



**HAL**  
open science

# Acquisition d'une tolérance aux insecticides en vergers de pommiers et ses conséquences chez une espèce auxiliaire, le forficule *Forficula auricularia* L

Adrien Le Navenant

## ► To cite this version:

Adrien Le Navenant. Acquisition d'une tolérance aux insecticides en vergers de pommiers et ses conséquences chez une espèce auxiliaire, le forficule *Forficula auricularia* L. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2019. Français. NNT : 2019AVIG0354 . tel-02880079

**HAL Id: tel-02880079**

**<https://theses.hal.science/tel-02880079>**

Submitted on 24 Jun 2020

**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.



# Thèse de Doctorat d'Avignon Université

Ecole doctorale 536 : Sciences et Agrosciences

Spécialité : Biologie

Laboratoires

Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie marine et continentale

Institut National de la Recherche Agronomique

Présentée par :

**Adrien Le Navenant**

**Acquisition d'une tolérance aux insecticides en vergers de pommiers et ses conséquences chez une espèce auxiliaire, la forficule *Forficula auricularia* L.**

Soutenue le 28 Novembre 2019 devant le jury composé de :

Alain Pasquet	Chargé de Recherche HDR, Université de Lorraine	Rapporteur
Marie-Stéphane Tixier	Professeure, Montpellier SupAgro	Rapporteuse
Luc Belzunces	Directeur de Recherche HDR, INRA, Avignon	Examineur
Joël Meunier	Chargé de Recherche HDR, Université de Tours	Examineur
Florence Maunoury-Danger	Maître de conférences, Université de Lorraine	Invitée
Magali Rault	Maître de conférences HDR, Université d'Avignon	Directrice de thèse
Myriam Siegart	Ingénieure, INRA, Avignon	Co-encadrante



## Remerciements

C'est donc maintenant le moment de s'essayer à l'exercice tant délicat des remerciements. Au cours de ces 3 années de thèse de nombreuses personnes m'ont apportées du soutien sous diverses formes, je leur exprime ma profonde gratitude.

Je remercie la **SFR Tersys** pour avoir financé ma thèse, sans quoi rien de tout cela n'aurait été possible. Je remercie également la **fondation Rovaltain** pour le financement du projet I-ResPect auquel est associée ma thèse.

Je remercie **Luc Belzunces, Florence Maunoury-Danger, Joël Meunier, Alain Pasquet, Marie-Stéphane Tixier** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche, ainsi que **Yvan Capowiez, Axel Decourtye, Thomas Delattre et Joël Meunier** pour leurs conseils durant mes deux comités de thèse.

Je suis particulièrement reconnaissant envers mes directrices de thèses, **Magali Rault** et **Myriam Siegwart**. Je voudrais vous remercier de m'avoir accordé cette opportunité de réaliser une thèse et d'avoir eu confiance en moi. Vous m'avez tant appris durant ces 3 dernières années, chacune à votre manière, et je vous en suis extrêmement reconnaissant. A vous deux merci énormément.

Je suis reconnaissant envers tous **les membres de l'équipe IMBE – BES**, qui m'ont accueilli et aidé durant ces 3 dernières années, **Joffrey, Christophe, Virginie, Alain, Hugues** et particulièrement **Séverine Suchail**, pour ses conseils ainsi que son aide régulière au cours de ces trois années. Je remercie aussi **Virginie Montelle**, qui malgré ma fâcheuse tendance à prévenir au dernier moment, a toujours réussi à faire valider mes démarches administratives.

Je souhaiterais remercier **Yvan Capowiez** pour sa participation à l'ensemble de mes travaux. Je pense notamment à ces nombreux échanges relatifs au passionnant monde des statistiques et du langage R, ainsi qu'aux relectures de mes papiers/posters.

I would like to thank **all the team « Physiologische Ökologie der Tiere » of the university of Tübingen (Germany)**, that adopted me for two months, and especially **Heinz-R. Köhler** and **Rita Triebkorn** for the warm welcome and many advices provided. These two months have been very important for me and allowed me to overcome my difficulties of language. I make so many mistakes but now I talk! Thanks to **Andreas** for all the time that you spent to explain me the Hsp experimentation, and for your

help on many occasions. Thanks to **Lucas, Nils, Stefanie & Stefanie, Hannah, Katharina**. And Thanks for this Christmas party so crazy! You're great. Don't change.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers **l'équipe « ID » de l'institut Sophia Agrobiotech** (Sophia Agropolis, France) et particulièrement à **Gaëlle Le Goff** et **Thierry Fricaux** qui m'ont accueilli à deux reprises. Bien que ces séjours soient de courtes durées, ils m'ont apporté l'occasion de m'essayer à des expérimentations sur la génétique. Je vous en remercie grandement.

Parmi les nombreuses personnes que j'ai rencontré durant ces 3 années, je souhaiterais particulièrement remercier :

**Sandrine**, qui m'a énormément aidé et soutenu dans ma thèse et ce dès le tout début (dès le 1<sup>er</sup> jour je crois bien !). Ce fût aussi un grand plaisir que de compter plusieurs centaines d'œufs en ta compagnie ! Je te suis reconnaissant pour le temps et l'aide que tu m'as alloué pour les expérimentations. Merci aussi pour l'ensemble de ces moments détentes. Vivement la prochaine partie de « pandemic » ou du « 6 qui prend ! ».

**Corinne**, à peine arrivée dans l'équipe je crois que tu as directement été mise à contribution pour les expérimentations, je te suis très reconnaissant de toute l'aide que tu as apporté. C'est toujours un plaisir de travailler avec toi et ta bonne humeur ! Surtout reste comme tu es !

**Karine**, qui m'a entraîné dans des délires de courses sportives le matin à 6h. Ces moments ont été indispensables tout au long de ma thèse. Je te suis très reconnaissant pour l'ensemble colossale de « petits services » que tu m'as rendus, tu as le cœur sur la main, mais n'oublie pas d'en garder un morceau pour toi !

**Saad**, la première personne que je rencontre le matin à 7h, toi aussi tu es toujours prêt à rendre service, chose que tu as faite à de nombreuses reprises. Je t'en remercie.

L'ensemble des doctorants et anciens doctorants, parmi lesquels **Elodie, JB, Valou, Fatina, Anaïs, Emilie, Alice** et **Marie**, je vous remercie pour l'ensemble du temps passé avec vous et ces soirées animées. Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté un biologiste dans cet étage de chimistes ! C'était vraiment sympa, le livre d'or en témoigne ! Je remercie **Fatina** et **Marie**, de m'avoir accompagné à mes conférences, j'en garderai de super souvenir. Je tiens à remercier particulièrement **Elodie**, pour

répondre au téléphone quand ENGIE m'appelle ! Blague à part, merci à toi pour ton amitié et ton soutien durant ces trois années, et oui, j'avoue, je me suis ~~un peu,~~ ~~souvent,~~ énormément reposé sur toi pour les recherches administratives, je t'en suis reconnaissant ! Une dernière chose, merci aussi pour le gâteau au chocolat.

Enfin je terminerai en remerciant **Agathe** et **Chloé**, deux stagiaires que j'ai pu encadrer durant ces 3 années. Elles m'ont apporté une grande aide et j'en suis reconnaissant. **Chloé**, merci aussi pour ta bonne humeur durant ces nombreux jours d'expérimentations, il fallait bien ça pour avancer toujours plus vite !

A vous tous,

**Merci**



*A mes parents,*

*Qui m'ont toujours soutenu et qui ont tout fait  
pour me permettre d'aller plus loin*



# Sommaire, table des figures et tableaux

## 1 Sommaire

<i>Acquisition d'une tolérance aux insecticides en vergers de pommiers et ses conséquences chez une espèce auxiliaire, la forficule <i>Forficula auricularia</i> L.....</i>	<b>1</b>
<i>Remerciements .....</i>	<b>2</b>
<i>Sommaire, table des figures et tableaux.....</i>	<b>1</b>
<b>1</b> Sommaire .....	<b>1</b>
<b>2</b> Tableaux.....	<b>4</b>
<b>3</b> Figures.....	<b>5</b>
<b>4</b> Liste des abréviations :.....	<b>6</b>
<i>Résumé .....</i>	<b>7</b>
<i>Summary .....</i>	<b>8</b>
<i>Chapitre 1 : Introduction générale .....</i>	<b>9</b>
<b>1</b> Contexte général.....	<b>9</b>
<b>2</b> Les vergers de pommiers du Sud-Est de la France.....	<b>11</b>
2.1 Les principaux ravageurs en vergers de pommiers .....	<b>12</b>
2.1.1 Le puceron cendré.....	<b>13</b>
2.1.2 Le carpocapse des pommes .....	<b>14</b>
2.2 Les différents systèmes de production.....	<b>16</b>
2.2.1 L'agriculture biologique (AB).....	<b>16</b>
2.2.2 La production fruitière intégrée (PFI).....	<b>17</b>
2.2.3 L'agriculture conventionnelle (CONV).....	<b>18</b>
2.3 Des solutions alternatives aux pesticides .....	<b>18</b>
<b>3</b> Les produits phytosanitaires utilisés en vergers de pommiers .....	<b>19</b>
3.1 Les familles d'insecticides.....	<b>21</b>
3.1.1 Les organophosphorés : .....	<b>24</b>
3.1.2 Les Carbamates .....	<b>25</b>
3.1.3 Du pyrèthre aux pyrèthrinoïdes .....	<b>25</b>
3.1.4 Les néonicotinoïdes.....	<b>25</b>
3.2 Contamination des milieux et écotoxicologie .....	<b>26</b>
<b>4</b> Mécanismes de défense, résistance et tolérance aux insecticides.....	<b>30</b>
4.1 Résistance et tolérance aux insecticides .....	<b>30</b>

4.1.1	La résistance.....	30
4.1.2	La tolérance.....	37
4.2	Mécanismes de défense et coûts énergétiques .....	37
4.2.1	Les protéines de choc thermique (Hsps).....	37
4.2.2	Allocation des réserves et détournement pour la détoxication .....	39
<b>5</b>	<b><i>F. auricularia</i>, auxiliaire de culture dans les vergers de pommiers.....</b>	<b>40</b>
5.1	Biologie de <i>F. auricularia</i> .....	43
5.2	Impact des pesticides sur <i>F. auricularia</i> .....	44
	<b><i>Chapitre 2 : Objectifs de la thèse.....</i></b>	<b>46</b>
	<b><i>Chapitre 3 : Voies métaboliques et sensibilité de l'acétylcholinestérase impliquées dans la tolérance au chlorpyrifos-éthyl chez la forficule Forficula auricularia.....</i></b>	<b>48</b>
<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>49</b>
<b>2</b>	<b>Materials and methods .....</b>	<b>52</b>
2.1	Chemicals.....	52
2.2	Earwigs sampling and bio-tests .....	52
2.3	Sample preparation .....	54
2.4	Enzyme assays .....	54
2.5	In vitro acetylcholinesterase inhibition kinetics .....	55
2.6	Statistics.....	56
2.6.1	In vitro inhibition.....	56
2.6.2	Mortality and activities tests.....	56
2.6.3	Specificity of mortality data .....	56
<b>3</b>	<b>Results.....</b>	<b>56</b>
3.1	Mortality.....	56
3.2	Impact of chlorpyrifos-ethyl on metabolic pathways.....	57
3.3	Impact of chlorpyrifos-ethyl on acetylcholinesterase activity.....	59
<b>4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>61</b>
	<b><i>Chapitre 4 : Impacts des pratiques culturales sur les réserves énergétiques et les traits morphométriques chez F. auricularia.....</i></b>	<b>66</b>
<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>67</b>
<b>2</b>	<b>Materials and methods .....</b>	<b>69</b>
2.1	Chemical compounds .....	69
2.2	Characterization of crop management strategies in the apple orchards.....	69
2.3	Earwigs sampling .....	70

2.4	Morphometric measurements .....	70
2.5	Crude extract preparation .....	71
2.6	Biochemical measurement .....	71
2.6.1	Determination of glycogen content .....	71
2.6.2	Determination of lipid content .....	72
2.6.3	Determination of protein content.....	72
2.7	Statistical analysis.....	72
<b>3</b>	<b>Results.....</b>	<b>72</b>
3.1	Weight .....	73
3.2	Morphometric traits of <i>F. auricularia</i> depending on rearing conditions.....	74
3.3	Energetic reserves .....	77
<b>4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>78</b>
<b>Chapitre 5 : Rôle des Hsp70 dans la résistance/tolérance aux insecticides chez</b>		
<b><i>F. auricularia</i>.....</b>		<b>81</b>
<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>81</b>
<b>2</b>	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>82</b>
2.1	Matériel biologique .....	82
2.2	Biotest.....	83
2.3	Préparation des échantillons et dosage de l'activité AChE .....	83
2.3.1	Dosage de l'activité AChE.....	83
2.3.2	Dosage de la quantité d'Hsp70 .....	84
2.4	Statistiques .....	85
<b>3</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>86</b>
3.1	Mortalité.....	86
3.2	Activité de l'ACHE .....	86
3.3	Expression des Hsps .....	87
<b>4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>88</b>
<b>Chapitre 6 : Bilan de la thèse et perspectives .....</b>		<b>91</b>
<b>1</b>	<b>Bilan de la thèse.....</b>	<b>91</b>
<b>2</b>	<b>Perspectives .....</b>	<b>97</b>
<b>Bibliographie.....</b>		<b>100</b>
<b>Annexes.....</b>		<b>117</b>

## 2 Tableaux

<i>Tableau 1: Principaux ravageurs du pommier et les périodes de traitements</i> .....	14
<i>Tableau 2 : Matière active importée et surface agricole utilisée</i> .....	20
<i>Tableau 3: Quelques insecticides utilisés dans différentes familles chimiques</i> .....	23
<i>Tableau 4 : Activité des GSTs et des CbEs et résistances aux OPs</i> .....	36
<i>Tableau 5 : Les 5 familles d'Hsps</i> .....	38
<i>Tableau 6 : Nombre de traitements en vergers pommiers :</i> .....	53
<i>Tableau 7 : Specific activity of the protective metabolism</i> .....	57
<i>Tableau 8 : Susceptibility ratio of AChE</i> .....	60
<i>Tableau 9 : Ratio de croissance</i> .....	74

### 3 Figures

Figure 1 : Dégâts de <i>Dysaphis plantaginea</i> sur une feuille de pommiers.....	12
Figure 2 : Cycle de vie de <i>Dysaphis plantaginea</i> .....	13
Figure 3: Cycle de vie de <i>Cydia pomonella</i> .....	15
Figure 4 : Dégât de <i>Cydia pomonella</i> sur la pomme .....	15
Figure 5 : Verger de pommiers dans le Sud-est de la France.....	17
Figure 6 : Utilisation des PPS et traitements appliqués en arboriculture.....	21
Figure 7 : Les insecticides neurotoxiques et leurs cibles.....	22
Figure 8 : Interaction entre les B-estérases et les insecticides neurotoxiques.....	24
Figure 9 : Devenir des pesticides dans le sol (d'après Sanchez-Hernandez, 2011). .....	26
Figure 10 : Métabolisation du chlorpyrifos .....	28
Figure 11 : Schéma des différentes voies de métabolisation .....	29
Figure 12 : Calcul du facteur de résistance d'une population résistante.....	31
Figure 13 : Nombre d'espèces résistantes à au moins 1 insecticide.....	32
Figure 14 : Forficule présent dans les vergers .....	41
Figure 15 : Dimorphisme sexuel chez <i>F. auricularia</i> . .....	42
Figure 16 : Cycle de vie de <i>F. auricularia</i> . .....	44
Figure 17 : Publication n°1 .....	48
Figure 18 : Mortality of organisms.....	57
Figure 19 : Defense metabolism.....	58
Figure 20 : Specific activity of AChE.....	59
Figure 21 : Sensibilité de l'AChE in vitro .....	60
Figure 22 : Publication n°2 .....	66
Figure 23 : Treatment Frequency Index applied during 2015.....	73
Figure 24 : Body weight (g) of <i>F. auricularia</i> .....	74
Figure 25 : Width of telson .....	75
Figure 26: Morphometric traits of earwigs .....	76
Figure 27: Length of femur (mm) .....	76
Figure 28 : Energetic reserves of <i>F. auricularia</i> .....	77
Figure 29 : Mortalité (%) .....	86
Figure 30 : Activité de l'AChE.....	87
Figure 31 : Expression relative des Hsps.....	88
Figure 32 : Schéma bilan .....	95

#### 4 Liste des abréviations :

AChE	Acétylcholinestérase
AB	Agriculture Biologique
CbE	Carboxylestérase
Conv	Conventionnel
GST	Glutathion-S-transférase
Hsp	Heat shock proteins
Hsp70	Heat shock proteins 70 kDa
IFT	Indice de Fréquence de Traitements
OP	Organophosphorés
PFI	Production fruitière intégrée
PPS	Produits phytosanitaires
RLs	Niveau de résistance

## Résumé

Dans le contexte Européen visant la réduction de l'utilisation des pesticides, la connaissance des effets des insecticides sur les auxiliaires est une piste novatrice et prometteuse au développement de nouveaux programmes en Production Fruitière Intégrée (PFI). Prédateur généraliste la forficule (perce oreille), *Forficula auricularia* L., contribue à la lutte biologique grâce à son efficacité sur certains ravageurs tels que les pucerons en vergers de pommiers.

Les forficules sont prélevés dans des vergers de pommiers (PACA, France) conduits en agriculture biologique (AB), en Production Fruitière Intégrée (PFI), en agriculture conventionnelle ou dans des vergers ne recevant aucun traitement phytosanitaire. Nos résultats montrent que cet auxiliaire est capable de développer des mécanismes de tolérance à un insecticide organophosphoré (OP), le chlorpyrifos-éthyl. Après exposition au chlorpyrifos-éthyl à la dose autorisée en vergers, les organismes provenant d'un verger conduit en agriculture conventionnelle sont caractérisés par une faible mortalité. Cette diminution de la mortalité est expliquée par une activité élevée des glutathion-S-transférases et des carboxylestérases, deux enzymes impliquées dans les voies de détoxification, et par une diminution de la sensibilité de l'acétylcholinestérase (cible moléculaire des OP au niveau du système nerveux). L'étude de la sensibilité de l'AChE vis à vis des OP, montre une dichotomie entre les mâles plus sensibles et femelles plus résistantes.

Nous nous sommes également intéressés à l'induction des Hsp70 après exposition au chlorpyrifos, pour évaluer les mécanismes de défense cellulaire mis en place. Les résultats, malgré leur grande variabilité, soulignent la différence de sensibilité entre vergers, et entre sexes au sein du même verger. Il est connu que les mécanismes de défense génèrent un coût métabolique important. Nous avons donc analysé la quantité de réserves énergétiques (glucides, lipides et protéines) ainsi que certaines caractéristiques morphologiques chez *F. auricularia* selon le verger d'origine des forficules. Les perce-oreilles prélevés en vergers conventionnels sont généralement plus petits que ceux provenant des autres vergers. La quantité de réserves dépend des conditions environnementales liées à l'utilisation des pesticides et de la période de prélèvement des forficules en vergers. En particulier la quantité élevée de glycogène observée chez les femelles prélevées à l'automne (deux mois après la fin des traitements) dans les vergers conventionnels, est en accord avec une réallocation des réserves pour la reproduction.

Cette étude met en évidence pour la première fois l'acquisition de mécanismes de résistance chez la forficule fortement exposée aux insecticides en vergers conventionnels. Elle ouvre la voie à de nouvelles pistes de recherche sur l'apparition de cette résistance en fonction de la pression anthropique exercée sur un auxiliaire des cultures.

Mots clefs : *Forficula auricularia*, chlorpyrifos, tolérance, réserves énergétiques, voies de détoxification, acétylcholinestérase, Hsp70, biomarqueurs

## Summary

In the European context of reducing pesticide use, knowledge of the effects of insecticides on natural enemies is an innovative and promising approach for the development of new Integrated Pest Management (IPM) program. European earwigs *Forficula auricularia* (Linnaeus) are considered as efficient predators in apple orchards and contribute to the biological control of aphids, leaf rollers and psyllids.

Earwigs were sampled in apple orchards in Provence, (South-Eastern France), managed under contrasting strategies: organic, integrated pest management (IPM), conventional, or untreated orchards. Our study underlines the differences in metabolic pathway responses in *F. auricularia* populations influenced by their historic management strategies. In particular, we have shown that earwigs collected in conventional orchard exhibited lower mortality and higher enzyme activities (glutathion-S-transferases and carboxylesterases) involved in detoxification, compare to organic orchard. A decrease in sensitivity of the acetylcholinesterase (the molecular target of OP insecticides, involved in the nervous system functioning) was also observed in earwigs pre-exposed in the conventional orchard with higher sensitivity of AChE in male compared to female earwigs. We have investigated the induction of Hsp70s as an efficient defense mechanism, which could play an important role in tolerance to insecticide. Our results underlined the differences previously observed depending on management strategy and for a considered orchard, depending on earwig sex.

It is well known that insecticide tolerance can be associated with fitness costs. That is why energetic reserves (glycogen, lipids and proteins) and morphological traits have been quantified on earwigs from orchards with different management practices. *F. auricularia* from conventional orchards were smaller than the other earwigs. Moreover, we have shown that the amount of energetic reserves depended on insecticide use and on the period of sampling. The high glycogen content observed in females collected in conventional orchards, 2 months after the end of treatments, supports a reallocation of reserves to the reproduction.

This work brought to light the emergence of resistance to insecticides of the natural enemy *F. auricularia*, exposed to pesticides in conventional apple orchard.

Key words: *Forficula auricularia*, chlorpyrifos, tolerance, energetic reserves, detoxication pathway, acetylcholinesterase, Hsp70, biomarkers



# Chapitre 1 : Introduction générale

## 1 Contexte général

Depuis le début de sa sédentarisation et le développement de l'agriculture l'Homme cherche à contrôler les ravageurs et maladies de ses productions végétales afin d'augmenter leurs productivités et de subvenir à ses besoins. Il y a déjà plus de 2000 ans, les chinois utilisaient comme biocide le pyrèthre extrait de chrysanthème sauvage afin de lutter contre les poux et les puces. En Occident, les premières traces écrites de l'utilisation des pesticides en agriculture remontent à l'Antiquité. Elles nous ont été transmises par Marcus Porcius Cato Censorius dit Caton l'Ancien dans un ouvrage dénommé « De re rustica » écrit autour de 160 avant J-C et réédité à de nombreuses reprises (Caton, 2004). Dans ce traité sur l'agriculture, Caton indique le procédé de préparation d'une substance permettant de repousser le « vers coquin » de la vigne autrement nommé cochylis. À la même époque, Pline l'Ancien, naturaliste Romain recommande d'utiliser de l'arsenic pour arrêter la progression des maladies cryptogamiques des raisins (Plinius Secundus and André, 2003).

Au Moyen-Âge, les découvertes de nombreuses propriétés toxiques des plantes sont utilisées pour contrôler les populations de ravageurs. C'est le cas notamment de Maïmonide qui rédige en 1135 un traité sur les poisons (Moïse Maïmonide and Rabbinowicz, 1865).

Mais c'est au 19<sup>ème</sup> siècle, avec l'augmentation des échanges commerciaux entre les continents entraînant l'importation volontaire ou non de plantes et d'insectes allochtones, qu'une pression supplémentaire se fit sentir sur les cultures. Le développement de la chimie minérale permit alors le déploiement de nombreux insecticides à base de cuivre, d'arsenic, de fluorure et de soufre. C'est le cas notamment de l'utilisation de la bouillie bordelaise mise au point par Alexis Millardet, utilisée pour contrôler le mildiou dans les vignes (Millardet and Gayon, 1885).

Cependant le véritable essor des pesticides dit « modernes » commence dans les années 1930 avec le développement de la chimie organique. À la même période les propriétés insecticides du Dichloro-Diphenyl-Trichloroéthane (DDT), synthétisé la première fois par Othmar Zeidler (1873), sont mises en avant (Smith, 1991). Durant la seconde guerre mondiale, le développement d'armes chimiques a conduit à la

découverte de nombreux insecticides neurotoxiques organochlorés. Au fur et à mesure que les connaissances de l'impact des pesticides sur l'environnement et la santé humaine se sont développées, des limitations d'usages ont commencé à être imposées par les instances dirigeantes des différents pays utilisateurs. Ce fût le cas notamment pour le DDT qui a vu son utilisation décriée après *Silent Spring* de R. Carson (1962) pour son impact sur l'environnement *via* son accumulation dans la chaîne trophique. Il a été interdit dans de nombreux pays après l'apparition de cas de résistance chez les ravageurs.

La France s'inscrit dans cette tendance à diminuer la toxicité, l'écotoxicité et la quantité des produits phytosanitaires utilisés sur son territoire. L'objectif du plan national Ecophyto I mis en place en 2008, était de réduire de moitié l'utilisation des pesticides sous 10 ans. Ce plan s'inscrit dans la suite logique de la directive européenne 2009/128 qui demande à ce que « *les États membres aient recours à des plans d'action nationaux visant à fixer des objectifs quantitatifs, des cibles, des mesures, des calendriers et des indicateurs en vue de réduire les risques et les effets de l'utilisation des pesticides sur la santé humaine et l'environnement et à encourager le développement et l'introduction de la lutte intégrée contre les ennemis des cultures et de méthodes ou de techniques de substitution en vue de réduire la dépendance à l'égard de l'utilisation des pesticides* » .

En 2014 un rapport parlementaire indique que les conditions nécessaires mais non suffisantes sont rassemblées pour atteindre l'objectif de réduction de l'utilisation des produits phytosanitaires (PPS). C'est donc sur la base de 68 nouvelles recommandations qu'un deuxième plan Ecophyto II est mis en place en 2015, suivi du plan Ecophyto II+ en 2018. Dans ces nouvelles versions, la volonté de diminuer de 50% l'utilisation des pesticides est réaffirmée. Ces plans reposent sur des mutations profondes des filières de production, dans le but de réduire les risques sur la santé humaine, parmi lesquelles :

- L'accompagnement des agriculteurs vers l'agro-écologie
- le développement d'expérimentation de certificats d'économie de produits phytosanitaires
- le soutien de l'expérimentation et du biocontrôle

Le plan Ecophyto II+ confirme le plan de sortie de commercialisation du glyphosate, matière active d'un herbicide controversé, le 28 juin 2018.

Le travail réalisé au cours de cette thèse s'inscrit dans l'axe de soutien du biocontrôle. En région Provence-Alpes-Côte-D'azur (PACA), les vergers de pommiers présentent un indice de fréquence de traitement (IFT) élevé. Pour réduire les traitements phytosanitaires et leurs impacts, il faut donc développer des moyens de lutte alternatifs contre les ravageurs et approfondir ceux déjà existants. Parmi ces moyens, la présence de différents auxiliaires (coccinelles, syrphes, forficules) constitue un écosystème utile permettant de réguler les populations de ravageurs en vergers et représente une alternative intéressante à la diminution de l'utilisation des pesticides.

Mes travaux de thèse sont focalisés sur l'étude d'un prédateur généraliste, la forficule (pince-oreille), *Forficula auricularia* L. En vergers de pommiers, *F. auricularia* contribue à la lutte biologique par sa prédation sur certains ravageurs tels que les pucerons. Si le lâcher d'ennemis naturels représente une piste novatrice, de nombreuses questions sont à approfondir quant à l'impact des pesticides sur ces espèces auxiliaires. En particulier l'utilisation d'insecticides induit, chez les organismes non-cibles, des effets toxiques non intentionnels à l'origine d'apparition de cas de résistance. La connaissance d'un tel phénomène sur la forficule *F. auricularia* est donc une piste novatrice et prometteuse au développement de nouveaux programmes en Production Fruitière Intégrée (PFI).

## 2 Les vergers de pommiers du Sud-Est de la France.

En 2018 les vergers de pommiers représentent en France 37 000 ha de cultures (Agreste, 2019). La culture de la pomme est la première culture fruitière de l'Hexagone, loin devant l'abricot (12 200 ha) et la pêche (9 000 ha). Une grande partie de cette production est localisée en PACA avec 10 000 ha de vergers de pommiers ce qui en fait le premier centre de production de la France (Agreste, 2019).

Les pommiers sont exposés à de nombreux ravageurs, et la phytoprotection y est intensive avec un IFT moyen de 36 traitements par an (Sauphanor et al., 2009; Malagnoux et al., 2015b; Marliac et al., 2015). De plus l'apparition de nombreuses résistances (chez le carpocapse en particulier) rend la situation particulièrement préoccupante. Afin de mieux comprendre les alternatives aux pesticides possibles en

vergers de pommiers, nous allons présenter les ravageurs et les différentes pratiques phytosanitaires associées.

## 2.1 Les principaux ravageurs en vergers de pommiers

Dans le sud-est de la France, les principaux ravageurs sont les pucerons et les tordeuses (Orts et al., 2006). D'autres espèces ont des impacts pour le moment de plus faible envergure comme les cochenilles ou les zeuzères (Bouvier et al., 2005).



Figure 1 : Dégâts de *Dysaphis plantaginea* sur une feuille de pommiers.

D'après <https://www.cliniquedesplantes.fr>

En PACA, les quatre espèces de pucerons majoritaires dans les vergers de pommiers sont les pucerons verts non migrants *Aphis pomi* et migrant *Rhopalosiphum insertum*, le puceron cendré *Dysaphis plantaginea* et le puceron lanigère *Eriosoma lanigerum*. Les pucerons sont des insectes piqueurs-suceurs. Ils fragilisent la plante hôte par prélèvement de la sève et favorisent l'installation de maladies virales et fongiques. *A. pomi* provoque un enroulement des jeunes feuilles ainsi que leur noircissement. En cas de forte attaque il peut provoquer un arrêt de la croissance des jeunes pousses (Carroll and Hoyt, 1984). *R. insertum* induit moins de dommages que *A. pomi* mais en cas de forte présence il provoque lui aussi l'enroulements des jeunes feuilles (SudArbo, 2012). Ce sont les espèces *E. lanigerum* et surtout *D. plantaginea* qui induisent le plus de dommages économiques (Bouvier et al., 2005; Dib et al., 2010a). Les pousses envahies par ces pucerons vont s'enrouler entraînant une diminution du rendement (Figure 1). Les fruits acquièrent une forme plus petite et irrégulière et ne pourront être commercialisés.

### 2.1.1 Le puceron cendré

Le puceron cendré ou *Dysaphis plantaginea* se développe sur deux hôtes : le pommier (*Malus domestica* Borkh.) comme hôte primaire et le plantain (*Plantago* spp.) comme hôte secondaire.

