » (Fig. 27). Elle a lieu, pour la ponte la plus importante, fin Janvier-début Février pour les forficules provenant de vergers à agriculture « conventionnelle ». Elle est plus précoce pour les forficules provenant de vergers AB et PFI, environ mi Janvier. La date de ponte est variable d'une année sur l'autre, en fonction de la température extérieure. Pour l'élevage 2013, le pic de ponte (1^{ère} ponte) des forficules provenant des vergers à agriculture « conventionnelle » correspond au pic de la 2^e ponte des forficules provenant des vergers AB et PFI.

La date d'éclosion des pontes est également plus tardive pour les forficules provenant des vergers à agriculture « conventionnelle ». Avec 2 semaines de décalage, l'éclosion des pontes a lieu mi mars pour les forficules provenant des vergers AB et PFI et début Avril pour

les forficules provenant des vergers à agriculture « conventionnelle ». La durée de développement des œufs est donc la même qu'elle que soit la provenance des forficules.

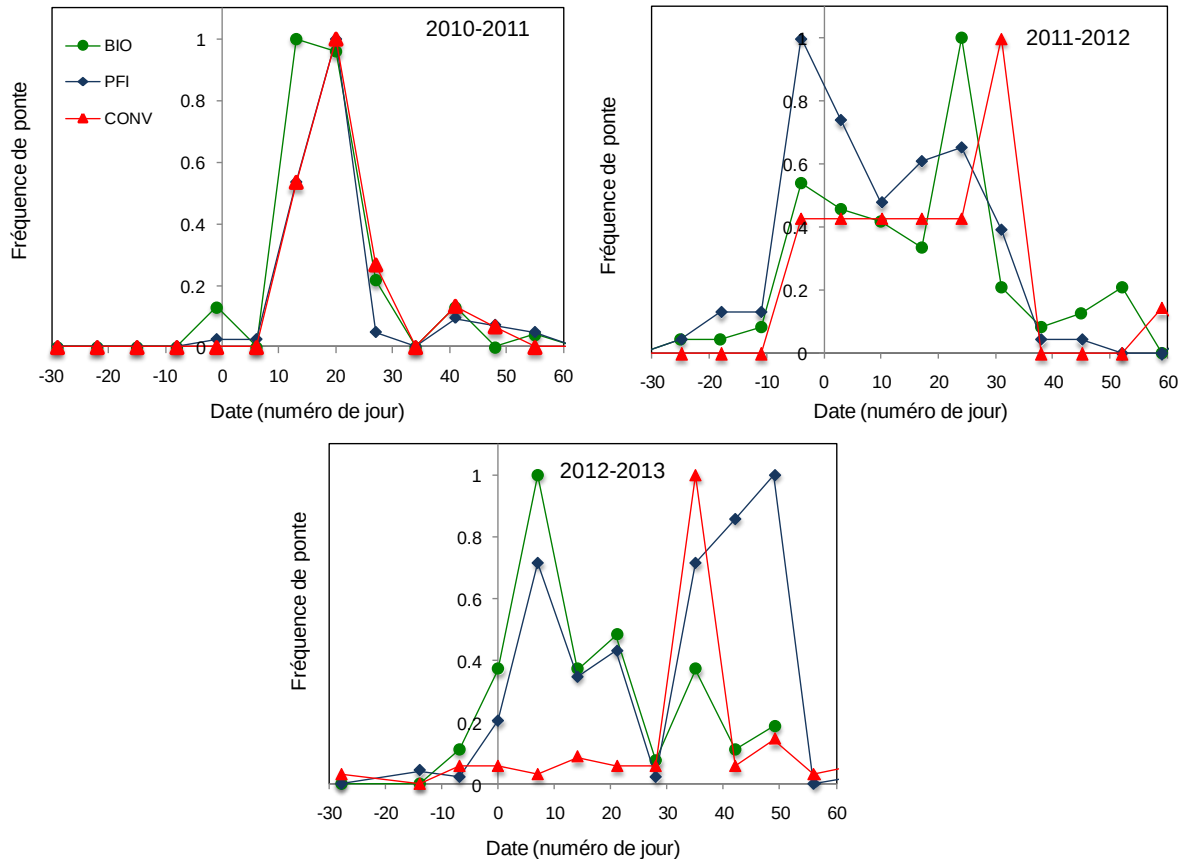


Figure 27. Distribution des pontes en fonction du temps, relevée au cours des 3 années d'élevage selon la provenance des forficules.

Le temps est exprimé en nombre de jour, le jour 1 correspondant au 1er janvier de chaque année civile. La fréquence des pontes est calculé à chaque date et correspond au (nombre de ponte observé à une date)/(nombre max de ponte observé)

Le taux d'éclosion des pontes a été équivalent quelque soit la provenance des forficules en 2011 et 2013. En 2012, nous avons observé un meilleur taux d'éclosion en AB puis en PFI en comparaison avec celui obtenu pour les forficules provenant des vergers à agriculture « conventionnelle ».

Quelque soit la provenance des forficules parents, nous avons observé un taux de mortalité important des larves, obtenues en élevage, au cours de leur développement. Seuls les résultats obtenus au cours des saisons 2011-2012 et 2012-2013 sont présentés. Le nombre de L3 survivants transférés par couple est aussi fonction de la provenance des adultes forficules (Fig. 28). En 2012, le nombre de L3 transférés par couple est majoritaire pour les couples provenant des vergers AB (10 ± 5 L3 transférés), puis pour les couples provenant des vergers PFI (5 ± 3 L3 transférés) et en dernier pour les couples provenant des vergers à agriculture

« conventionnelle » (4 ± 2 L3 transférés). En 2013, le nombre de L3 transférés par couple est majoritaire pour les couples provenant des vergers PFI (15 ± 2 L3 transférés), puis pour les couples provenant des vergers à agriculture « conventionnelle » (12 ± 6 L3 transférés) et en dernier pour les couples provenant des vergers AB (11 ± 1 L3 transférés).

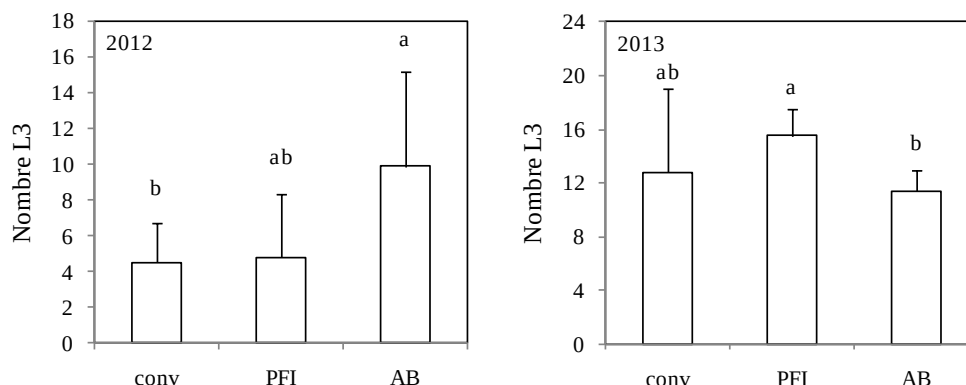


Figure 28. Nombre de L3 transférés par couple selon la nature de la protection phytosanitaire d'où proviennent les adultes forficules. Les différentes lettres au dessus des barres d'erreur indiquent les différences significatives avec l'ANOVA deux facteurs hiérarchisés, significativité 5%.

4. Discussion

Le cycle de vie univoltin du forficule nous garantit d'observer l'impact des expositions de l'année en cours. Le suivi des pontes et du développement des premiers stades larvaires en condition de laboratoire limite les problèmes liés aux prélèvements lors des suivis terrain (problèmes de piégeage) (Gobin et al. 2006) et facilite le suivi des premiers stades larvaires. Dans les mêmes conditions d'élevage et pour une même année, on obtient des différences significatives entre type de pratique. Nous avons vu que le nombre moyen d'œufs pour la première ponte est significativement inférieur pour les forficules provenant des vergers à agriculture « conventionnelle » comparés aux forficules provenant des vergers AB. Le nombre moyen d'œufs pour la première ponte des couples provenant des vergers PFI oscille généralement entre ces deux valeurs extrêmes, selon les années. Les chiffres obtenus dans cette étude coïncident avec ceux des études retrouvées dans la littérature (entre 30 et 60 œufs selon les années) pour des conditions d'élevage (Albouy and Caussanel 1990; Wirth et al. 1998; Gobin et al. 2006; Meunier et al. 2012). D'une année sur l'autre, nous avons observé des différences pour une même pratique ce qui signifie que les facteurs environnementaux (T° par exemple) sont très importants. Il apparaît donc que le nombre d'œufs par ponte est fortement influencé par les facteurs environnementaux. En revanche, lorsque tous les

individus sont soumis aux mêmes conditions environnementales, au sein de l'élevage,, le nombre d'œufs par ponte varie en fonction des pratiques phytosanitaires.

Dans la littérature, le nombre de ponte par femelle et la date de ces pontes ont été démontrés variables chez *F. auricularia* distinguant deux types univoltins apparentés A et B (Wirth et al. 1998; Guillet et al. 2000). Cette distinction a été réalisée d'une part, de manière moléculaire en identifiant un polymorphisme lors du séquençage d'une région de la cytochrome oxydase. D'autre part, au cours d'analyses génétiques sur ces deux types d'espèces qui ont donné des couples AxB stériles (Wirth et al. 1998). Le type A (Single Brood Population) produit une seule cohorte au cours de l'année avec des soins maternels qui durent longtemps (jusqu'à la transition entre le 2^e et le 3^e stade larvaire). Les œufs sont déposés au début de l'hiver avant que la femelle hiberne. Ce type a été retrouvé dans les régions froides et de hautes altitudes. Les femelles du type B (Double Brood Population) produisent deux portées successives au cours de l'année (rarement trois (Worthington 1926)), présentent des soins maternels plus courts (jusqu'à la transition entre le 1^{er} et le 2^e stade larvaire) et donc les larves de la première cohorte quittent le nid plus tôt. La première ponte a lieu l'hiver après la diapause de la femelle alors que la 2^e ponte a lieu à la fin de l'hiver (Lamb 1975; Vancassel 1984; Vancassel and Quris 1994; Wirth et al. 1998; Guillet et al. 2000). *F. auricularia* dans le Sud Est de la France est de type B avec plusieurs pontes successives possibles (Lenfant and Sauphanor 1992). Dans notre étude nous n'avons suivi que la première ponte car il s'agit de celle qui produit le plus de descendance. Cette date a été également fonction de la provenance des forficules. La première ponte a toujours été plus précoce pour les individus prélevés dans les vergers AB comparée à la première ponte provenant des vergers à agriculture « conventionnelle ». La date de la première ponte pour les femelles provenant des vergers PFI est généralement similaire à celle des femelles provenant des vergers AB. Ce décalage dans le temps des premières pontes des femelles forficules représente un deuxième résultat nouveau permettant d'étudier la reproduction du forficule soumis à différentes pratiques phytosanitaires.

La durée de développement des œufs étaient la même quelque soit la provenance des forficules. La date d'éclosion des pontes était donc décalée dans le temps selon la provenance des forficules, de la même manière que les dates de ponte. L'éclosion était plus précoce pour les forficules provenant des vergers AB, cette date d'éclosion était toujours plus tardive pour les forficules provenant des vergers à agriculture « conventionnelle ». Là encore, les résultats étaient intermédiaires pour les forficules provenant des vergers PFI. Il apparait que les différences qui distinguent les modes de protection phytosanitaire, i.e. la fréquence de

traitement et la nature des substances utilisées, modifient la reproduction du forficule. Les molécules synthétiques telles que les herbicides, insecticides (carbamates, neonicotinoïdes, organophosphorés, pyréthrinoïdes, etc), acaricides autorisés en agriculture « conventionnelle » affectent la reproduction du forficule *F. auricularia* en diminuant le nombre d'œufs pondus et en rendant les pontes plus tardives. On notera que les efforts pour limiter l'utilisation de produits de synthèse en PFI ont eu vraisemblablement une influence sur la reproduction des forficules. Le nombre moyen d'œufs par ponte et la date de ponte des forficules provenant des vergers PFI étaient intermédiaires aux résultats des vergers AB et agriculture « conventionnelle ». Nous validons aussi l'observation relevée dans la littérature qui nous indique que le développement des forficules est dépendant de la température (Behura 1956; Helsen et al. 1998). Les pontes ont été plus ou moins précoces selon les années et le développement des œufs et des larves a été globalement plus ou moins rapide selon les conditions extérieures (plus rapide avec des températures élevées).

Le taux d'éclosion des pontes a été partout le même quelque soit la provenance des forficules. Ce résultat souligne l'importance des soins maternels (Köl liker 2007; Köl liker and Vancassel 2007). Ce comportement maternel n'est pas altéré par les différentes pratiques phytosanitaires. En revanche, lorsque la femelle meurt avant l'éclosion de sa ponte, les œufs ne reçoivent alors plus les soins nécessaires à leur développement et à la survie des larves. Dans notre étude, lorsque les œufs étaient proche de l'éclosion, l'éclosion était possible sans la femelle mais la survie des larves restait toutefois limitée (souvent moins de cinq larves sur cinquante œufs pondus arrivaient à l'état adulte sans la présence de leur mère). Selon Vancassel and Foraste (1980) il existerait un signal entre la mère et ses larves permettant une meilleure régulation du comportement maternel et du développement des larves. Lorsque la mère meurt, ce signal n'étant plus présent, la survie des larves est compromise.

Le suivi des premiers stades larvaires est difficile en condition d'élevage. Nous n'avons pas pu évaluer le taux de survie des larves en fonction des pratiques. La plus grande difficulté à laquelle nous avons été confrontés est la forte mortalité des jeunes larves associée à leur perte liée aux conditions expérimentales. Un espace trop confiné pour le développement de dizaines de larves limite leur capacité d'adaptation et un développement optimal. De plus, une seule observation hebdomadaire est insuffisante pour suivre l'évolution de chaque stade larvaire. *F. auricularia* étant de type B dans le Sud-est de la France, les soins maternels cessent et ne deviennent plus indispensables pour le troisième stade larvaire ; le transfert des larves aurait du être effectué lors du deuxième stade larvaire.

De nombreuses études ont été réalisées sur les effets directs des pesticides sur la reproduction d'autres organismes que le forficule. Whitehorn et al. (2012) ont montré en condition de laboratoire chez les bourdons, qu'une exposition à un néocotinoïde diminue le taux de croissance de la colonie comparé aux colonies témoins (bourdons non exposés), et réduit de 85% la production de nouvelles reines. Cette diminution d'effectif dans les populations soumises à des traitements a également été observée en vergers sur les oiseaux (Bouvier et al. 2005) et des populations d'insectes auxiliaires (Otieno et al. 2011). Dans notre étude, lorsque nous avons échantillonné les forficules pour la mise en place de l'élevage, nous avons récupéré moins d'individus dans les vergers en agriculture « conventionnelle » (Tab. 7). Le petit nombre d'œufs pondus par les forficules des vergers à agriculture « conventionnelle » peut expliquer en partie cette observation. Des effets indirects induits par les pesticides sont également observés chez différentes espèces. Comme l'a montré Scott et al. (1997), le développement d'une résistance au pyréthrianoïde chez la mouche *Haematobia irritans* (L.) engendre un coût supplémentaire pour l'organisme qui provoque une diminution du nombre de nymphose, et du nombre d'adultes produits. Amichot (1999) montre chez la drosophile que l'impact de la deltaméthrine est fort sur l'expression des gènes de deux cytochromes P450 impliqués dans la synthèse de l'ecdysone (l'ecdysone est une hormone stéroïde intervenant dans le processus de la mue des arthropodes et dans le contrôle de leur reproduction). Au-delà des altérations physiologiques, un autre effet indirect des pesticides sur la faune utile d'un verger peut également être une diminution de la quantité de proies et donc une diminution de nourriture pouvant impacter le développement (Köl liker 2007). Le poids des forficules prélevés dans les vergers à agriculture « conventionnelle » était significativement plus faible que pour les autres vergers allant dans le sens de l'hypothèse d'une plus petite quantité de nourriture présente dans les vergers les plus traités.