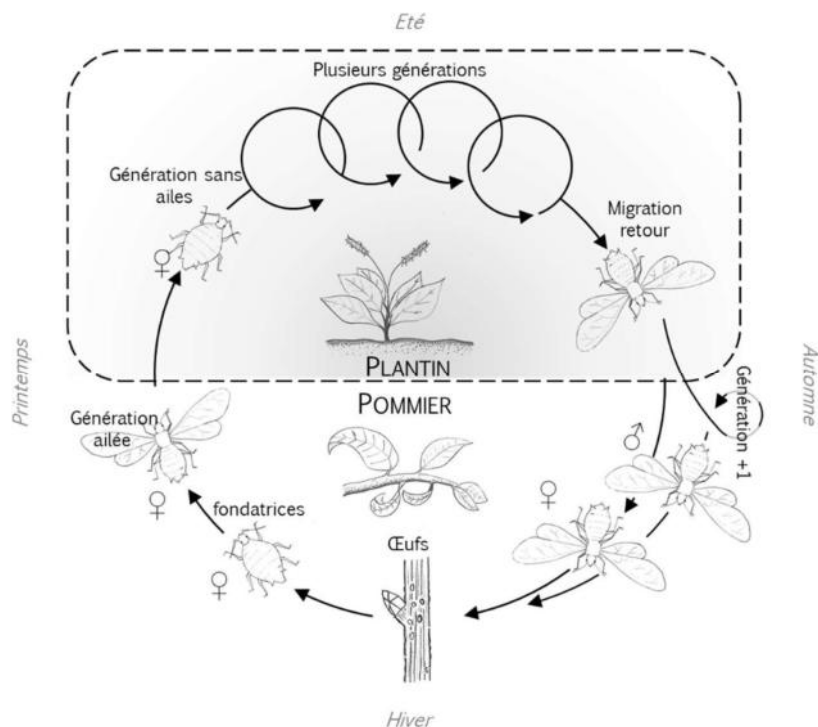


Figure 2 : Cycle de vie de *Dysaphis plantaginea*.  
Par Le Navenant A., inspiré du dossier technique Adalia 2004

C'est en hiver que *D. plantaginea* pond sur son hôte primaire donnant naissance en début de printemps à de nombreuses femelles fondatrices sans ailes (Figure 2). Elles vont alors se nourrir et se dupliquer sur les nouvelles feuilles de l'année donnant naissance à des femelles virginipares aptères. Par la suite, chaque femelle peut donner naissance à environ 70 à 80 larves. En juin, des pucerons ailés apparaîtront et migreront sur le plantain, plante hôte secondaire sur lequel ils se multiplieront tout l'été. Le début de la reproduction sexuée a lieu avec la diminution du ratio jour/nuit vers septembre, et donne une nouvelle génération ailée de femelles. En octobre ces femelles sexuées migrent vers les pommiers. Après reproduction, il y a ponte des œufs au début de l'hiver dont l'éclosion permettra l'émergence de nouvelles fondatrices en avril/mai (Blommers et al., 2004). Pour lutter contre le puceron cendré, les traitements sont nécessaires de mars à mai (Tableau 1).

Tableau 1: Principaux ravageurs du pommier et les périodes de traitements

Ravageur	Période de traitement	Matières actives
Carpocapse Tordeuse orientale	Fin Avril à Septembre	Phéromones, chlorpyriphos éthyl (OP), fénoxycarbe (analogue hormone juvénile), thiaclopride (néonicotinoïde)
Puceron cendré	Mars à Mai	Deltaméthrine / tauflualine / lambda-cyhalothrine (pyrethrinoïdes) puis acetamipride (neonicotinoïde)
Puceron lanigère	à partir de Mai	Pyrimicarbe (carbamate), spirotétramat

### 2.1.2 Le carpocapse des pommes

Les tordeuses, sont des lépidoptères comptant parmi elles plusieurs ravageurs du pommier. Leurs noms (tordeuses) proviennent de la capacité des chenilles à enrouler et tordre les feuilles des plantes dont elles se nourrissent. En région PACA, le carpocapse des pommes et des poires (*Cydia pomonella*) est le ravageur qui cause le plus de dégâts (Grigg-McGuffin et al., 2015; Reyes et al., 2015). Les dommages sont causés à l'intérieur du fruit par les larves. Les tordeuses orientales (*Grapholita molesta*) attaquent de manière minoritaire les jeunes pousses et les fruits en fin de saison. Comme tous les lépidoptères, le carpocapse a une métamorphose complète. Il traverse quatre états : œufs, larve, chrysalide et adulte. Le cycle de vie de *Cydia pomonella* (Figure 3) est relié au cycle de son hôte principal, le pommier *Malus domestica*, (Shel'Deshova, 1967).

L'adulte va pondre sur les feuilles, tiges ou fleurs fécondées à partir du mois de mai. La larve qui en sort se loge dans la pomme (Figure 4), affectionnant particulièrement les pépins. Elle passe alors ses 5 stades larvaires à l'abri dans le fruit. C'est au cours de ces stades larvaires que sont observés les dégâts sur les fruits. Une fois à maturité la larve quitte le fruit et va se réfugier dans une anfractuosité du tronc, d'une charpentièrre ou du sol et former un cocon qui accueillera la nymphe le temps de la métamorphose. Selon les conditions climatiques, soit la larve entre en diapause, soit l'émergence des adultes a lieu. En région PACA les températures élevées permettent l'apparition de 3 à 4 générations annuelles (Balachowsky, 1966; Audemard, 1991)

Afin de réguler les populations de ces ravageurs différentes pratiques agricoles sont mises en place. La nature des pesticides employés ainsi que leur intensité d'utilisation sont de bons indicateurs de chaque type de pratique (agriculture.gouv.fr, 2006).

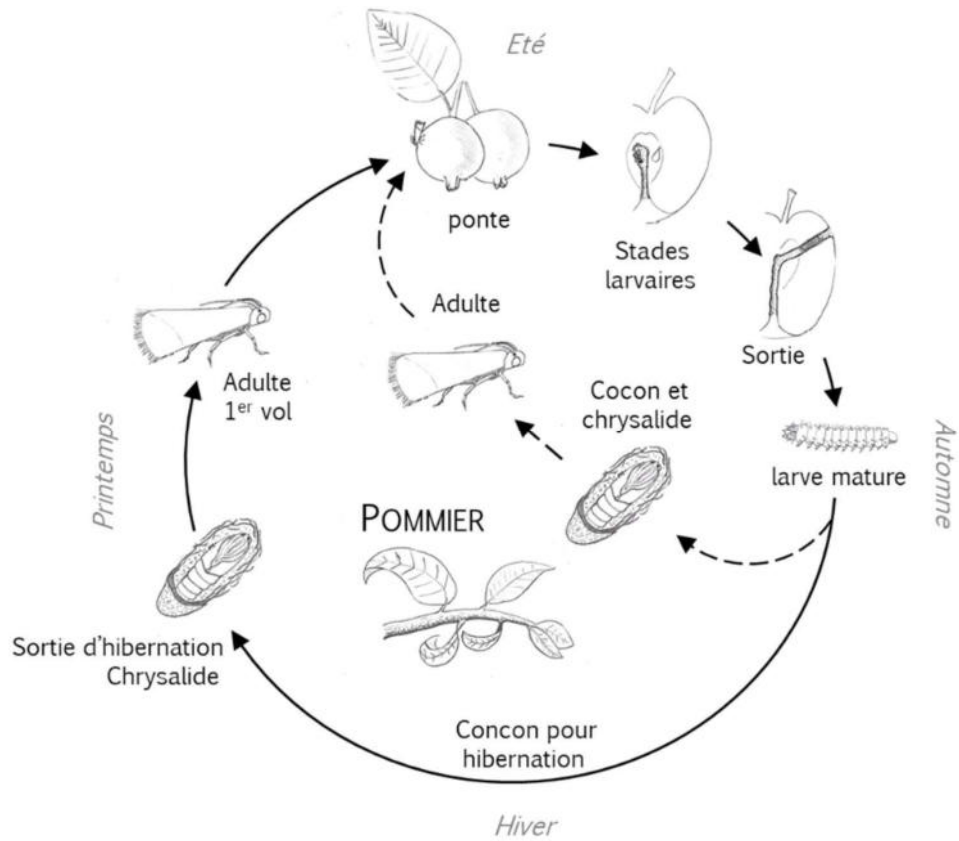


Figure 3: Cycle de vie de *Cydia pomonella*  
Le Navenant A., inspiré d'une illustration de Bayer-agri.fr



Figure 4 : Dégât de *Cydia pomonella* sur la pomme  
agrimaroc.net

## 2.2 Les différents systèmes de production

En France, il existait encore au début de ma thèse 3 grands systèmes de production en vergers de pommiers : l'agriculture biologique (AB), l'agriculture intégrée ou production fruitière intégrée (PFI) et l'agriculture conventionnelle (CONV). Chacune de ces productions possède des règles propres concernant l'utilisation des pesticides. Pour les travaux de cette thèse, les définitions de ces trois systèmes de production sont les suivantes :

### 2.2.1 L'agriculture biologique (AB)

L'agriculture biologique est caractérisée par la suppression de tout traitement à base de produits phytosanitaires de synthèse. Le règlement européen (CE) n°834/2007 complété par le n° 884/2008 et le n°1254/2008 définit l'agriculture biologique comme étant « *un système de gestion durable pour l'agriculture qui respecte les systèmes et cycles naturels et maintient et améliore la santé du sol, de l'eau, des végétaux et des animaux, ainsi que l'équilibre entre ceux-ci* ». Elle doit aussi contribuer à « *atteindre un niveau élevé de biodiversité et avoir une utilisation responsable de l'énergie et des ressources naturelles, telles que l'eau, les sols, la matière organique et l'air* ». L'objectif est de « *produire une grande variété de denrées alimentaires et autres produits agricoles qui répondent à la demande des consommateurs concernant des biens produits par l'utilisation de procédés qui ne nuisent pas à l'environnement, à la santé humaine, à la santé des végétaux ou à la santé et au bien-être des animaux* » (CE 834, 2007). L'utilisation d'intrants phytosanitaires est limitée aux substances d'origines végétales auxquelles s'ajoutent les substances produites par les micro-organismes, les préparations à base de minéraux (cuivre, fer, soufre, huiles minérales), les micro-organismes actifs (*Bacillus thuringiensis*) et les macro-organismes (parasitoïdes et prédateurs). Concernant les vergers de pommiers d'autres méthodes dites alternatives sont utilisées pour réguler les populations de ravageurs et notamment l'utilisation de la confusion sexuelle pour combattre le carpocapse et/ou la tordeuse orientale. Le principe est de perturber la reproduction en saturant, par diffusion, l'atmosphère par des analogues de phéromones sexuelles normalement émises par les femelles (Cardé and Minks, 1995). On peut noter aussi l'utilisation de filets Alt'Carpo ([www.alt-carpo.com](http://www.alt-carpo.com), 2005), formant une barrière physique contre le carpocapse (Figure



5). En France un peu moins de 6% de terres agricoles respectent le cahier des charges de l'agriculture biologique, plaçant le pays en 2017 à la 21ème position, loin derrière l'Autriche, l'Estonie, la Suède ou encore l'Italie avec respectivement 23,4% ; 19,6% 19,1% et 14,9% de terres agricoles conduites en AB (Eurostat, 2019).



*Figure 5 : Verger de pommiers dans le Sud-est de la France  
Culture conventionnelle à gauche et biologique à droite avec les filets Alt'Carpo. Par  
Le Navenant A.*

### 2.2.2 La production fruitière intégrée (PFI)

La production fruitière intégrée est un compromis entre l'agriculture conventionnelle et biologique (Sansavini, 1997). Ce système de production tend à remplacer lorsque possible les intrants de synthèse par des procédés naturels de régulation des ravageurs afin de minimiser l'impact environnemental tout en maximisant les rendements (EcophytoPIC, 2019). L'objectif est donc de rendre le système capable de résister à des ravageurs notamment en utilisant une combinaison de facteurs tels que: (i) l'utilisation d'espèces cultivées adaptées à l'environnement, tolérantes ou résistantes aux agresseurs ainsi que l'utilisation du biocontrôle ; (ii) l'utilisation de la confusion sexuelle ; (iii) l'utilisation de la lutte physique (Directive 2009/128/CE, 2009). Les traitements chimiques sont appliqués en ultime recours lorsque les seuils de nuisibilité sont dépassés et que les autres moyens de lutte sont inefficaces. La première demande de certification remonte à 1992 auprès de la Commission Internationale de la Lutte Biologique (CILB) qui en définit le cahier des charges. La directive « Production Intégrée » (OILB/SROP, 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 « refuges » servant de réservoir aux insectes auxiliaires. Au niveau Européen, la directive 2009/128/EC sur l'utilisation des pesticides oblige chaque état à mettre en place ce nouveau mode de production depuis 2014.

En pratique, il existe un gradient d'utilisation de pesticides au sein de ces systèmes de production, avec certains vergers PFI proches de l'agriculture biologique et d'autres plus proches de l'agriculture conventionnel. Pour ces derniers c'est alors principalement l'utilisation de méthodes alternatives et notamment la confusion sexuelle qui les différencie.

### 2.2.3 L'agriculture conventionnelle (CONV)

L'agriculture conventionnelle (CONV) résulte des connaissances en chimie acquises après-guerre soutenant l'intensification de l'agriculture pour nourrir la population. L'objectif était de s'affranchir des limitations de l'environnement par l'utilisation de fertilisants et de contrôler les populations de ravageurs/parasites et maladies par l'utilisation de pesticides dans le but d'atteindre une productivité maximale. A cette époque les connaissances sur les effets secondaires des pesticides étaient insuffisantes. Actuellement l'utilisation de pesticides est réglementée en Europe par le règlement (CE) N° 1107/2009.

Depuis 2011, on observe une diminution progressive de l'agriculture conventionnelle au profit de l'agriculture raisonnée liée à une prise de conscience des arboriculteurs concernant notamment la baisse de biodiversité et les effets irréversibles des pratiques conventionnelles (Bengtsson et al., 2005; Crowder et al., 2010).

### 2.3 Des solutions alternatives aux pesticides

L'utilisation des pesticides pose de sérieux problèmes de contamination des milieux, de baisse de la biodiversité et de risques pour la santé humaine. La demande sociale s'oriente donc vers une agriculture plus respectueuse de l'environnement en France mais également en Europe.

Les méthodes alternatives ont pour but de limiter l'utilisation de pesticides en agissant sur les pratiques culturales, l'aménagement de l'habitat et en développant les méthodes de lutte intégrée (Wyss et al., 2005; Zehnder et al., 2007).

Comme cité précédemment, une méthode de lutte physique a été développée en 2005. Elle consiste à limiter l'attaque des ravageurs par l'intermédiaire d'un filet insect-proof, les filets Alt'Carpo (Romet and Severac, 2008). L'utilisation de ces filets permet de réduire significativement les IFT insecticides microbiologiques (carpovirusine et

*B. thuringiensis*) de 57% en AB et les insecticides de synthèse et/ou microbiologiques de 70% en PFI (Capowiez, 2013).

Parmi les pratiques culturales, on compte le choix variétal (variétés résistantes aux maladies fongiques par exemple), la taille des arbres (Simon et al., 2012) et le travail du sol. L'aménagement de l'habitat a pour objectif de favoriser la biodiversité des auxiliaires en créant des zones refuges (haies composites) (Debras et al., 2007), l'enherbement et la gestion de l'inter-rang ainsi que la création de bandes fleuries (Marliac et al., 2016).

La lutte biologique consiste à utiliser des organismes vivants pour prévenir et limiter le développement des ravageurs. L'abondance et la diversité des ennemis naturels dépendent de la composition, et de la gestion des habitats (Hatt et al., 2018). Il existe trois grands types de lutte biologique : (1) la lutte biologique classique qui consiste à introduire intentionnellement un prédateur exotique (Van Lenteren et al., 2006); (2) la lutte biologique par augmentation qui consiste à augmenter les populations d'auxiliaires déjà présents dans le milieu et (3) la lutte biologique par conservation qui manipule l'environnement dans le but de fournir les ressources alimentaires indispensables à l'augmentation des effectifs des auxiliaires de cultures et d'aménager des zones refuges où les ravageurs peuvent s'installer devenant moins nuisibles pour les cultures (Villenave, 2006).

Parmi les ennemis naturels, de nombreuses espèces sont intéressantes (Van Driesche and Bellows, 1996) principalement chez les Coléoptères (coccinelles, cantharides, staphylindes, carabidés), les Diptères (syrphes, cécidomyies) et les Dermaptères (forficules) (Boivin, 2001), ainsi que les Arachnides (Marliac et al., 2016; Belkair et al., 2018)

### 3 Les produits phytosanitaires utilisés en vergers de pommiers

La France est le 2<sup>ème</sup> utilisateur de produits phytosanitaires en Europe avec 67 100 tonnes de matière active utilisées en 2017 juste derrière l'Espagne (71 900 tonnes) et devant l'Italie (56 200 tonnes) (Eurostat, 2019).

Concernant spécifiquement les vergers de pommiers le nombre moyen de traitements de pesticides, tout mode de production confondu, est de 36 par an (Figure 6B). Les familles de pesticides majoritaires sont les fongicides (63%) et les insecticides

(25%). Cette utilisation massive de pesticides doit être mise en relation avec la surface de terre agricole. La France est au 1er rang européen avec environ 26 000 000 ha de terre allouée à l'agriculture et une moyenne de 2,6 kg de matière active par hectare en 2017 (Tableau 2).

*Tableau 2 : Matière active importée et surface agricole utilisée*

Pays	Matière active de PPS importé (MAI) (kg)	Surface agricole utilisée (SAU) (hectare)	MAI / SAU
Irlande	2 539 428	4 208 966	0,60
Suisse	1 982 673	3 123 687	0,63
Royaume-Uni	15 870 120	15 697 987	1,01
Danemark	3 028 715	2 892 721	1,05
Grèce	4 427 995	3 583 040	1,24
Pologne	22 923 102	13 859 544	1,65
Autriche	4 543 181	2 549 604	1,78
Finlande	4 273 146	2 230 096	1,92
Hongrie	9 551 176	4 912 206	1,94
<b>France</b>	<b>67 101 218</b>	<b>25 854 227</b>	<b>2,60</b>
Allemagne	44 879 933	16 464 465	2,73
Portugal	8 163 183	2 354 721	3,47
Espagne	71 829 951	20 274 213	3,54
Belgique	6 136 495	1 433 987	4,28
Italie	56 236 199	10 949 675	5,14

*La France est le deuxième pays européen à importer le plus de substances actives [MAI] (en kg) de produits phytosanitaires avec plus de 67 100 tonnes mais elle possède une Surface Agricole Utilisée (SAU) importante (près de 26 000 000 hectares de terres cultivées) si bien que son ratio MAI / SAU est de 2,6 se classant ainsi en 9<sup>ème</sup> position (Eurostat consulté en 2019).*

### 3.1 Les familles d'insecticides

Les produits phytosanitaires sont subdivisés en différentes classes dont les principales sont : les herbicides, les fongicides, les insecticides et les acaricides, les régulateurs de croissance des végétaux, les produits de stérilisation du sol et les rodenticides. Leur utilisation dépend généralement du type de culture et du climat régional. En France, l'arboriculture fruitière et la première culture consommatrice d'insecticides et la deuxième consommatrice de fongicides après la viticulture (Figure 6A) (Butault et al., 2011). En 2017 la France est le 3<sup>ème</sup> utilisateur d'insecticides en Europe avec 3 800 tonnes de matière active (Eurostat, 2019). En 2015, les fongicides et les insecticides constituaient les traitements majoritaires appliqués en arboriculture et notamment en vergers de pommiers avec respectivement un IFT de 22,8 et de 9 (Figure 6B).

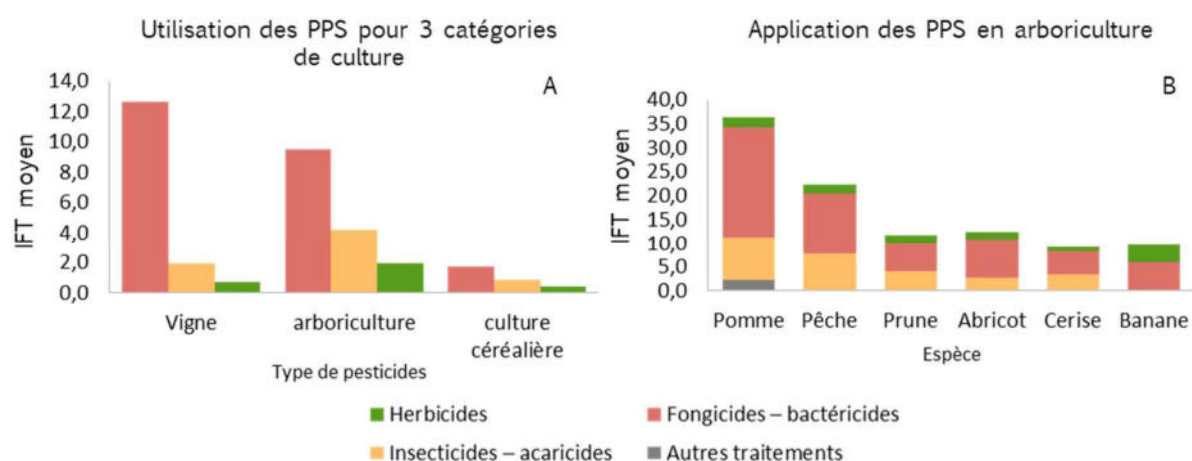


Figure 6 : Utilisation des PPS et traitements appliqués en arboriculture

A : IFT moyen des PPS pour 3 grandes catégories de culture. Données extraites de 3 rapports d'Agreste (viticulture 2016, arboriculture 2015 et grandes cultures 2014). B : Nombre de traitements appliqués en arboriculture fruitière, toutes pratiques confondues en 2015 et sur l'ensemble du territoire. (Dossier Agreste n°43 consulté en 2019).

Les principaux modes d'action des différents insecticides, actuellement utilisés ciblent différentes fonctions de l'organisme : le système nerveux, musculaire ou respiratoire, la voie de biosynthèse des lipides, ou la croissance de l'organisme. Pour chaque mode d'action, il existe différentes familles chimiques d'insecticides. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'impact des insecticides utilisés en vergers de pommiers. Seules les différentes familles d'insecticides neurotoxiques seront présentées.

Les insecticides neurotoxiques perturbent la transmission de l'information nerveuse au niveau de l'axone ou de la synapse. Les premiers insecticides neurotoxiques « modernes » tels que les organochlorés ont été utilisés très largement dès les années 1945. En France, depuis les années 1970 les organochlorés ont été remplacés en raison de leur temps de rémanence important (de 5 à 10 ans) et de leur capacité à s'accumuler dans la chaîne trophique. Aujourd'hui, les familles d'insecticides neurotoxiques utilisées sont réparties dans les familles suivantes (1) les organophosphorés (OP) et les carbamates (CA) qui ciblent spécifiquement l'acétylcholinestérase (AChE) (Oakeshott et al., 2005), (2) les pyréthrinoïdes qui ont une action sur le canal sodium et donc sur la transmission des potentiels d'action le long la membrane des axones, (3) les avermectines qui agissent sur les récepteurs GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) (Vijverberg, 1990) et (4) les néonicotinoïdes et les spinosines qui se fixent aux récepteurs nicotiniques (Cresswell, 2011) (Figure 7 et Tableau 3).

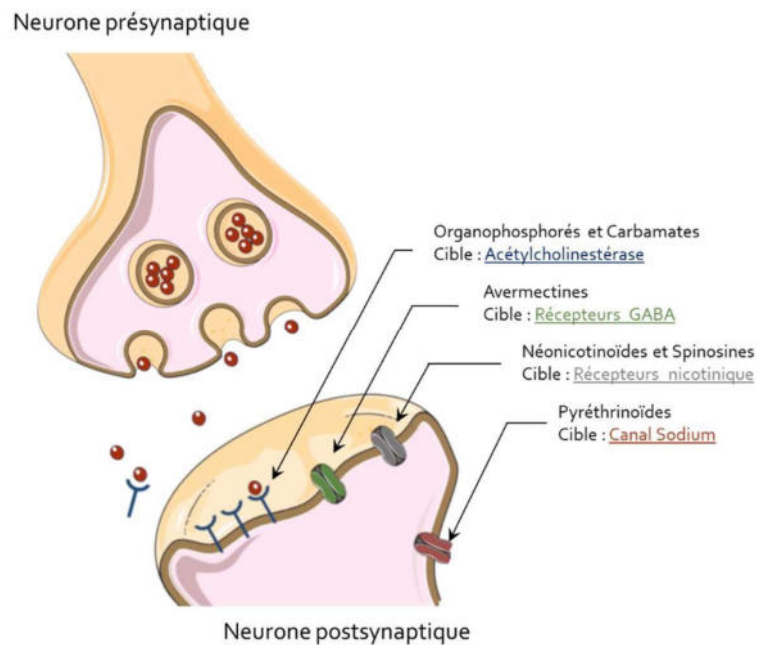


Figure 7 : Les insecticides neurotoxiques et leurs cibles.  
Par Le Navenant A. avec les illustrations de Smart Servier Art.

Tableau 3: Quelques insecticides utilisés dans différentes familles chimiques

Familles chimiques	Principales substances	Mode d'action
Carbamates	Alanycarb, Carbaryl, Carbofuran, FormetanateMethiocarb, Methomyl, Metolcarb, Oxamyl, Thiodicarb, Thiofanox, Triazamate, Trimethacarb	Inhibiteurs de l'ACHE
Organophosphorés	Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Coumaphos, Dimethoate, Dimethylvinphos, Malathion, Phosmet, Temephos, Terbufos, Tetrachlorvinphos,	
Pyréthrinoïdes pyréthrines	Acinathrin, Cycloprothrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin, Fenpropathrin, Fenvalerate, Pyrethrins (pyrethrum), Silafluofen, Tefluthrin, Tetramethrin, Tralomethrin, Transfluthrin, Permethrin	Modulateur du canal sodium
Néonicotinoïdes	Acetamiprid, Clothianidin, Dinotefuran, Imidacloprid, Nitenpyram, Thiacloprid, Thiamethoxam	Agonsite du récepteur nicotinique à acétylcholine nAChR
Spinosides	spinetoram, spinosad	Activateur allostérique du récepteur nicotinique à acétylcholine nAChR

### 3.1.1 Les organophosphorés :

Les organophosphorés (OP) ciblent l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme responsable de l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine, permettant ainsi l'arrêt de l'influx nerveux. L'inhibition de l'AChE induit une accumulation de grandes quantités d'acétylcholine dans la synapse, provoquant une dépolarisation continue du neurone post-synaptique.

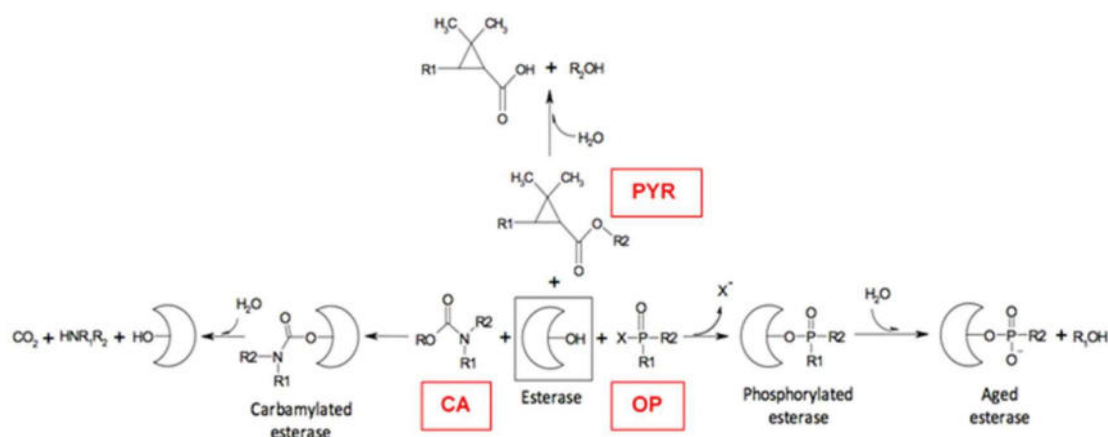


Figure 8 : Interaction entre les B-estérases et les insecticides neurotoxiques

Interactions des carbamates (CA), de la forme oxon des organophosphorés (OP) et des pyréthrinoides synthétiques (PYR) avec le site actif des B-estérases (cholinestérases et carboxylestérases). L'inhibition des B-estérases par les CA conduit à la formation d'un complexe carbamylé, instable à partir duquel l'activité de l'enzyme peut être rapidement récupérée après hydrolyse spontanée. Les OP provoquent une inhibition irréversible des B-estérases en formant un complexe phosphorylé stable. La récupération de l'activité enzymatique nécessite la synthèse de nouvelles molécules d'enzymes. Les pyréthrinoides synthétiques (PYR) n'interagissent qu'avec les CbEs. Les carboxylestérases induisent l'hydrolyse des PYR et libération de l'alcool correspondant et d'un acide carboxylique. Schéma élaboré par Sanchez-Hernandez (2011), d'après Sogorb & Vilanova (2002) et Thompson & Richardson (2004).

Cette dépolarisation est à l'origine des perturbations neuronales, allant d'une incapacité de coordination des mouvements affectant le déplacement jusqu'à la mort de l'individu. Les insecticides OP sont à l'origine d'une réaction de phosphorylation sur le site catalytique de l'enzyme au niveau d'un résidu sérine (Wheelock et al., 2005; Quinn et al., 2017). L'inhibition provoquée par les OP est considérée comme irréversible car la réactivation de l'enzyme phosphorylée est très lente (Thompson, 1999). Il est cependant possible de régénérer l'enzyme en ajoutant des composés chimiques de la famille des oximes, permettant ainsi de rompre la liaison entre l'OP et le site actif (Franjesevic et al., 2019). Cette réactivation de l'AChE n'est possible que si l'enzyme inhibée ne subit aucun processus de vieillissement au cours duquel, une O-dealkylation se produit sur la sérine induisant la formation d'un complexe irréversible (Vale and Bradberry, 2017). Sous cette forme l'AChE est alors considérée comme définitivement



inactivée, c'est le phénomène « d'aging » (Figure 8). Dans ce cas, seule la synthèse de nouvelles molécules d'ACHé permet de restaurer une activité neuronale normale (Habig and Di Giulio, 1991).