5. Conclusion

Le forficule étant univoltin, il permet de suivre l'impact des pratiques phytosanitaires sur une génération. De plus, le forficule est soumis aux différents niveaux d'exposition des pesticides (sol, surface foliaire) tout au long de son cycle biologique. La mise en place d'un élevage à partir d'insectes prélevés directement dans des vergers soumis à différentes pratiques phytosanitaires nous a permis de voir que la fécondité était modifiée par ces différentes pratiques. Nous avons vu que les forficules provenant des vergers soumis à une agriculture « conventionnelle » pondent moins d'œufs comparé aux forficules provenant des

vergers PFI et AB. La date de ponte est plus tardive pour les forficules provenant des vergers à agriculture « conventionnelle ». La durée de développement des œufs et le taux d'éclosion des pontes ne sont quant à elles pas modifiées. Nous ne pouvons pas donner de conclusion concernant le développement des larves, le taux de mortalité ayant été élevé et le protocole doit être adapté pour suivre le développement larvaire. Au moins deux observations par semaine auraient été nécessaires et le transfert des larves au 2^{ème} stade larvaire préférable. La faible présence du forficule en vergers à agriculture « conventionnelle » peut en partie être expliquée par les troubles de fécondité observés chez les forficules provenant de ce type de vergers et la mortalité directe entraînée par les traitements sur les quelques individus qui arrivent à naître dans ce type de verger.

Chapitre VI. Abondance et diversité du forficule dans des vergers soumis à différentes pratiques

Pour connaître l'impact des pratiques phytosanitaires appliquées en vergers et être au plus près des conditions de développement du forficule (habitat, écologie), nous avons réalisé une étude populationnelle basée sur l'échantillonnage des forficules au terrain. Un éventail de vergers soumis à différents modes de culture (AB, PFI, bas intrants, abandonnés) a été suivi pendant 3 ans pour évaluer la possibilité d'utiliser ces organismes comme bioindicateurs. L'analyse de la biodiversité et l'observation de la réponse des communautés aux pratiques agricoles sont réalisées à la fin du printemps et au début de l'automne. Les vergers conduits en agriculture « conventionnelle » ne se retrouvent pas dans cette étude à cause de la très faible présence du forficule et de la « disparition » de ce mode de production au cours de la thèse. Nous avons pu voir au chapitre précédent que la reproduction du forficule est limitée (moins d'œufs pondus) dans les quelques vergers à agriculture « conventionnelle ». Par ailleurs, les réponses biologiques que nous avons obtenues d'une part, sur les B-estérases (fort impact de OP et CB) expliquent en partie ces faibles populations dans les vergers fortement traités. D'autre part, l'impact des expositions sur la capacité prédatrice (baisse de la capacité prédatrice après exposition à OP et neonicotinoïde) est un autre paramètre pouvant expliquer ces faibles populations. Une alimentation appauvrie peut en effet limiter les capacités de reproduction du forficule et impacter le développement de ses larves (Köl liker et al. 2007) limitant son abondance dans les vergers fortement traités.

Pour le suivi de populations, des caractéristiques paysagères ont été prises en compte pour chaque verger (présence d'une haie, surface du verger, état alentour du verger, travail de la terre (labour), qualité de l'écorce des pommiers). Et nous avons calculé les IFT (fongicides, insecticides microbiologiques, insecticides synthétiques) pour caractériser la fréquence de traitements de ces substances. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, des données de toxicité des pesticides sont disponibles pour *F. auricularia* dans la littérature, mais à notre connaissance, aucune donnée n'est disponible sur *F. pubescens*. Nous avons donc réalisées des expositions au laboratoire (DL₅₀) sur les deux espèces de forficule échantillonnées pour contrôler les différences de sensibilités observées sur le terrain.

The abundance and diversity of earwigs in apple orchards are influenced by pesticide management strategy

Soumis à Science of the Total Environment

Malagnoux Laure^a, Marliac Gaëlle^b, Magali Rault^a, Sylvaine Simon^c, Capowiez Yvan^b

^a Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse UMR 7263 CNRS-IRD, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE), 301 rue Baruch de Spinoza BP21239 F-84916 Avignon Cedex 09, France

^b INRA, UR 1115, Plantes et Systèmes de culture Horticoles, Site Agroparc, F-84914 Avignon Cedex 09, France

^c INRA, UE 0695 Recherches Intégrées, Gothenon, 26320 Saint Marcel-lès-Valence, France

Abstract

Apple orchards are agro-systems managed with high levels of inputs and especially pesticides. Our aim was to assess whether different orchard management (abandoned, low-input, organic, IPM) would have an effect on the abundance and diversity of earwigs that are considered as important natural enemies of apple main pests. We thus studied during three years the density of *Forficula auricularia* and *F. pubescens* in spring and autumn in a set of selected orchards characterized by their pesticide use and some small-scale landscape parameters (quality of hedges and land cover of the plots around each orchard). The pesticide use was significantly different between low-input, organic and IPM orchards with particularly significant differences regarding insecticide applications (2.2, 4.9 and 9.2 respectively). Pesticide use had clearly much higher effects on earwig abundances and diversity than orchards or landscape characteristics. The density of *F. auricularia* was significantly lower in IPM orchards (0.47 ind. per tree) compared to organic, low-input and abandoned orchards (3.1, 4.5 and 1.6 ind. per tree, respectively). *F. pubescens* was almost absent from IPM orchards and its abundance was higher in abandoned or low-input orchards compared to organic ones with respectively 1.5, 2.8 and 0.8 ind. per tree. As a consequence the percentage of *F. pubescens* in the earwig community decreased from abandoned (52%) to low-input (40%), organic (15%) and IPM orchards (0.5%). These field results were confirmed by LD₅₀ assays carried out under laboratory conditions showing that for the two pesticides causing mortality close to normal application rates, *F. pubescens* was clearly more sensitive than *F. auricularia*. Owing to their ease of capture and determination, and their sensitivity response to pesticides, we concluded that earwigs are relevant bioindicator species of pesticides effects use in pomefruit orchards.

Keywords: *Forficula auricularia*, *Forficula pubescens*, organic, IPM, hedges, insecticides.

Abbreviations: IPM: Integrated Pest Management; TFI: Treatment Frequency Index computed on all pesticides; TFI_{fung}, TFI_{insect}, TFI_{micro}: Treatment Frequency Index computed only on fungicides, insecticides and microbial insecticides, respectively.

1. Introduction

Among the agricultural crops, each year an estimated 2.5 million tons of pesticides are applied worldwide (van der Werf 1996). However, the proportion of pesticides applied reaching the target pest has been found to be less than 0.3% (Pimentel 1995). Since the use of pesticides in agriculture inevitably leads to exposure of non-target organisms, undesirable side-effects may occur on some species, communities (Pelosi et al. 2013) or on ecosystems as a whole (Hole et al. 2005; 2006; Bianchi et al. 2006; Bahlai et al. 2010).

In France, apple orchards are among the most intensely agrochemical-treated crop with on average 35 pesticide applications per year in Provence, South-Eastern France (Sauphanor and Dirwimmer 2009; Butault et al. 2011). They are thus an interesting case to study both the deleterious effects of pesticides on non-target populations and to follow the positive effects of a reduction in pesticide use. Moreover, orchards are as well particularly suitable systems to study the level of ecosystem services provided by biodiversity, because they are semi-permanent ecosystems and present a complex multi-strata design (Altieri 1999) in which generalist predators can hide, find resources or shelters during the whole year. In France, there are approximately 44,500 ha of apple orchards (Source SSP – Agreste 2012, RGA 2010). Two pest control strategies are generally identified in commercial apple orchards: integrated pest management (IPM) and organic farming. In France, thanks to the Ecophyto plan (Jacquet et al. 2011) aiming at drastically reducing the use of pesticides by 2018, new protection methods are developing such as the Alt'carpo net (exclusion nets against codling moth) (Dib et al. 2010). They decreased the number of insecticide applications and we have to check if this decrease in pesticide use benefit to biocontrol agents.

To assess the effectiveness of these new alternatives or more generally to follow the positive effects of a decreasing pesticide use, one needs a reliable bioindicator species. A bioindicator is an organism or an assemblage of organisms which allows us to characterize an ecosystem and to bring to light as early as possible their modifications, natural or manmade (Fontanetti et al. 2011). A bioindicator has to be sufficiently widespread, easy to collect and has to tolerate sub-lethal effects of contaminant. A correlation between contaminant concentration in the external environment and the concentration in the organism is expected.

Studies about the use of terrestrial bioindicators to assess pesticide effects are few in number and present different limits. Spiders (epigeal or arboreal) are often used but they require important skills/knowledge to identify species. We believe that earwigs (*Forficula*

spp.) can overcome this limitation. Earwigs are arthropods commonly found in apple orchards. They live in the trees from May to October in Southeastern France, in the soil at fall and in winter where females build a nest to deposit their eggs and where larvae live until the third instar. Males, females and larvae are nocturnal and they hide during the day under shelters (bark, holes in the ground). Earwigs produce an aggregation pheromone (Sauphanor 1992) and can therefore be found in high abundances in shelters and traps (Dib et al. 2010). This characteristic permits easy capture and counting. Since earwigs are univoltine (one generation per year), they are an interesting model to study the effects of pest management strategy at the population level (Peusens and Gobin 2008). Another advantage of earwigs is that although omnivorous, they are considered to be efficient generalist predators in pome fruit orchards (Dib et al. 2011; Romeu-Dalmau et al. 2012). Thus, ideally we can relate their abundance to an important ecosystem service, biocontrol of pests.

Earwigs are known to be sensitive to pesticides and especially insecticides (Sauphanor et al. 1993, Shaw and Wallis 2010). However, in order to use them as a bioindicator species, we should take into account the effects of other so-called confounding factors (Kammenga et al., 2000). Besides pesticides, other agricultural practices such as tillage (Sharley et al. 2008; Moerkens et al. 2012) and the presence and quality of hedges (Debras et al. 2007) influence earwig abundance. The characteristics of the bark of apple trees and thus the apple cultivar, offering shelters, can have an effect as well (Debras 2007). At least, beyond hedges, there is an increasing evidence that landscape composition can alter arthropods abundance and diversity in agricultural crops (Tscharntke et al. 2007).

In this study, in order to evaluate the potential of earwigs as bioindicator organisms, we studied their presence and diversity in apple orchards under very different management regimes, from abandoned orchards without any pesticide application to experimental orchards and commercial orchards with an increasing use of pesticides (from organic to IPM). We also checked the impact on earwigs of the most commonly used pesticides through LD₅₀ assays under laboratory conditions to validate some of our field results. Furthermore, we characterized each orchard plant environment to take into account other factors explaining the observed abundance and diversity.

2. Materials and methods

a. Field sites and characterization

This study was carried out in South-East of France within a radius of 20 km around Avignon. In total, seventy-four orchards were investigated on a three years period (2011-2013). Among these 74 orchards, 8 were abandoned (since at least 5 years), 6 were classified as low-input regarding pesticide use (experimental INRA orchards), the remaining ones were commercial orchards: 35 under organic and 25 under IPM management strategy. Not all orchards were surveyed each year (depending on time schedule and producer authorization). On average 25 orchards that distributed among of each type of orchards (abandoned, low-input, organic and IPM) were surveyed each year.

In each surveyed orchard, the calendars were recorded and analyzed by computing global treatment frequency index (TFI) as the total number of treatments per hectare with commercial products, weighted by the ratio of the dose used to the recommended dose (Jørgensen 1999). However, since organic farming used different kinds of pesticides, TFI was determined for three classes of pesticides: fungicides, microbiological insecticides (granulosis virus and *Bacillus thuringiensis*), and other insecticides. Insecticides and fungicides authorized in organic farming are all natural products (mainly mineral oil, spinosad and pyrethre as insecticides and sulphur and copper as fungicides) whereas in IPM orchards synthetic pesticides are used as well. Other agricultural practices are different between organic orchards on one hand and low-input and IPM orchards on the other hand: tillage and organic fertilizers are applied in organic orchards but not herbicides and mineral fertilizers.

In each surveyed orchard, a brief description of the orchard surroundings was carried out at the beginning of the study (once a year unless major changes were noted). This description included the characterization of the lining hedgerows, the nature of the land cover surrounding the orchards (i.e. proportion of adjacent orchards), some descriptor of the orchard (surface area, shape) and some tree characteristics. The landscape around Avignon is characterized by the presence of a dense network of windbreak hedgerows that protects orchards against the prevailing Northern winds. We thus computed an index (HQ) that merged the quantity of hedgerow and its quality in terms of floral biodiversity:

$$HQ = \sum(a_i * l_i) / \sum(l_i) \quad (1)$$

with l_i the length of each orchard border and $a_i=0$ when no hedgerow, $a_i=1$ in presence of a hedgerow with a very low plant biodiversity (typically pure *Cypripedium* hedgerow) and $a_i=2$ when the hedgerow has a higher plant biodiversity (i.e. the dominant species represents less

than 80% of the trees). Regarding land cover around each orchard, we computed the linear proportion of orchards (OP) in the surroundings as follows:

$$OP = \text{sum}(b_i * l_i) / \text{sum}(l_i) \quad (2)$$

with l_i the length of each orchard border and b_i equals to 1 when this border separated two orchards (otherwise $b_i=0$). We thus only considered a 4-connectivity, i.e. the four edges of each orchard (corners were neglected). The shape of each orchard was simply computed by dividing its perimeter by the square root of its surface (the greater this value, the more rectangular is the orchard).

b. Earwigs sampling

There are two main periods to estimate earwig populations in orchards. In both of them we used 10 cm wide corrugated cardboard band traps wrapped around tree trunks that take advantage of the aggregative behaviour of earwigs in shelters (Sauphanor 1992). The first period permits a temporal estimation (every month) during the earwig period of activity in apple trees (between May and August). Alternatively, earwig abundance can be estimated in late autumn (October) in link with the classical method used to estimate the abundance of codling moth (*Cydia pomonella*), one of the apple main pests, whose larvae hide and hibernate either under the tree bark or even in the soil. In each season, 30 band traps per orchard were randomly located avoiding the first and last rows and trees in the row. For the sampling, the bands were enclosed in a plastic bag. The bags were opened under laboratory conditions. The earwigs were counted according to species, sex and larvae instar and then released in the corresponding orchards two days later. In the following, total earwig abundances were analyzed by summing adult and larva density for each species. Abundances observed during the spring-summer period were divided by the number of sampling dates so that we can compare them with abundance found in autumn and thus expresses in mean number of individuals per tree.

In our survey, we used both methods in some of the orchards the same year to determine if they provide the same information or not. Overall, on the 74 orchards, we carried out around 210 sample sessions, among which two thirds were realised with the temporal method (spring-summer period).

c. LD₅₀ assay

LD₅₀ assays were realized in laboratory conditions to study whether the two species display different sensitivities to pesticide. Male and female adults of *Forficula auricularia* and *F. pubescens* were caught in summer using cardboard traps placed on apple tree branches from an abandoned orchard (pesticide free for eight years).

Five insecticides from four different chemical families were evaluated independently during the first 24h exposure to determine their LD₅₀. The pesticides were Success4® (the spinosyn Spinosad from Dow AgroSciences) which is authorized in organic orchards, Pirimor G® (the carbamate Pirimicarb from Syngenta), Supreme® (the neocotinoid Acetamiprid from Certis), Decis Expert® (the pyrethroid Deltamethrin from Bayer) and Pyrinex® (the organophosphorus Chlorpyrifos-ethyl from Philagro), the four last being common insecticides used in French apple orchards (except organic ones). Insecticide solutions were the commercial formulations purchased in specialized stores. They were diluted with distilled water to obtain different concentrations around the normal application rates for French apple orchards. Control earwigs were exposed to water in the same conditions to ensure that the mortality was not due to external conditions.