### 3.1.2 Les Carbamates

Les carbamates (CA) sont développés vers les années 1960 et ciblent eux aussi l'acétylcholinestérase. Ils ont cependant une potentialité plus faible que les OP de part une vitesse de carbamylation de la sérine plus lente et par la formation d'un complexe carbamate - enzyme instable, facilement réversible par simple hydrolyse, permettant la restauration de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (Kerkut, 1985).

### 3.1.3 Du pyrèthre aux pyréthrinoïdes

Le pyrèthre est originalement obtenu à partir d'extrait des fleurs de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Les pyréthrines bien que très efficaces, sont sensibles à la lumière et très rapidement dégradées. C'est pourquoi des composés plus stables les pyréthrinoïdes ont été développés. Les pyréthrinoïdes agissent sur les canaux sodium voltage dépendant en augmentant leur durée d'inactivation (Anadón et al., 2009). Cette ouverture des canaux sodiques est assez importante pour induire des décharges répétitives de l'axone entraînant une dépolarisation massive. Toute repolarisation est alors impossible (Gammon et al., 1982).

### 3.1.4 Les néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes sont une famille d'insecticides très représentée avec plus de 21 PPS référenciés en France (source Web : Ephy, consulté en 2020). Le premier néonicotinoïde, l'imidaclopride, a été découvert en 1985 par S. Kagabu (Bayer CropScience, Japon) et mis sur le marché en 1991 (Tomizawa and Casida, 2011). Ils deviennent les insecticides les plus utilisés dans le monde (Jeschke and Nauen, 2008; Casida and Durkin, 2013) grâce à leur efficacité liée à une translocation systémique dans la plante (Bonmatin et al., 2015) ainsi qu'une application possible en traitement de semence par enrobage (Simon-Delso et al., 2015).

Les néonicotinoïdes sont des agonistes du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (Casida and Durkin, 2013). Les différences structurales de ce récepteur entre les vertébrés et les insectes expliquent la faible toxicité des néonicotinoïdes sur les vertébrés (Tomizawa and Casida, 2005). Cependant, l'utilisation de cette famille de

pesticides est très controversée suite à la découverte d'effets fortement toxiques mis en évidence sur les abeilles. Ces dernières sont exposées à cause des propriétés systémiques de ces molécules se retrouvant jusque dans le pollen (Suchail et al., 2001) et perturbent la capacité de vol retour des abeilles à la ruche (Henry et al., 2012). C'est pourquoi depuis 2018 les insecticides appartenant à cette famille sont peu à peu retirés du marché pour être normalement tous prohibés en 2020.

### 3.2 Contamination des milieux et écotoxicologie

Les insecticides sont utilisés pour réguler les populations de ravageurs responsables de dégâts directs et/ou vecteurs de maladies, dans un objectif d'augmentation des rendements de production. Ils sont souvent introduits dans les cultures par pulvérisation, ce qui augmente la contamination des milieux (eau, air et sol) (Köhler and Triebkorn, 2013). Différents processus physico-chimiques et biologiques interviennent dans le transfert et le devenir des pesticides dans l'environnement. Ainsi, une réduction des différentes populations, des micro-organismes à la macrofaune du sol, déclenche des effets indirects aux niveaux supérieurs de la chaîne trophique soit par réduction des populations de proies, par réduction de la capacité des micro-organismes du sol à métaboliser les pesticides ou par bioaccumulation (Figure 9)

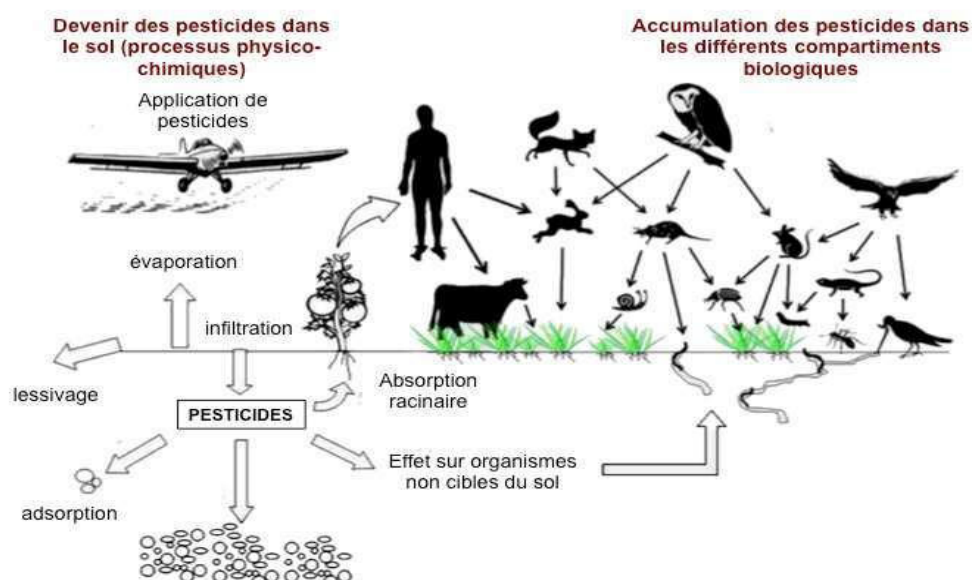


Figure 9 : Devenir des pesticides dans le sol (d'après Sanchez-Hernandez, 2011).

L'écotoxicologie développée dans les années 1970 a pour rôle d'apporter des réponses sur les problèmes posés par les dangers des polluants sur la santé humaine

et sur l'environnement (Truhaut, 1977). En s'intéressant à l'aspect environnemental de la toxicologie, l'écotoxicologie recouvre différents champs disciplinaires et s'appuie sur la définition de deux notions clés clairement identifiées : les bioindicateurs et les biomarqueurs (Lagadic et al., 1997). Les bioindicateurs représentent le(s) organisme(s) modèle(s) au sein desquels sont identifiés des biomarqueurs (moléculaires, cellulaires, tissulaires, physiologiques et comportementaux). Les biomarqueurs sont donc des structures ou des processus biologiques dont les variations induites par les polluants sont observables et/ou mesurables au niveau de l'individu.

Quel que soit le polluant considéré, l'exposition des organismes induit l'induction et la modification des différentes voies impliquées dans la protection et/ou le maintien des fonctions cellulaires et physiologiques, qui constituent autant 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 le repliement des protéines endommagées et empêchent leurs agrégations (Gupta et al., 2010). Le métabolisme énergétique (nutrition, enzymes de la digestion, 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. Concernant les pesticides et plus particulièrement les insecticides neurotoxiques, une cible privilégiée 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.



La conjugaison est une phase qui peut être catalysée par les enzymes de la famille des glutathion-S-transférases (GSTs; EC 2.5.1.18) (Figure 11). Les GSTs interviennent dans la détoxification de nombreux composés endogènes et des xénobiotiques, tels que les insecticides, les drogues, les polluants organiques ou les métabolites secondaires (Hayes et al., 2005). Ces enzymes accélèrent la liaison des xénobiotiques avec le groupement sulfurique du glutathion, facilitant ainsi l'excrétion du complexe xénobiotique-glutathion. Il existe 3 groupes de GSTs répartis en fonction de leur localisation : cytosolique, mitochondriale et microsomale. Les insectes possèdent principalement des GSTs cytosoliques.

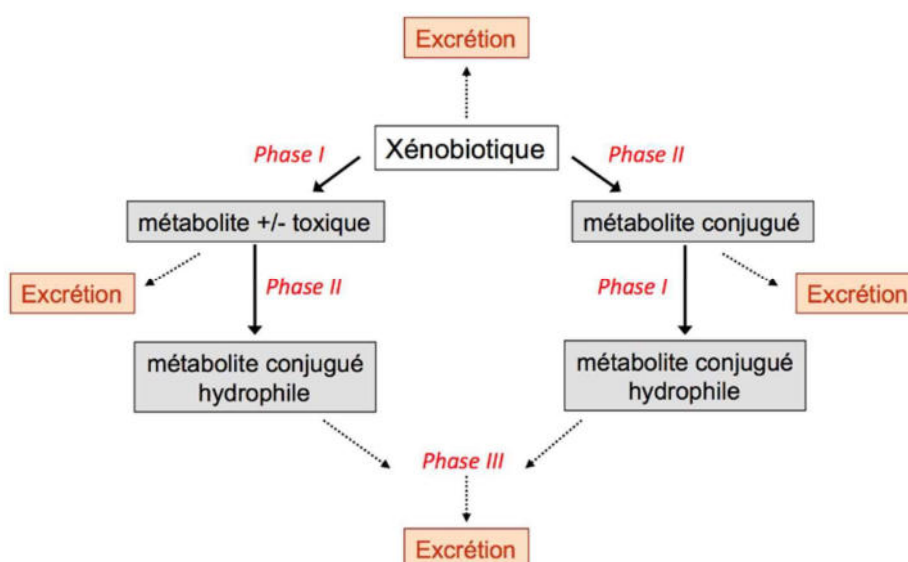


Figure 11 : Schéma des différentes voies de métabolisation

La phase I correspond à une phase de fonctionnalisation au cours de laquelle des réactions d'hydrolyse (CbE) et d'oxydation (CYP450) sont réalisées ; la phase II représente une phase de conjugaison (GST) ; la phase 3 est assurée par des transporteurs ABC, spécialisé dans l'efflux des molécules toxiques. A chaque étape, l'excrétion des métabolites est possible.

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) (Figure 8).

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). Les bioindicateurs quant à eux, 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. En association avec les biomarqueurs, ils permettent d'améliorer la compréhension des mécanismes d'adaptation et de leur transmission intergénérationnelle.

## 4 Mécanismes de défense, résistance et tolérance aux insecticides

### 4.1 Résistance et tolérance aux insecticides

L'exposition répétée aux insecticides augmente le nombre de cas de résistance (Schmidt-Jeffris and Beers, 2018) ou induit l'apparition de tolérance des organismes (Poupardin et al., 2008). Les populations tolérantes peuvent subir de rapides changements phénotypiques en réponse à une variation temporelle et/ou spatiale de l'environnement (Kelly et al., 2012). On parle alors de « Plasticité phénotypique »

#### 4.1.1 La résistance

Une des premières utilisations du terme « résistance » dans la bibliographie scientifique remonte en 1914 par Melander suite à l'observation de populations d'insectes restant en vie après utilisation d'une dose normalement létale d'insecticide. En 1992, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit la résistance comme « *une caractéristique héréditaire qui confère une tolérance accrue à un pesticide ou à un groupe de pesticides, de sorte que les individus résistants survivent à une concentration du ou des composés qui serait normalement mortelle pour les espèces* » (Organization World Health, 1992).

Plus récemment, l'IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) définit la résistance comme « *un changement héréditaire de la sensibilité à un pesticide d'une population d'organismes nuisibles se traduisant par l'échec répété d'un produit phytosanitaire à atteindre le niveau de contrôle attendu lorsqu'il est utilisé conformément aux recommandations d'utilisation* » La résistance est donc définie comme étant la capacité d'une population à survivre à une dose d'insecticide correctement appliquée et, qui lui est normalement mortelle (Coles and Dryden, 2014; Hemingway et al., 2002; Prather et al., 2000).

La résistance d'une population est due à la sélection spécifique d'individus « pré-avantagés ». Ces individus possèdent initialement des variations génétiques aléatoires et naturelles induisant une sensibilité moindre à un xénobiotique, ou dans le cas de cette étude, à un insecticide. Cette sélection se fait souvent sur plusieurs générations augmentant la proportion d'individus résistants (Scott, 1995). On définit un facteur de résistance ( $F_R$ ) comme le rapport entre les DL50 (dose létale observée induisant 50% de mortalité) des individus résistants et des individus sensibles (Figure 12). Lorsque les individus résistants ne sont pas présents en quantité suffisamment importante ou que la résistance induit un facteur de résistance trop faible ( $2 < F_R < 10$ ), on parle de résistance biologique. Lorsque ces facteurs de résistance sont élevés ( $F_R > 10$ ) c'est qu'il y a très probablement une diminution de l'efficacité des insecticides en vergers, on parle alors de résistance au champ ("Source Web: Qu'est-ce que la résistance aux PPP? - R4P," 2019).

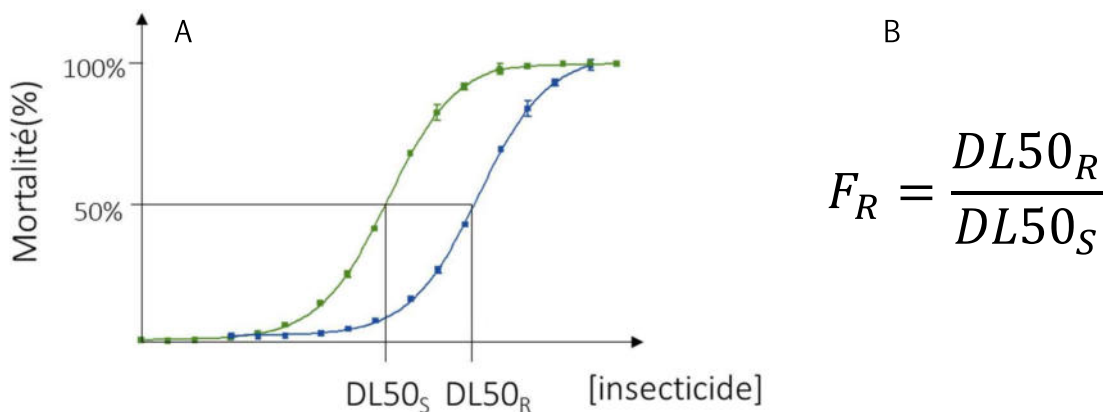


Figure 12 : Calcul du facteur de résistance d'une population résistante

A : DL50 d'une population sensible (en vert) et d'une population résistante (en bleu). Plus la population est résistante plus la DL50 sera importante. B. le facteur de résistance de la population résistante en comparaison avec la population sensible est calculé en utilisant les DL50 de ces 2 populations selon la formule si dessus.

Dans la littérature de nombreux auteurs utilisent ces facteurs de résistance pour caractériser la résistance mais généralement aucun ne fait la différence entre résistance biologique et résistance au champ. Il est cependant convenu que la résistance induit dans la majorité des cas un  $F_R$  supérieur à 10 comme montré chez les acariens (Kanga et al., 2010), et parfois même supérieur à 100 pour *Aphis gossypii* (Carletto et al., 2010). Dans le cas des populations d'insectes fréquemment contrôlées par les insecticides, on retrouve des  $F_R$  extrêmement importants (supérieurs à 1000)

en comparaison avec une souche sensible comme pour le cas de *Aphis gossypii* (Wang et al., 2007) ou de *Plutella xylostella* (Yu and Nguyen, 1992).

La résistance aux insecticides influence le contrôle et la gestion des ravageurs depuis la moitié du XX<sup>e</sup> siècle. Depuis la fin des années 1940, le nombre de cas de résistance aux insecticides et le nombre d'espèces et de composés impliqués n'a cessé d'augmenter (Figure 13 : Sparks and Nauen, 2015).

Les mécanismes de résistance peuvent être classés en différentes catégories :

- Une diminution de la pénétration de l'insecticide dans l'organisme,
- Une augmentation de la séquestration et/ou de l'excrétion de l'insecticide,
- Un comportement d'évitement,
- Une résistance métabolique,
- Une insensibilité de la cible moléculaire de l'insecticide.

Diminution de la pénétration :

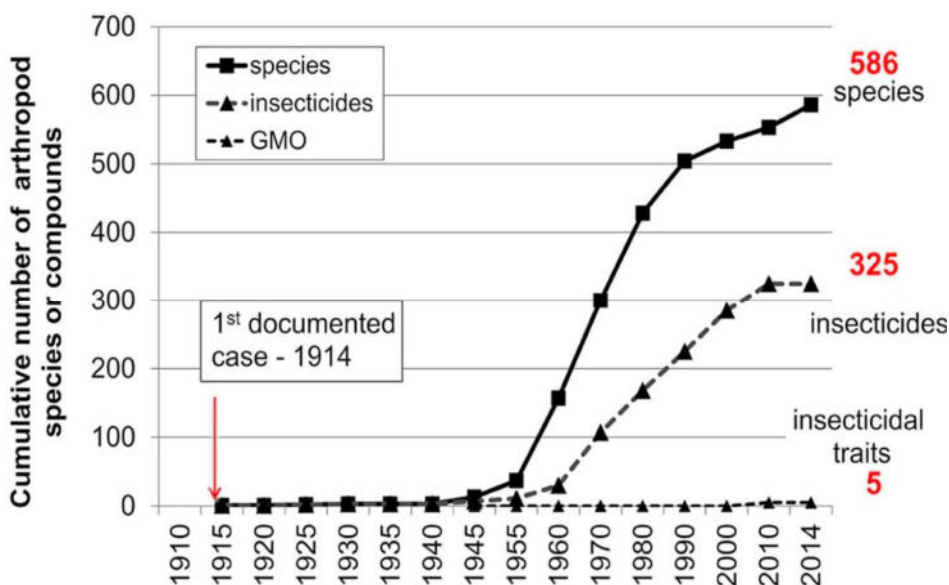


Figure 13 : Nombre d'espèces résistantes à au moins 1 insecticide

Nombre d'insecticides pour lesquels une ou plusieurs espèces présentent une résistance, et le nombre de caractéristiques des organismes génétiquement modifiés pour lesquels une résistance a été avérée (d'après Sparks & Nauen 2015).



La cuticule ou exosquelette est la partie la plus externe du corps de l'insecte. Elle joue plusieurs rôles de protection, contre la dessiccation ou encore la prédation, mais aussi un rôle de support mécanique permettant la locomotion (Wan et al., 2016). C'est aussi la première barrière contre les xénobiotiques et leur pénétration dans l'organisme.

La variabilité d'imperméabilité aux insecticides peut être due à deux facteurs, l'épaisseur de la cuticule, ou sa structure. L'augmentation de l'épaisseur de la cuticule a été mise en évidence chez *Anopheles gambiae* lui conférant une résistance aux insecticides (Balabanidou et al., 2016; Yahouédo et al., 2017).

La modification de la composition de la cuticule peut être induite par la surexpression de la laccase-2 jouant un rôle dans le durcissement et la pigmentation des cuticules. Ce phénomène a été mis en évidence chez une population de moustiques *Culex pipiens* résistante aux insecticides (C. Pan et al., 2009).

#### Augmentation de la séquestration et/ou de l'excrétion de l'insecticide

Suite à la pénétration d'un pesticide dans l'organisme, certaines enzymes et protéines sont capables de le fixer et de le transférer vers différents organes (corps gras, hémolymphe) pour éviter son action sur la cible moléculaire. Deux mécanismes interviennent. Soit la séquestration directe de l'insecticide par fixation au niveau du site actif, soit l'hydrolyse de certaines familles d'insecticides, libérant une forme moins toxique, après fixation au site actif. Les estérases jouent un rôle important dans la résistance des insectes par séquestration.

Les carboxylestérases (CbE ; EC 3.1.1.1) hydrolysent les esters carboxyliques. Les CbEs sont présentes aussi bien chez les invertébrés que les vertébrés et constituent une famille d'iso-enzymes, chacune plus ou moins spécifique à un substrat. L'abondance relative des différentes formes des CbEs au sein d'un organisme joue un rôle important dans le métabolisme de résistance à de nombreux insecticides (Farnsworth et al., 2010; Reyes et al., 2011). Les carboxylestérases séquestrent les insecticides carbamates et organophosphorés (Figure 8), et sont capables d'hydrolyser les pyréthriinoïdes (Phase I) (Wheelock et al., 2005). La séquestration permet de diminuer la forme libre des OPs susceptibles de se lier aux AChEs. Si les CbEs sont plus sensibles à l'inhibition des OPs que les AChEs, elles constituent un mécanisme de protection efficace des AChEs (Wheelock et al., 2008).

### Détection des xénobiotiques et comportements d'évitement

Le comportement d'évitement des insecticides est défini comme étant la capacité d'un organisme à détecter et à reconnaître un danger [ici l'insecticide] et à s'échapper de cette zone de danger (Kostromytska et al., 2018). Ce comportement permet ainsi à l'organisme de réduire son exposition aux insecticides et de survivre dans un environnement toxique par exemple en arrêtant de consommer une nourriture contaminée ou en quittant la zone au profit d'un environnement non traité. L'évitement est une résistance comportementale si ce trait n'est pas exprimé dans les populations qui n'ont pas été exposées à la pression de sélection (Zalucki and Furlong, 2017). Des modifications dans le comportement ont été relevées chez différentes espèces de moustiques après l'introduction de moustiquaires imprégnées d'insecticides. *A. gambiae* qui était exclusivement endophile (vivait uniquement à l'intérieur des habitations) a adopté un comportement exophile de plus en plus important (Sokhna et al., 2013). Une autre étude montre que *A. funestus* a modifié son comportement face aux moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes en développant une exophagie à hauteur de 70% contre 45% avant la mise en place de ces filets (Corbel et al., 2012). Ces modifications comportementales ne sont possibles que si l'organisme est capable de détecter l'insecticide. Cette détection peut se faire à distance *via* des chémorécepteurs comme c'est le cas pour le cricket (*Neoscapteriscus spp*) face aux pesticides fipronil et bifenthrine (Thompson and Brandenburg, 2005; Kostromytska et al., 2018), ou suite à un contact physique de l'insecticide avec l'organisme (Chareonviriyaphap et al., 2013).

### La résistance métabolique

La résistance métabolique résulte d'une augmentation de la capacité de métabolisation d'un insecticide (1) soit par une augmentation de la quantité d'une enzyme responsable de la dégradation ou de la transformation d'un insecticide en molécule moins toxique, (2) soit par une modification structurale d'une enzyme qui améliore son affinité pour le toxique. La littérature sur la résistance métabolique est vaste et met en évidence le rôle des cytochromes P450 (CYP450), des GSTs et des CbEs (Figure 11).

Dans le cas des insecticides neurotoxiques, la plupart des cas de résistances résultent soit d'une surexpression des CYP450, ou d'une augmentation de leur affinité

pour les insecticides. C'est le cas pour les résistances aux pyréthriinoïdes et aux carbamates (Scott, 1999). La résistance peut également être associée à une augmentation de l'activité des GSTs et de leur niveau d'expression. C'est le cas pour les résistances aux organophosphorés, pyrethriinoïdes, et organochlorés (Hemingway and Ranson, 2000; Lumjuan et al., 2011) (Tableau 4).

#### L'insensibilité de la cible moléculaire

Suite à une mutation, la modification structurale de la cible moléculaire d'un insecticide induit une diminution de l'affinité de la cible et par suite une perte de sensibilité vis à vis de cet insecticide. L'insecticide devient alors moins toxique pour l'organisme. Différentes mutations au niveau du gène de l'AChE ont été mises en évidence et sont responsable de nombreux cas de résistance des insectes aux organophosphorés. La plupart de ces mutations sont localisées au niveau du site actif de l'AChE, diminuant ainsi l'inhibition causée par les OP (Mutero et al., 1994; Chen et al., 2001; Anazawa et al., 2003; Weill et al., 2003; Cassanelli et al., 2006).

Tableau 4 : Activité des GSTs et des CbEs et résistances aux OPs

OP resistant	Name insects	Activity of GSTs	Auteurs
Azinphosmethyl	<i>N. fallacis</i>	Degradation of OP with GSH is 6 times more important in resistant than susceptible. Increase by 3 of CbEs (resistant compare by susceptible)	Motoyama <i>et al.</i> , 1971
Azinphosmethyl	<i>M. domestica</i>	Degradation of OP with GSH is 6 times more important in resistant than susceptible.	Motoyama and Dauterman, 1972
Tetrachlorvinphos	<i>M. domestica</i>	Activity of GSTs is 16 time more important in OP resistant than susceptible (females)	Oppenoorth <i>et al.</i> , 1977
Tetrachlorvinphos	<i>M. domestica</i>	Activity of GSTs is 100 time more important in OP resistant than susceptible	Oppenoorth <i>et al.</i> , 1979
Azinphosmethyl	<i>E. postvittana</i>	Degradation of OP with GSH is 1,7 time more important in resistant than susceptible. Increase by 3 of nonspecific esterase activity (resistant compare by susceptible)	Armstrong and Suckling, 1988
Malathion/Cyflutrin	<i>T. castaneum</i>	Activity of GSTs is 5 time more importante in OP resistant than susceptible	Reidy <i>et al.</i> , 1990
All OPs	<i>M. domestica</i>	Activity of GSTs is 2 time more important in organism from OP resistant than susceptible	Fournier <i>et al.</i> , 1992
Chlorpyriphos / Methyl-Parathion / Malathion / Diazinon / Methamidophos	<i>P. xylostella</i>	Activity of GSTs is 2.2 time more important in organism from OP resistant than susceptible	Yu and Nguyen, 1992
Azinphosmethyl	<i>P. idaeusalis</i>	Activity of GSTs is 2 time more important in organism from OP orchard than another orchard	Carlini <i>et al.</i> , 1995
Chlorpyriphos	<i>B. germanica</i>	Activity of GSTs is 3.4 time more important in organism from OP resistant than susceptible	Valles and Yu, 1996
Temephos	<i>A. aegypti</i>	Increase activity of GSTs (4.6) and esterase (4.6) for 6th generation with contact to Temephos compare to 1st generation	Rodríguez <i>et al.</i> , 2002
All OPs	<i>M. persicae</i>	Relative CbEs gene copy numbers in the more resistant strains is 4-fold increases than susceptible.	Field <i>et al.</i> , 1999)
All OPs	<i>A. gossypii</i>	CbEs activity was significantly higher in resistant strain than in susceptible strain (10 times more)	Cao <i>et al.</i> , 2008

### 4.1.2 La tolérance

Bien qu'il existe de nombreuses définitions pour le phénomène de tolérance, ces dernières décrivent systématiquement des changements de susceptibilité rapide qui se produisent au sein d'une même génération après une exposition à un stress (Hollingsworth et al., 1997; Hua et al., 2013; Riaz et al., 2009). En pratique, la tolérance induit chez les organismes de faibles facteurs de résistance, généralement compris entre 2 et 10 (Hollingsworth et al., 1997).

Les mécanismes de tolérance sont peu étudiés en comparaison des mécanismes de résistance, bien que la tolérance puisse induire d'importantes répercussions sur la persistance des populations suite à une exposition aux insecticides (Hua et al., 2013).

La tolérance induit des limites et des coûts car les individus doivent assurer le maintien et la régulation des gènes non exprimés et des mécanismes de régulation de la transcription (Murren et al., 2015). Cependant ces coûts semblent faibles en comparaison avec les coûts considérables de la maintenance des organismes (Snell-Rood, 2012).

## 4.2 Mécanismes de défense et coûts énergétiques

### 4.2.1 Les protéines de choc thermique (Hsps)

Face à un stress chimique, en dehors des mécanismes de résistance et de tolérance, les organismes sont capables de développer de nombreuses réponses cellulaires pour limiter les dommages et maintenir ou ré-établir l'homéostasie cellulaire (mécanismes de réparation de l'ADN, système anti-oxydant et Hsp). Parmi ces réponses, l'induction des Hsps est une des voies de défense majoritaire. Les Hsps sont des protéines chaperonnes participant en conditions normales au bon repliement des autres protéines lors de leurs synthèses. Elles ont aussi un rôle de guide lors de la translocation des protéines à travers les membranes, et permettent le désassemblage des structures de protéines (Bukau and Horwich, 1998). Initialement elles ont été découvertes via leurs inductions en condition de stress où elles maintiennent la structure 3D des protéines prévenant ainsi contre l'agrégation ; Il existe 5 familles de Hsps en fonction de leurs masses moléculaires. On retrouve les Hsp60, les Hsp70, Hsp90, les Hsp100 ainsi que les petites Hsp (ou sHsps) (Köhler et al., 1999; Gupta et al., 2010) (Tableau 5).

Tableau 5 : Les 5 familles d'Hsps

Famille d'Hsps	Caractéristiques	Références
Hsp100	De 100 à 104 kDa Rôle dans la protéolyse responsable de la dégradation des protéines endommagées Rôle de protéines chaperonnes	Burton and Baker, 2005
Hsp90	De 82 à 90 kDa Hsps cytosoliques les plus abondantes dans les cellules eucaryotes Protéines homologues chez les procaryotes en association avec de nombreuses protéines intracellulaires (actine, tubuline, kinase, récepteurs divers)	Carver <i>et al.</i> , 1994; Te <i>et al.</i> , 2007; Gupta <i>et al.</i> , 2010
Hsp70	De 68 à 75 kDa Famille d'Hsp la plus conservée dans l'évolution Localisé dans le cytosol, les mitochondries, et le réticulum endoplasmique Réponse à de nombreux stress et rôle essentiel dans des environnements hostiles Permet la dissolution d'agrégats insolubles et le repliement des polypeptides	Marshall <i>et al.</i> , 1990; Nover, 1991; Ahn <i>et al.</i> , 2004; Tutar, 2006
Hsp60	Entre 58 et 65 kDa Rôle important dans le repliement des polypeptides et la translocation des protéines Dans les mitochondries, les chloroplastes et les bactéries	van der Vies <i>et al.</i> , 1993
sHsps	De 15 à 30 kDa Protéines chaperonnes présentes chez les archées, bactéries, plantes et animaux Participent au repliement des protéines dénaturées	Taylor and Benjamin, 2005; Waters and Rioflorido, 2007

Les premiers travaux ont été réalisés sur les Hsp70 et montrent une induction de l'expression de ces HSPs à la suite d'une variations de la température (Ritossa, 1962). Plus tard le phénomène de protection des protéines par les Hsps fût découvert. Des études plus récentes ont montré qu'en plus d'une réponse aux chocs thermiques, l'expression de ces protéines est en rapport avec le stade de développement de l'organisme (King and MacRae, 2015), et peut participer à la protection contre la dessiccation (Benoit et al., 2010). Le rôle des Hsp70 dans la protection contre les insecticides a aussi été exploré et il a été démontré que l'expression des Hsp70 augmente avec l'exposition à la beta-cyperméthrine chez le puceron *Rhopalosiphum padi* (Li et al., 2017) avec un pic d'expression 24h après traitement.

Chez *Drosophila melanogaster* le chlorpyrifos-éthyl induit une augmentation de l'expression des Hsp70 6h après l'exposition à l'insecticide pour une forte concentration (0.5 ppm) et une augmentation au bout de 12h pour une concentration de 0.005 ppm (Nazir et al., 2001). Cependant une étude récente indique que pour le scarabée *Leptinotarsa decemlineata* aucune variation d'expression n'est détectée 24h après exposition au chlorantraniliprole ou à l'imidaclopride (Dumas et al., 2019). Il semble donc que la réponse des Hsps aux insecticides varie en fonction du temps d'exposition, de la dose et de la famille d'insecticides mais aussi en fonction des organismes.

#### 4.2.2 Allocation des réserves et détournement pour la détoxification

Il est généralement admis que les différents mécanismes de défense sont associés à un coût énergétique (Calow, 1991; Coustau et al., 2000; Sokolova et al., 2012). Tous les organismes pour se mouvoir et faire fonctionner la machinerie cellulaire ont besoin d'énergie. Cette énergie est fournie par les molécules d'adénosine triphosphate (ATP) *via* la métabolisation du glycogène et des lipides.

Chez les insectes la plupart des lipides se trouvent dans un organe diffus nommé le corps gras localisé sous le tégument, et autour des intestins et des organes reproducteurs (Kerkut, 2013). Plus de 90% des lipides accumulés par l'organisme sont sous la forme de triglycérides. Ces derniers peuvent ensuite par le biais d'une  $\beta$ -oxydation libérer de l'énergie (Athenstaedt and Daum, 2006). Les triglycérides sont synthétisés à partir de glucides, d'acides gras ou de protéines et sont la forme

d'énergie ayant le plus grand potentiel calorifique par unité de poids tout en libérant deux fois plus d'eau que le métabolisme du glycogène. Les lipides sont les principaux composants du corps gras avec plus de 50% de la masse sèche de cet organe (Ziegler, 1991).

Le glycogène est formé par la glycogénogenèse dans les muscles ou dans le foie. C'est une molécule polymérisée complexe formée de chaînes de glucose liées par des liaisons  $\alpha(1-4)$ , et ramifiées toutes les 10 unités environ, par des liaisons  $\alpha(1-6)$ . La véritable source d'énergie est donc le glucose, obtenu par hydrolyse du glycogène *via* la glycogénolyse.

Chez les insectes, le corps gras, réserve de lipides et de glycogène, possède de nombreuses fonctions parmi lesquelles celle de fournir de l'énergie pour la croissance, la reproduction et la métamorphose (Mirth and Riddiford, 2007). En fonction de la demande il accumule ou relargue dans l'hémolymphe des composés énergétiques indispensables à ces événements. Il participe aussi à la maintenance de l'individu et notamment à sa protection en synthétisant des peptides antimicrobiens (Arrese and Soulages, 2010). Dans de nombreux cas il a été montré que les insecticides induisent une diminution des réserves énergétiques (Ribeiro et al., 2001; Surendra Nath, 2002; Silva et al., 2004; Rharrabe et al., 2008; Rivero et al., 2011). Cet effet peut être induit soit de manière directe par l'action de l'insecticide qui perturbe le mécanisme énergétique soit, si l'insecticide agit par une action indirecte *via* une utilisation accrue des réserves énergétiques au profit de la maintenance (et notamment de la détoxification) détournant ainsi les flux énergétiques de la croissance ou de la reproduction. Si la reproduction est impactée il est alors possible d'avoir des répercussions sur la population.

##### 5 *F. auricularia*, auxiliaire de culture dans les vergers de pommiers

La forficule, communément appelé pince-oreille, est un Dermaptère. L'ordre des Dermaptères compte 1800 espèces dans le monde dont une vingtaine en France. La forficule Européenne, *Forficula auricularia* Linné (Famille des Forficulidae) est l'espèce la plus répandue dans les pays au climat tempéré (Behura, 1956; Sauphanor and Sureau, 1993). Elle est présente en Europe et en France et introduit au Canada (INPN, 2018) ainsi qu'en Australie (Albouy et al., 1990).



Plus rarement, une autre espèce, *Forficula pubescens*, est également présente et peut cohabiter avec *F. auricularia* dans les mêmes vergers (Debras et al., 2007). La distinction des 2 espèces se fait sur des caractéristiques morphologiques (taille et forme des cerques) facilement identifiables (Figure 14) (Albouy et al., 1990).

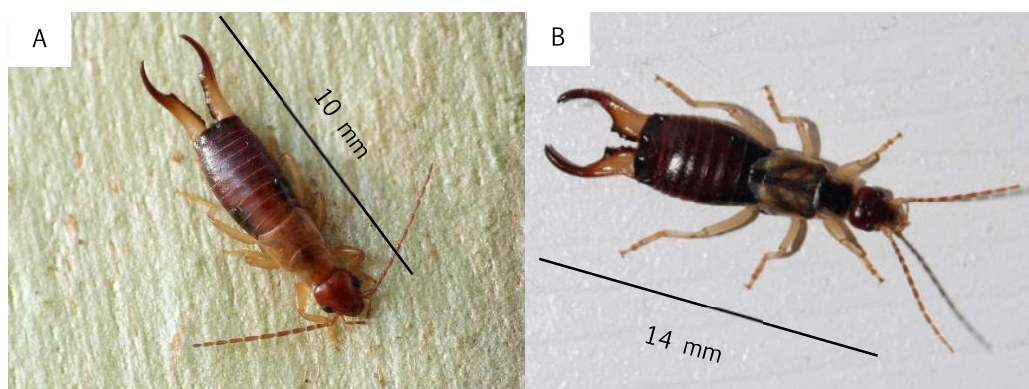


Figure 14 : Forficule présent dans les vergers

A : Mâle *F. pubescens* et B : Mâle *F. auricularia*. La distinction se fait principalement au niveau des cerques. La taille peut aussi être un indice avec les organismes *F. pubescens* plus petit que *F. auricularia* au même stade de développement. Crédits photos : Elleelle (A) et E. Zelenko (B)

Le sexe ratio de *F. auricularia* est de 50%. Les forficules présentent un dimorphisme sexuel au niveau des cerques, (recourbés chez les mâles et droits chez les femelles) permettant d'identifier aisément les mâles des femelles au stade adulte (Figure 15). D'un point de vue génétique, *F. auricularia* possède  $2n = 22$  chromosomes additionnés d'une paire de chromosome sexuel, XY ou X1X2Y pour les mâles et XX pour les femelles. Les espèces de forficules retrouvées en vergers de pommiers sont polyphages consommant aussi bien de la matière végétale que de petits insectes. Considéré comme ravageurs dans les vergers de fruits à noyaux (abricotiers, pêchers) (Burnip et al., 2002), la forficule *F. auricularia* est une espèce auxiliaire efficace non seulement en vergers de pommiers (Lenfant *et al.*, 1994; Dib *et al.*, 2010b; Dib *et al.*, 2011; Romeu-Dalmau *et al.*, 2012; Malagnoux, 2014; Dib *et al.*, 2016) mais aussi dans les cultures de houblons (Buxton and Madge, 1976), de haricots (Manyuli et al., 2008), d'agrumes (Piñol et al., 2009) et de poiriers (Lenfant *et al.*, 1994).

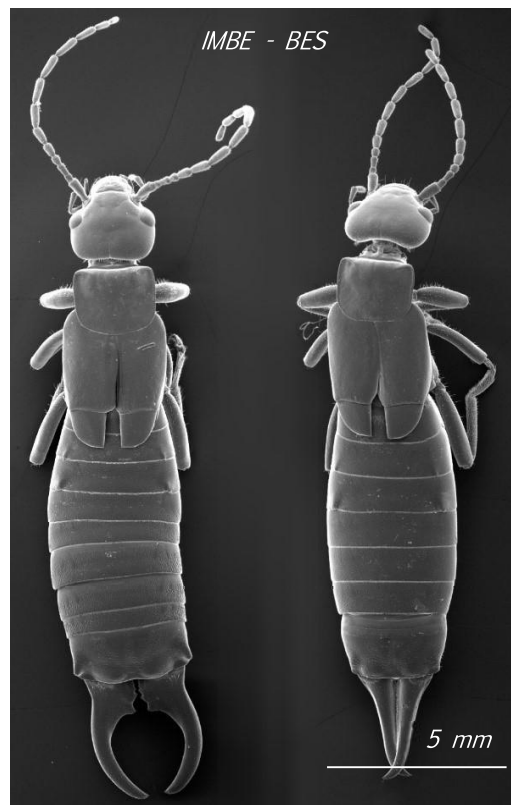


Figure 15 : Dimorphisme sexuel chez *F. auricularia*.

Femelle *F. auricularia* en haut et mâle en bas. Image réalisée en microscopie électronique à balayage. Crédit photo : Institut Méditerranéen de la Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE) équipe BES.

## 5.1 Biologie de *F. auricularia*

La forficule est une espèce principalement nocturne, se réfugiant la journée dans de petites interstices du sol, ou dans des abris formés par les écorces ou les pierres. Elle sécrète des phéromones d'agrégation qui provoquent des regroupements de plusieurs centaines d'individus logés à l'abri de la lumière dans la journée (Sauphanor, 1992). C'est une espèce univoltine (une seule génération par an issue de plusieurs portées) (Moerkens et al., 2010), hétérométabole i.e. les larves sont quasi-identiques aux adultes, à l'exception des cerques immatures qui ne se différencient qu'au stade adulte.

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 d'une cinquantaine d'œufs se succèdent, déposées à partir d'octobre pour la première (Meunier et al., 2012).

La reproduction est uniquement sexuée et le mâle est rapidement chassé par la femelle après la fécondation. Chez *F. auricularia* la femelle a un comportement maternel très développé consacrant jusqu'à 90% de son temps à la surveillance et à l'entretien des œufs (J. T. Costa, 2006) et ne s'absentant que sur de très courtes périodes. Les soins donnés par la femelle à ses œufs sont primordiaux pour permettre leur éclosion notamment en empêchant les développements fongiques et microbiens. En absence de soins maternels, le succès d'éclosion des œufs est diminué, passant de 80% à 50% dans des conditions contrôlées (Boos et al., 2014). Cet effet et encore plus important après inoculation des œufs par des champignons cryptogamiques du genre *Mucor* très présent dans les sols (Mari et al., 2000). Parallèlement l'inoculation préalable des œufs par des spores double le temps de toilette effectué par la femelle, passant de 18 min à 35 min sur une période d'observation de 75 min (Boos et al., 2014). Les propriétés antifongiques et microbiennes du toiletteage pourraient être expliquées par la présence de benzoquinones dans la salive ou par l'inoculation des œufs par la femelle avec des bactéries relarguant des antifongiques (J. T. Costa, 2006; Boos et al., 2014).

Chaque stade larvaire dure environ 25 jours à des températures variant de 13°C à 26°C. Plus il fait chaud plus le développement des larves est rapide. Au cours de son développement, la forficule occupe différents milieux, du sol aux parties aériennes des arbres. Le développement pré-imaginal de *F. auricularia* comprend 4 stades larvaires (Behura, 1956; Lamb and Wellington, 1975; Albouy et al., 1990). Alors que le premier (L1) et le deuxième (L2) stades larvaires restent dans ou sur le sol, seul les troisième (L3) et quatrième (L4) stades et les adultes, fréquentent régulièrement la strate arborée, et ont un rôle sur leurs proies (Lenfant et al., 1994; Kölliker and Vancassel, 2007; Dib et al., 2010b) (Figure 16).

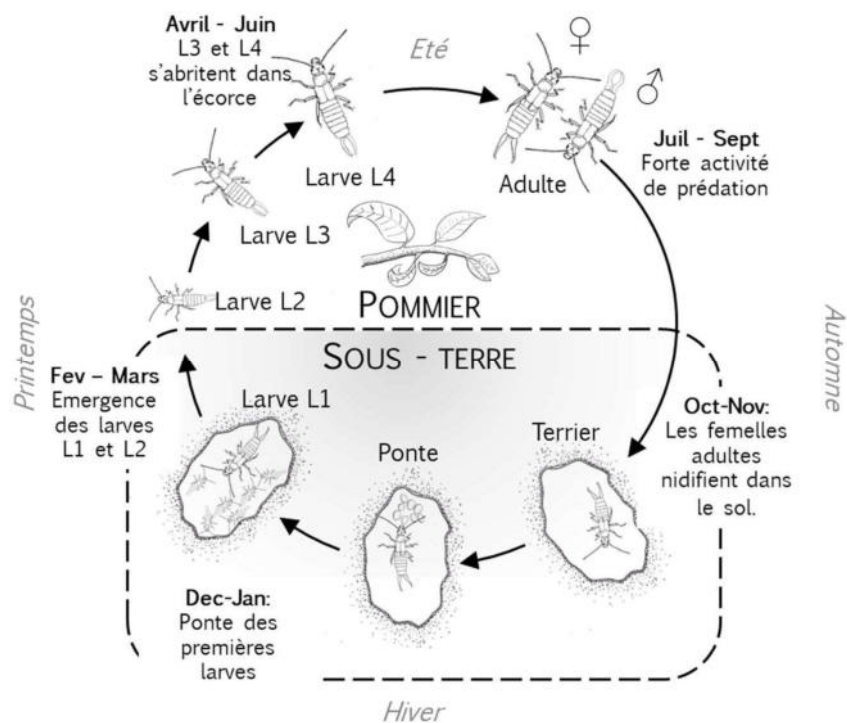


Figure 16 : Cycle de vie de *F. auricularia*.  
Le Navenant A d'après Dib et al. 2010b

## 5.2 Impact des pesticides sur *F. auricularia*

D'un point de vue écotoxicologique, les forficules sont faciles à piéger (grâce à leurs phéromones d'agrégation) et présentent l'intérêt de couvrir différents niveaux d'exposition (sol, surface du sol et surface foliaire) en fonction de leur stade de développement (Figure 16). Du fait de l'existence d'une seule génération par an, il y a un risque fort d'impact des pratiques agricoles utilisées en vergers de pommiers sur les populations de *F. auricularia*.

La sensibilité aux pesticides de *F. auricularia* a commencé à être étudiée depuis les années 1980 en conditions de laboratoire (French-Constant and Vickerman, 1985; Sauphanor, 1992) puis en conditions réelles sur le terrain (Sauphanor and Staaubli, 1994). Ces premiers résultats montrent une sensibilité aux insecticides OP et pyréthrinoïdes. Plus récemment des études ont montré que les mâles présentent une plus forte sensibilité que les femelles aux insecticides OP au niveau de biomarqueurs biochimiques (AChE et CbE) (Malagnoux, 2014). Une analyse du comportement de prédation vis-à-vis du puceron cendré a également mis en évidence une forte sensibilité des mâles exposés à des insecticides OP, néonicotinoïdes, spinosynes et pyréthrinoïde appliqués à la dose autorisée en vergers (Malagnoux et al., 2015a). De plus, il existe une différence de sensibilité non seulement entre sexes au sein d'une même espèce, mais également entre deux espèces de forficules largement présentes dans le Sud de la France : *Forficula auricularia* et *Forficula pubescens* (Malagnoux et al., 2015b). Bien que les populations de *F. auricularia* diminuent lorsque l'IFT augmente en vergers de pommiers, cette espèce reste présente dans les vergers avec parfois de fortes densités, alors que l'espèce *F. pubescens* est totalement absente des vergers conduits en PFI ou des vergers conventionnels (Malagnoux et al., 2015b).

Le projet de cette thèse vise à améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la tolérance de *F. auricularia* vis-à-vis des insecticides appliqués en vergers de pommiers.

## Chapitre 2 : Objectifs de la thèse

En vergers de pommiers, une utilisation massive d'insecticides organophosphorés, néonicotinoïdes et pyréthrinoïdes induit, chez les arthropodes non-cibles, des effets toxiques non intentionnels, à l'origine d'apparition de cas de résistance. Dans le contexte Européen visant la réduction de l'utilisation des pesticides, la connaissance des effets des insecticides sur les auxiliaires est une piste novatrice et prometteuse au développement de nouveaux programmes en Production Fruitière Intégrée (PFI).

Les objectifs de ce travail de thèse sont d'évaluer les mécanismes de résistance/tolérance aux insecticides chez la forficule, *Forficula auricularia* L., prédateur généraliste efficace. Plus particulièrement, nous étudierons les mécanismes de résistances au Pyrinex®, un insecticide organophosphoré dont la matière active est le chlorpyrifos-éthyl, largement utilisé ces dernières années en vergers de pommiers. Trois questions scientifiques sont soulevées :

- Quels sont les mécanismes impliqués dans l'acquisition de résistance/tolérance ?

Dans cette partie nous explorerons les différentes voies de métabolisation impliquées dans la détoxification des xénobiotiques. En particulier nous analyserons l'activité des glutathion-S-transférases et des carboxylestérases. La sensibilité de l'acétylcholinestérase, cible moléculaire des insecticides OP, sera évaluée chez les organismes provenant de différents vergers.

- Quels mécanismes de défense cellulaires sont associés à l'acquisition de cette résistance ?

Parmi les mécanismes de défense cellulaire moins spécifiques nous étudierons l'induction des Hsp70 pour améliorer nos connaissances sur les réponses physiologiques développées chez les forficules.

- Cette résistance aux insecticides est-elle accompagnée d'un coût physiologique ?

En particulier, les réserves énergétiques des forficules résistants sont-elles affectées par ce phénomène ? Nous évaluerons l'influence de l'exposition aux insecticides en vergers sur deux générations successives de forficules, en mesurant les variations de réserves énergétiques et la modification de certains traits morphométriques.

Les forficules sont prélevés en vergers peu ou fortement traités. Les résultats permettront de faire le lien entre stress environnemental, capacité d'adaptation de cet organisme et les coûts physiologiques de cette adaptation. Ces résultats donneront une idée plus claire du potentiel d'utilisation de forficules résistants aux insecticides en PFI.


## Chapitre 3 : Voies métaboliques et sensibilité de l'acétylcholinestérase impliquées dans la tolérance au chlorpyrifos-éthyl chez la forficule *Forficula auricularia*

Cette partie est consacrée au premier objectif qui est d'observer si une tolérance ou résistance aux produits phytosanitaires s'est mise en place parmi ces populations et de comprendre quels sont les mécanismes impliqués. Des forficules adultes provenant de 3 vergers commerciaux conduit chacun selon des chartes différentes (Conventionnelle, Production Fruitière Intégrée, et Agriculture Biologique) sont échantillonnés et ramenés au laboratoire. La sensibilité des individus, l'activité des glutathion-S-transférases et des carboxylestérases impliquées dans les voies de détoxification ainsi que l'activité de l'acétylcholinestérase (cible moléculaire des insecticides OP) sont analysées après exposition au chlorpyrifos-éthyl, à la dose autorisée en vergers de pommiers.

L'ensemble des résultats a été valorisé par une publication dans *Chemosphere* en 2019 (Le Navenant et al., 2019) (Figure 17), ainsi que par deux posters, (SEFA 2017, Lille, FR ; SETAC 2018, Rome, IT) ; puis lors d'une conférence orale à la SEFA (Montpellier, FR) la même année.

Chemosphere 227 (2019) 416–424


---



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

# Chemosphere


journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)



---

### Metabolic mechanisms and acetylcholinesterase sensitivity involved in tolerance to chlorpyrifos-ethyl in the earwig *Forficula auricularia*

Adrien Le Navenant <sup>a, b, \*</sup>, Myriam Siegwart <sup>b</sup>, Sandrine Maugin <sup>b</sup>, Yvan Capowiez <sup>c</sup>,  
Magali Rault <sup>a</sup>



<sup>a</sup> Avignon University, Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, IMBE, Pôle Agrosciences, 301 rue Baruch de Spinoza, BP 21239, 84916, Avignon, France  
<sup>b</sup> INRA, Unité PSH, Equipe Ecologie de la Production Intégrée, Site Agroparc, 84914, Avignon Cedex 9, France  
<sup>c</sup> INRA, UMR 1114 EMMAH Domaine Saint Paul 84914, Avignon Cedex 09, France

---

#### HIGHLIGHTS

- Chlorpyrifos-ethyl exposure killed fewer earwigs from conventional orchard.
- High carboxylesterases/glutathione-S-transferases found in pre-exposed earwigs.
- Acetylcholinesterase was less sensitive in earwigs from conventional orchard.
- Chlorpyrifos-induced inhibition of acetylcholinesterase was higher in males.

---

Figure 17 : Publication n°1



## 1 Introduction

The widespread use of pesticides in agriculture to control crop pests is having adverse side effects on the environment (Köhler and Triebkorn, 2013). These side effects have been classified into two categories: ecotoxicity (Carson, 1962) and pest resistance to pesticides. Rachel Carson was the first scientist to describe ecotoxicity in 1962 in her book *The Silent Spring* (Carson, 1962). Fifty-seven years later, we are still observing the deleterious effects of pesticides on non-target and beneficial organisms.

Apple orchards are highly productive crops. In France, approximately 54,000 ha of apple orchards are sprayed with pesticides with, on average, more than 30 pesticide applications per year in Provence (Mazzia et al., 2015; Sauphanor et al., 2009). Among these treatments, organophosphorus (OP), neonicotinoid and synthetic pyrethroid compounds are the most widely used insecticides.

Considered as beneficial insects in apple orchards, earwigs (*Forficula auricularia* (Linnaeus)) have been extensively studied due to their key role in the regulation of pests such as aphids, leaf rollers and psyllids (Dib et al., 2010b, 2011). Their ease of capture and identification make them an interesting potential bioindicator of orchard management intensity. It has been shown that pesticides, as well as other practices such as tillage and hedge quality, are likely to have an impact on their energy reserves and morphological traits (Suchail et al., 2018) abundance and diversity (Sharley et al., 2008; Moerkens et al., 2012; Malagnoux et al., 2015b). Several studies have also shown that insecticides directly affect their biochemical (Malagnoux et al., 2014), or behavioral biomarkers such as predatory activity (Sauphanor et al., 1993; Malagnoux et al., 2015a). The impact of pesticides depends on the earwig species: for example, *F. auricularia* is less sensitive to insecticides than *F. pubescens*. Moreover, for both species, a sex-specific response was observed after insecticide exposure (Malagnoux et al., 2015b).

OP insecticides, and especially chlorpyrifos-ethyl, are commonly used in agriculture, and they are highly and acutely toxic to wildlife (Köhler and Triebkorn, 2013). These neurotoxic compounds target acetylcholinesterase (AChE) by permanently binding in its active site (Fairbrother, 1991; Nunes, 2011). The decrease in AChE activity prevents the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), causing cascade effects such as continuous post-synaptic neuron stimulation and severe

neurological disruption. For these reasons, AChE inhibition is the basis of the most popular biomarker of OP insecticide exposure in many vertebrates and invertebrates (Nunes, 2011). After exposure, AChE activity is only restored by de novo enzyme synthesis (Rault et al., 2008).

In addition to AChE inhibition and direct impacts on biochemical and behavioral mechanisms in beneficial arthropods, insecticide exposure can increase resistance (Schmidt-Jeffris and Beers, 2018) and induce tolerance on organisms (Poupardin et al., 2008). Tolerant populations can undergo rapid phenotypic changes. Such acclimation named phenotypic plasticity is defined by the ability of one genotype to produce different phenotypes in response to time or spatial environmental variability (Kelly et al., 2012). It has been shown that plasticity can induce insecticide tolerance in different organisms such as amphibians (Hua et al., 2013, 2015) and aphid pests (Simon and Peccoud, 2018). On another hand, resistance to insecticides can occur via various mechanisms, but modifications to both the detoxification pathways and molecular target of the insecticide are two of the most common ways (R4P, 2016). Two major stages of metabolic transformation of insecticides underlie biotransformation-based acclimation or resistance (Li et al., 2007): (i) a phase of functionalization which results in oxidation by cytochrome P450 multiple function oxidase (CYP<sub>450</sub>) (Puinean et al., 2010). This phase involves a second step, ester hydrolysis or bioscavenging (especially for OP insecticides) by carboxylesterases (CbEs) which can enhance the functionalization stage (Jokanović et al., 1996) or decrease the available OP concentration (Wheelock et al., 2005); and (ii) a second stage named conjugation using glutathione conjugation through the Glutathione-S-transferases (GSTs), the most important enzyme group involved (Kostaropoulos et al., 2001; Enayati et al., 2005). Through these different stages, degradation products are generally less toxic than parent molecules and more easily excretable, but numerous examples also showed an increase in toxicity (Casida, 2016). This was particularly the case for organophosphorus insecticides (OPs), which are activated by CYP<sub>450</sub> (L. G. Costa, 2006).

According to Aldridge classification (Aldridge, 1953), CbEs (EC 3.1.1.1.) belong to the B-esterases which are inhibited by OPs while A-esterases are able to hydrolyze OP compounds. CbEs play an important role in the metabolism of many agrochemicals and pharmaceuticals products. In particular, they hydrolyze pyrethroids and they bind

stoichiometrically to carbamates and organophosphates (Wheelock et al., 2005). These serine hydrolases are often more sensitive to inhibition by OPs than AChE (Wheelock et al., 2008) so this chemical interaction is considered an efficient mechanism of OP detoxification by which fewer OP molecules may reach the active AChE site. CbEs consist of multiple isozymes with variable levels and activities. Their expression and activity are tissue and organism-dependent, and they can be found in digestive tissues, muscle or brains (Wheelock et al., 2008). It is well known that the variability in CbEs levels as well as relative iso-enzyme abundance contribute to the selective toxicity of ester-containing insecticides in both mammals and insects, and previous results have pointed out their role in the tolerance of some insect pests to OP pesticides (Farnsworth et al., 2010; Reyes et al., 2011).

GSTs enzymes (EC 2.5.1.18.) are involved in the detoxification of various endogenous and xenobiotic compounds, such as drugs, insecticides, organic pollutants, secondary metabolites and other toxins (Hayes et al., 2005). They increase the efficiency of conjugation of the cysteine sulphhydryl group of glutathione (GSH) with xenobiotics. An electrophilic site of insecticides reacts with this sulphhydryl group of GSH leading the formation of GSH conjugates. These conjugates are more readily excreted than the parent insecticide (Sheehan et al., 2001; Hayes et al., 2005). In general, GSTs can be classified into at least four subgroups according to their subcellular location and function: cytosolic, mitochondrial, microsomal and bacterial antibiotic resistance proteins (Sheehan et al., 2001). A majority of insect GSTs are cytosolic enzymes and have been grouped into two main classes (Lumjuan et al., 2007). It is now well established that insect GSTs are associated with resistance to organophosphate, pyrethroids and organochlorine insecticides (Hemingway and Ranson, 2000; Li et al., 2007; Lumjuan et al., 2011). Moreover, increases in GSTs activity and expression levels in pyrethroid resistant mosquitoes have also been reported (Li et al., 2007).

Resistance can also be due to target specific mutations. Point mutations in the AChE gene resulting from intensive use of OPs have been identified in many insect species and most are localized in the active site which decreases AChE inhibition (Mutero et al., 1994; Chen et al., 2001; Weill et al., 2003; Anazawa et al., 2003; Li and Han, 2004; Cassanelli et al., 2006). However, the detailed impact of each mutation

on the protein structure remains unclear. Point mutations provide specific resistance and depending on the insecticide tested, they may induce resistance or not (Fournier, 2005)

The aim of this study was to assess the effects of three orchard management strategies, organic, integrated pest management (IPM) and conventional practices, on *F. auricularia* metabolic pathways and the sensitivity of the AChE target. Both CbEs, and GSTs were investigated as metabolic pathways involved in resistance and/or tolerance. They were studied on earwig populations either before or after exposure to chlorpyrifos-ethyl.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemicals

The 1-naphthyl acetate (1-NA), 1-naphthol, acetylthiocholine iodide (AcSCh), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), Fast Garnet, reduced glutathione (GSH), 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), and a protease inhibitor cocktail were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). The pure OP molecule chlorpyrifos-oxon (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphate) was purchased from Cluzeau Info Lab (France). For in vivo tests, we used a commercial liquid formulation of the OP insecticide chlorpyrifos-ethyl (*Pyrinex@ME*®, active ingredient 250g a.i. L-1, Philagro).

### 2.2 Earwigs sampling and bio-tests

French orchards can be classified into three management practices depending on the type and frequency of pesticides used: 1) organic orchard where all chemical pesticides are replaced with natural products (organic); 2) integrated pest management (IPM), where chemical pesticides are used sparingly according to damage thresholds and finally, 3) conventional orchards (conv), where chemical pesticides are routinely used within the limits of the French law. Within these different strategies we chose 3 commercial orchards (1 orchard per practice), with known contrasted treatments for the last ten years especially concerning the use of OP insecticides (Tableau 6). All orchards are located in Noves, near Avignon (south-

eastern France) within a 10 km radius. Even if very mobile on plants, the dispersal distance of earwigs is very low, less than 30 m per month (Moerkens et al., 2010). This means that we studied 3 distinct populations strongly under the influence of local pesticide use.

*Tableau 6 : Nombre de traitements en vergers pommiers :*

Earwig population	Origin	OP insecticides per year	Neurotoxic insecticides per year
Organic	Organic commercial apple orchard using « Alt'Carpo » netting system	0	0
IPM	Commercial apple orchard under IPM strategy	1	6
Conv	Commercial apple orchard under conventional strategy	5,9	11,4

*Origin of earwig populations analyzed and the average of their received treatments regarding OPs and total neurotoxic insecticides in the last 10 years. Neurotoxic insecticides include OP, neonicotinoid and synthetic pyrethroid compounds.*

Earwig populations collected in organic orchards are considered as naïve population regarding OP exposure since they never were exposed to OP treatments, while those from conventional orchard were pre-exposed for years to OP since such treatments were applied more than twice a year every year in the last 20 years except in the last 2 years. Earwigs from IPM are considered as less exposed to OP because after a period of about 1-OP treatment per year, no OP was applied in the IPM orchard since 2013.

Male and female adult *F. auricularia* earwigs were collected in July 2017, using cardboard traps placed around the trunk of the apple trees in orchards under the three different management strategies described above: organic, integrated pest management and conventional. Since *F. auricularia* species is univoltine, adults were of roughly the same age and care was taken to sample earwigs of similar weight. All bio-test experiments were conducted with Pyrinex® an insecticide authorized in the European Union and commonly used in French non-organic apple orchards until 2017. The insecticide solution was diluted with distilled water to adjust the pesticide concentration to the Normal Application Rate (NAR) allowed in French apple orchards (50 g.hL<sup>-1</sup> active ingredients, chlorpyrifos-ethyl). Petri dishes (8cm diameter) were used for exposure by adapting the method described by Sauphanor *et al.* (1992), and

Malagnoux *et al.* (Malagnoux et al., 2015a). A volume of 115  $\mu\text{L}$  of pesticide solution was applied with a pre-moistened paintbrush on the Petri dish surface to mimic commercial sprayers. The insecticide was left to evaporate for 30 min under an extractor hood to dry the dish before earwig exposure. Control earwigs were exposed to water in the same conditions. For each treatment (control, and chlorpyrifos-ethyl) 50 males and 50 females were placed separately in groups of 5 individuals per Petri dish containing a shelter (small piece of corrugated cardboard) and a piece of food (corn diet) to prevent cannibalism. The Petri dishes were incubated overnight for a 12h exposure time in a climate-controlled chamber at 20°C and subjected to variations in natural light. After this incubation time, the earwig status (alive or dead) was noted. Alive earwigs were frozen at -80°C for biochemical measurements. Earwigs were noted alive when they were able to walk and had moving legs or antenna when physically stimulated with a paintbrush.