Eight cm Petri dishes were used for the insecticide exposure by adapting the method described by Sauphanor et al. (1992), which used a Burgerjon type Potter-tower (Burgerjon 1956). Potter-towers are calibrated to apply 1.7 mg.cm⁻² of insecticide solution to mimic commercial sprayers, the insecticide volume here applied was calculated for the area of the Petri dish surface. 115 µL of pesticide solution was thus applied with a pre-moistened paintbrush. The insecticide was allowed to evaporate for 30 min under an extractor hood to avoid direct exposure of earwigs to the liquid pesticides. For each pesticide concentration, 20 adult earwigs (10 males, 10 females) were exposed and the whole experiment was replicated 5 times for each pesticide. The exposure lasted 24h in an outdoor insectarium thus at ambient temperature under shading conditions.

The earwig status (alive, moribund or dead) was noted. Earwigs were noted moribund when they were unable to walk but moved legs or antenna when subjected to physical stimulus with a paintbrush. Moribund earwigs were considered to be dead since in previous experiments we observed that they died a few days later and we assumed that under natural conditions these earwigs would die rapidly due to predation. The percentage of mortality was calculated for each pesticide concentration. A logistic regression was used between log(dose) and the percentage of mortality to determine the LD₅₀ which corresponds to the probability to have 50% mortality after adjustment of the model.

d. Statistical analysis

The correlation between the spring-summer samplings and the autumn sampling was assessed using a Spearman correlation test based on ranks.

The normality and homoscedasticity of the TFI values were assessed and accepted by Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. The differences in TFI between orchard management types were tested using a one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey HSD tests.

The difference in earwig density (for both species) between orchard management types was assessed using a generalized liner model (GLM) using a quasi-Poisson error distribution and a logit link function to take into account the high number of null abundances. Difference in percentage of *F. pubescens* in the earwig communities between orchard management types was assessed using a beta regression model since the possible values were between 0 and 1, using the ‘betareg’ package (Cribari-Neto and Zeileis 2010).

The influence of the parameters of pesticide use or small-scale landscape on each species abundance and on the proportion of *F. pubescens* was tested using the same procedures (GLM and beta regression).

In all GLM or beta regression, as season was never a significant factor the surveys of spring-summer and autumn were simply merged into the same matrix and tested together. DL50 and confidence intervals were computed for each species, sex and pesticide using the package ‘drfit’ (Ranke 2006).

All computations were done using R software.

3. Results

a. Pesticide application

No pesticides were applied in abandoned orchards, so all their TFI are null. Low-input orchards were characterized by a significantly lower total TFI (11.7) compared to organic and IPM orchards (Fig. 29). Indeed, excepted for microbial insecticides, significantly less fungicides (6.0) and insecticides (2.2) were applied annually in these orchards. In organic orchards, the total TFI was slightly but significantly lower (22.2) than in IPM orchards (26.6). This difference was due to a significantly lower insecticide use (4.9 in organic vs 9.2 in IPM), whereas no significantly difference was observed regarding fungicide applications.

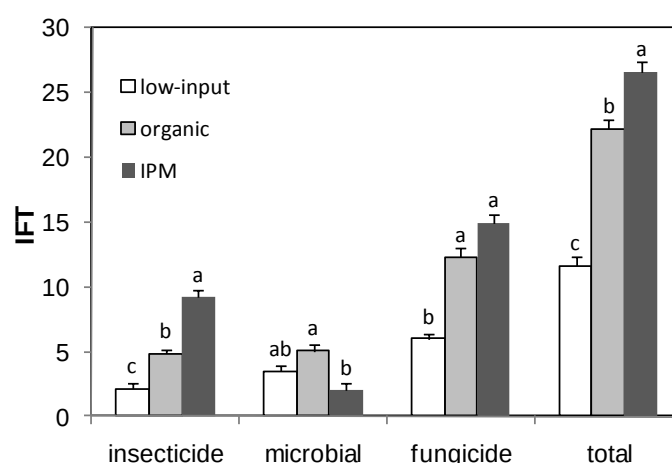


Figure 29. Mean (+SE) of Treatment Frequency Index for the insecticides, fungicides, microbial and all pesticides applied annually in the orchards according to their management.

Bars bearing different letters are different at the 5% level (each pesticide class was tested separately).

b. Earwig abundance and diversity

Two earwig species were commonly found in shelters placed in the apple trees. These are *F. auricularia* with a worldwide distribution (often called European earwig) and *F. pubescens* characterized by a Mediterranean distribution (Debras et al. 2007, Romeu-Dalmau et al. 2012). The latter is smaller in size and generally darker.

The abundance of either *F. auricularia* or *F. pubescens* between seasons were significantly correlated ($R^2 = 0.83$ and 0.65 ; $p < 0.001$ and $p = 0.01$, respectively). However, on average total earwig densities were higher in autumn (4.2 earwigs per tree) than in spring-summer (3.6 earwigs per tree).

The abundance of *F. auricularia* was significantly lower in IPM orchards (0.47 ind. per tree on average). In other orchards (low-input, organic or abandoned), its abundance varied greatly from 1.6 to 4.5 ind. per tree, but not significantly (Fig. 30).

The abundance of *F. pubescens* was significantly higher in low-input and abandoned orchards (Fig. 30) with respectively 1.6 and 2.8 ind. per tree compared to IPM orchards (with on average 0.8 individuals per tree). This earwig species was rarely found in IPM orchards (on average 0.01 ind. per tree).

As a consequence the percentage of *F. pubescens* in the earwig community was significantly the highest in abandoned and low-input orchards (52 and 40%, respectively). This percentage was then significantly higher in organic orchards compared to IPM orchards (Fig. 31).

The abundance of *F. auricularia* was significantly influenced by TFI_{fung} ($p < 0.001$) and our synthetic indicator of hedge quantity and quality ($0.01 < p < 0.05$) (Table 8). The abundance of *F. pubescens* was significantly influenced by TFI_{fung} , $\text{TFI}_{\text{insect}}$ ($p < 0.001$) and the orchard area ($0.01 < p < 0.05$) whereas the synthetic indicator of hedges had a marginal significant influence ($p = 0.039$). The proportion of *F. pubescens* in the earwig community was significantly influenced by TFI_{fung} and $\text{TFI}_{\text{insect}}$ ($p < 0.001$) and marginally influenced by the orchard area ($p = 0.011$).

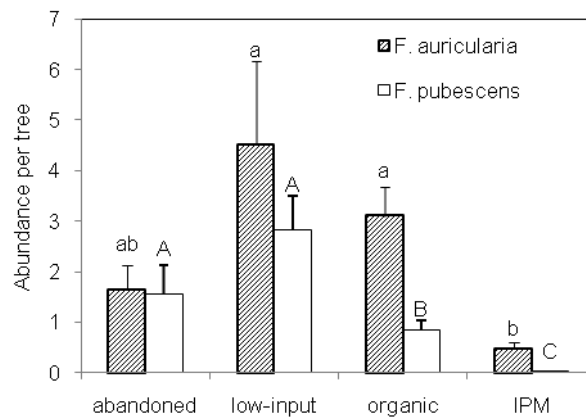


Figure 30. Mean densities (+SE) of *F. auricularia* (a) and *F. pubescens* (b) in the orchards according to their management. Bars bearing different letters are different at the 5% level.

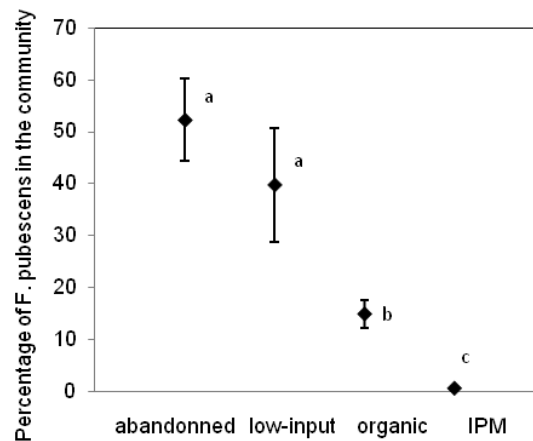


Figure 31. Percentage of *F. pubescens* in the orchards according to their management. Values bearing different letters are different at the 5% level.

Tableau 9. Summary of generalized linear model (GLM) for the abundance of *F. auricularia* and *F. pubescens* and of the beta regression for the proportion of *F. pubescens* in the earwig community. For each explanatory variable, the standardized effect, the standard deviation (SE) and the significance level (p-value) are given (ns: not significant ; *: 0.01<p<0.05 ; **: 0.001<p<0.01 ; ***: p<0.001).

Response variable	Explanatory variable	Standardized effect	SE	p-value
Abundance <i>F.auricularia</i>	TFI _{micro}	-0.028	0.028	ns
	TFI _{fung}	-0.058	0.021	***
	TFI _{insect}	-0.003	0.052	ns
	Hq _a	2.682	0.955	*
	Op _b	0.007	0.005	ns
	Orchard area	0.284	0.233	ns
Abundance <i>F.pubescens</i>	TFI _{micro}	0.017	-0.022	ns
	TFI _{fung}	-0.093	0.027	***
	TFI _{insect}	-0.257	0.064	***
	Hq _a	1.938	0.943	*
	Op _b	0.015	1.376	ns
	Orchard area	-1.517	0.381	*
Proportion <i>F. pubescens</i>	TFI _{micro}	-0.027	0.017	ns
	TFI _{fung}	-0.051	0.014	***
	TFI _{insect}	-0.098	0.026	***
	Hq _a	0.462	0.408	ns
	Op _b	0.001	0.001	ns
	Orchard area	-0.418	0.164	*

^a Index of hedge quality and quantity. ^b linear proportion of orchards in the surroundings (4-connectivity)

c. LD₅₀

Three of the tested insecticides (the spinosad Success4®, the carbamate Pirimor® and the pyrethroid Decis®) did not cause mortality at normal application rates after 24h exposure, neither on *F. auricularia*, nor on *F. pubescens*. The organophosphorus Pyrinex® and the neocotinoid Supreme® caused mortality on the two species with distinct impact on males and females. LD₅₀ were thus determined for these two last pesticides separately on males and females of *F. auricularia* and *F. pubescens* (Table 9). *F. pubescens* was always more sensitive than *F. auricularia* to the two pesticides (LD₅₀ about three times higher for *F. auricularia* exposed to Pyrinex® and twice for *F. auricularia* exposed to Supreme®). Both species were more sensitive to Pyrinex® than Supreme®. According to the ratio LD₅₀/NAR (Table 9) LD₅₀ values obtained for Pyrinex® were close related to the normal application rate used in French apple orchards (either 0.72 (females) to 0.61 (males) times above or 1.9 (females) to 1.7 (males) times higher than NAR for *F. pubescens* and *F. auricularia* respectively). Concerning Supreme® LD₅₀ values were fourteen and eight to nine times higher than NAR for *F. auricularia* and *F. pubescens* respectively. Either *F. auricularia* and *F. pubescens* males were slightly but significantly more sensitive than females towards both pesticides.

Tableau 10. LD₅₀ (mg kg⁻¹) and 95% confidence interval, NAR (normal application rate allowed in French apple orchards) and the ratio LD₅₀/NAR.

LD₅₀ were computed separately for males and females for each species *F. auricularia* and *F. pubescens* and for the two insecticides.

		<i>F. auricularia</i>		<i>F. pubescens</i>		NAR (g hl ⁻¹)	LD ₅₀ /NAR	
		LD ₅₀ (g.hl ⁻¹)	Limits of the 95% confidence interval	LD ₅₀ (g.hl ⁻¹)	Limits of the 95% confidence interval		<i>F.</i> <i>auricularia</i>	<i>F.</i> <i>pubescens</i>
Pyrinex®	female	96.93	(92.25 ; 102.20)	35.76	(34.44 ; 37.08)	50	1.94	0.72
	male	85.09	(80.84 ; 89.83)	30.55	(29.45 ; 31.62)		1.70	0.61
Supreme®	female	72.33	(68.00 ; 77.59)	47.29	(45.97 ; 48.70)	5	14.47	9.46
	male	70.49	(66.13 ; 75.88)	40.02	(38.81 ; 41.21)		14.10	8.00

4. Discussion

F. auricularia and *F. pubescens* can coexist in Mediterranean apple orchards and no negative interaction between these two species has been reported up to now: Sauphanor and Sureau (1993) observed a positive association between individuals of *F. auricularia* and *F. pubescens* under laboratory conditions, Debras et al. (2007) did not observe any negative spatial correlation between these two species, thus assumed a food specialization limiting

their competition and Romeu-Dalmau et al. (2012) found a random association under field conditions (citrus orchards). Due to important differences in size, color, presence of wings and the length of the male cerci, we can easily distinguish the two species under laboratory conditions.

There are strong differences in pesticide use among studied orchards. Low-input orchards are few in number and represent experimental systems where TFI is on average decreased by 50% either at the expense of time (since based on visual control to trigger pesticide applications) or, some years, of orchard yield (when pests are not controlled). They cannot be considered as commercial orchards but enable to study extreme scenarios.

The different pest management regimes had marked effects on the abundance and diversity of the earwig community with few differences in species response to pesticide application. It can be surprising that abandoned orchards did not host significant higher earwig abundances since they did not receive any pesticides. However, it is known that the trap efficiency is lower in these orchards since the number of natural shelters is very high and thus decrease the attractiveness of our artificial shelters (Debras et al 2007, Dib et al. 2010).

The effects of the pesticides and especially insecticides on predators can be either direct (toxicity) or indirect (decrease in the abundance of prey) (Sauphanor and Stäubli 1994). Generally, *F. auricularia*, as tested under laboratory or field conditions, is mainly sensitive to organophosphate and pyrethrinoid insecticides (French-Constant and Vickerman 1985; Sauphanor and Stäubli 1994; Epstein et al. 2000; Badji et al. 2004; Nicholas et al. 2005; Logan et al. 2011). More recent insecticides such as thiacloprid or spinosad were found to be toxic or very toxic to *F. auricularia* (Shaw and Wallis 2010). Nothing is known about the sensitivity of *F. pubescens* to pesticides. It is striking that, to our knowledge, no fungicide was found to be toxic or very toxic to *F. auricularia*.

Differences in earwig abundance can be related to pesticide use and toxicity. Both earwig species showed decreasing abundances from these low-input orchards to organic and then to IPM ones, even if the abundance of *F. auricularia* was not significantly different between organic and IPM orchards. Since the pesticide applications (TFI) showed the same decrease from low-input to IPM orchards, especially for insecticides, it was not surprising that we found significant relationships between TFI_{fong} and the density of *F. auricularia* on the one hand and between TFI_{insect} and TFI_{fong} and the density of *F. pubescens* on the other hand. TFI_{fong} and TFI_{insect} are significantly ($p < 0.01$) but weakly correlated ($R^2 = 0.12$). We thus assume that both earwig species are influenced directly or indirectly by the very high number of fungicides applied (12.3 and 15 in organic and IPM orchards, respectively) even if at least

for *F. auricularia* no toxic effect of fungicides is reported in the literature. It could suggest as well that *F. auricularia* is less sensitive to insecticides than *F. pubescens*.

The difference in earwig abundance between organic and IPM orchards, albeit only significant for *F. pubescens*, can be related to a lower pesticide application frequency (significant only for insecticides) but as well to the use of non-synthetic pesticides even if the general toxicity of the pesticides used in organic production (mainly the spinosad, pyrethre insecticides and the sulphur, copper fungicides) is still an open question (Bahlai et al. 2010). Regarding earwigs, the pesticides used in organic production did not show any high toxicity at the exception of spinosad (Shaw and Wallis, 2010; Logan et al. 2011), kaolin (Marko et al. 2008) and neem (Sauphanor et al. 1995), the two latter being not authorized in France during our study period however.

These results, higher abundance of earwigs (especially *F. pubescens* in our case) in organic orchards than in IPM orchards, are in agreement with the results of Logan et al. (2011) on *F. auricularia* observed in kiwi orchards. Moreover, these authors observed an increase in the density of earwigs in the IPM orchards between 2006 and 2010 and observed that this was correlated with a marked decrease in the use of broad-spectrum insecticides (such as the organophosphate diazinon). Interestingly, during exactly the same period, Romeu-Dalmau et al. (2012) observed that the density (and relative proportion) of *F. pubescens* greatly increased in citrus orchards (from less than 5 to about 30 ind. per tree). Even if no indication was given on the number and types of pesticides applied in these citrus orchards, we can assume this may be linked to the withdrawal of many old broad-spectrum pesticides (among which organophosphates) following the reevaluation of their toxicity by EEC between 2001 and 2009. These observations, along with ours, suggest that the abundance and the diversity of earwigs may respond rapidly to modifications of pesticide use. It means as well that the recolonisation capacities of these earwigs from refuge areas are high as mentioned by Longcore et al (2003).

Not only the total abundance of earwigs is significantly correlated to the quantity of applied pesticides (mainly fungicides but as well insecticides for *F. pubescens*), but the relative proportion of *F. pubescens* as well (decreasing from abandoned to IPM orchards). This indicates that the two species display different responses to the gradient of pesticide use. Since nothing was known about possible difference in sensitivity between these two species, LD₅₀ assays were carried out. They showed that not all insecticides were toxic for earwigs under laboratory conditions but they demonstrated, for the two insecticides for which toxicity was observed (Suprem® and Pynex®), that *F. pubescens* was significantly more sensitive

than *F. auricularia*. We further demonstrated that females are less sensitive than males for each pesticide and species. Even if it is always difficult to extrapolate results from laboratory to field, since exposure may differ and avoidance behaviour may occur under field conditions, the LD₅₀ assays corroborated the results of our field study. Field and laboratory results are consistent.

Comparatively to the effects of pesticide use, the influence of the orchard characteristics and their surroundings is much lower. We only found marginally significant relationships between *F. auricularia* and the synthetic indicator of hedge quantity and quality and between *F. pubescens* and the orchard area (p-values between 0.01 and 0.05). The first relationship is positive and indicates that hedges are refuges for *F. auricularia* which is well known (Debras et al, 2007; Dib et al 2010). We highlighted that both the length of lining hedgerows and their plant diversity affect the earwig community. The negative relationship between *F. pubescens* and orchard surface area could be due to the fact that larger orchards imply larger distances between some traps to the orchard borders and hedges but clearly knowledge about *F. pubescens* biology and ecology is too scarce to be more affirmative. Since orchard protection strategy had a significant effect on earwigs, it was surprising that the proportion of commercial orchards in the close vicinity of the surveyed orchard did not influence negatively the abundance of the two earwig species. However, the ecological niche of *F. pubescens* is largely unknown and this of *F. auricularia* is not well established; some authors find that its abundance was positively correlated with the presence of grass cover around the crops (Wyckhuys and Robert 2006) and other indicated that they may prefer open habitats to forest (Kocarek 1998). Overall, the relative insensitivity of the earwig community to the characteristics of the orchard surroundings compared to its sensitivity to pesticide use, along with its great colonisation abilities (presumably from the hedges), provide an interesting bioindicator value to these organisms.

5. Conclusions

We demonstrated that the earwig community was greatly influenced by pesticide use in apple orchards and to a minor extent by some orchards characteristics (hedges and area). Only two species of earwigs were found in the canopy and these two species, easily distinguishable, expressed different response to the gradient of pesticide use. This resulted in a marked decrease in the relative proportion of *F. pubescens* in intensively sprayed orchards up to its elimination in IPM orchards. These observations, along with some earwig characteristics

(univoltine species, ease of capture and identification) made them interesting potential bioindicator, especially in pomefruit orchards, where they are considered as active natural enemy against aphids. We suggest considering both the *F. pubescens*/*F. auricularia* ratio and the total earwig abundance to characterize the intensity of pesticide use and the potential biocontrol by generalist predators in apple orchards.

Acknowledgments

The authors would like to express their sincere thanks to Odile Mascle, who participated to the field monitoring and Juliette Goussopoulos who managed several LD₅₀ assays. Part of funding for this research was provided by the AltCarpo project. L. Malagnoux and G. Marliac are grateful respectively to the Provence-Alpes-Côte d'Azur Region (France) and the ANR DynRurAbio for their doctoral fellowships.

Chapitre VII. Bilan de la thèse

Dans ce travail, nous avons développé des biomarqueurs sur un nouvel organisme qui plus est, utile afin de pouvoir suivre les effets des pesticides *in situ* dans les vergers de pommiers (ou plus généralement en arboriculture). Nous avons pris en considération différentes échelles d'études (tissulaire, individu, population) pour réaliser une analyse la plus intégrative possible, du laboratoire au terrain. Les vergers de pommiers sont la culture fruitière particulièrement adaptée pour étudier l'impact des pratiques phytosanitaires à cause de leur fort usage de traitements phytosanitaires (IFT 36, Sauphanor et al., 2012). Nous avons choisi le forficule *F. auricularia* comme espèce modèle car il s'agit d'une espèce courante à travers le monde en verger de pommiers (Albouy and Caussanel 1990), soumise aux différents niveaux d'exposition des pesticides (sol, surface et surface foliaire) et connue comme auxiliaire efficace en vergers de fruits à pépins (Dib et al. 2011; Romeu Dalmau 2012). Le forficule *F. auricularia* est aussi connu comme ravageur en verger de fruits à noyaux, difficile à éliminer, ce qui en fait une espèce peu sensible, garantissant sa présence en vergers de pommiers, intéressante à étudier comme espèce modèle.

Dans un premier temps, nous avons étudié, au laboratoire, l'impact de certains pesticides sur la physiologie et la biologie du forficule. Les insecticides étudiés ont été sélectionnés « *a priori* » après avoir consulté les calendriers de traitement des producteurs et en choisissant des familles de pesticides les plus variées possibles. En parallèle, nous avons étudié leur reproduction à partir d'insectes collectés sur le terrain et leur écologie en réalisant des suivis de populations dans un réseau de vergers commerciaux. L'ensemble des résultats est synthétisé dans le tableau 10 et la figure 32, nous allons les discuter dans les paragraphes suivants.

Tableau 11. Tableau récapitulatif des résultats obtenus sur le forficule pour connaître l'impact des produits phytosanitaires (avec les différentes échelles d'études et les conditions d'exposition).

Echelle	Exposition		Résultats
Tissus	Conditions "laboratoire"	expositions <i>in vitro</i> des extraits bruts de forficule au chlorpyrifos-oxon et carbaryl	<u>Caractérisation des B-estérases chez le forficule <i>F. auricularia</i></u> AChE, enzyme clé du système nerveux; CbE, rôle de détoxification AChE dans la tête, CbE dans tout le corps, quelque soit le sexe du forficule Activité CbE > activité AChE quelque soit le sexe → forte capacité protectrice potentielle des AChE par les CbE Quantité isoenzymes CbE ♀ > ♂ → capacité protectrice des CbE ♀ plus grande que ♂ Activités AChE et CbE diminuées par exposition OP et CB Activité CbE diminue plus que AChE après exposition OP , CB CbE ♂ plus impactées
		4 pesticides étudiés indépendamment, expositions aux résidus de pesticides	<u>Comportement de prédation puceron/forficule <i>F. auricularia</i> et mesures B-estérases sur forficules exposés</u> Success4® (spinosad) et Pyrinex® (OP) → diminution AChE et CbE sur L4 forficules, diminution capacité prédatrice Pyrinex® (OP), Supreme® (neocot) → diminution AChE et CbE sur adultes forficules, diminution capacité prédatrice ♂ plus sensibles que ♀ aussi bien du point de vue biochimique (B-estérases) que du point de vue comportemental (capacité prédatrice) Success4® (spinosad) → diminution capacité prédatrice sur adultes forficules sans impacter B-estérases Decis Expert® (pyrethrinolide) → pas d'effet sur capacité prédatrice des L4 et adultes forficules
Organisme	Conditions vergers de pommiers région PACA	développement et reproduction du forficule (♂ & ♀) en conditions naturelles	<u>Fécondité et développement du forficule <i>F. auricularia</i></u> Mise en place d'un élevage à partir de forficules prélevés en vergers en Octobre dans un réseau de vergers (AB, PFI, agriculture "conventionnelle") Nombre moyen d'œufs pondus par ponte diminué pour les forficules des vergers à agriculture "conventionnelle" Date de ponte retardée pour les forficules des vergers à agriculture "conventionnelle" Efficacité d'éclosion pas impactée → comportement maternel pas touchée → ♀ plus résistantes confirmé (vus les résultats des études en condition laboratoire)
Population		prise en compte caractéristiques paysagères	<u>Abondance et diversité du forficule sur le terrain (<i>F. auricularia</i>, <i>F. pubescens</i>)</u> Suivi terrain des populations de forficule sur réseau vergers AB, PFI, bas intrants, abandonnés Présence forficule en vergers à agriculture "conventionnelle" pas suffisante pour cette étude (l'ensemble des résultats précédents est confirmé sur le terrain) Abondance <i>F. auricularia</i> et <i>F. pubescens</i> décroissante bas intrants > AB > PFI <i>F. auricularia</i> sensible à la présence de haies, <i>F. pubescens</i> sensible à la surface du verger <i>F. pubescens</i> plus sensible que <i>F. auricularia</i> aux insecticides au terrain, confirmé par des tests de DL50 Rapport quantité présence <i>F. auricularia</i> / <i>F. pubescens</i> = bon indice pression phytosanitaire

Notre première question de recherche portait sur la caractérisation de l'activité des B-estérases (AChE et CbE), biomarqueurs biochimiques sensibles aux pesticides OP et CB. L'AChE, cible des OP et CB, assure un rôle fondamental dans le fonctionnement du système nerveux et les CbE sont connues pour assurer un rôle de détoxification des OP et pyrethrinoïdes. Ces activités sont donc classiquement utilisées comme marqueurs spécifiques biochimiques en écotoxicologie. Cette caractérisation a été réalisée sur les différentes parties de l'organisme (tête, thorax, abdomen) et indépendamment chez les mâles et femelles du forficule *F. auricularia*. La localisation tissulaire permet d'évaluer le tissu dans lequel le biomarqueur étudié est majoritairement présent et donc de cibler l'impact des pesticides. Cette caractérisation comprend la détermination du niveau de base des enzymes (AChE et CbE) en absence d'exposition aux pesticides (individus prélevés dans un verger abandonné depuis plus de 8 ans), et les réponses des B-estérases *in vitro* après incubation en présence d'un OP (chlorpyrifos-oxon) et d'un carbamate (carbaryl). L'activité des cholinestérases est majoritairement liée à une activité AChE présente dans la tête sous forme de protéine membranaire, confirmant le rôle fondamental de cette enzyme au niveau du système nerveux central chez les insectes. Les CbE, mises en évidence à l'aide de 3 substrats différents (α -NA, pNPA, pNPV), sont réparties dans tout le corps du forficule sous forme de protéines solubles. L'ensemble des molécules nécessaires pour ce type d'étude biochimique rend ces biomarqueurs coûteux mais rapides à analyser. Le substrat α -NA présente la plus forte activité (cinq fois supérieure aux activités obtenues avec les autres substrats) et permet de mettre en évidence en gel natif 8 isoenzymes chez les femelles, alors que 4 seulement sont visibles chez les mâles. Après incubation *in vitro* en présence d'OP et CB, nous avons mis en évidence que l'activité des CbE est plus sensible que l'activité AChE quelque soit le sexe et les mâles sont toujours plus sensibles que les femelles. La mesure conjointe, facile et rapide de ces biomarqueurs permet d'évaluer rapidement la toxicité des OP grâce à la capacité des CbE (et l'abondance d'isoformes) à séquestrer les molécules toxiques, limitant leur quantité disponible pour inhiber l'AChE. Les isoenzymes supplémentaires présentes chez la femelle peuvent potentiellement assurer un rôle protecteur plus important (Sogorb and Vilanova 2002). Les enzymes CbE et AChE sont plus sensibles aux OP qu'aux CB comme cela a déjà été observé pour l'AChE d'un coléoptère (Gao et al. 1998). Les composés organophosphorés ont en effet plus d'affinité que les composés carbamylés avec ces enzymes. AChE et CbE sont des biomarqueurs complémentaires, l'inhibition de l'AChE reflète une réponse biologique du système nerveux pouvant provoquer des désordres comportementaux chez l'individu.

La caractérisation des B-estérases chez le forficule nous a permis de mettre en évidence une toxicité différentielle selon le sexe, des OP et des CB. Ces différences peuvent avoir des répercussions sur l'état des populations de forficule présentes dans les vergers où les insecticides de synthèse (comme les OP) sont utilisés en grande quantité (vergers PFI et vergers à agriculture « conventionnelle »). Des études sur le terrain étaient nécessaires pour valider cette observation réalisée en condition laboratoire.

Nous avons ici utilisé un biomarqueur de neurotoxicité (AChE) et un biomarqueur de métabolisation (CbE) parce que la majorité des insecticides utilisés sont des neurotoxiques et pour voir en partie l'état des réponses métaboliques du forficule. D'autres biomarqueurs de métabolisation, spécifiques auraient pu être étudiés, comme les oxygénases (le cytochrome P450 système enzymatique capable de métaboliser des composés exogènes (composés organiques) et des composés endogènes (stéroïdes, acides gras)) ou la glutathion-S-transférase également enzyme de détoxification. La connaissance de la physiologie de l'organisme modèle ainsi que l'influence des différents facteurs (biotiques et abiotiques) sont des éléments primordiaux pour l'interprétation des données lorsque ces enzymes sont appliquées comme biomarqueur d'exposition dans l'environnement. Les études réalisées ensuite vont nous permettre d'approfondir la physiologie du forficule et les facteurs environnementaux pouvant interférer avec le stress « pesticide ».