### 2.3 Sample preparation

The head, thorax and abdomen of the earwigs were dissected and used separately to measure enzyme activities. Abdomens were used for GSTs and CBEs measurements while AChE was measured in the head, which is where this enzyme is produced. Individual tissue samples were homogenized on ice using a homogenizer (Ultra Turrax IKA T18 basic at 14 000 rpm) in 10% (w/v) 50 mM Hepes buffer pH 7 for the abdomen or 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 for the head (aprotinin, leupeptin and pepstatin = 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , antipain = 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , trypsin inhibitor = 1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). Tissue homogenates were centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C and the crude extracts (supernatants), were kept. Abdomen homogenates were immediately used for CBEs and GSTs measurements while head extracts were stored at -20°C with 10% glycerol as an enzyme stabilizing agent until analysis.

### 2.4 Enzyme assays

All enzyme activities were measured spectrophotometrically in triplicate using a microplate reader (Synergy HT, Bio-Tek).

CBE activity was quantified by measuring the degradation of 1-naphthyl acetate (1-NA) to 1-naphthol (Thompson, 1999). The reaction medium (195  $\mu\text{L}$  final volume)

containing 1  $\mu\text{L}$  of diluted (1/20) abdomen extract, 50 mM Hepes buffer (pH 7), 0.03 mM 1-NA (final concentration) was stopped after a 20 min incubation at 25°C by adding 55  $\mu\text{L}$  2.5% SDS containing 0.04% Fast Garnet GBC. The solutions were left to stand for 20 min at room temperature in the dark, and the absorbance of the 1-naphthol-Fast Garnet complex was read at 590 nm. Enzyme activity was calculated from a standard curve ( $A_{590} = f([1\text{-naphthol}])$ ) containing pure 1-naphthol as standard, in the same conditions.

GST activity was measured at 340 nm for 3 min (Habig et al., 1974) in a reaction mixture (200  $\mu\text{L}$  final volume) containing 10  $\mu\text{L}$  of diluted (1/10) abdomen extract, Hepes buffer 50 mM (pH 7), 0.75 mM CDNB prepared in ethanol, and 2.5 mM GSH final concentrations.

The AChE activity was monitored at 412 nm at 25°C following the method of Ellman *et al.* (1961) and adapted by Rault *et al.* (2008), using a millimolar extinction coefficient ( $6,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) calculated according to a dithiotreitol-DTNB external calibration curve. The reaction mixture (200  $\mu\text{L}$  final volume) contained 2  $\mu\text{L}$  of head extract, 0.375 mM DTNB, 1.5 mM AcSCh in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH=7).

Blanks (reaction mixture free of sample) were checked for non-enzymatic hydrolysis of the substrates. The final activities were expressed as units per milligram of total protein ( $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein for AChE and  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein for CBEs and GST). One unit of enzyme activity was defined as one micromole of formed product per minute under the experimental conditions described above. Total protein content was determined using the Bradford method (Bradford, 1976), with bovine serum albumin as a standard.

## 2.5 *In vitro* acetylcholinesterase inhibition kinetics

*In vitro* inhibition kinetics were conducted to test for a direct interaction between chlorpyrifos-ethyl-oxon and AChE activity. Tissue homogenates from unexposed earwigs (8  $\mu\text{l}$ ) were incubated individually with serial concentrations of chlorpyrifos-ethyl-oxon ( $10^{-12}$  to  $10^{-3}$  M final concentration) for 30 min at 25°C. The inhibition assay was terminated by adding the substrate (AcSCh), and the residual AChE activity was measured as described above.

## 2.6 Statistics

### 2.6.1 In vitro inhibition

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:

$$y = E_0 \cdot e^{(-b \times t)} + E_{res}$$

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  $IC_{50} = \ln(2)b^{-1}$ .

### 2.6.2 Mortality and activities tests

The significance of all results was tested using permutation tests due to non-respect of normality and homoscedasticity (Software; R version 3.4.3 and RStudio version 1.1.423). We used the package 'lmPerm' (Wheeler and Torchiano, 2016) and the function `aovp` combined with the function `pairwise.perm.t.test` from `RVAideMemoir` package. "Fdr" adjust of p-value were used due to risk of multiple comparison.

### 2.6.3 Specificity of mortality data

The first `aovp` test showed that no significant differences were observed for mortality depending on earwig sex (p-value 0.6667). Thus in further analyses and especially for mortality, males and females were grouped.

## 3 Results

### 3.1 Mortality

At the normal application rate allowed in French apple orchards, chlorpyrifos-ethyl led to high mortality in earwigs after 12 hours exposure, with marked differences depending on their origin (Figure 18). Earwigs collected in either organic or IPM orchards were more sensitive than earwigs collected in conventional ones (p-value: 0.006 IPM-Conventional and 0.015 Organic-Conventional). More than 80% mortality was observed in earwigs from organic and IPM, whereas less than 50% mortality was observed in earwigs from the conventional orchard.



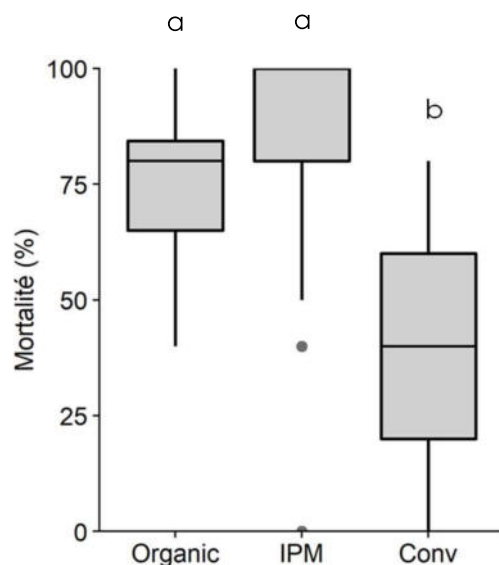


Figure 18 : Mortality of organisms

Effect of chlorpyrifos-ethyl exposure (12h, in a climate-controlled chamber at 20°C and subjected to variations in natural light) on *E. auricularia* mortality (%). Tukey box plots indicate the median, 25th and 75th percentiles (box edges), the range (whiskers) and outliers (black dots). Different letters denote significant differences between management strategies (p-value: 0.003).

### 3.2 Impact of chlorpyrifos-ethyl on metabolic pathways

Unexposed males and control females from conventional orchards exhibited about two times higher basal CbE activity compared to earwigs from organic and IPM orchards (p-value < 0.005 for both sexes). A four times higher level in unexposed constitutive GST in earwigs from conventional orchards compared to organic and IPM ones was also observed (p-value < 0.005 for both sexes) (Tableau 7; Figure 19).

Tableau 7 : Specific activity of the protective metabolism

	Acetylcholinesterase (mU.mg-1)			Carboxylesterase (U.mg-1)			Glutathion-S-transferase (U.mg-1)		
	Organic	IPM	Conv	Organic	IPM	Conv	Organic	IPM	Conv
Male	40.86 ±17.68	40.81 ±15.01	32.63 ±12.24	1.01 ±0.29	1.03 ±0.44	1.86 ±0.69	1.77 ±0.56	2.8 ±1.92	9.18 ±4.57
Female	30.55 ±16.39	26.35 ±12.98	28.62 ±13.49	0.69 ±0.31	0.92 ±0.59	1.52 ±0.66	1.98 ±1.16	4.24 ±3.31	8.83 ±3.83

Specific enzyme activities, expressed as U.mg-1 protein (mean±SD) were measured in homogenates from the head (AChE) or abdomen (GSTs and CbE) of *Forficula auricularia* earwigs, sampled from three different management strategies.

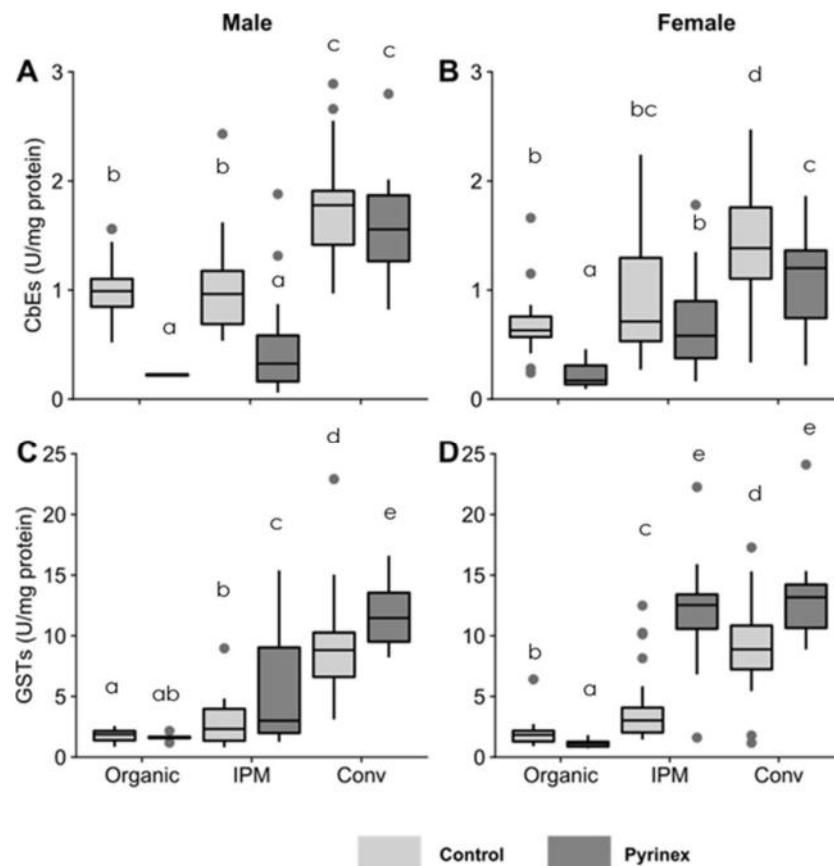


Figure 19 : Defense metabolism

Response of Carboxylesterase (CbE) activities ( $U \cdot mg^{-1}$  proteins) for males (A) and females (B) and Glutathion-S-Transferase (GST) activities ( $U \cdot mg^{-1}$  proteins) for males (C) and females (D) depending on management strategy after 12h exposure to chlorpyrifos-ethyl. Tukey box plots indicate the median, the 25th and 75th percentiles (box edges), the range (whiskers) and outliers (black dots). Different letters indicate significant differences between orchards and treatment (the CbEs p-values for male and female between orchard and treatment were less than 0.001 (same results for GSTs). Activities were measured on extracts from the abdomen of the earwig *Forficula auricularia*. For each experiment  $n=20$ , except for the earwigs collected in organic orchards after chlorpyrifos-ethyl exposure where  $n=6$ .

After exposure to chlorpyrifos-ethyl, sex and earwig origin influenced the effect on CBEs activity. We observed a strong decrease in CBEs in male earwigs caught either in organic or IPM orchards (78.0% and 54.5% inhibition respectively). For females, only those collected in the organic orchard showed a strong decrease in activity (-67.7%), with no significant difference observed for females from the IPM orchard. Regarding the conventional orchard, a 29.9% decrease was observed for females (p-value= 0.033), while no significant inhibition was recorded for males (p-value= 0.169) (Figure 19A & 19B).

In contrast, after exposure to chlorpyrifos-ethyl, GSTs activity increased, for both male and female earwigs collected in IPM and conventional orchards (Figure 19C &

19D). This increase was more pronounced for females, especially for females collected in the IPM orchard (Figure 19D). Concerning earwigs collected in the organic orchard, despite their weak GSTs activity, we observed a significant decrease in this enzyme activity for females, but no modification was observed for males.

### 3.3 Impact of chlorpyrifos-ethyl on acetylcholinesterase activity

Basal AChE activity levels in both male and female earwigs are summarized. No significant differences could be observed either between sexes or management strategies. However, exposure to chlorpyrifos-ethyl, induced a sex-dependent response in AChE activity (Figure 20). Strong and significant decreases in AChE activity were observed for males after chlorpyrifos-ethyl exposure (80.3%, 45.4% and 73.4% inhibition for organic, IPM and conventional orchards respectively; p-values= 0.003 for each strategy) while the female AChE remained constant (p-value= 0.878; 0.530 and 0.105 for organic, IPM and conventional strategies respectively).

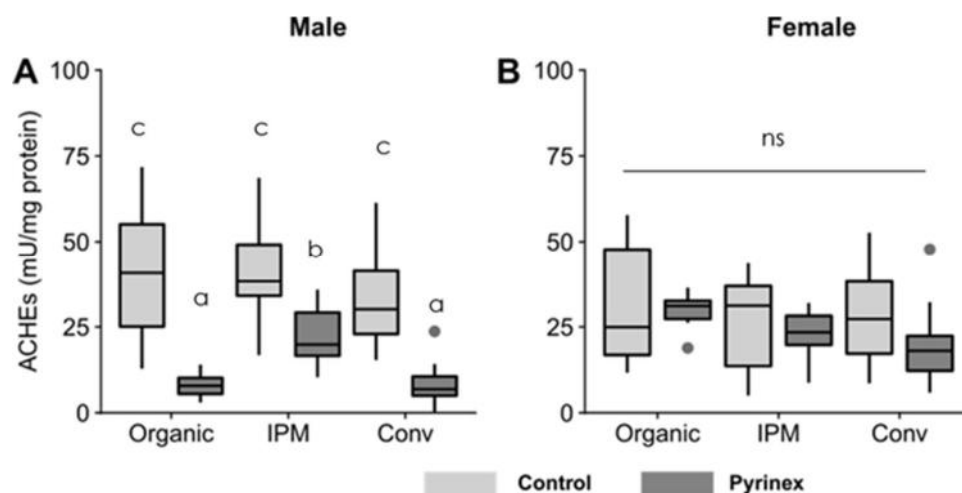


Figure 20 : Specific activity of AChE

Response of Acetylcholinesterase (AChE) activity in earwig males (A) and females (B) depending on management strategy after 12h exposure to chlorpyrifos-ethyl. Tukey box plots indicate the median, 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles (box edges), the range (whiskers) and outliers (black dots). Significant differences between orchards and treatment are indicated by different letters (females p-value for treatment = 0.08; female p-value for orchard = 0.19; male p-value <0.001 for both factors). For each experiment n=20, except for the earwigs collected in organic orchards after chlorpyrifos-ethyl exposure where n=6.

*In vitro* inhibition kinetics in homogenates incubated in the presence of chlorpyrifos-ethyl-oxon generated typical sigmoid dose-dependent curves (Figure 21). The estimated IC<sub>50</sub> values for the female earwigs AChE were 7.83x10<sup>-8</sup> M (organic); 9.30x10<sup>-8</sup> M (IPM); 4.51x10<sup>-7</sup> M (conventional). IC<sub>50</sub> values for the male earwigs were 1.30x10<sup>-7</sup> M (organic); 8.68x10<sup>-8</sup> M (IPM); 5.30 x10<sup>-7</sup> M (conventional). Both sexes

exhibited very closely related  $IC_{50}$  values. In order to compare AChE sensitivity between strategies, a susceptibility ratio (SR) was calculated by dividing the conventional  $IC_{50}$  by organic or IPM  $IC_{50}$ , for each sex independently. An increase in sensitivity compare to conventional organisms is indicated by values greater than one (Tableau 8).

Tableau 8 : Susceptibility ratio of AChE

	SR values for males	SR values for females
Organic	4.11	5.76
IPM	6.11	4.85

Susceptibility ratio (SR) for *in vitro* inhibition kinetics of AChE incubated in the presence of chlorpyrifos-ethyl-oxon ( $10^{-12}$  to  $10^{-3}$  M final concentration) for 30 min at 25°C. The SR is calculated by dividing the conventional  $IC_{50}$  by the organic or IPM  $IC_{50}$ , for each sex independently. A value greater than 1 indicates increased sensitivity.

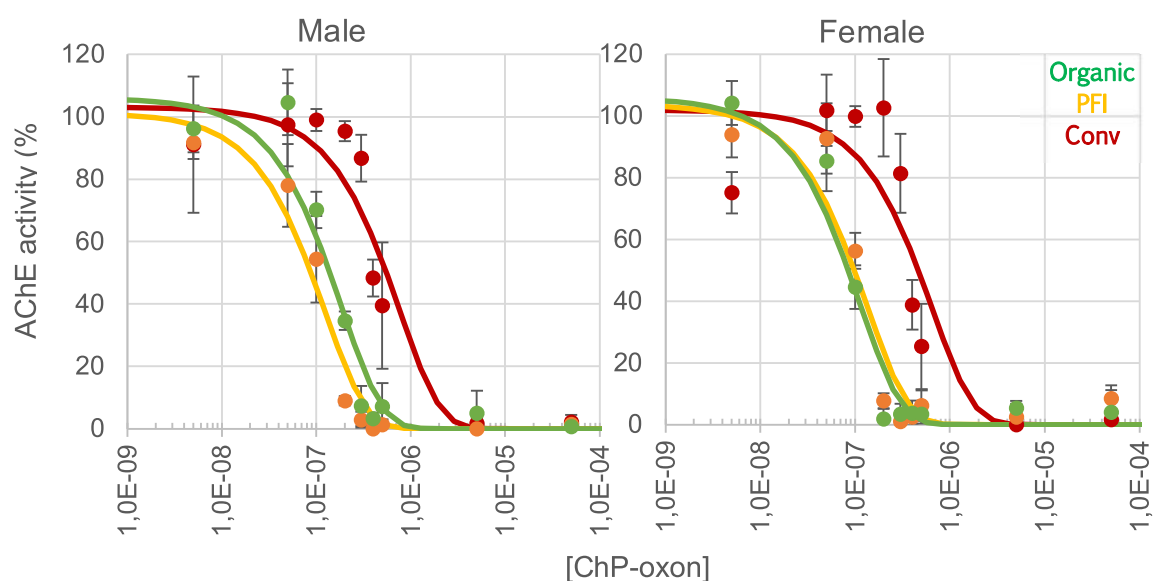


Figure 21 : Sensibilité de l'AChE *in vitro*

Dose-dependent inhibition curves for *Forticula auricularia* acetylcholinesterase (AChE) in the presence of serial molar concentrations of chlorpyrifos-ethyl-oxon. Symbols are the mean $\pm$ SD expressed as percentage of the control. Each point corresponds to the mean of three independent assays.

## 4 Discussion

There is increasing interest on understanding the underlying mechanisms that drive evolutionary responses of populations to environmental changes including the role of plasticity and resistance (Garnas, 2018). Insecticide resistance in non-target organisms reflects the long-term negative effects of pesticides. It highlights the adaptive response and evolution of non-target organisms subjected to anthropic pressure. A number of studies assessed the toxic impacts of insecticides on pests but currently there is increasing interest in also assessing the impacts on beneficial species, by describing the side-effects of pesticides with lethal and sub-lethal consequences (Desneux et al., 2007; Biondi et al., 2012; Benamú et al., 2013; Schmidt-Jeffris and Beers, 2018). In apple orchards, earwigs are an interesting beneficial arthropod. Based on the lethal response data obtained in the present study, the 50% decrease in mortality of *F. auricularia* collected in a conventional apple orchard (compared to organic or IPM orchards) suggests resistance to the insecticide in this population. A similar decrease in mortality was previously observed in different insect species such as pests (Aïzoun et al., 2013; Grigg-McGuffin et al., 2015) or natural enemies (Tirello et al., 2012). Resistance to pesticides in effective biocontrol agents can be a desirable feature. For example, the release of resistant populations of the predatory mite *K. aberrans* had been successfully carried out in vineyards and apple orchards where pest control strategies included chlorpyrifos and other pesticides (Duso et al., 2009, 2012; Ahmad et al., 2013). Here, we have demonstrated for the first time that the earwig *F. auricularia* is able to acquire resistance to chlorpyrifos insecticides.

Resistance to insecticides is known to depend on either change in specific metabolic pathways or mutation of the insecticide's molecular target. The response of two major enzyme families commonly involved in xenobiotic detoxification including pesticides, GSTs and CbEs partially supported our hypothesis that resistance could have arisen in the conventional orchard. First, a higher constitutive activity of both GSTs and CbEs in earwigs collected in the conventional orchard (compare to the organic one) is consistent with resistance in this species. We observed that basal GST activity was 4-times higher in these earwigs compared to those from the organic orchard. Previous studies have shown the involvement of GSTs in resistance to organophosphate insecticides in the codling moth (Fuentes-Contreras et al., 2007;

Voudouris et al., 2011). In the housefly *Musca domestica*, GSTs activity was correlated with an increased level in mRNA and proteins, with a 2-4 times-higher level in resistant strains compared to susceptible ones (Fournier et al., 1992). Similar effects were described for resistant versus susceptible strains of the diamondback moth *P. xylostella* and the cockroach *B. germanica* resistant to chlorpyrifos-ethyl (respectively a 2.2- and a 3.4-times higher GSTs activities) (Yu and Nguyen, 1992; Valles and Yu, 1996); for the tufted apple bud moth *P. idaeusalis* resistant to azinphosmethyl (2-times higher GSTs activity, (Carlini et al., 1995) ; and for the red flour beetle *T. castaneum* and the mosquito *A. aegypti* resistant respectively to malathion and temephos (5 and 4.6-fold higher GSTs activity, (Rodríguez et al., 2002). On another hand, in the present study, we observed that GST activity was strongly induced, after exposure to chlorpyrifos-ethyl in both pre-exposed (from conventional) and mid-exposed (from IPM) earwig populations. Such an induction highlights the capacity of earwigs from those orchards to rapidly respond to OP exposure, which agrees with high phenotypic plasticity in those individuals compare to the absence of response for naïve earwigs (in organic orchard). Moreover, despite the low basal GST activity observed in earwigs from the IPM orchard, the rapid induction of their GST activity reflects a positive selection of individuals exhibiting efficient detoxification mechanism. The low basal GST activity observed in earwigs from IPM orchard, suggests that when insecticide pressure was relaxed (end of OP treatments since 2013) susceptible genotypes could have survived and reproduced themselves. However, among this earwig population, a substantial amount of individuals were able to maintain their ability to adapt to insecticide exposure. These two events confirm the plasticity of the individuals belonging to the IPM population. They are consistent with the potential role of plasticity in evolutionary response to pesticides depending on spatiotemporal variation in pesticide exposure which can lead to rapid environmental changes.

The second metabolic pathway investigated involved CbE isoenzymes. As specified above, constitutive CbEs activity in *F. auricularia* collected in the conventional orchard was two times higher than that measured in the other earwigs. This result is similar to the quantitative increase observed in the codling moth and the cotton aphid, where respectively a 2- and a 3.7-times higher constitutive activity in resistant compare to susceptible strains was found (Y. Pan et al., 2009; Reyes et al., 2011). This enhanced

production of CbEs confers resistance to insecticides, such as organophosphates, carbamates, and to a lesser extent, pyrethroids by sequestering and metabolizing these insecticides before they reach the nervous system (Bass et al., 2014). A quantitative increase in CbEs activity has been shown to induce broader metabolic resistance compared to qualitative modification (Cui et al., 2015). In this case, the protection results in an effective molecular sequestration of OP insecticides (Sogorb and Vilanova, 2002; Wheelock et al., 2008), which avoids inhibition of AChE, the molecular target of OP. This protective mechanism has been described in numerous cases including aphids (Sun et al., 2005; Bass et al., 2014) and mosquitoes (Mouches et al., 1986; Hopkins et al., 2017).

We observed a decrease in male AChE activity after exposure to chlorpyrifos-ethyl. The inhibition rate was similar in earwigs from the conventional and organic orchards but slightly different in those from the IPM orchard. However lethal responses suggested that earwigs from the conventional orchard were able to best survive the chlorpyrifos-ethyl exposure. Therefore, we performed an *in vitro* inhibition trial with chlorpyrifos-oxon to elucidate whether the higher susceptibility of earwigs from the organic orchard, could be explained by a higher affinity of AChE for chlorpyrifos-oxon. The AChE IC<sub>50</sub> values of males and females from organic and IPM were lower than those from conventional orchards (4- and 5.5-times respectively). Therefore, the intrinsic sensitivity of AChE to this OP insecticide could be a significant additional explanation for the differences observed between management practices. AChE activity and sensitivity support the ability of earwigs collected in conventional orchards to better cope with chlorpyrifos exposure. In addition, our findings highlight the fact that higher resistance levels could be reached when an increase in CbEs activity was associated with a modified and less sensitive form of AChE. It is generally accepted that modified AChE leads to a specific insensitivity to OPs as demonstrated in Hemiptera, Diptera and mites (Russell et al., 2004; Gilbert and Gill, 2010), but in some cases, no corresponding mutations could be found in partial gene sequences from resistant insects (Javed et al., 2003). Deeper analysis to evaluate *F. auricularia* AChE susceptibility is needed to better allocate which is due to tolerance and resistance mechanisms.

In addition to earwig origin, AChE inhibition after chlorpyrifos exposure depended on sex. In recent studies, we have shown that *F. auricularia* males are more sensitive to OP insecticides than females using both biochemical biomarkers (Malagnoux, 2014) and predation activity (Malagnoux et al., 2015a). The  $LD_{50}$  observed for chlorpyrifos-ethyl and acetamiprid on *F. auricularia* confirmed that males are slightly but significantly more sensitive than females (Malagnoux et al., 2015b). The *in vivo* response of AChE to chlorpyrifos-ethyl exposure observed in the present study, clearly support the differential responses of males and females in this earwig species. These results point out the need to analyze both sexes independently, to better assess the impact of insecticides on this species either from a biochemical or physiological point of view.

Insecticide resistance is frequently associated with fitness costs, explaining why susceptible genotypes increase in frequency when insecticide pressure is relaxed (Emden and Harrington, 2007). It is well known that reallocation of energy reserves to maintain homeostasis under pesticide exposure mainly focuses on protein induction to improve defense mechanisms, which often involves overproduction of detoxification enzymes (Calow, 1991; Kooijman, 2009). Earwigs from conventional orchards increase detoxification metabolism and divert energy from maintenance and growth. Indeed, *F. auricularia* weighed less and had smaller morphometric traits (inter-eye distance, femur length) in conventional than organic orchards (Suchail et al., 2018) which is consistent with the reallocation of reserves to current induction of GSTs and higher CbE levels.

In conclusion, this study is the first report of *F. auricularia* insecticide tolerance. Our results underline the differences in metabolic pathway responses in earwig populations influenced by their historic management strategies. In particular, constitutive GSTs and CBEs activity levels were higher, and a decrease in sensitivity of AChE was observed in male and female earwigs pre-exposed in the conventional orchard. After exposure the absence of AChE inhibition in females suggests that, *in vivo*, further mechanisms could be involved in this sex. Other biological parameters should additionally be investigated and extended to higher amount of commercial orchards to fully understand relationships between insecticide use and susceptibility, and define how agricultural strategies influence earwig life-history traits. Overall our findings highlight the need to develop an integrated approach to assess both the



physiological and biochemical modifications induced by pest management strategies on natural enemies.

## Chapitre 4 : Impacts des pratiques culturales sur les réserves énergétiques et les traits morphométriques chez *F. auricularia*

Ce chapitre est consacré à l'étude des coûts de la tolérance aux insecticides chez les forficules. Une première étude réalisée sur un nombre restreint de vergers a montré que les forficules provenant des vergers conventionnels et PFI avaient des réserves plus faibles que les autres organismes provenant des vergers AB. Cette diminution de réserve a des répercussions sur la croissance des organismes et plus spécifiquement sur la distance interoculaire, ainsi que le prothorax. L'ensemble de ces données a été valorisé par une publication (Figure 22).

Environmental Science and Pollution Research  
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-2371-x>

RESEARCH ARTICLE



### **An exploratory study of energy reserves and biometry as potential tools for assessing the effects of pest management strategies on the earwig, *Forficula auricularia* L**

Séverine Suchail<sup>1</sup> · Adrien Le Navenant<sup>1,2</sup> · Yvan Capowiez<sup>3</sup> · Alain Thiéry<sup>1</sup> · Magali Rault<sup>1</sup>

Received: 8 February 2018 / Accepted: 22 May 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

*Figure 22 : Publication n°2*

Nous avons élargi l'étude à un plus grand nombre de vergers par pratique. De nouveaux traits morphométriques (fémur, cerques) ont été analysés afin de déterminer si certaines fonctions de l'organisme pouvaient être impactées (déplacement, reproduction, défense). Les données ont été présentées sous forme d'un poster au colloque « resistance 19 » (Rothamsted, GB 2019). Cette étude sera soumise à publication en 2019, sous le titre provisoire : « Impact of insecticide tolerance on energy reserves and morphometric traits in two succeeding generations of the earwig *F. auricularia* »

## 1 Introduction

Agricultural production needs to increase to meet the needs of a growing world population. Doing so in ways that do not compromise environmental integrity and public health is a greater challenge still (Gorbach, 2001; Tilman et al., 2002). The advent of the chemistry and mechanic has radically changed how we cultivated. Nowadays, we observed larger production system and widespread use of pesticide to control crop pests. These pesticides may cause adverse side effects to the environment (Köhler and Triebkorn, 2013). In organisms, different levels of biological organization are impacted by pesticides use, from neurotoxicity, immunotoxicity, and altered metabolism to altered behavior which could induce cascade events at higher levels with population decline and affect ecosystem functioning (Köhler and Triebkorn, 2013). In this context, agricultural practices reducing biodiversity decrease goods and services of non-target organisms, because services depend both on the number and type of species in ecosystem (Mace et al., 2012).