Après avoir vu que le système nerveux du forficule est perturbé par les expositions *in vitro* à certains pesticides, notre deuxième question de recherche portait sur l'état de la capacité prédatrice du forficule après exposition aux pesticides en condition de laboratoire. Le comportement est souvent sensible pour mesurer les effets indirects des pesticides et représentatif d'un point de vue écologique, comparés aux suivis de létalité classiques réalisés pour les études de toxicité (Little and Finger 1990; Melvin and Wilson 2013). L'étude du comportement pour des études écotoxicologiques est plus commune dans le milieu aquatique que le milieu terrestre (Calow and Forbes 2003). Des exemples peuvent toutefois être donnés sur le milieu terrestre, notamment sur le comportement excavateur du ver de terre après exposition à des pesticides (Capowiez et al. 2010) ou les mouvements de ventilation et déplacement chez le chironome *Chironomus riparius* (Diptère) après exposition à l'imidaclopride (Azevedo-Pereira et al. 2011). La capacité prédatrice du forficule contribue à la régulation naturelle dans un verger et pourrait servir d'alternatives ou permettre la diminution d'utilisation de certains pesticides. Pour pouvoir conseiller aux arboriculteurs l'utilisation du forficule en tant qu'auxiliaire, il est important de s'assurer de la qualité de son

état physiologique et de sa capacité prédatrice après exposition à des pesticides (naturels ou de synthèse). Le comportement de prédation du forficule sur le puceron cendré (*Disaphis plantaginea*) a été étudié sur le dernier stade larvaire (L4) et au stade adulte du forficule (en distinguant mâle, femelle) après exposition au laboratoire de ces derniers à différents pesticides neurotoxiques indépendamment (le spinosad Success4® autorisé en AB, l'OP Pyrinex®, le neocotinoïde Supreme® et le pyrethrinoïde Decis expert®). Le Decis expert® n'a aucune incidence sur la capacité prédatrice des forficules quelque soit le sexe ou le stade de développement étudié. En revanche, La prédation a été affectée par les insecticides neurotoxiques (Success4® Supreme® et Pyrinex®). Chez les adultes, la capacité de prédation est plus fortement altérée chez les mâles. Pour voir si le comportement de prédation était lié à l'impact de ces molécules au niveau cellulaire, le dosage des biomarqueurs biochimiques B-estérases a été réalisé sur les forficules exposés du test de prédation. Les résultats sur le comportement ont été corroborés par les mesures d'activités biochimiques : AChE et CbE chez les L4 ont été diminuées par le Success4® et le Pyrinex®, chez les adultes par le Supreme® et le Pyrinex®. Ces résultats nous montrent la complémentarité des marqueurs biochimiques AChE et CbE, lorsque les deux enzymes sont touchés, le comportement étudié est fortement impacté (cas du Pyrinex®). Au delà d'un certain pourcentage d'inhibition des CbE leur capacité à séquestrer les molécules d'OP et donc à protéger l'activité des AChE est alors dépassée. Seul le Success4® n'a pas eu un impact significatif sur les enzymes AChE et CbE des adultes alors que ce pesticide avait un impact significatif mais faible sur la capacité prédatrice des mâles et femelles adultes. Ces résultats signifient que l'impact neuronal du Success4 au niveau du récepteur nicotinique n'influence pas l'activité AChE. Ces études pourraient être complétées par des études sur d'autres biomarqueurs de l'état cellulaire, susceptibles d'affecter le comportement, des biomarqueurs en relation avec le métabolisme énergétique et/ou des biomarqueurs du stress oxydant par exemple (SOD/catalase/GPx) pour voir la production d'espèces réactives de l'oxygène compromettantes. Le stress oxydant perturbe en effet le fonctionnement de nombreux tissus et voies métaboliques essentiels au comportement des individus. Ces résultats pourraient peut-être expliquer au niveau cellulaire, la diminution de prédation observée pour les adultes exposés au Success4®. Après cette étude comportementale, nous pouvons affirmer que l'utilisation de Pyrinex® serait à déconseiller si on veut pouvoir compter sur la capacité de régulation des forficules en verger de pommiers. Au niveau cellulaire (étude B-estérases), nous avons déjà vu que l'OP était la molécule la plus toxique. L'usage du Supreme® et le Spinosad® seraient également à limiter au vu de l'impact qu'ils ont sur le comportement de

prédation et sur les B-estérases du forficule. Le Decis expert® ne semble pas présenter de toxicité pour la capacité prédatrice du forficule mais d'autres études de réponses cellulaires (autres biomarqueurs de métabolisation cités précédemment) devraient être réalisées pour s'assurer de l'innocuité de ce produit. D'autres comportements pourraient également servir à étudier l'impact des pesticides en condition de laboratoire, par exemple les déplacements du forficule ou la reconnaissance des partenaires (via leur phéromone). Il est à noter que ces expositions en condition de laboratoire nous permettent de voir ce qu'il peut se produire, en théorie, sur le terrain mais ces expositions sont probablement beaucoup plus fortes que ce qui se passe réellement en vergers. Au laboratoire, le forficule subit toute la durée d'exposition sans pouvoir s'échapper. Pour prendre en compte la dimension écologique, les études suivantes ont été réalisées à partir de forficules présents dans des vergers soumis à différentes pratiques phytosanitaires.

La reproduction joue un rôle essentiel dans le maintien des populations. Considérant les différences de sensibilité entre sexes observées en conditions de laboratoire, notre troisième question de recherche portait sur l'impact des pratiques phytosanitaires sur la reproduction et le développement des premiers stades larvaires de forficules prélevés en vergers. Pour cette partie, nous avons mis en place un élevage chaque année pendant trois ans à partir de forficules prélevés à l'automne dans un réseau de vergers (AB, PFI, agriculture « conventionnelle »). Les forficules utilisés pour mettre en place les élevages, sont donc nés dans des vergers aux pratiques phytosanitaires utilisées réellement dans la région, ils ont subi ces pratiques tout au long de leur développement (en faisant l'hypothèse qu'ils sont restés dans le verger toute l'année). Des couples ont été créés en Novembre et placés individuellement dans un dispositif « élevage » sous un abri extérieur. Les suivis ont été hebdomadaires pendant les 3 années d'étude, rendant ces observations assez chronophages mais très peu coûteuses financièrement. Les premières pontes ont été relevées (nombre d'œuf, date de ponte), le taux d'éclosion calculé, le développement des premiers stades larvaires suivi (seul le nombre de L3 survivants a été pris en compte lors de leur transfert dans des boîtes de stockage) pour chaque type d'agriculture dont les forficules parents proviennent. La fécondité a été altérée, i.e moins d'œufs ont été pondus par les forficules provenant des vergers à agriculture « conventionnelle » et la date de la première ponte a été plus tardive pour ces mêmes forficules. La durée de développement des œufs et l'efficacité d'éclosion sont identiques quelque soit la provenance des forficules parents. Nous avons déjà vu d'une part, que la capacité prédatrice des femelles est moins altérée que celle des mâles par des

expositions aux pesticides en condition de laboratoire, d'autre part que les femelles possèdent plus d'isoenzymes de CbE potentiellement capables de protéger l'AChE et de détoxifier les pesticides OP et pyrethrinoides. On peut donc supposer que le comportement maternel n'est pas ou peu altéré par les différentes pratiques phytosanitaires. Nous n'avons pas pu donner de conclusions concernant le développement des larves, le taux de mortalité ayant été trop élevé et le protocole de suivi du développement larvaire à adapter. Au moins deux observations par semaine auraient été nécessaires et le transfert des larves au 2^{ème} stade larvaire préférable. En plus des effets directs des traitements synthétiques entraînant la mortalité des forficules dans les vergers conventionnels, cette partie nous aura permis de voir que des effets indirects se produisent sur la reproduction du forficule *F. auricularia* limitant le nombre de forficule d'une génération à l'autre. Le comportement de prédation altéré par certains insecticides peut en partie expliquer ce résultat. Une alimentation appauvrie peut avoir un impact sur la reproduction du forficule, limitant la quantité/qualité des spermatozoïdes et/ou d'ovocytes. De plus, l'énergie dépensée pour combattre la toxicité des produits utilisés n'est plus disponible pour les processus biologiques comme la reproduction ou le développement.

Pour valider notre étude sur la reproduction et nos résultats sur les différences de sensibilité entre sexes, un suivi terrain des populations de forficule était nécessaire. Notre quatrième question de recherche s'intéressait à l'état des populations de forficule présentes dans des vergers soumis à différentes pratiques phytosanitaires (AB, PFI, bas-intrants, abandonnés). Lors des suivis terrain pour mettre en place l'élevage, nous avons vu que le nombre de forficules présents dans les vergers à agriculture « conventionnelle » était très limité (selon les années seulement 2-4 vergers présentaient quelques forficules). Nous avons également remarqué la présence de deux espèces majoritaires en différentes quantités selon les vergers, *F. auricularia* (majoritaire) et *F. pubescens* (minoritaire en verger commercial). La 2^{ème} espèce est moins répandue dans le monde mais commune dans les régions méditerranéennes (Debras et al. 2007; Romeu-Dalmau et al. 2011). Pour étudier l'impact des pesticides sur les populations de forficule présentes en vergers, nous avons pris en compte des caractéristiques paysagères pouvant interférer avec l'impact des pesticides. En utilisant des GLM, nous avons évalué l'impact des caractéristiques paysagères (présence de haies, qualité/quantité des haies, surface du verger, habitat autour du verger, qualité de l'écorce des pommiers) mais aussi l'impact de pratiques culturales (travail de la terre, irrigation) par rapport à l'impact des pratiques phytosanitaires via calculs de différents IFT (insecticides, fongicides, insecticides microbiologiques). Globalement, les populations de forficules (*F.*

auricularia et *F. pubescens*) sont plus impactées par les pratiques phytosanitaires que par les caractéristiques du paysage ou les autres pratiques culturales. Les deux caractéristiques paysagères qui influencent mais modérément les populations de forficules sont la présence d'une haie pour *F. auricularia* et la surface du verger pour *F. pubescens*. Dans notre suivi terrain, les fongicides et insecticides synthétiques représentent la plus grande partie des traitements phytosanitaires. L'abondance des populations de forficule a été diminuée pour les deux espèces, mais pas de la même manière, dans les vergers les plus traités du suivi (vergers PFI). Cette moindre abondance en verger PFI peut être expliquée par la toxicité directe (mortalité, prédation), par des effets indirects sur les ressources (moins de proies) mais également par des effets sur la reproduction, comme on l'a vu précédemment, dans les vergers fortement traités. *F. pubescens* a été plus sensible aux insecticides que *F. auricularia* sur le terrain. Des tests de DL_{50} au laboratoire ont confirmé cette différence de sensibilité. Dans la littérature à notre connaissance, aucune étude n'avait encore été réalisée sur la toxicité des pesticides sur *F. pubescens*. De plus d'après nos tests DL_{50} , les mâles sont plus sensibles que les femelles pour les deux espèces *F. auricularia* et *F. pubescens*. Ce dernier résultat coïncide avec les résultats obtenus pour *F. auricularia* d'une part, pour la toxicité des pesticides sur la capacité prédatrice du forficule qui était plus réduite chez les mâles que chez les femelles et d'autre part, pour la toxicité des pesticides sur les B-estérases qui est plus forte chez les mâles (isoenzymes des CbE moins nombreuses et plus sensibles chez le mâle assurant plus difficilement leur rôle tampon).

Pour conclure sur le suivi terrain, *F. pubescens* semble être une bonne espèce à utiliser en tant que bioindicateur de pratiques phytosanitaires. Elle est relativement facile à déterminer au terrain et surtout très sensible aux insecticides. Sa présence est limitée dans un verger traité avec des insecticides mais sa présence revient dès une année sans traitement. Une espèce unique ne suffit pas pour être un indicateur environnemental de qualité à cause des capacités d'adaptation possibles. Il serait donc plus judicieux de suivre le ratio *F. pubescens*/*F. auricularia* ainsi que leur abondance totale pour caractériser l'intensité des pratiques phytosanitaires.

La modélisation nous permettrait de pouvoir corréler les données obtenues sur les individus au laboratoire avec les observations du terrain sur les populations. Par exemple, le modèle DEBTox (Dynamic Energy Budget in Toxicology) développé aux Pays Bas par Kooijman et Bedaux (1996), vise à rendre compte de la perturbation créée par un contaminant sur la dynamique énergétique utilisée pour la fécondité, la croissance et la survie des

organismes. Il emploie les résultats des tests normalisés utilisés pour étudier la toxicité du contaminant sur un individu pour les corrélérer entre eux de manière simplifiée. Il est ensuite possible de le coupler à une matrice de populations pour intégrer les résultats obtenus à l'échelle individuelle à des données obtenues sur des études de population. Ce modèle est utilisé aussi bien dans le milieu aquatique (Billoir et al. 2007) que le milieu terrestre. Il a justement été utilisé sur un insecte, le chironome (*Chironomus riparius*), exposé à un pesticide (méthiocarbe) pour estimer des données obtenues sur les individus. Ces estimations ont ensuite pu être couplées à un modèle de population (matrice Leslie) pour prédire les effets du méthiocarbe sur les populations de chironome (Lopes et al. 2005). Dans notre étude, ce modèle n'est pas encore utilisable car nous n'avons pas l'ensemble des données en particulier sur les réserves énergétiques nécessaires.

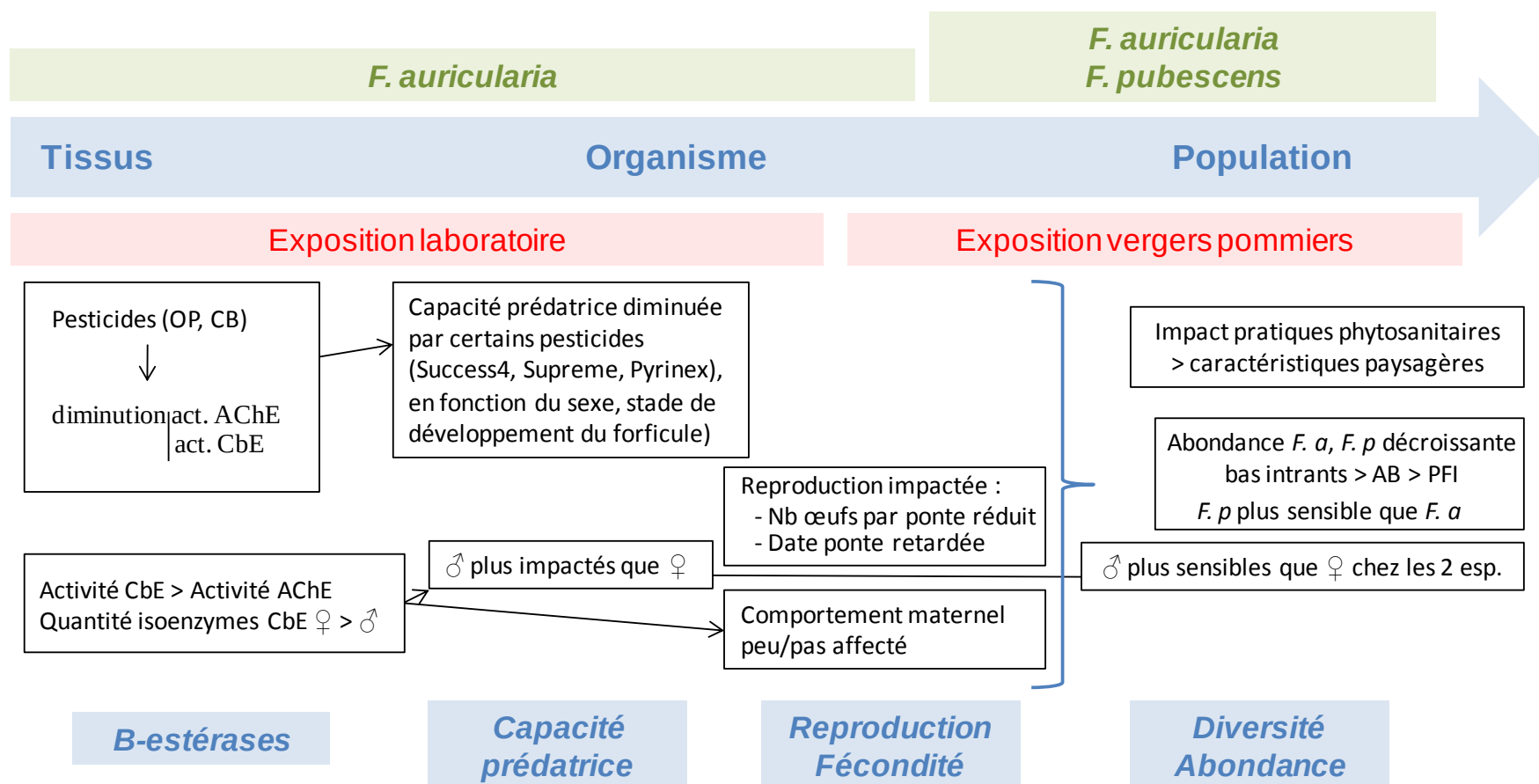


Figure 32. Schéma synthétique des principaux résultats, avec les liens connectant les différentes échelles d'étude. OP : organophosphoré, CB : carbamate, AChE : acétylcholinestérase, CbE : carboxylestérase, *F.a* : *Forficula auricularia*, *F.p* : *Forficula pubescens*, PFI : Production Fruitière Intégrée.

Perspectives

De l'ensemble de nos données, émerge un premier résultat intéressant permettant de comprendre le maintien des populations de forficule dans les vergers. Il s'agit de la différence de sensibilité entre mâles et femelles exposés à des pesticides. Les femelles sont moins sensibles que les mâles aussi bien à travers les résultats sur les B-estérases, la capacité de prédation que les DL_{50} et même sur le comportement maternel peu affecté. S'agit-il de tolérance liée au sexe ou du développement d'une résistance ?

Dans le cas d'une tolérance, il serait, en théorie, possible de voir des différences entre mâles et femelles sur les réserves énergétiques. Il est à noter que nous avons observé cette différence de sensibilité quelque soit la période du cycle de vie des forficules (aussi bien l'été, l'automne pour les forficules fraîchement prélevés sur le terrain, qu'au printemps, hiver pour les forficules présents dans les boîtes de stockage). Ces réserves énergétiques pourraient être mesurées via les réserves en glycogène. Les réserves en glycogène sont importantes pour le cycle de reproduction et l'accumulation des réserves pour les pontes chez la femelle. Il serait alors nécessaire de déterminer le niveau de base des réserves en glycogène tout au long de l'année chez des mâles et femelles forficules témoins (jamais exposés), puis de mesurer ces niveaux après exposition des forficules à des pesticides.

Dans le cas d'une résistance, il s'agirait probablement d'une résistance biochimique ou physiologique. Le forficule actif principalement la nuit a moins intérêt à développer un comportement d'évitement qu'une résistance biochimique ou physiologique. Il pourrait donc s'agir soit d'une surproduction de protéines impliquées dans la métabolisation (estérases, cytochrome P450, glutathion-S-transférase) soit de mutations ponctuelles sur les gènes codant pour les protéines cibles (ACHE, récepteurs nicotiniques) entraînant une baisse d'affinité pour les pesticides (Haubruge and Amichot 1998). L'activation des voies de métabolisation via les oxygénases-CYP450 dépendantes permet d'une part d'améliorer la détoxification mais d'autre part induit une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'organisme. Le stress oxydant serait donc à surveiller également.

Un autre résultat intéressant est le ratio *F. auricularia*/*F. pubescens*. Ce ratio pourrait être utilisé (en zone méditerranéenne) pour suivre et connaître l'intensité des pratiques phytosanitaires. Une meilleure caractérisation de la différence de sensibilité entre ces deux

espèces serait utile. Au niveau de l'individu, la caractérisation biochimique des B-estérases (AChE et CbE) devrait être réalisée sur *F. pubescens*. La comparaison avec *F. auricularia* permettrait d'évaluer le rôle des B-estérases dans les différences de sensibilité vis à vis des pesticides OP.

Dans nos études, nous avons vu qu'il existe un impact de certains produits phytosanitaires sur le forficule, au niveau cellulaire sur les B-estérases, au niveau du comportement sur sa capacité prédatrice, au niveau de l'individu sur sa reproduction et au niveau des populations présentes en vergers. Ces résultats devraient permettre de faire des recommandations en ce qui concerne les pesticides à favoriser en PFI pour protéger les auxiliaires. Ils pourraient également venir compléter les tests qui sont mis en place pour l'obtention de l'AMM mais alors un lourd travail de validation/normalisation est à prévoir. Dans ces procédures d'AMM, il serait judicieux d'utiliser des modèles capables de prendre en compte l'environnement des sites traités, la faune auxiliaire présente sur ces sites pour les épargner et les mélanges de substances qui peuvent se retrouver en même temps sur les parcelles traitées. Il serait également bien que les résultats de toxicité obtenus pour obtenir l'AMM soient tous librement accessibles.

Actuellement, il est nécessaire de continuer la vulgarisation des résultats sur la toxicité des pesticides auprès des utilisateurs pour qu'ils soient conscients des effets sur les organismes non-cibles. Il est vraisemblable qu'ils soient alors intéressés par l'utilisation des méthodes alternatives.

Bibliographie

A

-
- Addison R.F. 1996. The use of biological effects monitoring in studies of marine pollution. *Environmental Reviews* 4 (3): 225–237.
- Albouy V., Caussanel C. 1990. Dermaptères ou perce-oreilles. Faune de France, 75. Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles, Paris, France, 245 pp.
- Aldridge W.N., 1953. Serum esterases I. *Biochem. J.* 53, 110-117.
- Allon N., Raveh L., Gilat E., Cohen E., Grunwald J., Ashani Y. 1998. Prophylaxis against soman inhalation toxicity in guinea pigs by pre-treatment alone with human serum butyrylcholinesterase. *Toxicol. Sci.* 43, 121-128.
- Altieri MA. 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. In: Elsevier editor. *Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes*. Amsterdam. p. 19–31.
- Amichot M. 1999. Effet des insecticides sur les capacités d'adaptation et de reproduction des insectes. Recherche dans le domaine des risques et des pollutions. Colloque de restitution INERIS, Avignon 14 15 16 Novembre 2005.
- Asante S.K. 1997. Natural enemies of the woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) (Hemiptera: Aphididae): A review of the world literature. *Plant Protection Quarterly* 12 (4): 166–172.
- Aubertot J.N., Barbier J.M., Carpentier A., Gril J.J., Guichard L., Lucas P., Savary S., Voltz M. 2005. Pesticide, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Rapport d'expertise INRA CEMAGREF, Quae.
- Azevedo-Pereira H.M.V.S., Lemos M.F.L., Soares A.M.V.M. 2011. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* meigen larvae: linking acetylcholinesterase activity to behaviour. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1210-1215.

B

- Badji C.A., Guedes R.N.C., Silva A.A., Araújo R.A. 2004 Impact of deltamethrin on arthropods in maize under conventional and no-tillage cultivation. *Crop Protection* 23, 1031–1039
- Bahlai C.A., Xue Y., McCreary C.M., Schaafsma A.W., Hallett R.H. 2010 Choosing organic pesticides over synthetic pesticides may not effectively mitigate environmental risk in soybeans. *PLoS ONE* 5, e11250
- Barata C., Solayan A., Porte C. 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 66, 125-139.
- Barbosa P. 1999. Conservation Biological Control. Academic Press. San Diego, USA.
- Behura B.K. 1950. Life-history of the European earwig, *Forficula auricularia*. *Nature* 166 (4210).
- Behura B.K. 1956. The biology of the European earwig, *Forficula auricularia* L. *Annals of Zoology* 1: 117–142.
- Bengtsson J., Ahnström J., Weibull A.C. 2005. The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: A meta-analysis. *Journal of Applied Ecology* 42 (2): 261–269.
- Bianchi FJJA, Booij CJH, Tscharntke T. 2006. Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 273 (1595): 1715–1727.
- Billoir E., Péry A.R.R., Charles S. 2007. Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: A combination of the debtox and matrix population models. *Ecological Modelling* 203 (3–4): 204–14.
- Biondi A., Desneux N., Siscaro G., Zappalà L. 2012. Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. *Chemosphere* 87, 803–812
- Blancou J. 1995. Les méthodes de désinfection de l'antiquité à la fin du XVIIIe siècle. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 14 (1): 21–30.
- Blommers L.H.M., Helsen H.H.M., Vaal F.W.N.M. 2004. Life history data of the rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea* (Pass.) (Homopt., Aphididae) on plantain and as migrant to apple. *Journal of Pest Science* 77, 155–163
- Borioli P., Filleron E., Géa A., Hucbourg B., Libourel G., Masson R., Mouiren C., et al. 2013. Guide de protection fruitière intégrée. Objectifs Info Arbo.

- Bouvier J.C., Toubon J.F., Boivin T., Sauphanor B. 2005. Effects of apple orchard management strategies on the great tit (*Parus major*) in Southeastern France. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (11): 2846–52.
- Bouvier J.C., Ricci B., Agerberg J., Lavigne C. 2011. Apple orchard pest control strategies affect bird communities in southeastern France. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30 (1): 212–219.
- Bradley S.J., Mayer D.F. 1994. European earwig control. In *Arthropod management test book series*, 20:1–43.
- Brun L., Didelot F., Parisi L. 2008. Stratégies innovantes contre la tavelure du pommier. Conception, évaluation et intégration en vergers à l'INRA: Sept Ans D'expérimentation. *Phytoma*, no. 612: 10–15.
- Bunyan P.J., Jennings D.M. 1968. Organophosphorus poisoning : some properties of avian esterase. *J. Agricult. Food Chem.* 16, 326-331.
- Burgerjon A. 1956. Pulvérisation et poudrage au laboratoire par des préparations pathogènes insecticides. *Annales Epiphyties* 7, 677–686.
- Burnip G.M., Daly J.M., Hackett J.K., Suckling D.M. 2002. European earwig phenology and effect of understorey management on population estimation. *Horticultural Entomology* 55: 390–395.
- Butault J.P., Delame N., Jacquet F., Zardet G. 2011. L'utilisation des pesticides en France: État des lieux et perspectives de réduction. 35. Notes et études socio-économiques.
- Buxton J.H. 1974. The biology of the European earwig, *Forficula auricularia* L., with reference to its predatory activities on the damson-hop aphid, *Phorodon humuli* (Shrank). Thèse de doctorat University of London, Angleterre.
- Buxton J.H., Madge D.S. 1976. The evaluation of the European earwig (*Forficula auricularia*) as a predator of the damson-hop aphid (*Phorodon humuli*). I. Feeding experiments. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 19 (2): 109–114.

C

-
- Calow P., Forbes V.E. 2003. Does ecotoxicology inform ecological risk assessment? *Environmental Science and Technology*, 146–151.
- Campos M.R., Picanço M.C., Martins J.C., Tomaz A.C., Guedes R.N.C., 2011. Insecticide selectivity and behavioral response of the earwig *Doru luteipes*. *Crop Prot.* 30, 1535-1540.

- Capowiez Y., Rault M., Mazzia C., Belzunces L. 2003. Earthworm behaviour as a biomarker – a case study using imidacloprid. *Pedobiologia* 47, 542–547.
- Capowiez Y., Dittbrenner N., Rault M., Triebkorn R., Hedde M., Mazzia C. 2010. Earthworm cast production as a new behavioural biomarker for toxicity testing. *Environmental Pollution* 158 (2): 388–393.
- Capowiez Y. 2013. Agronomical and environmental impacts of a protection method: the enclosure netting Alt'Carpo". Rapport final d'activités Ministère/ADEME/ONEMA. INRA.
- Caquet T. 2012. Evaluation Des risques et écotoxicologie : le cas des pesticides. *Innovations Agronomiques* 23: 29–54.
- Carde R.T, Minks A.K. 1995. Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. *Annual Review of Entomology* 40 (1): 559–585.
- Carr R.L., Chambers J.E., 1991. Acute effects of the organophosphate paraoxon on schedule-controlled behaviour and esterase activity in rats : dose-response relationships. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40: 929-936.
- Carroll D.P., Hoyt S.C. 1984. Augmentation of European earwigs (Dermaptera: Forficulidae) for biological control of apple aphid (Homoptera: Aphididae) in an apple orchard. *Journal of Economic Entomology* 77 (3): 738–740.
- Carson R. 1962. Silent Spring. Ed. Houghton Mifflin.
- Caselli F., Gastaldi L., Gambi N., Fabbri E., 2006. *In vitro* characterization of cholinesterases in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 143, 416-421.
- Caussanel C. 1966. Etude du développement larvaire de *Labidura riparia* (Dermaptère : Labiduridae). *Annales de la Société Entomologique de France (N.S.)*, 11 (2), 469-498.
- Chanda S.M., Mortensen S.R., Moser V.C., Padilla S. 1997. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an *in vitro* and *in vivo* comparison. *Fundam. Appl. Toxicol.* 38, 148-157.
- Chisholm P., Gardiner M., Moon E., Crowder D.W. 2014. Tools and techniques for investigating impacts of habitat complexity on biological control. *Biological Control* In Press.
- Cisneros J., Goulson D., Derwent L.C., Penagos D.I., Hernández O., Williams T. 2002. Toxic effects of spinosad on predatory insects. *Biological Control* 23 (2): 156–63.
- Codron J.M., Habib R., Jacquet F., Sauphanor B. 2003. Bilan et perspectives environnementales de la filière arboriculture fruitière. In : Dron Eds. Agriculture,

territoire, environnement dans les politiques européennes. Dossier de l'environnement de l'INRA 23. INRA, Paris

- Coppin C.W., Jackson C.J., Sutherland T., Hart P.J., Devonshire A.L., Russell R.J., Oakeshott J.G. 2012. Testing the evolvability of an insect carboxylesterase for the detoxification of synthetic pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42 (5): 343–352.
- Costamagna A.C., van der Werf W., Bianchi F.J.J.A., Landis D.A. 2007. An exponential growth model with decreasing r captures bottom-up effects on the population growth of *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae). *Agricultural and Forest Entomology* 9, 297-305.
- Cribari-Neto, F., A. Zeileis. 2010. Beta Regression in R. *Journal of Statistique Software* 34 (2): 1–24.
- Crowder D.W., Northfield T.D., Strand M.R., Snyder W.E. 2010. Organic agriculture promotes evenness and natural pest control. *Nature* 466 (7302): 109–U123.

D

-
- Dauta-Dupuy M. 1978. Contribution à l'étude d'un Dermaptère méditerranéen: *Eurobellia moesta* (Gené) (Carcinophoridae); recherches biologiques et autoécologiques. Thèse de doctorat, Université Toulouse.
- Debras J.F. 2007. Rôles fonctionnels des haies dans la regulation des ravageurs : Le cas du psylle *Cacopsylla pyri* L. dans les vergers du Sud-Est de la France. Thèse de doctorat Université d'Avignon, France.
- Debras JF, Dussaud A, Rieux R, Dutoit T. 2007. Recherche prospective sur le rôle « source » des haies en production fruitière intégrée. Le cas des perce-oreilles : *Forficula auricularia* L. et *Forficula pubescens* Gené. *Comptes Rendus Biologies* 330 (9): 664–673.
- De Castro A.A., Corrêa A.S., Legaspi J.C., Guedes R.N.C., Serrão J.E., Zanuncio J.C. 2013. Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere* 93, 1043–1050
- Dedourge-Geffart O., Palais F., Geffard A., Amiard-Triquet C. 2012. Chapitre 11. Origin of energy metabolism impairments. In : *Ecological biomarkers – indicators of ecotoxicological effects*. Amiard-Triquet C., Amiard J.C., Rainbow P. eds, CRS Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Dell'Omo G. 2002. *Behavioural ecotoxicology*. John Wiley & Sons.

- Deng L., Dai J., Cao H., Xu M. (2007) Effects of methamidophos on the predating behavior of *Hylyphantes graminicola* (Sundevall) (Araneae: Linyphiidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 478–482.
- Denoyelle R, Rault M, Mazzia C, Mascle O, Capowiez Y. 2007. Cholinesterase activity as a biomarker of pesticide exposure in *Allolobophora chlorotica* earthworms living in apple orchards under different management strategies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (12): 2644–2649.
- Desneux N., Rafalimanana H., Kaiser L. 2004. Dose–response relationship in lethal and behavioural effects of different insecticides on the parasitic wasp *Aphidius ervi*. *Chemosphere* 54, 619–627.
- Desneux N., Decourtye A., Delpuech J.M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81-106.
- Dib H. 2010. Rôle des ennemis naturels dans la lutte biologique contre le puceron cendre, *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera: Aphididae) en vergers de pommiers. Thèse de doctorat Université d'Avignon, France.
- Dib H., Simon S., Sauphanor B., Capowiez Y. 2010. The role of natural enemies on the population dynamics of the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera : Aphididae) in organic apple orchards in south-eastern France. *Biol. Control* 55, 97-109.
- Dib H, Sauphanor B, Capowiez Y. 2010. Effect of codling moth exclusion nets on the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea*, and its control by natural enemies. *Crop Protection* 29 (12): 1502–1513.
- Dib H., Jamont M., Sauphanor B., Capowiez Y. 2011. Predation potency and intraguild interactions between generalist (*Forficula auricularia*) and specialist (*Episyrphus balteatus*) predators of the rosy apple aphid (*Dysaphis plantaginea*). *Biological Control* 59, 90–97.
- Directive 91/414/CEE du Conseil du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. *Journal Officiel* L 230 du 19.8.1991.
- Directives Techniques OILB III. 2002. “Directives pour la production intégrée de fruits à pépins.” *Guidelines for Integrated Production of Pome Fruits* 25 (8). IOBC/wprs Bull. 37–45.
- Domingues I., Agra A.R., Monaghan K., Soares A.M.V.M., Nogueira A.J.A. 2010. Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 5-18.