Despite this awareness, apple orchards are still highly productive crops with, on average, about 30 pesticide applications per year in Provence, South-Eastern France (Sauphanor et al., 2009; Mazzia et al., 2015). Two main pest management strategies are generally identified in commercial apple orchards: Integrated Pest Management (IPM) with a 35 Treatment Frequency Index (TFI corresponding to the total number of pesticide treatments), and organic farming with on average a 25 TFI. Both practices are using insecticides with a TFI of 15.7 for synthetic ones on IPM and 14.9 for natural ones on organic orchards (including microbial insecticides). Among these treatments, organophosphorus (OP), neonicotinoid and synthetic pyrethroid compounds are the most used insecticides on IPM where we can define different intensity level. Today, there is general agreement among the public and, growers that crop protection should rely less on the use of synthetic pesticides and more on agro-ecology principles (Marliac et al., 2015; Jones et al., 2016). Among these principles, biological control through the promotion of natural enemies and with limited use of pesticides is of prime importance (Beers et al., 2016).

European earwigs *Forficula auricularia* (Linnaeus) are considered as beneficial predators in apple orchards. They have been extensively studied for the regulation of pests such as aphids, leaf rollers and psyllids (Debras *et al.*, 2007; Dib *et al.*, 2010a;

Dib *et al.*, 2011; Orpet *et al.*, 2019). In addition, earwigs shelter in tight spaces during the day, so they are relatively easy to capture. Their easy identification makes them an interesting potential bioindicator of the orchard management intensity. Their abundance and diversity could be influenced by practices such as tillage and hedge quality (Sharley *et al.*, 2008; Moerkens *et al.*, 2012) and by pesticides use (Malagnoux *et al.*, 2015a; Malagnoux *et al.*, 2015b). However, despite a decrease in their abundance in treated orchards, tolerance to OP insecticides has been mentioned after a long term pesticide pressure in the earwigs *F. auricularia* (Le Navenant *et al.*, 2019).

It is well known that insecticide tolerance can be associated with fitness costs (Rivero *et al.*, 2011), and this explains why susceptible genotypes increase in frequency when insecticide pressure is relaxed (Foster *et al.*, 2017). This reduction of energy reserve is the consequence of trade-offs, resulting in the reallocation of energetic resources from a primary function (such as egg production) to maintain a secondary function (such as overproduction of detoxifying enzymes). Fitness cost induced by the resistance to OPs insecticide was observed in the diptera *Culex pipens* with effect on predation activity, mating cost, fecundity and development cost in resistant strains (Berticat *et al.*, 2002; Berticat *et al.*, 2004; Berticat *et al.*, 2008).

Glycogen and the lipid triacylglycerol are the predominant energy reserves in animal cells. Both are stored in the fat bodies distributed throughout the body of the insect with triglycerides representing more than 50% of their dry weight (Arrese and Soulages, 2010). Insect fat body plays an essential role in energy storage but also in biosynthesis and metabolic function like production of hemolymph proteins and circulating metabolites (Law and Wells, 1989). Because glycogen can be quickly hydrolyzed to glucose in the hemolymph of insects, its content may vary depending on physiological status and/or environmental conditions (Anand and Lorenz, 2008; Chowanski *et al.*, 2015). On another side, triacylglycerol, formed by fatty acids, can be used for energy production through  $\beta$ -oxidation. They supply higher caloric content per unit of weight than glycogen (Arrese and Soulages, 2010). They provide energy during diapause for organism development and sustain flight activity (Van der Horst, 2003). Proteins produce energy through catabolism and are essential in tissue building, repair and protection. The whole of this reserves are used for growth, maintain and reproduction (Arrese and Soulages, 2010).

In insects, it has been shown that life history traits are linked to various environmental changes such as habitat loss (Öckinger et al., 2010), climate change (Musolin, 2007) or agricultural management strategies (Kliot and Ghanim, 2012) and that diversion of the energy flow to the benefit of detoxification or defense induced a negative impact on those traits (Ribeiro et al., 2001; Silva et al., 2004). Then, alteration of life history traits can affect population dynamic of insects including beneficial arthropods.

The aims of our study were to determine on two succeeding generations of the earwig *F. auricularia*, the first one directly collected in orchards and its progeny obtained under a rearing program, whether the energy reserves (glycogen, lipid and proteins) and morphometric parameters (inter-eye, prothorax and telson widths and femur length), were affected by pesticide use.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemical compounds

Sodium chloride, Tris-HCL, trichloroacetic acid, ethanol, oyster glycogen, glucose, sodium acetate, amyloglucosidase from *Aspergillus niger*, phosphovanilline, sulfuric acid and bovine serum albumin were purchased from Sigma-Aldrich® (Saint Quentin-Fallavier, France) while glucose GOD-PAP kit was purchased from BioLabo SAS® (Maizy, France)

### 2.2 Characterization of crop management strategies in the apple orchards

The study was carried out in the South-East of France, where 24% of French apple orchards are concentrated (Agreste, 2019). We choose 9 apple orchards, in a 20 km circular region around Avignon. A set of characteristics was selected to describe the diversity of practices within these orchards. The selected characteristics focused on pesticide use (TFI for microbial and classical insecticides), and alternative strategies (presence of nets, sexual confusion). Six orchards are classified as IPM strategies where chemical pesticides are used sparingly according to damage thresholds with a TFI of 30 on average (Sauphanor et al., 2009; Marliac et al., 2015; Malagnoux et al., 2015b). Among those orchards we noticed that 3 of them could be considered as “conventional” (named C1; C2 and C3) because they exhibited a higher TFI for insecticides and still did not use sexual confusion against codling moths compared to

the others IPM orchards (named I1; I2 and I3). Three orchards are considered as organic orchards (named O1, O2 and O3) where only “natural” pesticides are authorized. The main pesticides used in organic apple production are copper and sulphur (fungicides), mineral oils, neem (organic oil) and spinosad (insecticides), which target aphids and codling moth and some microbial insecticides targeting codling moth (granulovirus and *Bacillus thuringiensis*). For each orchard, treatment calendars were recorded and analyzed to compute the overall treatment frequency index (TFI) (Jørgensen, 1999). The TFI was determined for insecticides depending on their composition, microbial and organic insecticides were pooled together and compared to synthetic ones.

### 2.3 Earwigs sampling

Male and female adults of *F. auricularia* were caught in October 2015 using cardboard trap placed on apple tree trunk. Since *F. auricularia* species is univoltine, adults were of roughly the same age. Organisms were either directly stored at -20°C until biochemical and morphometric measurements were carried out (20 for each sex), or placed in a rearing program under laboratory conditions with natural variation of light and temperature. Twenty females per orchard were used for the earwig breeding. All the individuals were fed ad libitum, independently of their provenance. Nymphs (at the 4 different stages named N1, N2, N3, N4), male and female adults (October 2016) of the new generation were randomly chosen and withdrawn from the rearing. Ten earwigs per stage (nymphs, females and males) were stored at -20°C for morphometric and reserve contents analysis.

### 2.4 Morphometric measurements

Frozen earwig adults (male and female) and nymphs were slightly thawed to avoid change in morphometric parameters and dried. Then, they were weighed individually using a XT0120A Precisa® electronic precision balance with an accuracy of 0.1 mg. All morphometrics measurements were carried out using an eyepiece micrometer on Nikon® binocular microscope. Measurements were first recorded as unit of the micrometer scale to the nearest 1 mm and were converted into millimeters ( $\pm 0.01$  mm). Each earwig was positioned carefully to avoid bias in measurement and to achieve the same plan of view. A single person carried out all measurements to avoid

user bias. For adults (males and females) and nymphs we measured the maximum width of prothorax, inter-eye and telson and the length of the left femur of 3rd pairs (Suchail et al., 2018).

Adults (male and female) from apple orchards and from breeding were noted respectively F0 and F1.

## 2.5 Crude extract preparation

After the morphometric measurements were done, the earwigs were individually dissected to check for parasitism. The whole body of the earwigs was homogenized on ice in 10% (*w/v*) low-salt buffer containing 10 mM Tris-HCL (pH 7.3) and 10 mM NaCl and centrifuged for 10 min at 3000g according to Suchail et al 2018. The supernatant was used for further glycogen, lipid and protein measurements.

## 2.6 Biochemical measurement

### 2.6.1 Determination of glycogen content

The method based on enzymatic hydrolysis of glycogen by amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) was used according to Parrou and Francois (1997). Solution trichloroacetic 4% acid was added for deproteinization to 250  $\mu$ L; 70  $\mu$ L and 30  $\mu$ L of crude extract (*v/v*) for adults, nymphs N4 and nymphs N3 respectively. The solution was centrifuged at 3000g for 1 min at 4 °C. Two volumes of 95% ethanol were added to precipitate glycogen content that was present in the supernatant. Glycogen was finally pelleted by centrifugation at 5000g for 5 minutes at 4 °C. Ethanol was removed and pellet was dried 2 hours at room temperature. Once dry, glycogen pellet was incubated for 2 hours at 60 °C in 500  $\mu$ L (adults) or 100  $\mu$ L (nymphs) of 0.2M sodium acetate pH 5.2 containing 7 UI of amyloglucosidase. After incubation, the solution was cooled on ice and the amount of glucose generated from glycogen was determined using Glucose GOD-PAP method adapting to 96-well microplate format. Solution mixture containing 250  $\mu$ L of Glucose GOD-POD and 25  $\mu$ L of glucose produced above, was left to stand for 20 min at room temperature before glucose detection by measuring the absorbance at 505 nm. The amount of glucose was calculated from a standard curve ( $A_{505} = f$  [glucose]) containing pure glucose as a standard treated within the same conditions. Because the final values were included, the amount of glycogen was corrected for the glucose content in samples that were not incubated with amyloglucosidase.

### 2.6.2 Determination of lipid content

Total lipids were determined according to Frings *et al.* (1972) adapted to 96-well microplate format (Suchail *et al.*, 2018). Two hundred ninety-eight microliter concentrated sulfuric acid was added either to 2  $\mu$ L of sample or 2  $\mu$ L of standard solution (olive oil). The solutions were homogenized and placed in water at 98°C for 10 min and cooled on ice for 5 min. A 700  $\mu$ L of phospho-vanillin reagent was added to each extract or lipid standard. After homogenization and incubation at 37 °C in a water bath for 15 min, samples were cooled on ice and the absorbance was recorder at 540 nm.

### 2.6.3 Determination of protein content

Total protein content was determined by the Lowry method modified according to Markwell *et al.* (1978), with bovine serum albumin as a standard.

The energy reserve values were derived directly from a standard curve prepared with known concentrations of serum albumin, glycogen or lipid. All assays were conducted in triplicate and the above components were express as milligrams per gram of earwig.

### 2.7 Statistical analysis.

The significance of all results was tested using permutation tests due to non-respect of normality and homoscedasticity (Software; R version 3.4.3 and RStudio version 1.1.423). We used the package ‘lmPerm’ (Wheeler and Torchiano, 2016) and the function `aovp` combined with the function `pairwise.perm.t.test` from `RVAideMemoir` package. “Fdr” adjust of p-value were used due to risk of multiple comparison.

## 3 Results

Only organic and microbial insecticides were applied in organic orchards with an average of 6.6 compared to IPM (2) and conventional (1) orchards. Both IPM and conventional orchards used synthetic insecticides with an average of 4.5 for IPM and



7.6 for conventional. However, considering the total TFI, no significant differences were observed between management strategies (Figure 23).

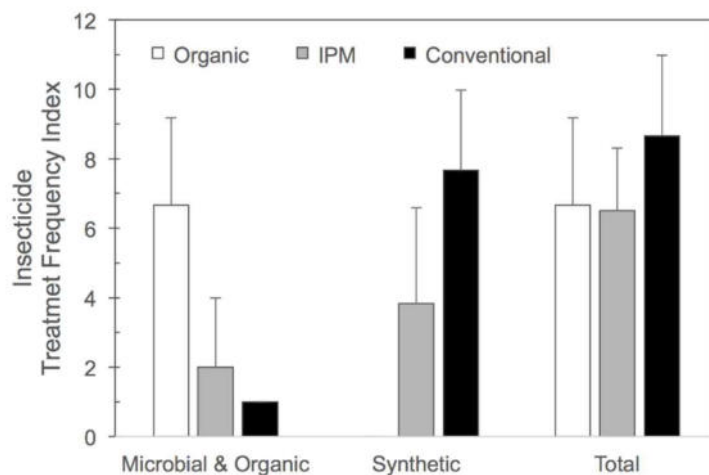


Figure 23 : Treatment Frequency Index applied during 2015  
Mean ± standard deviation of the Treatment Frequency Index for the synthetic or organic insecticides applied during the year 2015 in the orchards investigated, according to their management strategy.

### 3.1 Weight

No differences could be observed depending on management strategy on the weight of earwigs. However, a significant difference could be observed between earwig's weight caught in orchards (F0) and those raised under our breeding program (F1) (p-value<0.001) (Figure 24). The generation obtained after one year under laboratory conditions, (food ad libitum, absence of pesticides and natural temperature of rearing), exhibited significant higher weights than the earwigs reared under field conditions. It appears that, whatever the orchard characteristics or the generation of earwigs (either sampled in orchards or taken from the breeding program) female earwigs were significantly heavier ( $49.9 \pm 1.7$  mg and  $61.4 \pm 2.1$  mg for female F0 and F1 respectively) than males ( $46.7 \pm 1.7$  mg and  $53.4 \pm 1.5$  mg for male F0 and F1 respectively) (p-value<0.05). Regarding the growth of earwig nymphs, the weight increased with a ratio between the N3 to N4 instar of  $2.205 \pm 0.530$  and, between the N4 instar to the adult stage with a ratio of  $2.649 \pm 0.586$  (Tableau 9).

### 3.2 Morphometric traits of *F. auricularia* depending on rearing conditions

Tableau 9 : Ratio de croissance

Management strategy	Body weight		Femur length		Prothorax width	
	N4/N3	Adult/N4	N4/N3	Adult/N4	N4/N3	Adult/N4
Organic	1.84	3.31	1.47	1.22	1.34	1.12
IPM	2.81	2.23	1.45	1.23	1.35	1.10
Conventional	1.95	2.39	1.39	1.18	1.32	1.07
Mean $\pm$ sd	2.20 $\pm 0.53$	2.65 $\pm 0.58$	1.43 $\pm 0.03$	1.21 $\pm 0.02$	1.33 $\pm 0.01$	1.10 $\pm 0.02$

Ratio calculated between two consecutive instar for body mass, length of femur and width of prothorax on the earwigs raised under our breeding program.

Among the morphometric parameters, width of telson is the only one that showed

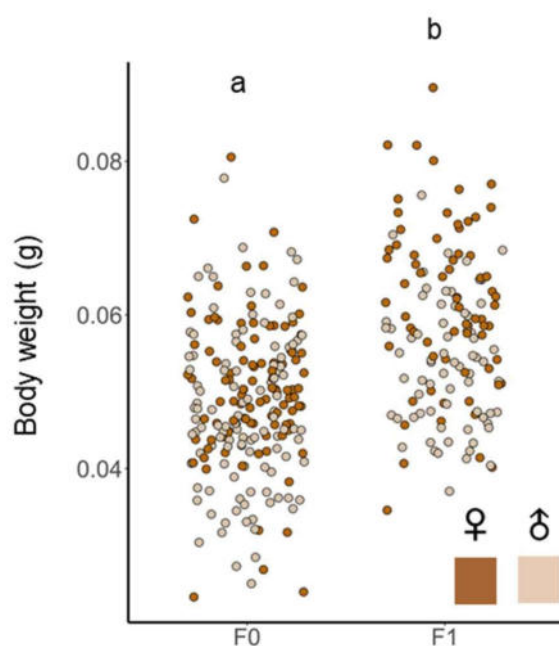


Figure 24 : Body weight (g) of *F. auricularia*  
Individual earwigs weight depending on sex and generation. Significant differences between generation are indicated by different letters ( $p$ -value $<0.001$ )

significant differences between males and females ( $p$ -value $<0,001$ ), either for earwigs sampled in orchards than for raising earwigs. In both cases, males exhibited larger telson than females with an increase of  $34.8\pm 4.6\%$  and  $20.0\pm 5.4\%$  for orchards and raising earwigs respectively (Figure 25). There were no differences observed on width of telson, depending on orchards characteristics.

Concerning the other parameters, because no significant differences could be observed depending on sex, values obtained for males and females were pooled together for further analysis. The results roughly showed 2 different groups for the earwigs sampled in orchards: one, with bigger sizes corresponds to the organic and IPM orchards, while another one corresponds to the conventional orchards with higher TFI. Concerning the last group, slight differences could be observed on morphometric traits with the earwigs collected in the orchards either under IPM or organic practices (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). The length of femur, and the width of prothorax were the most discriminating traits that maximize the differences between groups collected in orchards (conventional vs IPM + organic).

An homogenization for morphometric traits occurred regarding the adult earwigs

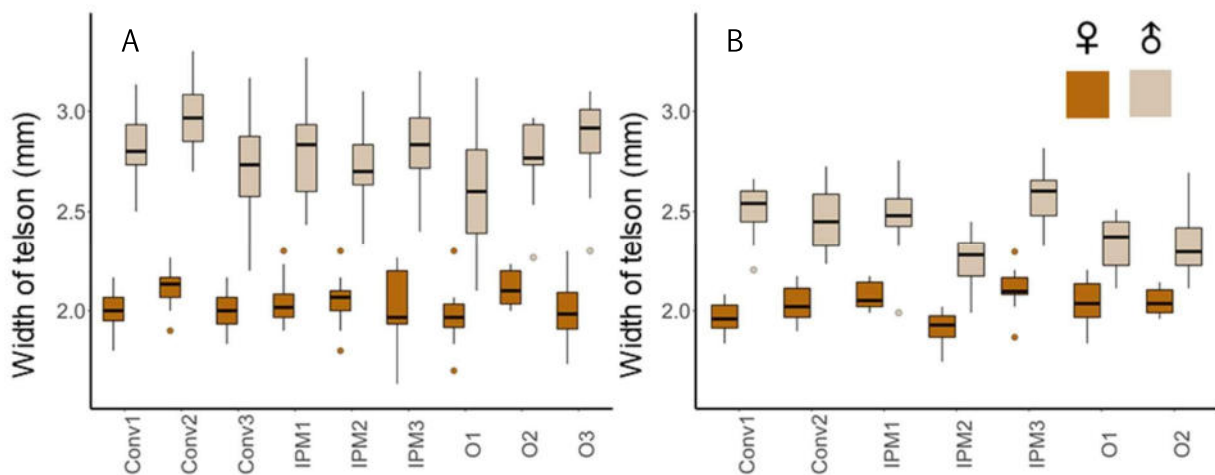


Figure 25 : Width of telson

Depending on sex, for earwigs collected in orchards (A) and for the succeeding generation after one year under raising conditions (B).

raised under our rearing conditions. Still, the smaller sizes were observed on earwigs previously sampled in the orchards that had received the highest TFI, even if no significant differences could be observed between orchard strategies (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Based on femur length, no significant differences could be observed regarding the growth of nymphs from N3 to N4 and adults. It is interesting to note that for all the earwigs, independently of their origin, the growth obeyed to Dyar's law with an average of growth ratio of  $1.43 \pm 0.04$  and  $1.21 \pm 0.02$  from N3 to N4 and N4 to adults respectively. This result suggested that the management practices did not impact the growth of earwigs (Tableau 9).

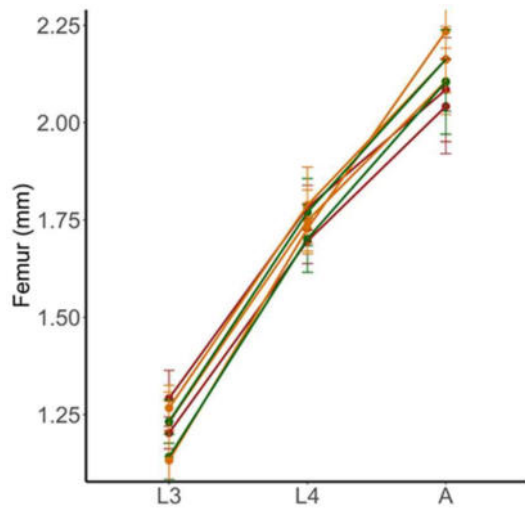


Figure 27: Length of femur (mm)

Femur length depending on stage of earwigs F1. Their parents were collected in Conventional (●); IPM (●); Organic orchards (●).

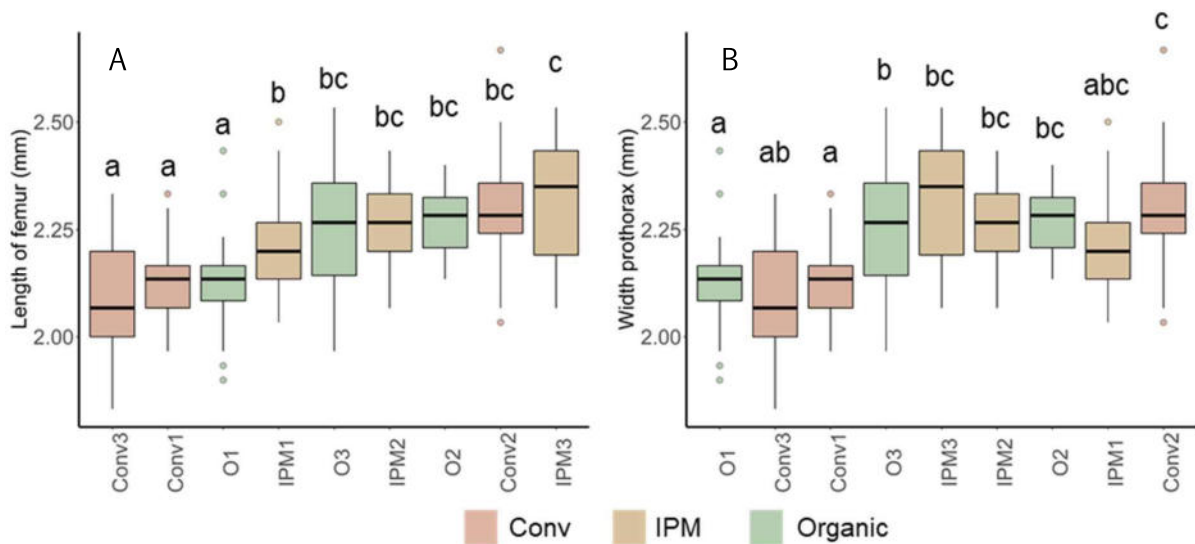


Figure 26: Morphometric traits of earwigs

Length of femur (A) and prothorax (B) for *Forficula auricularia*. Significant differences are indicated by different letters

### 3.3 Energetic reserves

Regarding measured reserves (lipid, glycogen and proteins) we observed effective differences between sex and management strategies.

The amount of lipid was lower in earwigs sampled in conventional and IPM orchards compared to organic ones (generation F0). This lower lipid content was particularly observed on females (p-value<0.05) (Figure 28A). Moreover, we observed a reversed trend for glycogen with higher glycogen content for females F0 collected in conventional orchards (p-value<0.05) (Figure 28B).

Males exhibited higher glycogen contents (mean increase of 78.7% ± 61,3, p-value<0.01) than females (Figure 28B). It is noteworthy that all the earwigs raised under our breeding program (generation F1), had higher higher reserves, either for glycogen and lipid contents, than their parents (Figure 28C, Figure 28D), without any differences anymore between orchards.

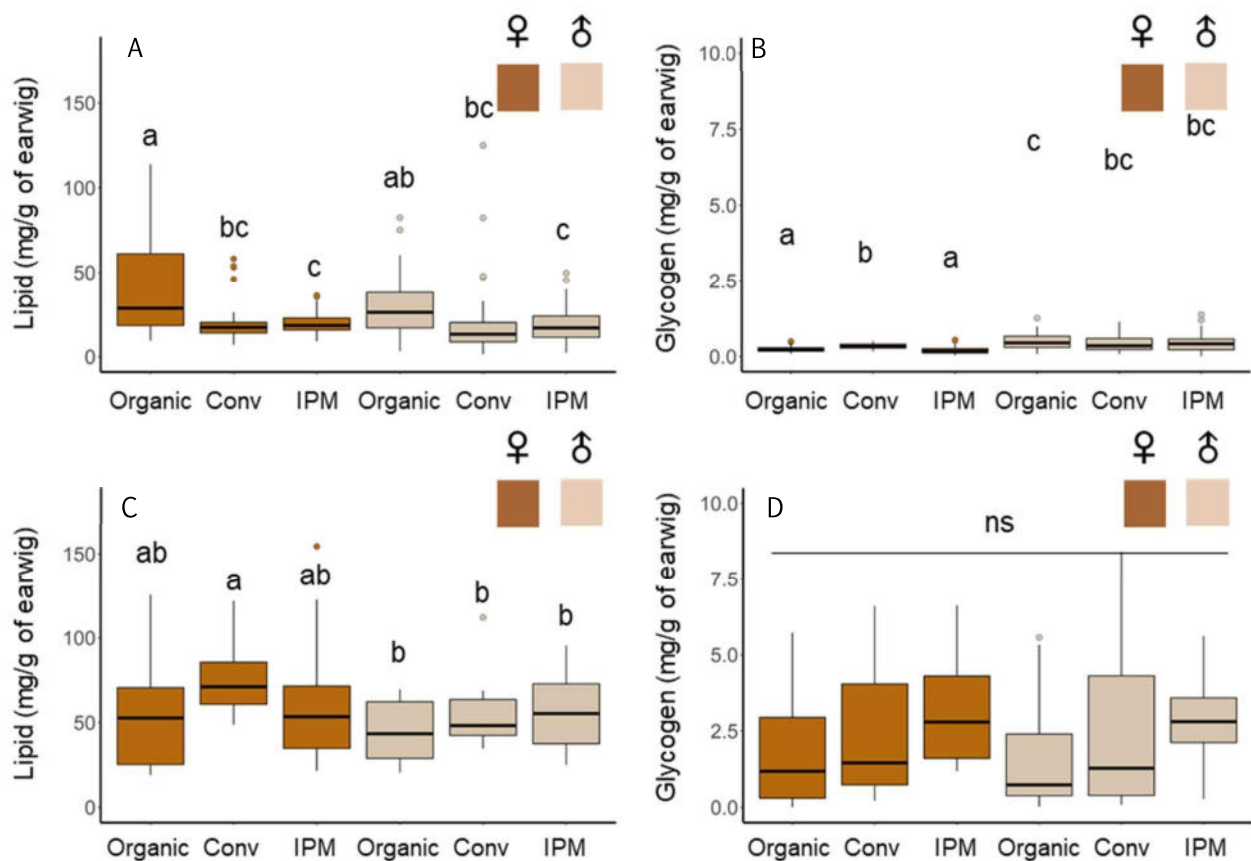


Figure 28 : Energetic reserves of *E. auricularia*

Energetic reserves for F0 earwigs collected in orchards (A) Lipid; (B) Glycogen and for F1 earwigs reared in a breeding program for 1-year (C) Lipid; (D) Glycogen. Different letters indicate significant differences between orchards and treatment (p-value < 0.05)

## 4 Discussion

There are physiological, behavioral and morphological trade-offs in insects in order for them to cope with environmental fluctuations induced by agricultural practices i.e. pesticide use, landscape fragmentation or loss of habitats. They may develop many strategies to minimize the negative environmental effects. All responses produced are costly for the organism in terms of metabolic resources and energy demand (Calow, 1991). Because the energy resources of organisms are generally limited, agricultural management practices can induce additional metabolic costs and modify energetic reserves and/or morphometric parameters (Congdon et al., 2001; Yasmin and D'Souza, 2010). Nestel *et al.* (2016) showed that ecological stressors can affect developmental instability, which induces reduced fitness in insects. Morphological parameters, e.g. individual mass or size could be used to detect the effects of environmental stress on insects.

In this study, we did not observe any significant differences in earwigs weight depending on management practices. However, the earwigs caught in conventional and IPM orchards appeared slightly lighter compared to organic orchards. Lower weights were previously observed in earwigs caught in summer in IPM compared to organic apple orchards (Suchail et al., 2018). In other organisms such as earthworms, the impact of management strategies on weight could be contradictory. As an example, it has been shown that despite high levels of variability for *A. chlorotica* fresh weight between orchards, no significant difference was found between management strategies (Givaudan et al., 2016). Herein, our results pointed out that the main difference observed on fresh weight depends on sex. Females were heavier than males, while we observed reversed results in Suchail *et al.* 2018. This could be easily explained by the life cycle of earwigs and the period of sampling (July in Suchail *et al.* 2018 versus October in the present study). According to (Albouy et al., 1990; Sauphanor et al., 1993), female earwigs start their oogenesis in late summer/early autumn, and most of them were pregnant in October, then increasing their body weight. Indeed, we confirmed this assumption by a visual checking during the dissection of earwigs. If we did not observe any parasitism, all the females from both generations investigated (F0 and F1) were full of pre-mature eggs in October (data not shown).

Concerning reserves and morphometric traits, we observed that earwigs from conventional orchards were different compared to those collected in organic orchards. However, earwig's traits from IPM strategy could be either similar to conventional (in particular for energetic reserves) or similar to organic characteristics (for morphometric traits). Morphometric traits could be influenced either from pesticides or environmental abiotic conditions. Giglio *et al.* (2017) showed in the carabidae, *Calathus fuscipes*, that morphological parameters, e.g., body and pronotum width decreased after an exposure to the larvicide lambda-cyhalothrin. In our investigation, among the four morphological parameters studied in F0 generation, femur length and prothorax width seem to characterize two opposite pest management strategies, organic and IPM on one side and conventional practices on the other side. Femur length is the most discriminating parameter with smaller traits in earwigs collected in conventional orchards, suggesting that high historic level of insecticide exposure could influence the body shape of such organisms. Even if the earwigs were collected in a narrow geographic area with similar local environment in terms of climate and landscape, we cannot ignore the possibility for intra-specific variability shaped under pesticide pressure. Dellicour *et al.*, (2017) have shown intra-specific differences in wing morphometric traits and size from solitary bees that could highlight micro-evolutionary processes depending on particular geographical area.