Dulin F., Halm-Lemeille M.P., Lozano S., Lepailleur A., Sopkova-de Oliveira Santos J., Rault S., Bureau R. 2012. Interpretation of honeybees contact toxicity associated to acetylcholinesterase inhibitors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79 (May): 13–21.

E

Ellman L., Courtney K.D., Andreas Jr. V., Feartherstone R.M. 1961. A new rapid colorimetric determination of cholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.

Environmental Protection Agency (EPA) 2012. <http://www.eap.org>. Accessed 23 July 2012.

Epstein D.L., Zack R.S., Brunner J.F., Gut L., Brown J.J. 2000. Effects of broad-spectrum insecticides on epigeal arthropod biodiversity in pacific northwest apple orchards. *Environmental Entomology* 29 (2): 340–48.

European Commision, 1998. Directive 98/8/EC of the European Parliament and the Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocides products on the market. Official Journal of the European Union L123/1.

European Commision, 2009. Regulation (EC) N° 1107/2009 of the European parliament and the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Official journal of the European Union L 309:1-50.

F

FAO. 2002. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Rome). International code of conduct on the distribution and use of pesticides. 38 pp.

Fenoglio M.S., Trumper E.V. 2007. Influence of weather conditions and density of *Doru luteipes* (Dermaptera: Forficulidae) on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) egg mortality. *Environmental Entomology* 36, 1159–1165.

Ffrench-Constant R.H., Vickerman G.P. 1985. Soil contact toxicity of insecticides to the European earwig *Forficula auricularia* [Dermaptera]. *Entomophaga* 30, 271–278.

Fogel M.N., Schneider M.I., Desneux N., Gonzalez B., Ronco A.E. 2013. Impact of the neonicotinoid acetamiprid on immature stages of the predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecotoxicology* 22, 1063–1071.

Fontanetti CS, Nogarol LR, de Souza RB, Perez DG, Maziviero GT. 2011. Bioindicators and biomarkers in the assessment of soil toxicity. In S Pascucci InTech editor. Soil Contamination p. 143-168.

- Forbes V.E., Palmqvist A., Bach L. 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25 (1): 272–280.
- Fournier J. 2007. Naissance de la protection chimique des cultures. In *Pesticides: Impacts Environnementaux, Gestion et Traitements*, 11–27. Presses Ponts et Chaussées.
- Frasco M.F., Fournier D., Carvalho F., Guilhermino L. 2006. Cholinesterase from the common prawn (*Palaemon serratus*) eyes: catalytic properties and sensitivity to organophosphate and carbamate compounds. *Aquat. Toxicol.* 77, 412–421.

G

-
- Gagnaire B., Geffard O., Xuereb B., Margoum C., Garric J. 2008. Cholinesterase activities as potential biomarkers: characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). *Chemosphere* 71 (3): 553–560.
- Gao J.R., Rao V., Wilde G.E., Zhu K.Y. 1998. Purification and kinetic analysis of acetylcholinesterase from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 39, 118–125.
- García-de la Parra L.M., Bautista-Covarrubias J.C., Rivera-de la Rosa N., Betancourt-Lozano M., Guilhermino L. 2006. Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65, 372–380.
- Gobin B., Marien A., Davis S., Leirs H. 2006. Enhancing earwig populations in Belgian orchards. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 71: 269–273.
- Gobin B., Peusens G., Moerkens R., Leirs H. 2008. Understanding earwig phenology in top fruit orchards. In *Ecofruit - 13th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing: Proceedings to the Conference from 18th February to 20th February 2008 at Weinsberg/Germany*, 208–212.
- Gomez Y., Koelliker M. 2013. Maternal care, mother-offspring aggregation and age-dependent coadaptation in the European earwig. *Journal of Evolutionary Biology* 26 (9): 1903–1911.
- Gomori G., 1953. Human esterases. *J. Lab. Clin. Med.* 42, 445–453.

- Guillet S., Josselin N., Vancassel M. 2000. Multiple introductions of the *Forficula auricularia* species complex (Dermaptera: Forficulidae) in Eastern North America. Canadian Entomologist 132 (1): 49–57.
- Gupta S.C., Sharma A., Mishra M., Mishra R.K., Chowdhuri D.K. 2010. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? Life Sciences 86 (11–12): 377–84.

H

-
- Hansen M.R., Sigsgaard L., Braun P. 2006. Earwig in pome fruit production - a beneficial? In Present and Near Future, 119:279–282.
- Haubruge E., Amichot M. 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2 (3): 161–74.
- He Y., Zhao J., Zheng Y., Desneux N., Wu K. 2012. Lethal effect of imidacloprid on the coccinellid predator *Serangium japonicum* and sublethal effects on predator voracity and on functional response to the whitefly *Bemisia tabaci*. Ecotoxicology 21, 1291–1300.
- Helsen H., Vaal F., Blommers L. 1998. Phenology of the common earwig *Forficula auricularia* L. (Dermaptera: Forficulidae) in an apple orchard. International Journal of Pest Management 44 (2): 75–79.
- Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S., Decourtye A. 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. Science 336, 348–350.
- Hill E.F., Fleming W.J. 1982. Anticholinesterase poisoning of birds: field monitoring and diagnosis of acute poisoning. Environmental Toxicology and Chemistry 1 (1): 27–38.
- Hole DG, Perkins AJ, Wilson JD, Alexander IH, Grice F, Evans AD. 2005. Does organic farming benefit biodiversity? Biological Conservation 122 (1): 113–130.

I

-
- ITAB. 2011. Guide des intrants utilisables en agriculture biologique en France. Source e-phy.

J

- Jacquet F., Butault J.P., Guichard L. 2011. An economic analysis of the possibility of reducing pesticides in French field crops. *Ecological Economics* 70 (9): 1638–1648.
- Jeannequin B., Dosba F., Plénet D., Pitrat M., Chauvin J.E. 2011. Vers des cultures fruitières et légumières à hautes performances environnementales. *Innovations Agronomiques* 12: 73–85.
- Johnson G., Moore S.W. 2012. The carboxylesterase/cholinesterase gene family in invertebrate Deuterostomes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 7 (2): 83–93.
- Jørgensen LN. Denmark's action plans for pesticides: status and role of research. 1999. *Nordisk Jordbrugsforskning* (81): 201–202.
- Junges C.M., Lajmanovich R.C., Peltzer P.M., Attademo A.M. 2010. Predator-prey interactions between *Synbranchus marmoratus* (Teleostei: Synbranchidae) and *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Amphibia: Hylidae): Importance of lateral line in nocturnal predation and effects of fenitrothion exposure. *Chemosphere* 81, 1233-1238.

K

- Kaiser J. 2001. Bioindicators and biomarkers of environmental pollution and risk assessment. Ed. Science publishers. 204 pp.
- Kammenga JE, Dallinger R, Donker MH, Köhler HR, Simonsen V, Triebkorn R, Weeks JM. 2000. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 164: 93–147.
- Kang J.S., Moon Y.S., Lee S.H. 2012. Inhibition properties of three acetylcholinesterases of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by organophosphates and carbamates. *Pest. Biochem. Physiol.* 104, 157-162.
- Kocarek P. 1998. Life cycles and habitat associations of three earwig (Dermaptera) species in lowland forest and its surroundings. *Biologia* 53 (2): 205–11.
- Koehler H.R., Triebkorn R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341, 759–765.
- Kölliker M., Vancassel M. 2007. Maternal attendance and the maintenance of family groups in common earwigs (*Forficula auricularia*): a field experiment. *Ecol. Entomol.* 32, 24-27.
- Kölliker M. 2007. Benefits and costs of earwig (*Forficula auricularia*) family life. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61 (9): 1489–1497.

Kooijman S.A.L.M., Bedaux J.J.M. Analysis of toxicity tests on *Daphnia* survival and reproduction. Water Research, 1996.

L

Lagadic L., Amiard J.C., Caquet T. 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In Biomarqueurs En Écotoxicologie : Aspects Fondamentaux, Masson, 1–9. Paris.

Laguerre C., Sanchez-Hernandez J.C., Köhler H.R., Triebkorn R., Capowiez Y., Rault M., Mazzia C. 2008. B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure. Environ. Pollut. 157, 199–207.

Lamb R.J. 1975. Effects of dispersion, travel, and environmental heterogeneity on populations of the earwig *Forficula auricularia* L. Canadian Journal of Zoology 53 (12): 1855–1867.

Lamb R.J., Wellington W.G. 1975. Life history and population characteristics of the European earwig *Forficula auricularia* (Dermaptera: Forficulidae), at Vancouver British Columbia. Canadian Entomologist 107: 819–824.

Lamb R.J. 1976. Parental behavior in the Dermaptera with special reference to *Forficula auricularia* (Dermaptera: Forficulidae). The Canadian Entomologist 108 (06): 609–619.

Landis D.A., Wratten S.D., Gurr G.M. 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. Annual Review of Entomology 45 (1): 175–201.

Lang G.J., Zhang X.H., Zhang M.Y., Zhang C.X. 2010. Comparison of catalytic properties and inhibition kinetics of two acetylcholinesterases from a Lepidopteran insect. Pesticide Biochemistry and Physiology 98 (2): 175–182.

Lenfant C., Sauphanor B. 1992. Earwig in orchards: what for? Phytoma 445, 44–52.

Little E.E., Finger S.E. 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. Environmental Toxicology and Chemistry 9, 13–19.

Logan D.P., Maher B.J., Connolly P.G. 2011. Increased numbers earwigs (*Forficula auricularia*) in kiwifruit orchards are associated with fewer broad-spectrum sprays. New Zealand Plant Protection 64: 49–54.

Longcore T. 2003. Terrestrial arthropods as indicators of ecological restoration success in coastal sage scrub (California, USA). Restoration Ecology 11 (4): 397–409.

Lopes C., Péry A.R.R., Chaumot A., Charles S. 2005. Ecotoxicology and population dynamics: using DEBtox models in a Leslie modeling approach. *Ecological Modelling* 188 (1). Special Issue on Theoretical Ecology and Mathematical Modelling: Problems and Methods: 30–40.

M

Madden P. 1988. Low-Input/Sustainable agricultural research and education—challenges to the agricultural economics profession. *American Journal of Agricultural Economics* 70 (5): 1167–1172.

Maher B.J., Logan D.P., Connolly P.G. 2006. Effect of mineral oil and diazinon residues on the predator european earwig, *Forficula auricularia*, in kiwifruit. *New Zealand Plant Protection* 59: 202–207.

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. *Journal of Applied Entomology* 132 (1): 26–35.

Markó V., Jenser G., Kondorósy E., Ábrahám L., Balázs K. 2013. Flowers for better pest control? The effects of apple orchard ground cover management on green apple aphids (*Aphis* Spp.) (Hemiptera: Aphididae), their predators and the canopy insect community. *Biocontrol Science and Technology* 23 (2): 126–145.

Markwell M.A.K., Hass S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206–210.

Martinou A.F., Seraphides N., Stavrinides M.C. 2014. Lethal and behavioral effects of pesticides on the insect predator *Macrolophus pygmaeus*. *Chemosphere* 96, 167–173.

Mas F., Kölliker M. 2008. Maternal care and offspring begging in social insects: chemical signalling, hormonal regulation and evolution. *Animal Behaviour* 76 (4): 1121–1131.

Mas F., Haynes K.F., Koelliker M. 2009. A chemical signal of offspring quality affects maternal care in a social insect. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276 (1668): 2847–2853.

Mas F., Koelliker M. 2011a. Differential effects of offspring condition-dependent signals on maternal care regulation in the European earwig. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 65 (2): 341–349.

Mas F., Koelliker M. 2011b. An offspring signal of quality affects the timing of future parental reproduction. *Biology Letters* 7 (3): 352–54.

- Massoulié J.M., Pezzementi L., Bon S., Krejci E., Valette F.M. 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 41, 31-91.
- Maxwell D.M. 1992. The Specificity of Carboxylesterase Protection against the Toxicity of Organophosphorus Compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology* 114 (2): 306–312.
- Maxwell D.M., Brecht K.W. 2001. Carboxylesterase: specificity and spontaneous reactivation of an endogenous scavenger for organophosphorus compounds. *J. Appl. Toxicol.* 21, S103-S107.
- Medina M.H., Correa J.A., Barata C. 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere*, 67, 2105- 2114.
- Melvin S.D., Wilson S.P. 2013. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis. *Chemosphere* 93, 2217–2223.
- Meunier J., Koelliker M. 2012. When it is costly to have a caring mother: food limitation erases the benefits of parental care in earwigs. *Biology Letters* 8 (4): 547–550.
- Meunier J., Wong J.W.Y., Gomez Y., Kuttler S., Roellin L., Stucki D., Koelliker M. 2012. One clutch or two clutches? Fitness correlates of coexisting alternative female life-histories in the European earwig. *Evolutionary Ecology* 26 (3): 669–682.
- Miles M., Dutton R. 2003. Testing the effects of spinosad to predatory mites in laboratory extended laboratory, semi-field and field studies. *IOBC/wprs Bull.* 26, 9–20.
- Miñarro M., Hemptinne J.L., Dapena E. 2005. Colonization of apple orchards by predators of *Dysaphis plantaginea*: Sequential arrival, response to prey abundance and consequences for biological control. *BioControl* 50 (3): 403–414.
- Moerkens R., Leirs H., Peusens G., Gobin B. 2009. Are populations of European earwigs, *Forficula auricularia*, density dependent? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 130 (2): 198–206.
- Moerkens R. 2010. A study on the population dynamics of earwigs: Why do population sizes vary? Thèse de doctorat Université Antwerpen, Belgique.
- Moerkens R. Leirs H., Peusens G., Gobin B. 2010. Dispersal of Single- and Double-Brood populations of the European earwig, *Forficula auricularia*: A mark-recapture experiment. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 137 (1): 19–27.
- Moerkens R., Gobin B., Peusens G., Helsen H., Hilton R., Dib H., Suckling D.M., Leirs H. 2011. Optimizing biocontrol using phenological day degree models: The European earwig in pipfruit orchards. *Agricultural and Forest Entomology* 13 (3): 301–312.

- Moerkens R, Leirs H, Peusens G, Belien T, Gobin B. 2012. Natural and human causes of earwig mortality during winter: temperature, parasitoids and soil tillage. *Journal of Applied Entomology* 136 (7): 490–500.
- Monteiro M., Quintaneiro C., Morgado F., Soares A.M.V.M., Guilhermino L. 2005. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 62, 341-347.
- Mortensen S.R., Brimijoin S., Hooper M.J., Padilla S. 1998. Comparison of the in vitro sensitivity of rat acetylcholinesterase to chlorpyrifos-oxon: what do tissue IC₅₀ values represent? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148, 46-49.
- Mueller T.F., Blommers L.H.M., Mols P.J.M. 1988. Earwig (*Forficula auricularia*) predation on the woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum*.” *Entomologia Experimentalis et Applicata* 47 (2): 145–152.
- Myczko Ł., Rosin Z.M., Skórka P., Wylegała P., Tobolka M., Fliszkiewicz M., Mizera T., Tryjanowski P. 2013. Effects of Management Intensity and Orchard Features on Bird Communities in Winter. *Ecological Research* 28 (3): 503–512.

N

-
- Nicholas A.H., Thwaite W.G. 2003. Toxicity of chemicals commonly used in Australian apple orchards to the European earwig *Forficula auricularia* L. (Dermaptera: Forficulidae). *General and Applied Entomology* 32: 9–12.
- Nicholas A.H., Spooner-Hart R.N., Vickers R.A. 2005. Abundance and natural control of the woolly aphid *Eriosoma lanigerum* in an Australian apple orchard IPM program. *BioControl* 50 (2): 271–91.
- Nunes B. 2011. The use of cholinesterase in ecotoxicology. *Rev. Environ.Contam. Toxicol. Rev.* 212: 29-59.

O

-
- Oakeshott J.G., Claudianos C., Campbell P.M., Newcomb R.D., Russell R.J. 2005. Biochemical genetics and genomics of insect esterases. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, edited by Editors-in-Chief: Lawrence I. Gilbert, Kostas Iatrou, and Sarjeet S. Gill, 309–381. Amsterdam: Elsevier.

Observatoire des Résidus de Pesticides. Site internet www.observatoire-pesticides.gouv.fr

Otieno M., Woodcock B.A., Wilby A., Vogiatzakis I.N., Mauchline A.L., Gikungu M.W., Potts S.G. 2011. Local management and landscape drivers of pollination and biological control services in a Kenyan agro-ecosystem. *Biological Conservation* 144 (10): 2424–31.

P

Peakall D. 1992. *Animal biomarkers as pollution indicators*. Chapman & Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.

Pelosi C., Toutous L., Chiron F., Dubs F., Hedde M., Muratet A., Ponge J.F., Salmon S., Makowski D. 2013. Reduction of pesticide use can increase earthworm populations in wheat crops in a European temperate region. *Agriculture Ecosystems & Environment* 181 (December): 223–30.

Peusens and Gobin 2008 IOBC/WPRS Bulletin. Volume: 35 Pages: 40-43. Published: 2008

Peusens G., Moerkens R., Belien T., Gobin B. 2009. Side effects of plant protection products and biological interactions on the European earwig *Forficula auricularia* L. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 74 (2).

Phillips M.L. 1981. *The ecology of the common earwig Forficula auricularia in apple orchards*. Thèse de doctorat Bristol University, Angleterre.

Pimentel D. 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 8 (1): 17–29.

Piñol J., Espadaler X., Cañellas N., Pérez N. 2009. Effects of the concurrent exclusion of ants and earwigs on aphid abundance in an organic citrus grove. *BioControl* 54 (4): 515–527.

Piñol J., Espadaler X., Pérez N., Beven K. 2009. Testing a new model of aphid abundance with sedentary and non-sedentary predators. *Ecological Modeling* 220 (19): 2469–2480.

Pont D., Garric J. 2010. Quelles nouvelles perspectives pour évaluer la qualité des milieux aquatiques ? *Revue Sciences Eaux et Territoires*.

Posthuma L., Van Straalen N.M. 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: a review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 106 (1): 11–38.

Pundir C.S., Chauhan N. 2012. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: a review. *Analytical Biochemistry* 429 (1): 19–31.

R

-
- Rahmani S., Bandani A.R. 2013. Sublethal concentrations of thiamethoxam adversely affect life table parameters of the aphid predator, *Hippodamia variegata* (Goeze) (Coleoptera: Coccinellidae). *Crop Protection* 54, 168–175.
- Ramade F. 1992. Précis d'écotoxicologie. Paris: Masson.
- Ranke J. 2006. Fitting dose-response curves from bioassays and toxicity testing *R. News* 3, 7–12.
- Rankin S.M., Chambers J., Edwards J.P. 1997. Juvenile hormone in earwigs: Roles in oogenesis, mating, and maternal behaviors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 35 (4): 427–42.
- Rault M., Mazzia C., Capowiez Y. 2007. Tissue distribution and characterization of cholinesterase activity in six earthworm species. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 147, 340–346.
- Ricard J.M., Garçin A., Jay M., Mandrin J.F. 2012. Biodiversité et régulation des ravageurs en arboriculture fruitière. CTIFL.
- Rigby D., Cáceres D. 2001. Organic farming and the sustainability of agricultural systems. *Agricultural Systems* 68 (1): 21–40.
- Romeu-Dalmau C., Espadaler X., Piñol J. 2011. Abundance, interannual variation and potential pest predator role of two co-occurring earwig species in citrus canopies. *Journal of Applied Entomology* 136 (7): 501–509.
- Romeu Dalmau C. 2012. Friend or foe? the relative role of earwigs as pests versus biocontrol agents in citrus canopies. Thèse de doctorat Universitat Autònoma de Barcelona, Espagne.
- Romeu-Dalmau C., Piñol J., Espadaler X. 2012. Friend or foe? The role of earwigs in a Mediterranean organic citrus orchard. *Biol. Control* 63, (2): 143–149.
- Romeu-Dalmau C., Gu P., Scott S., Grafton-Cardwell B. 2012. Earwigs: pests or beneficials in California citrus orchards? *Citrograph* 3: 18–22.

S

-
- Salgado V.L. 1998. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 60, 91–102.

- Sanchez-Hernandez J.C., Mazzia C., Capowiez Y., Rault M. 2009. Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 150, 503-511.
- Sanchez-Hernandez J.C. 2011. Pesticide biomarkers in terrestrial invertebrates. In Dr M. Stoytcheva (Ed.), *Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*, InTech, pp. 213–240.
- Sansavini S. 1997. Integrated fruit production in Europe: research and strategies for a sustainable industry. *Scientia Horticulturae* 68 (1): 25–36.
- Sauphanor B., Blaisinger P., Kienlen J.P., Sureau F. 1990. Régulation Du Cycle Annuel de *Forficula auricularia* L. *Colloques de l'INRA* 52:69–72.
- Sauphanor B., Blaisinger P., Sureau F. 1992. Méthode de laboratoire pour évaluer l'effet des pesticides sur *Forficula auricularia* L. (Dermaptera: Forficulidae). *Bulletin OILB SROP* 15, 117–121.
- Sauphanor B. 1992. An aggregation pheromone in the European earwig *Forficula auricularia*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 62 (3): 285–291.
- Sauphanor B., Chabrol L., Faivre d'Arcier F., Sureau F., Lenfant C. 1993. Side effects of diflubenzuron on a pear psylla predator: *Forficula auricularia*. *Entomophaga* 38, 163–174.
- Sauphanor B., Sureau F. 1993 Aggregation behavior and interspecific relationships in Dermaptera. *Oecologia* 96, 360–364.
- Sauphanor B., Miniggio C, Faivre d'arcier F. 1993. Mean term effects of pesticides on beneficials in pear orchard - a field trial evaluation. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie* 116 (5): 467–478.
- Sauphanor B., Staübli A. 1994. Evaluation au champ des effets secondaires des pesticides sur *Forficula auricularia* et *Anthocoris nemoralis*: Validation des résultats de laboratoire. *OILB SROP* 17: 83–88.
- Sauphanor B., Lenfant C., Sureau F. 1995. Effects of a neem seed extract (azadirachta-indica a juss) on the development of the Dermaptera, *Forficula auricularia* L. *Journal of Applied Entomology* 119 (3): 215–19.
- Sauphanor B., Berling M., Toubon J.F., Reyes M., Delnatte J., Allemoz P. 2006. Carpcapse des pommes cas de résistance au virus de la granulose en vergers biologiques : Fruits et légumes. *Phytoma-La Défense des végétaux* 590, 24–27.

- Sauphanor B., Dirwimmer C. 2009. Analyse comparative de différents systèmes en arboriculture fruitière. Rapport d'expertise Tome IV. ECOPHYTO R&D: Vers Des Systèmes de Culture Économes En Produits Phytosanitaires. Inra ed.
- Sauphanor B., Severac G., Maugin S., Toubon J.F., Capowiez Y. 2012. Exclusion netting may alter reproduction of the codling moth (*Cydia pomonella*) and prevent associated fruit damage to apple orchards. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 1–9.
- Scott J.A., Plapp F.W., Bay D.E. 1997. Pyrethroid resistance associated with decreased biotic fitness in horn flies (Diptera: Muscidae). *Southwestern Entomologist* 22 (4): 405–10.
- Scott G.R., Sloman K.A. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369–392.
- Severac G., Romet L. 2008. Alt'Carpo, une alternative efficace. *Phytoma* 612: 16–20.
- Sharley DJ, Hoffmann AA, Thomson LJ. 2008. The effects of soil tillage on beneficial invertebrates within the vineyard. *Agricultural and Forest Entomology* 10 (3): 233 – 243.
- Shaw P.W., Wallis D.R. 2010. Susceptibility of the European earwig, *Forficula auricularia*, to insecticide residues on apple leaves. *New Zealand Plant Protection* 63: 55–59.
- Shepard M., Waddil V., Kloft W. 1973. Biology of the predaceous earwig *Labidura riparia* (Dermaptera: Labiduridae). *Annals of the Entomological Society of America* 66 (4), 837-841.
- Simon S., Lauri P.E., Brun L., Defrance H., Sauphanor B. 2006. Does manipulation of fruit-tree architecture affect the development of pests and pathogens? A case study in an organic apple orchard. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81 (4): 765–773.
- Simon S., Bouvier J.C., Debras J.F., Sauphanor B. 2010. Biodiversity and pest management in orchard systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30 (1): 139–152.
- Simon S., Brun L., Guinaudeau J., Sauphanor B. 2011. Pesticide use in current and innovative apple orchard systems. *Agronomy for Sustainable Development* 31 (3): 541–555.
- Simon S., Morel K., Durand E., Brevalle G., Girard T., Lauri P.E. 2012. Aphids at crossroads: When branch architecture alters aphid infestation patterns in the apple tree. *Trees* 26 (1): 273–282.

- Sogorb M.A., Vilanova E., 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* 128, 215-228.
- Solomon M.G., Cross J.V., Fitz Gerald J.D., Campbell C.A.M., Jolly R.L., Olszak R.W., Niemczyk E., Vogt H. 2000. Biocontrol of pests of apples and pears in Northern and Central Europe - 3. Predators. *Biocontrol Science and Technology* 10 (2): 91–128.
- SSP (Service de la Statistique et de la Prospective) – Agreste. 2012. Recensement Général de l'Agriculture 2010. Exploitations agricoles et vergers, Agreste 277
- Stark J.D., Banks J.E., Acheampong S. 2004. Estimating susceptibility of biological control agents to pesticides: influence of life history strategies and population structure. *Biological Control* 29, 392–398.
- Suckling D.M., Burnip G.M., Hackett J., Daly J.C. 2006. Frass sampling and baiting indicate European earwig (*Forficula auricularia*) foraging in orchards. *Journal of Applied Entomology* 130 (5): 263–267.
- Symondson W.O.C., Sunderland K.D., Greenstone M.H. 2002. Can generalist predators be effective biocontrol agents? *Annual Review of Entomology* 47, 561–594.

T

-
- Thompson H.M. 1999. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology* 8, 369-384.
- Thorin-Trescases N, Voghel G., Farhat N., Drouin A., Gendron M.E., Thorin E. 2010. Age et stress oxydant: Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale. *Medecine Sciences : M/S* 26 (10): 875–80.
- Tilton F.A., Bammler T.K., Gallagher E.P. 2011. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 153, 9–16.
- Tirello P., Pozzebon A., Duso C. 2013. The effect of insecticides on the non-target predatory mite *Kampimodromus aberrans*: Laboratory Studies. *Chemosphere* 93, 1139–1144.
- Toubon J.F., Sauphanor B., de Sainte Marie C., Plénet D., Habib R. 2001. Status of integrated production in French apple orchards. *Integrated Fruit Protection IOBC/wrps Bulletin* 24 (5): 27–31.
- Toutant J.P. 1989. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog. Neurobiol.* 32, 423-446.

- Triebskorn R. 2005. Biomarkers, bioindicators and the Trondheim biomonitoring system. Water Encyclopedia: Water Quality and Resource Development. John Wiley and Sons, Inc., NJ.
- Truhaut R. 1977. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. Ecotoxicology and Environmental Safety 1: 151–173.
- Tscharntke T., Bommarco R., Clough Y., Crist T.O., Kleijn D., Rand T.A., Tylianakis J.M., van Nouhuys S., Vidal S. 2007. Conservation biological control and enemy diversity on a landscape scale. Biological Control 43 (3): 294–309.

U

UIPP 2012. Rapport d'activité 2011. Direction de la communication de l'UIPP. 43p

V

-
- Vancassel M., Foraste M. 1980. Parental behavior in Dermaptera. Reproduction, nutrition, development 20 (3B): 759–770.
- Vancassel M. 1984. Plasticity and adaptive radiation of Dermapteran parental behavior: Results and perspectives. In Advances in the Study of Behavior, edited by Colin Beer Jay S. Rosenblatt, Volume 14:51–80. Academic Press.
- Vancassel M., Quris R. 1994. Differential release of diapause in the earwig *Forficula auricularia* as indicator of respective contribution of 2 cohorts to the reproductive generation. Acta Oecologica-International Journal of Ecology 15 (1): 63–70.
- Van der Werf HMG. 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. Agriculture, Ecosystems & Environment 60 (2–3): 81–96.
- Vioque-Fernández A., de Almeida E.A., López-Barea J. 2007. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol. 145, 404–412.
- Vogt H., Just J., Grutzmacher A. 2009. Side effects of modern insecticides in fruit growing on the European earwig, *Forficula auricularia*. Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie 17:211–214.
- Vogt H., Weigel A. 1999. Is it possible to enhance the biological control of aphids in an apple orchard with flowering strips? Bull. OILB/srop 22: 39–46.

W

-
- Wheelock C.E., Phillips B.M., Anderson B.S., Miller J.L., Miller M.J., Hammock B.D. 2008. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 195, 117-178.
- Weiss M.J., McDonald G. 1998. European earwig, *Forficula auricularia* L. (Dermaptera : Forficulidae), as a predator of the redlegged earth mite, *Halotydeus destructor* (Tucker) (Acarina : Pentheleidae). *Australian Journal of Entomology* 37 (July): 183–185.
- Whitehorn P.R., O'Connor S., Wackers F.L., Goulson D. 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336 (6079): 351–52.
- Wigfield D.C., Wright S.C., Chakrabarti C.L., Karwowska R. 1986. Evaluation of the relationship between chemical and biological monitoring of low-level lead poisoning. *Journal of Applied Toxicology* 6 (4): 231–235.
- Wirth T., Le Guellec R., Vancassel M., Veuille V. 1998. Molecular and reproductive characterization of two sibling species in the European earwig. *Evolution* 52 (1): 260–265.
- Wong J.W.Y., Koelliker M. 2012. The effect of female condition on maternal care in the European earwig. *Ethology* 118 (5): 450–459.
- Wong J.W.Y., Koelliker M. 2013. The more the merrier? Condition-dependent brood mixing in earwigs. *Animal Behaviour* 86 (4): 845–50.
- Worthington E.B. 1926. The life-cycle of *Forficula auricularia* Linn. *The Entomologist* 59: 138–142.
- Wyckhuys K.A.G., Robert J.O.N. 2006. Population dynamics of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera : Noctuidae) and associated arthropod natural enemies in honduran subsistence maize. *Crop Protection* 25 (11): 1180–90.
- Wyss E., Luka H., Pfiffner L., Schlatter C., Gabriela U., Daniel C. 2005. Approaches to pest management in organic agriculture: A case study in European apple orchards. In *Organic-Research* (May), 33–36.

Z

-
- Zehnder G., Gurr G.M., Kühne S., Wade M.R., Wratten S.D., Wyss E. 2007. Arthropod pest management in organic crops. *Annual Review of Entomology* 52: 57–80.