If modification on morphometric traits corresponds to long-term response of organisms, energetic reserves give an insight of physiological response. When *F. auricularia* were collected in July, we have previously shown that both glycogen and lipid content were lower in the earwigs coming from IPM apple orchards (Suchail *et al.* 2018). According to the treatment calendars in this crop, July is very intense regarding pesticide use as pesticides are applied from late March to the end of August with an average of 30 pesticide applications (Sauphanor *et al.*, 2009; Marliac *et al.*, 2015). At this time, earwigs had to face pesticide exposure to survive. This was highlighted in previous report: we showed that *F. auricularia* collected in conventional orchards, exhibited tolerance to chlorpyrifos-ethyl compared to earwigs from organic orchards, with higher constitutive enzymes activities such as GSTs and CbEs (Le Navenant *et al.* 2018). These results supported the idea that earwigs developed physiological and biochemical modifications to cope with historical exposure to

pesticides, which is costly for the organisms. In the present study, F0 earwig were collected in late October, i.e. two months after the last pesticide application. We then observed that earwigs collected in conventional orchards exhibited lower lipid content, in particular for females, while they recovered an important glycogen content which was even higher than in females collected in organic orchards. Then if females are able to quickly accumulate their glycogen content to prepare their clutch (in October), it appeared that they could not fill up the gap concerning their lipid content. However, when a surplus of carbohydrates is available, pyruvate generated through glycolysis could be used to produce acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) a central intermediate for lipid metabolism (Wakil, 1961). Then, because lipid content is very low in female, we cannot exclude the possibility that lipids were burned at a faster rate than at which they are produced, i.e. stable lipids loss. In honey bees, mechanisms of stable lipid loss depend on behavioral maturation and novel regulatory processes (Ament et al., 2011), but still little is known about the molecular mechanisms by which animals achieve changes in their body mass. Further analysis could allow discriminating between stable lipid loss and absence of lipogenesis in the case of radioactively labeled glucose will not be incorporated into the lipid fraction, as it was the case for parasitic wasp (Giron and Casas, 2003).

In conclusion, energetic reserves and morphological parameters can be used to detect the effects of environmental stresses on an organism. We confirmed previous results concerning lower morphometric traits of earwigs F0 collected in highly treated orchards compared to those collected in organic ones. The high glycogen content observed in females F0 collected in conventional orchards, 2 months after the end of pesticide application, supports the hypothesis of a reallocation of reserves to the reproduction. Then females seem to be able to quickly adapt their energetic flow when the pesticide exposure is relaxed, from maintenance/tolerance to reproduction. Due to the rearing conditions (food ad libitum), all the earwigs F1 exhibited higher weights and energetic reserve content than their parents, and they reach the same level in reserve content and weight independently of the origin of their parents. In the future, metabolic pathways and specific enzymes involved in lipogenesis and glucogenesis, should be investigated in order to better understand physiological and biochemical modifications induced by pest management strategies on natural enemies.



# Chapitre 5 : Rôle des Hsp70 dans la résistance/tolérance aux insecticides chez *F. auricularia*

## 1 Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons vu que les forficules prélevées en vergers conventionnels présentent certaines des caractéristiques d'organismes résistants. En particulier, après exposition au *Pyrinex®* à la dose autorisée en vergers, la mortalité des individus prélevés dans les vergers conventionnels (45% de mortalité) est significativement inférieure à la mortalité observée chez les individus provenant de vergers biologiques ou PFI (80% de mortalité). De plus l'activité constitutive de deux enzymes impliquées dans les voies de detoxication, (GSTs et CbEs) est plus élevée chez les individus provenant de vergers conventionnels, alors que l'AChE est moins sensible aux OP chez ces organismes.

Il apparait donc que de longues années d'exposition à des traitements répétés d'insecticides, influencent la réponse des voies métaboliques et des biomarqueurs chez la forficule *F. auricularia*. La diminution des traits morphométriques observée chez les individus collectés dans les vergers conventionnels, confirme l'impact des traitements répétés sur le long terme, chez la forficule.

Nous nous sommes donc intéressés aux réponses cellulaires non spécifiques, vis-à-vis d'un stress, représenté ici par l'exposition aux traitements phytosanitaires appliqués en vergers. Parmi ces réponses, l'induction des protéines de choc thermique (ou Heat Shock Proteins, Hsp) représente une voie majeure de défense (Westerheide and Morimoto, 2005). Cette réponse est généralement caractérisée par une synthèse discontinue des protéines de stress Hsp.

Les Hsps sont des protéines découvertes par Ritossa (1962) sur une culture de drosophiles à la suite d'une augmentation de la température d'incubation. Ce sont des molécules chaperonnes qui sont garantes de la bonne conformation des protéines que l'on retrouve dans les cellules.

Les Hsp70 représentent la famille de Hsp la mieux conservée, des bactéries jusqu'aux humains, avec des masses molaires allant de 68 à 75 kDa. Ce sont les Hsps les plus fortement induites dans des conditions de stress. Localisées dans le cytosol, les mitochondries et le réticulum endoplasmique, l'expression des Hsp70 est

constitutive ou régulée (Gupta et al., 2010). Elles peuvent jouer un rôle de protection dans la contamination des organismes par certains xénobiotiques comme les métaux lourds chez les insectes (Haap and Köhler, 2009; Köhler et al., 2005) mais aussi par des insecticides neurotoxiques chez les poissons (Eder et al., 2009).

L'induction des Hsp70 représente donc un mécanisme efficace de défense pouvant jouer un rôle important dans la tolérance aux insecticides. Du fait de la réponse spécifique des Hsp70 représentée par une courbe de réponse : induction à faible dose; perte de régulation/dégradation à forte dose, il est préférable de coupler l'induction des Hsp à d'autres biomarqueurs.

L'objectifs de cette étude et donc de déterminer le rôle des Hsp70 dans la protection de *F. auricularia* selon sa provenance (vergers biologiques, PFI ou conventionnels). Des forficules provenant de vergers expérimentaux de l'INRA, à faibles intrants, seront également utilisés. L'induction des Hsp70 sera mesurée en fonction de différents temps d'exposition au *Pyrinex* afin d'établir une dynamique d'induction de ces protéines, en parallèle de l'inhibition de l'ACHe pour évaluer les corrélations potentielles entre impact et défense.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Matériel biologique

En septembre 2017, des forficules adultes, mâles et femelles ont été prélevés dans les mêmes vergers que ceux utilisés dans l'étude des voies métaboliques (AB, PFI et conventionnels) ainsi que dans un verger expérimental de l'INRA, nommé bas intrant, dans lequel aucun intrant n'est appliqué (sauf en cas de dommages importants). Tous les vergers sont localisés dans un rayon de 10 km autour de Noves (France). Le taux de dispersion des forficules étant estimé à 30 m par mois (Moerkens et al., 2010), nous supposons que les populations de forficules sont bien distinctes entre elles. Les organismes sont collectés par l'utilisation de bandes pièges constituées de carton ondulé disposées autour du tronc des pommiers. *F. auricularia* étant une espèce univoltine, les adultes prélevés sont donc de la même génération. Les organismes ainsi piégés sont mis en élevage temporaire le temps de réaliser des biotests.

## 2.2 Biotest

Le protocole d'exposition des forficules est identique à celui utilisé dans l'étude des voies métaboliques (Chapitre 3 : Voies métaboliques et sensibilité de l'acétylcholinestérase impliquées dans la tolérance au chlorpyrifos-éthyl chez la forficule *Forficula auricularia*). La solution commerciale de *Pyrinex®* est diluée dans l'eau distillée de manière à ajuster le pesticide à la dose autorisée en vergers (50 g.hL<sup>-1</sup> de chlorpyrifos-éthyl, la matière active). Un volume de 115µL de solution d'insecticide est déposé dans la boîte de pétri (8 cm de diamètre), puis étalé sur toute la surface intérieure de la boîte à l'aide d'un pinceau préalablement humidifié. Après 30 minutes d'évaporation, les forficules sont placés dans les boîtes (5 individus par boîte) (Malagnoux et al., 2015a; Le Navenant et al., 2019). Les forficules témoins sont exposés à de l'eau distillée, dans les mêmes conditions. Compte tenu des fortes mortalités observées après 12h d'exposition (Chapitre IV, Le Navenant *et al.* 2019) et pour suivre la dynamique d'induction des Hsp, les forficules sont analysés avant exposition (t=0) et après 3h et 6,5h d'exposition à température ambiante. Seuls les organismes survivants ayant des mouvements locomoteurs cohérent permettant un déplacement normal sont gardés pour l'analyse. A l'issue de chaque temps d'exposition, les forficules (20 mâles et 20 femelles par modalité et pour chaque verger) sont immédiatement décapités, plongés dans l'azote liquide (afin de préserver les Hsps qui sont très rapidement dégradées) et conservés individuellement au congélateur à -80°C jusqu'aux analyses. Les abdomens sont utilisés pour quantifier l'expression des Hsp70. Les têtes sont conservées pour effectuer le dosage de l'activité des AChEs.

## 2.3 Préparation des échantillons et dosage de l'activité AChE

### 2.3.1 Dosage de l'activité AChE

Les têtes sont broyées individuellement dans 10% (P/V) de tampon Tris-HCL 10 mM, NaCl 10 mM (pH 7,3) en présence d'inhibiteurs de protéases (aprotinine, leupeptine, pepstatine = 5µg.mL<sup>-1</sup>, antipainé = 1µg.mL<sup>-1</sup>, inhibiteur de trypsine = 1 mg.mL<sup>-1</sup>). Les broyats sont centrifugés à 3000g durant 10 min à 4°C afin de récupérer le surnageant utilisé pour la quantification de l'activité de l'AChE. L'activité de l'AChE est réalisée spectrophotométriquement à 412nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Synergy HT, Bio-Tek) selon le protocole décrit dans le chapitre III. Le mélange

réactionnel (200  $\mu$ L) contient 2  $\mu$ L d'extrait protéique de forficule, 0,375 mM de DTNB 1,5 mM d'AcSCH dans du tampon phosphate de sodium (0,1 M, pH 7). L'activité spécifique de l'AChE est déterminée pour chaque échantillon individuellement, et exprimée en unité d'activité enzymatique (U) par mg de protéine (1 U = 1  $\mu$ mol de produit formé par minute). La quantité totale de protéines extraites est mesurée par la méthode de Bradford avec du sérum albumine bovine comme standard de référence (Bradford, 1976).

### 2.3.2 Dosage de la quantité d'Hsp70

Toutes les étapes de préparation des échantillons sont réalisées dans la glace afin d'éviter la dégradation très rapide des Hsps.

Les abdomens sont broyés individuellement et manuellement dans 10% (P/V) dans un tampon d'extraction HépeS 20mM, acétate de potassium 80mM, acétate de magnésium 5mM, en présence d'inhibiteur de protéases à 2% (AEBSF 104mM, aprotinine 80  $\mu$ M, bestatine 4 mM, E-64 1.4 mM, leupeptine 2 mM et pepstatine A 1,5 mM). Les broyats sont centrifugés à 20 000 g durant 10 min à 4°C. Le surnageant constitue l'extrait protéique qui est utilisé pour la quantification de la quantité d'Hsps. La quantité de protéines totales extraites dans chaque échantillon est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

Le niveau d'expression des Hsp est mesuré par une technique de Western blot. Chaque extrait est déposé sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les gels sont ensuite transférés sur membrane de nitrocellulose et les Hsp sont révélées par des anticorps anti-Hsp couplé à un anticorps secondaire sur lequel une peroxydase permet la visualisation du complexe formé. 60  $\mu$ L d'extrait protéique de forficules sont mélangés à 60 $\mu$ L d'une solution de Tris (10 mM, pH 7) contenant 20% de glycérol, 3% de sodium dodecylsulfate, 0,3% de B-mercaptoéthanol, 0,005% de bleu de bromphénol. Les protéines sont dénaturées 5 minutes à 97 °C avant d'être déposées sur un mini-gel SDS-PAGE (12% acrylamide ; 0,12% bis-acrylamide). A l'issue de la migration (15 min à 80V, puis 90 min à 120 V), les protéines sont transférées sur des membranes de nitrocellulose par migration semi-sèche à l'aide de papier Whatman. Les membranes sont ensuite saturées en protéines (2h dans un tampon TBS (50 mM Tris, pH 7,7 ; 150 mM NaCl) contenant 50% sérum de cheval), rincées 5 minutes dans du tampon TBS puis incubées individuellement

toute la nuit sous agitation dans une solution d'anticorps primaires (anticorps de souris, anti Hsp70 humain, Dianova, FRG, dilution 1:5000 ; 10% de sérum de cheval dans du TBS). Le lendemain, après 5 minutes de rinçage dans du TBS, les membranes sont incubées 2h sous agitation dans une solution d'anticorps secondaires couplé à une peroxydase (anticorps de chèvre anti souris IgG, Dianova, FRG dilution 1 :1000, 10% de sérum de cheval dans du TBS). Après un dernier lavage, les Hsp70 sont révélées en plongeant les membranes dans une solution de Tris 30mM, pH 8,5 contenant 1mM de substrat 4-chloro(1)naphtanol, 0,0015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 6% de méthanol. Après rinçage et séchage (2h) les membranes de nitrocellulose sont scannées (définition de 600 dpi au format .tiff) et les images sont analysées à l'aide du logiciel Image Studio Lite (v5.2.5) qui sépare et convertit les taches colorées sur les membranes en valeurs numériques. Sur chaque gel, des standards (Hsps de poisson) sont placés aux extrémités des membranes afin de vérifier la qualité de l'expérience et de normaliser les signaux entre membranes. C'est au total de 575 échantillons répartis sur 69 membranes qui ont ainsi été quantifiés.

## 2.4 Statistiques

Du au non-respect de la normalité et de l'homoscédasticité la significativité des résultats a été testée par un test de permutation (logiciel R version 3.4.3 et RStudio version 1.1.423). Le package LmPerm a été utilisé avec la fonction aovp combinée avec la fonction pairwise.perm.t.test du package RVAideMemoir. La méthode « Fdr » permet d'ajuster les p-values dues aux risques de comparaisons multiples.

### 3 Résultats

#### 3.1 Mortalité

La mortalité varie en fonction du sexe et de la provenance des forficules (Figure 29). Alors que les femelles ne présentent aucune mortalité après 3h d'exposition au Pyrinex, les mâles collectés dans les vergers bas-intrants présentent 10% de mortalité. Après 6.5h d'exposition, une forte mortalité apparaît pour les mâles du verger bas intrant (47.5%) alors que cette dernière est plus faible pour les organismes provenant des autres vergers (respectivement 15%, 12.5% et 6.7% pour les vergers IPM, biologiques et conventionnels). Chez les femelles, la mortalité n'apparaît qu'après 6,5h d'exposition au Pyrinex® et reste faible avec 15%, 10% 5% et 0% pour les organismes provenant des vergers bas intrant, IPM, conventionnel et organique.

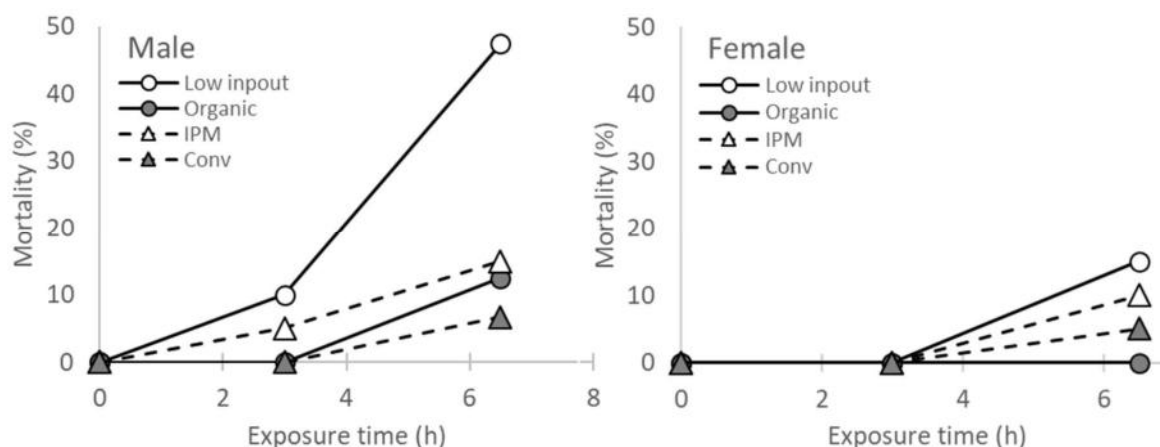


Figure 29 : Mortalité (%)

Mortalité (%) induite par différent temps d'exposition au Pyrinex® (0h, 3h, 6,5h) selon la provenance et le sexe chez La forficule adulte *F. auricularia*.

#### 3.2 Activité de l'ACHE

Au contact du chlorpyriphos-éthyl, les organismes provenant du verger en agriculture conventionnelle ont systématiquement la plus faible inhibition de l'activité de l'ACHE par rapport au contrôle, avec respectivement  $102\% \pm 17\%$  et  $87\% \pm 23\%$  d'activité pour les mâles à 3h et 6,5h et  $96\% \pm 20\%$  et  $57\% \pm 19\%$  d'activité pour les femelles (Figure 30). Chez les mâles, les organismes provenant du verger bas-intrant se distinguent des autres par une inhibition plus importante de l'activité de l'ACHE quel que soit le temps d'exposition. Les femelles, provenant des vergers bas-intrants

et des vergers biologiques ont des réponses similaires quel que soit le temps d'exposition au Pyrinex, et présentent les plus forts taux d'inhibition de l'AcHe.

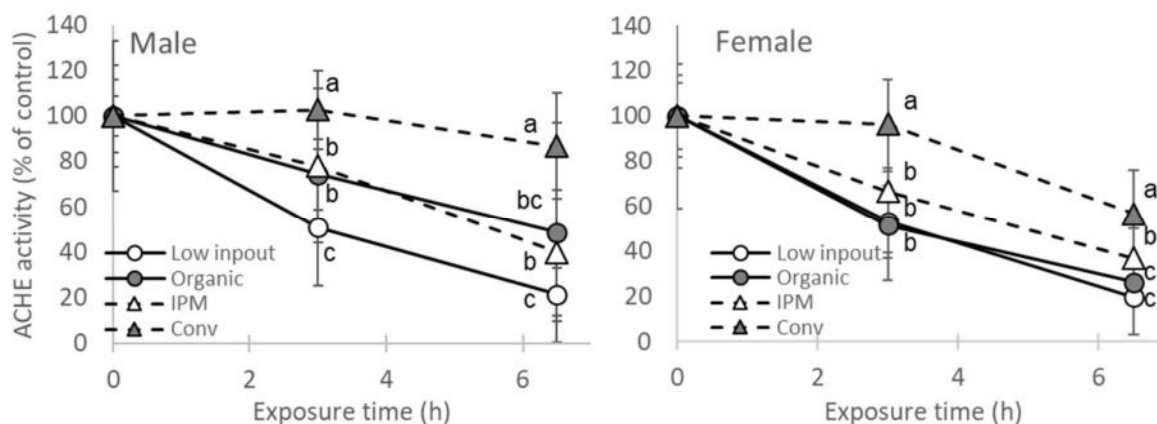


Figure 30 : Activité de l'AcHe

Dynamique d'inhibition de l'activité AChE (moyenne  $\pm$  écartype) chez les forficules exposés au Pyrinex. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre individus ( $p < 0,001$ ).

### 3.3 Expression des Hsps

L'expression des Hsp présentent de grandes variabilités, quel que soit le paramètre considéré (sexe, temps d'exposition et pratique du verger). De ce fait aucune différence significative ne peut être observée. Cependant des tendances apparaissent permettant de différencier la réponse entre mâles et femelles (Figure 31). Nous observons un niveau constant des Hsp70, qui reste proche de l'expression du contrôle, pour les organismes des deux sexes prélevés en verger conventionnel, pour tous temps d'exposition.

En revanche, le niveau d'expression des Hsp70 mesuré chez les mâles provenant des vergers bas-intrants diminue fortement après 3h d'exposition (perte de 40% par rapport au témoin). Après 6,5h d'exposition, l'expression des Hsps récupère le niveau du contrôle. Chez les femelles, l'induction des Hsp suit la courbe de réponse théorique avec une forte induction chez les individus fortement stressés (bas-intrants et AB > IPM et conventionnel) dès 3h d'exposition (augmentation de 25% des Hsps). Après 6,5 d'exposition, comme chez les mâles, les niveaux d'expression des Hsps s'homogénéisent.

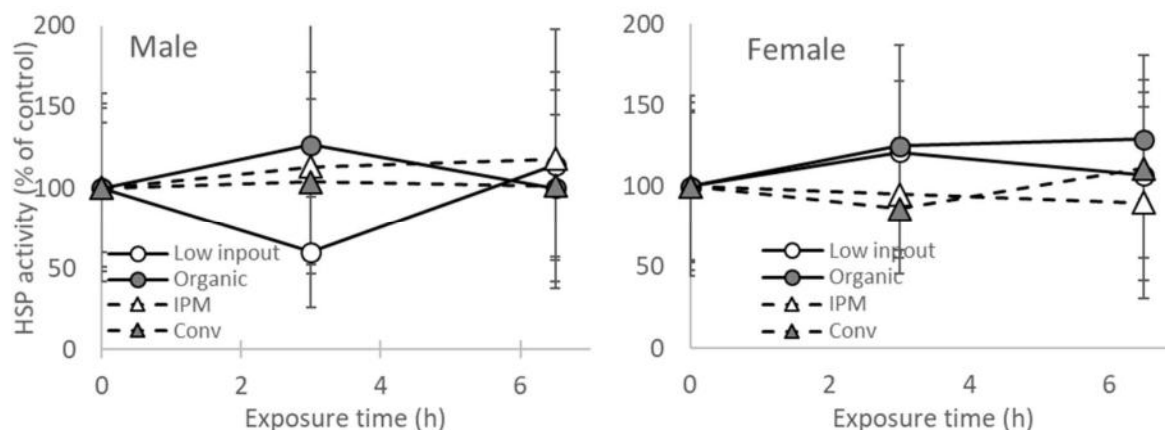


Figure 31 : Expression relative des Hsps

Expression des Hsp70 (en quantité relative ; moyenne  $\pm$  écartype) chez *F. auricularia* en fonction du temps d'exposition au Pyrinex.

#### 4 Discussion

L'utilisation des Hsp70 constitue un biomarqueur de stress intéressant chez les organismes aquatiques et les organismes terrestres (Köhler et al., 1992; Nadeau et al., 2001; Gupta et al., 2010). Cependant il a été montré que chez certaines espèces, ces protéines sont particulièrement instables. De plus, une variabilité élevée des réplicats est souvent observée ce qui peut poser des problèmes d'interprétations et nécessite d'analyser les résultats avec précaution (Staempfli et al., 2002). Dans cette étude, nous avons analysé deux biomarqueurs biochimiques en parallèle, l'inhibition de l'AChE et l'induction des Hsp70, après de courtes périodes d'exposition au *Pyrinex*<sup>®</sup> (chlorpyrifos-éthyl). La réponse de ces deux paramètres chez *F. auricularia* dépend du temps d'exposition et du verger d'origine des forficules.

Les forficules collectés dans les vergers conventionnels apparaissent moins sensibles au chlorpyrifos en termes de mortalité, d'inhibition de l'AChE et d'induction des Hsp. L'absence de mortalité chez les organismes (mâles et femelles) provenant du verger conventionnel ainsi que le maintien de l'activité des AChEs associée à une expression stable des Hsps indiquent que ces organismes sont capables de faire face à une courte exposition au Pyrinex, à la dose autorisée en vergers. Les mâles sont légèrement plus sensibles que les femelles avec l'apparition de faibles mortalités après 6,5h d'exposition.

Les organismes prélevés dans le verger bas-intrant, présentent des mortalités dès 3h d'exposition chez les mâles et 6,5h d'exposition chez les femelles. Ces réponses



sont corrélées avec la plus forte inhibition de l'activité de l'AChE. Bien qu'une forte variabilité soit observée dans l'expression des Hsp70, on observe une diminution de l'expression des Hsp après 3h d'exposition chez les mâles. Il semble donc que les mâles ayant été faiblement exposés aux pesticides au cours de leur vie, dans le verger bas-intrant, aient des difficultés à surmonter le stress important causé par une exposition au chlorpyrifos. En revanche, Le retour à un niveau normal d'Hsp après 6,5h d'exposition indique que quelques individus ont été capables de maintenir un niveau basal d'expression des Hsps pour limiter le stress et leur permettre de survivre (50% de l'effectif). Ces résultats sont en accord avec l'expression des Hsp chez les poissons qui présente une réponse maximale après un stress modéré, alors qu'une forte diminution de l'expression des Hsps est observée à la suite d'un stress trop important (Köhler et al., 2001). Quel que soit le verger d'origine des forficules, ces observations confirment les études précédentes réalisées chez *F. auricularia*, in vitro (Malagnoux *et al.*, 2014; Malagnoux *et al.*, 2015a) et in vivo (Le Navenant et al., 2019) qui mettent en évidence une sensibilité accrue des biomarqueurs AChE et CbE chez les mâles vis-à-vis des pesticides.

Il est difficile, dans notre étude, d'établir une corrélation entre l'expression des Hsps et l'inhibition de l'AChE. Par exemple, les organismes provenant du verger IPM présentent une inhibition de l'activité de l'AChE sans modification de l'expression des Hsps. Ces résultats indiquent que l'exposition au chlorpyrifos, ne semble pas provoquer une induction importante des Hsp70. Chez le saumon, Eder *et al.* (2009) ont montré non seulement une réponse variable selon le tissu, mais surtout une meilleure induction des Hsp90 après exposition au chlorpyrifos alors que les Hsp60 étaient plus facilement induites après une exposition à l'esfenvalerate (pyréthrinöide). Il semble donc indispensable d'étudier la réponse de différentes familles de Hsps selon l'espèce et le mode d'action de l'insecticide utilisé.

Face à l'instabilité des Hsp et face à la grande variabilité obtenue au sein d'une même modalité nous sommes confrontés à des difficultés d'interprétation. Certains auteurs ont donc privilégié une approche transcriptomique pour mesurer non plus la présence de la protéine au niveau cellulaire mais la quantité d'ARNm des Hsp70. Cette technique a permis de mettre en évidence de façon plus fine le rôle des Hsp70 dans la réponse à un stress chimique chez différentes espèces terrestres (Doganlar and

Doganlar, 2015; Li et al., 2017) ou aquatiques (Ceyhun et al., 2010). Li et al (2017) ont par exemple montré chez le puceron *Rhopalosiphum padi*, un ravageur des céréales, que les Hsps impliquées dans la thermo-tolérance sont les premières à être induites rapidement après une exposition à la cyperméthrine (un insecticide pyréthroïde). Chez *drosophila melanogaster*, Doganlar and Doganlar (2015) ont mis en évidence des corrélations positives entre transcription des gènes Hsp70 et des gènes impliqués dans la régulation du stress oxydant (superoxyde dismutase, catalase, glutathion-synthetase) suite à l'exposition à un mélange de pesticides. Cette corrélation positive résulte d'une forte cytotoxicité de ces mélanges.

Bien que difficile à interpréter, notre étude confirme la différence de sensibilité des forficules vis-à-vis du chlorpyrifos-ethyl en fonction des pratiques culturales des vergers d'origines des forficules. L'utilisation de deux biomarqueurs (inhibition de l'ACHé et modification de l'expression des Hsps) est en cohérence avec cette différence de sensibilité. En particulier, l'absence d'application de pesticides dans le verger bas-intrant, montre la difficulté des forficules à supporter une exposition au Pyrinex. Parmi les forficules provenant de ces vergers, les mâles n'ayant jamais reçu de traitements pesticides sont les organismes les plus sensibles, alors que les femelles semblent mieux supporter ce nouveau stress. Cette différence de sensibilité entre sexe au sein d'une même population de forficule, est également en accord avec nos observations précédentes (Malagnoux *et al.*, 2014; Malagnoux *et al.*, 2015a; Le Navenant *et al.*, 2019).

## Chapitre 6 : Bilan de la thèse et perspectives

### 1 Bilan de la thèse

Notre société fait face à de nombreux défis environnementaux liés entre autres aux changements climatiques, à la gestion des ressources naturelles ou à la perte de biodiversité. Dans ce contexte global d'une forte demande sociale en faveur d'un plus grand respect de l'environnement et de la santé humaine, il devient indispensable de développer des solutions compatibles avec une agriculture durable et conduisant à une baisse de l'utilisation des pesticides. En vergers de pommiers, la mise au point de méthodes alternatives devient un enjeu majeur face à la pression exercée par la forte présence de certains ravageurs. La lutte biologique qui utilise des organismes vivants qualifiés de prédateurs/auxiliaires pour lutter contre les ravageurs, représente une alternative efficace. Cependant l'utilisation massive des pesticides en vergers de pommiers induit des effets toxiques non-intentionnels chez les espèces non-cibles pouvant conduire à une diminution des populations d'ennemis naturels. Les vergers de pommiers, par leur index de traitements phytosanitaires élevé (IFT 36), représentent donc une culture particulièrement bien adaptée pour étudier l'impact des pratiques phytosanitaires sur les auxiliaires. Au cours de cette thèse nous avons choisi d'étudier la forficule *Forficula auricularia*, prédateur généraliste efficace, et de caractériser les mécanismes de défense aux insecticides (plus particulièrement à un insecticide organophosphoré, le *Pyrinex®* dont la matière active est le chlorpyrifos-éthyl) chez cette espèce.

Dans un premier temps nous avons étudié la mortalité, l'activité de deux enzymes de détoxification et la sensibilité de l'ACHé après exposition au chlorpyrifos-éthyl chez des forficules prélevés dans des vergers de pommiers aux pratiques phytosanitaires contrastées. Nous avons mis en évidence une diminution de la sensibilité au chlorpyrifos-éthyl chez les forficules provenant d'un verger traité de manière conventionnelle depuis plus de 10 ans, en comparaison avec des organismes provenant de vergers conduits en agriculture raisonnée ou biologique. En particulier, une forte diminution de mortalité chez les organismes provenant de vergers conventionnels (40% de mortalité) par rapport aux vergers AB et PFI (environ 75 à 80% de mortalité), nous conduit à émettre l'hypothèse de l'acquisition d'une tolérance aux OP chez les individus prélevés en verger conventionnel. Cette hypothèse est fortement soutenue par

différents facteurs observés chez ces forficules : (1) une augmentation de l'activité constitutive de deux enzymes impliquées dans les voies de détoxification des xénobiotiques, les GSTs et les CbEs et (2) une diminution de sensibilité de l'AChE, cible moléculaire des OP, suggérant une modification possible de l'enzyme. Non seulement l'AChE est moins sensible chez les organismes provenant de vergers conventionnels, mais quel que soit le verger d'origine, les femelles sont moins sensibles que les mâles. La résistance aux insecticides chez les auxiliaires est une piste novatrice et prometteuse au développement de nouveaux programmes en lutte biologique, notamment dans les cultures fortement traitées. Des exemples réussis de lâchers de populations résistantes d'auxiliaires (l'acarien *Kampimodromus aberrans*) ont été réalisés en vignes (Duso et al., 2012) et en vergers de pommiers (Duso et al., 2009; Ahmad et al., 2013) contre l'acarien rouge phytophage *Panonychus ulmi*. Les parcelles dans lesquelles *K. aberrans* est bien établi ne nécessitent plus aucun acaricide.

Si l'activité constitutive de GSTs et des CbEs est plus élevée chez les forficules provenant de vergers conventionnels, l'historique, en termes de traitements phytosanitaires reçus, influence fortement l'induction de ces enzymes. En effet, seuls les forficules pré-exposés (vergers conventionnels) ou moyennement pré-exposés (vergers PFI) ont la capacité d'augmenter l'activité des GSTs après exposition au chlorpyrifos-éthyl. Cette induction est en accord avec une plasticité phénotypique (Cothran et al., 2013; Hua et al., 2015), contrairement à l'absence de réponse observée chez les individus naïfs n'ayant jamais reçus d'insecticides d'origine anthropique (vergers AB).

Sachant que les mécanismes de résistance aux insecticides et de plasticité phénotypique peuvent être associés à des coûts physiologiques importants (Foster et al., 2017), nous avons réalisé conjointement une analyse morphométrique et des mesures de réserves énergétiques chez *F. auricularia* pour tester cette hypothèse. L'étude a montré une hétérogénéité importante sur les réserves énergétiques et les traits morphométriques chez les individus provenant, au sein d'une même pratique, de différents vergers, mais également entre individus provenant d'un même verger. Malgré ces variabilités, il apparaît que les forficules issus de vergers conventionnels sont généralement plus petits et présentent de plus faibles réserves énergétiques que ceux provenant des vergers AB et PFI. Si l'IFT ne permet pas de discriminer significativement

les réponses observées, d'autres facteurs influencent probablement les traits de vie des forficules, comme le travail du sol (Sharley et al., 2008; Moerkens et al., 2012), ou la présence et la qualité des haies (Moerkens et al., 2012). Tous les vergers étudiés au cours de cette thèse sont localisés dans un rayon de 20km au sud d'Avignon, ce qui limite les variations météorologiques. Dans la région, le paysage est caractérisé par la présence d'un réseau de haies denses, protégeant les parcelles du Mistral, un vent du nord pouvant être violent. Des études antérieures ont mises en évidence un plus fort impact des pesticides que des caractéristiques paysagères sur les populations de forficules (Malagnoux, 2014). Cependant, nous ne pouvons exclure la diversité des abris et des zones refuges dans les vergers de petites tailles, entourés de haies constituées de plusieurs essences. Ces zones refuges constituent des réservoirs potentiels de ressources alimentaires. C'est le cas d'un des vergers conventionnels pour lequel les forficules sont caractérisés par des tailles et des quantités de réserves énergétiques similaires à celles observées chez les organismes provenant des vergers biologiques. Les mesures effectuées sur la génération suivante obtenue en conditions de laboratoire (à partir des parents prélevés au terrain), montrent une récupération et une homogénéisation des traits morphométriques et des réserves énergétiques. L'absence d'utilisation de pesticide et un apport nutritionnel continu ne permet donc plus, (dès la première génération) de différencier les individus provenant de parents pré-exposés (vergers conventionnels) ou non exposés (vergers AB).

Un résultat marquant de l'analyse des réserves énergétiques chez *F. auricularia* est la modification de la quantité de réserves en fonction de la date de prélèvement dans les vergers. Lorsque les forficules sont prélevés en juillet (Suchail et al., 2018), les quantités de glycogène et de lipides sont plus faibles chez les organismes provenant de vergers PFI (pleine saison d'application des traitements). En revanche lorsque les prélèvements sont réalisés au mois d'octobre, (2 mois après la fin des traitements) la quantité de glycogène redevient équivalente chez tous les organismes, quel que soit leur verger d'origine, alors que les réserves lipidiques restent faibles chez les forficules provenant de vergers conventionnels et PFI. Ce résultat est particulièrement remarquable chez les femelles et suggère qu'elles sont capables d'accumuler rapidement du glycogène en prévision de l'ovogénèse, alors que pendant

la période de traitements elles allouaient exclusivement leurs réserves aux mécanismes de défense.

La qualité et la quantité des ressources disponibles dans les vergers dépendent des systèmes de production (moins d'arthropodes par exemple en vergers PFI et conventionnels). Cependant, la forficule *F. auricularia* étant omnivore, elle peut compenser le manque de proies animales par une alimentation végétale (pollen, fruits mûrs, jeunes pousses...).

L'impact des insecticides est aisément évalué en mesurant des biomarqueurs spécifiques comme l'inhibition de l'AcChE pour les OP. En revanche, les « biomarqueurs de stress », qui répondent à tout type de stress, y compris un stress biotique (stade du développement par exemple), traduisent une souffrance générale de l'organisme. Nous avons donc élargi notre étude aux mécanismes de défenses en nous intéressant à l'induction des hsp70. Bien que le suivi de ces 2 biomarqueurs complémentaires ne nous ait pas permis d'établir de corrélations entre inhibition de l'AcChE et induction des HSP70, chaque réponse dépend du sexe et de la provenance des forficules. Malgré les fortes variabilités observées, nos résultats soulignent les différences de sensibilités préalablement observées entre mâles et femelles, ainsi que la plus forte capacité de défense chez les forficules historiquement pré-exposés.

Si la réponse au stress chimique varie en fonction de l'origine des forficules, les différences entre mâles et femelles confirment la plus grande sensibilité des mâles vis à vis d'insecticides OP et néonicotinoïdes (Malagnoux *et al.*, 2014; Malagnoux *et al.*, 2015a). En effet après exposition au chlorpyrifos-éthyl, une réponse sexe-dépendante est observée *in vivo* en termes d'inhibition de l'AcChE, d'induction des enzymes de détoxification et d'induction des HSP70. Ainsi, chez *F. auricularia*, les femelles semblent moins sensibles et présentent la capacité de s'adapter plus rapidement que les mâles aux variations environnementales (exposition aux insecticides en particulier) en développant des mécanismes de défense efficaces tout en limitant leurs coûts physiologiques (Figure 32).

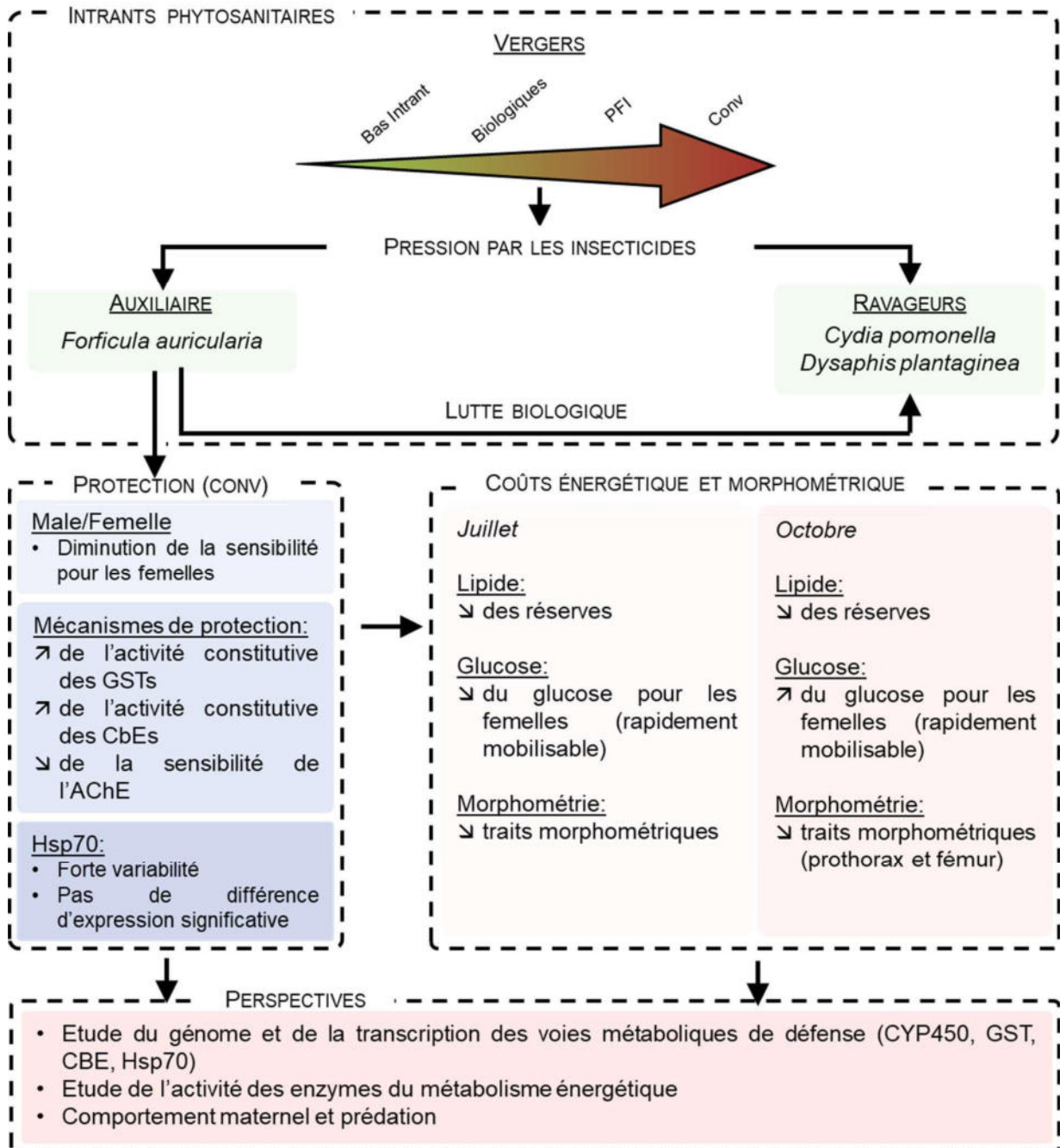


Figure 32 : Schéma bilan

Ces travaux de thèse ont montré la capacité d'une population de forficules, provenant d'un verger en agriculture conventionnelle, à mettre en place des mécanismes de protection contre les insecticides organophosphorés. Les facteurs de résistance observés sont significatifs mais relativement « faibles » ( $F_R=2$ ). A ce facteur de résistance sont associés une induction du métabolisme de détoxification (de l'ordre de 5 pour les GSTs et de 2 pour les CbEs) et une diminution de la sensibilité de l'AChE (de l'ordre de 4). Ces observations sont donc en faveur de la mise en place de mécanismes de tolérance chez les forficules, *F. auricularia* exposés à l'utilisation importante de pesticides en vergers conventionnels.

En conclusion, les résultats obtenus au cours de cette thèse montrent que l'auxiliaire *F. auricularia* a développé des capacités d'adaptation lui permettant de survivre en vergers traités. L'expression constitutive plus importante des GSTs et des CbEs est susceptible de favoriser la mise en place de tolérance croisée (insecticide ayant les mêmes modes d'action) et/ou multiple (modes d'action différents). L'existence de tolérance croisée, augmenterait le potentiel d'utilisation du forficule en lutte biologique. De plus, sa capacité de résilience, dès la première génération obtenue en absence de toute exposition aux insecticides en fait une espèce auxiliaire de choix pour une utilisation en lutte biologique, en vue d'accompagner la transition des vergers vers une agriculture plus durable.



## 2 Perspectives

Nos résultats montrent pour la première fois, l'apparition d'une tolérance aux insecticides chez la forficule *F. auricularia*.

De nombreux points restent à éclaircir pour établir sans ambiguïté l'acquisition de cette tolérance. Nous avons commencé, en collaboration avec l'institut Sophia Agrobiotech, l'analyse transcriptomique de l'expression des gènes impliqués dans la résistance aux insecticides. Les premiers résultats indiquent la présence d'une mutation S238G (correspondant au changement d'une sérine par une glycine en position 238), sur le gène *ace2*. Ce gène *ace2* est responsable de l'apparition de résistance à l'azinphosmethyl (OP) chez le doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata*) (Zhu et al., 1996). De plus, la forte induction du gène Cyp6NQ1 chez les forficules prélevés en vergers conventionnels est en accord avec l'apparition de résistance aux pesticides chez ces organismes. Le rôle de la famille CYP6 dans la résistance aux insecticides (pyréthrinoides, OPs) a été mis en évidence de nombreuses fois dans la littérature (Feyereisen et al., 1995; Maitra et al., 1996; Nikou et al., 2003). L'expression des gènes de cibles moléculaires d'autres familles d'insecticides (récepteur nicotinique, canal sodium) et des gènes codant les enzymes de détoxification (CbE, GST, CYP450) est en cours d'analyse et permettra d'avoir une image plus complète des mécanismes impliqués dans cette tolérance de *F. auricularia* au Pyrinex. L'expression des gènes d'autres cibles moléculaires (récepteur nicotinique, canal sodium) et des gènes codant les enzymes de détoxification (CbE, GST, CYP450) est en cours d'analyse et permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués. Les deux modifications génomiques observées confirment la mise en place d'un phénomène de résistance biologique notamment par la modification de l'AChE, la cible moléculaire. Cependant ces mutations, combinées à une importante activité constitutive et à l'induction rapide des enzymes impliquées dans les voies de détoxification (GST, CbEs), semblent insuffisantes pour augmenter le facteur de résistance et induire de la résistance au champ.

D'autre part, il serait intéressant d'utiliser ces techniques de transcriptomique pour détecter plus finement la réponse des Hsp70. Cette technique pourrait en effet réduire la variabilité des réplicats.

Concernant les coûts énergétiques, il apparaît judicieux de développer de nouveaux biomarqueurs du métabolisme énergétique en ciblant les enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse du glycogène et des lipides (Arrese and Soulages, 2010). La glycogène synthétase impliquée dans la synthèse du glycogène, la glycogène phosphorylase qui régulent l'hydrolyse du glycogène, l'hexokinase impliquée dans la glycolyse ou encore les enzymes impliquées dans la lipogenèse comme l'acétyl-CoA-carboxylase sont des candidats potentiels. La connaissance de leur activité constitutive ainsi que des variations induites par l'exposition à des insecticides permettrait d'identifier les points clés du métabolisme comme une déficience (i) de la dégradation du glycogène, (ii) de la synthèse des lipides ou une consommation excessive de ces derniers. Les résultats faciliteraient peut-être l'application du modèle DEB (Dynamic Energetic Budget) (Kooijman, 2009). Ce modèle développé à l'échelle de l'individu permet d'évaluer la distribution des réserves au sein d'un individu placé dans un environnement stable. Peu de travaux prennent en compte les phénomènes d'adaptation des organismes dans la perturbation des réserves énergétiques, alors que cela permettrait d'évaluer les conséquences des polluants sur plusieurs générations et par suite d'intégrer ces effets à l'échelle des populations (Jager et al., 2014).

Il serait pertinent d'évaluer l'impact de la tolérance sur le comportement des forficules et sur leur rôle dans la lutte biologique. La différence de sensibilité de l'AChE observée chez les forficules provenant de vergers conventionnels, pourrait induire une modification de leur comportement. Malagnoux *et al.* (2015b) ont mis en évidence une diminution de l'activité de prédation des forficules dits « naïfs » (prélevés en vergers abandonnés, c'est à dire n'ayant jamais été soumis à des traitements phytosanitaires) après exposition à différents insecticides neurotoxiques (chlorpyrifos-éthyl, spinosad, et acétamipride). Par ailleurs, *F. auricularia* est caractérisé par un comportement maternel très développé. Ce comportement est indispensable pour l'éclosion des œufs en empêchant les développements fongiques et microbiens. Toute perturbation de ce comportement maternel pourrait affecter le succès d'éclosion et donc le maintien des populations. L'étude du comportement maternel et de l'activité de prédation des forficules, compléterait la connaissance des fonctions physiologiques d'intérêt favorisant le maintien des populations.



## Bibliographie

- Agreste, 2019. Surfaces et production de fruits pour la France métropolitaine - Régions définitions 2016 - Disar-Saiku [WWW Document]. URL [https://stats.agriculture.gouv.fr/disar-saiku/?plugin=true&query=query/open/D\\_0043#query/open/D\\_0043](https://stats.agriculture.gouv.fr/disar-saiku/?plugin=true&query=query/open/D_0043#query/open/D_0043) (accessed 4.16.19).
- agriculture.gouv.fr, 2006. L'utilisation des pesticides en France : état des lieux et perspectives de réduction [WWW Document]. URL <http://agriculture.gouv.fr/telecharger/71232?token=d45ec7aae529bde12ee62b1249c60510> (accessed 10.19.16).
- Ahmad, S., Pozzebbon, A., Duso, C., 2013. Augmentative releases of the predatory mite *Kampimodromus aberrans* in organic and conventional apple orchards. *Crop Protection* 52, 47–56.
- Ahn, T., Yang, S., Yun, C.-H., 2004. Enhanced expression of human cytochrome P450 1A2 by co-expression with human molecular chaperone Hsp70. *Toxicology Letters* 153, 267–272.
- Aïzoun, N., Aikpon, R., Gnanguenon, V., Oussou, O., Agossa, F., Padonou, G.G., Akogbéto, M., 2013. Status of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato from the south and north Benin, West Africa. *Parasites & Vectors* 6, 274.
- Albouy, V., Caussanel, C., Hodebert, G., 1990. Dermaptères ou Perce-oreilles. Fédération française des sociétés de sciences naturelles.
- Aldridge, W.N., 1953. Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing *p*-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemical Journal* 53, 110–117.
- Ament, S.A., Chan, Q.W., Wheeler, M.M., Nixon, S.E., Johnson, S.P., Rodriguez-Zas, S.L., Foster, L.J., Robinson, G.E., 2011. Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *Journal of Experimental Biology* 214, 3808–3821.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Martínez, M.A., 2009. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal* 182, 7–20.
- Anand, A.N., Lorenz, M.W., 2008. Age-dependent changes of fat body stores and the regulation of fat body lipid synthesis and mobilisation by adipokinetic hormone in the last larval instar of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology* 54, 1404–1412.
- Anazawa, Y., Tomita, T., Aiki, Y., Kozaki, T., Kono, Y., 2003. Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 509–514.
- Armstrong, K.F., Suckling, D.M., 1988. Investigations into the biochemical basis of azinphosmethyl resistance in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 32, 62–73.
- Arrese, E.L., Soulages, J.L., 2010. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology* 55, 207–225.
- Athenstaedt, K., Daum, G., 2006. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1355–1369.
- Audemard, H., 1991. Population dynamics of the codling moth. Tortricid pests. Their biology, natural enemies and control. Amsterdam: Elsevier Science Publishers 327–338.
- Balabanidou, V., Kampouraki, A., MacLean, M., Blomquist, G.J., Tittiger, C., Juárez, M.P., Mijailovsky, S.J., Chalepakis, G., Anthousi, A., Lynd, A., Antoine, S., Hemingway, J., Ranson, H., Lycett, G.J., Vontas, J., 2016. Cytochrome P450 associated with insecticide

- resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. PNAS 113, 9268–9273.
- Balachowsky, A.S., 1966. Entomologie applique a l'agriculture. Traité. Tome II. Lepidopteres. Masson et Cie éditeurs, France.
- Bass, C., Puinean, A.M., Zimmer, C.T., Denholm, I., Field, L.M., Foster, S.P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R., Williamson, M.S., 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 51, 41–51.
- Beers, E.H., Mills, N.J., Shearer, P.W., Horton, D.R., Milickzy, E.R., Amarasekare, K.G., Gontijo, L.M., 2016. Nontarget effects of orchard pesticides on natural enemies: Lessons from the field and laboratory. Biological Control, Enhancing biological control in western orchards: a five-year project 102, 44–52.
- Behura, B.K., 1956. The biology of the European earwig, *Forficula auricularia* Linn. Annals of Zoology 1, 117–142.
- Belkair, S.A., Mazzia, C., Pasquet, A., Capowicz, Y., 2018. Temporal activity of spiders and earwigs during winter in apple trees under a Mediterranean climate. Biocontrol Science and Technology 28, 823–836.
- Benamú, M.A., Schneider, M.I., González, A., Sánchez, N.E., 2013. Short and long-term effects of three neurotoxic insecticides on biological and behavioural attributes of the orb-web spider *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae): implications for IPM programs. Ecotoxicology 22, 1155–1164.
- 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, 261–269.
- Benoit, J.B., Lopez-Martinez, G., Phillips, Z.P., Patrick, K.R., Denlinger, D.L., 2010. Heat shock proteins contribute to mosquito dehydration tolerance. Journal of Insect Physiology 56, 151–156.
- Berticat, C., Bonnet, J., Duchon, S., Agnew, P., Weill, M., Corbel, V., 2008. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. BMC Evolutionary Biology 8, 104.
- Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M., Chevillon, C., 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. Genet. Res. 79, 41–47.
- Berticat, C., Duron, O., Heyse, D., Raymond, M., 2004. Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. Genetics Research 83, 189–196.
- Biondi, A., Mommaerts, V., Smagghe, G., Viñuela, E., Zappalà, L., Desneux, N., 2012. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. Pest Management Science 68, 1523–1536.
- 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. J Pest Sci 77, 155–163.
- Boivin, G., 2001. Parasitoïdes et lutte biologique: paradigme ou panacée ? VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement.
- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. Environ Sci Pollut Res 22, 35–67.
- Boos, S., Meunier, J., Pichon, S., Kölliker, M., 2014. Maternal care provides antifungal protection to eggs in the European earwig. Behavioral Ecology 25, 754–761.

- 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, 2846.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bukau, B., Horwich, A.L., 1998. The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell* 92, 351–366.
- Burnip, G.M., Daly, J.M., Hackett, J.K., Suckling, D.M., 2002. European earwig phenology and effect of understorey management on population estimation. *New Zealand Plant Protection* 55, 390–395.
- Burton, B.M., Baker, T.A., 2005. Remodeling protein complexes: Insights from the AAA+ unfoldase ClpX and Mu transposase. *Protein Science* 14, 1945–1954.
- Butault, J.P., Delame, N., Jacquet, F., Zardet, G., 2011. L'utilisation des pesticides en France: état des lieux et perspectives de réduction. *Notes et études socio-économiques* 35, 1–24.
- 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, 109–114.
- Calow, P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100, 3–6.
- Cao, C.-W., Zhang, J., Gao, X.-W., Liang, P., Guo, H.-L., 2008. Overexpression of carboxylesterase gene associated with organophosphorous insecticide resistance in cotton aphids, *Aphis gossypii* (Glover). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 90, 175–180.
- Capowiez, Y., 2013. Agronomical & environmental impacts of a protection method: the enclosure netting alt'carpo 44.
- Cardé, R.T., Minks, A.K., 1995. Control of Moth Pests by Mating Disruption: Successes and Constraints. *Annual Review of Entomology* 40, 559–585.
- Carletto, J., Martin, T., Vanlerberghe-Masutti, F., Brévault, T., 2010. Insecticide resistance traits differ among and within host races in *Aphis gossypii*. *Pest Management Science* 66, 301–307.
- Carlini, E.J., McPherson, B.A., Felland, C.M., Hull, L.A., 1995. Biochemical Mechanisms of Azinphosmethyl Resistance in the Tufted Apple Bud Moth *Platynota idaeusalis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 51, 38–47.
- Carroll, D.P., Hoyt, S.C., 1984. Natural Enemies and Their Effects on Apple Aphid, *Aphis pomi* DeGeer (Homoptera: Aphididae), Colonies on Young Apple Trees in Central Washington. *Environ Entomol* 13, 469–481.
- Carson, R., 1962. *Silent spring*. Mifflin Company, Boston.
- Carver, L.A., Jackiw, V., Bradfield, C.A., 1994. The 90-kDa heat shock protein is essential for Ah receptor signaling in a yeast expression system. *J. Biol. Chem.* 269, 30109–30112.
- Casida, J.E., 2016. Unexpected Metabolic Reactions and Secondary Targets of Pesticide Action. *J. Agric. Food Chem.* 64, 4471–4477.
- Casida, J.E., Durkin, K.A., 2013. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annual Review of Entomology* 58, 99–117.
- Cassanelli, S., Reyes, M., Rault, M., Carlo Manicardi, G., Sauphanor, B., 2006. Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 642–653.
- Caton, M.P., 2004. *Economie rurale*. Errance, Paris.

- CE 834, 2007. CE 834 [WWW Document]. URL [https://www.agencebio.org/sites/default/files/upload/documents/3\\_Espace\\_Pro/RCE\\_BIO\\_834\\_2007\\_oct08.pdf](https://www.agencebio.org/sites/default/files/upload/documents/3_Espace_Pro/RCE_BIO_834_2007_oct08.pdf) (accessed 4.17.19).
- Ceyhun, S.B., Şentürk, M., Ekinci, D., Erdoğan, O., Çiltaş, A., Kocaman, E.M., 2010. Deltamethrin attenuates antioxidant defense system and induces the expression of heat shock protein 70 in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 152, 215–223.
- Chareonviriyaphap, T., Bangs, M.J., Suwonkerd, W., Kongmee, M., Corbel, V., Ngoen-Klan, R., 2013. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. *Parasites & Vectors* 6, 280.
- Chen, Z., Newcomb, R., Forbes, E., McKenzie, J., Batterham, P., 2001. The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 805–816.
- Chowanski, S., Lubawy, J., Spochacz, M., Ewelina, P., Grzegorz, S., Rosinski, G., Slocinska, M., 2015. Cold induced changes in lipid, protein and carbohydrate levels in the tropical insect *Gromphadorhina coquereliana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 183, 57–63.
- Coles, T.B., Dryden, M.W., 2014. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. *Parasites & Vectors* 7, 8.
- Congdon, J.D., Dunham, A.E., Hopkins, W.A., Rowe, C.L., Hinton, T.G., 2001. Resource allocation-based life histories: A conceptual basis for studies of ecological toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1698–1703.
- Corbel, V., Akogbeto, M., Damien, G.B., Djenontin, A., Chandre, F., Rogier, C., Moiroux, N., Chabi, J., Banganna, B., Padonou, G.G., Henry, M.-C., 2012. Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases* 12, 617–626.
- Costa, J.T., 2006. *The Other Insect Societies*. Harvard University Press.
- Costa, L.G., 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica chimica acta* 366, 1–13.
- Cothran, R.D., Brown, J.M., Relyea, R.A., 2013. Proximity to agriculture is correlated with pesticide tolerance: evidence for the evolution of amphibian resistance to modern pesticides. *Evolutionary Applications* 6, 832–841.
- Coustau, C., Chevillon, C., French-Constant, R., 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology & Evolution* 15, 378–383.
- Cresswell, J.E., 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology* 20, 149–157.
- Crowder, D.W., Northfield, T.D., Strand, M.R., Snyder, W.E., 2010. Organic agriculture promotes evenness and natural pest control. *Nature* 466, 109–112.
- Cui, F., Li, M.-X., Chang, H.-J., Mao, Y., Zhang, H.-Y., Lu, L.-X., Yan, S.-G., Lang, M.-L., Liu, L., Qiao, C.-L., 2015. Carboxylesterase-mediated insecticide resistance: Quantitative increase induces broader metabolic resistance than qualitative change. *Pesticide Biochemistry and Physiology, Insecticide and Acaricide Modes of Action and their Role in Resistance and its Management* 121, 88–96.
- Debras, J.-F., Dutoit, T., Rieux, R., Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 2007. Rôles fonctionnels des haies dans la régulation des ravageurs le cas du psylle *Cacopsylla pyri* L. dans les vergers du sud-est de la France. [s.n.], S.I.

- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Geffard, A., Amiard-Triquet, C., 2012. Origin of energy metabolism impairments. Ecological biomarkers—indicators of ecotoxicological effects. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 279–306.
- Dellicour, S., Gerard, M., Prunier, J.G., Dewulf, A., Kuhlmann, M., Michez, D., 2017. Distribution and predictors of wing shape and size variability in three sister species of solitary bees. PLOS ONE 12, e0173109.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.-M., 2007. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. Annual Review of Entomology 52, 81–106.
- Dib, H., Jamont, M., Sauphanor, B., Capowiez, Y., 2016. The feasibility and efficacy of early-season releases of a generalist predator (*Forficula auricularia* L.) to control populations of the RAA (*Dysaphis plantaginea* Passerini) in Southeastern France. Bulletin of Entomological Research 106, 233–241.
- 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.
- Dib, H., Sauphanor, B., Capowiez, Y., 2010a. Effect of codling moth exclusion nets on the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea*, and its control by natural enemies. Crop Protection 29, 1502–1513.
- Dib, H., Simon, S., Sauphanor, B., Capowiez, Y., 2010b. 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. Biological Control 55, 97–109.
- Directive 2009/128/CE, 2009. Directive 2009/128/CE. Journal officiel de l'Union Européenne 18, 165.
- Doganlar, O., Doganlar, B., 2015. Responses of antioxidant enzymes and heat shock proteins in *Drosophila* to treatment with a pesticide mixture. Arch Biol Sci (Beogr) 67, 869–876.
- Dumas, P., Morin, M.D., Boquel, S., Moffat, C.E., Morin, P.J., 2019. Expression status of heat shock proteins in response to cold, heat, or insecticide exposure in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. Cell Stress and Chaperones 24, 539–547.
- Duso, C., Fantì, M., Pozzebon, A., Angeli, G., 2009. Is the predatory mite *Kampimodromus aberrans* a candidate for the control of phytophagous mites in European apple orchards? BioControl 54, 369–382.
- Duso, C., Pozzebon, A., Kreiter, S., Tixier, M.-S., Candolfi, M., 2012. Management of Phytophagous Mites in European Vineyards, in: Bostanian, N.J., Vincent, C., Isaacs, R. (Eds.), Arthropod Management in Vineyards: Pests, Approaches, and Future Directions. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 191–217.
- EcophytoPIC, 2019. Définition de la Protection Intégrée / Article 3 de la Directive 2009/128/CE | EcophytoPIC [WWW Document]. URL <http://www.ecophytopic.fr/tr/principes-et-d%C3%A9finitions/directive-europ%C3%A9enne/d%C3%A9finition-de-la-protection-int%C3%A9gr%C3%A9e-article-3-de> (accessed 4.17.19).
- Eder, K.J., Leutenegger, C.M., Köhler, H.-R., Werner, I., 2009. Effects of neurotoxic insecticides on heat-shock proteins and cytokine transcription in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Ecotoxicology and Environmental Safety 72, 182–190.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7, 88–95.
- Emden, H.F.V., Harrington, R., 2007. Aphids as Crop Pests. CABI.



- Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 14, 3–8.
- Eurostat, 2019. Eurostat - Tables, Graphs and Maps Interface (TGM) graph [WWW Document]. URL <https://ec.europa.eu/eurostat/tgm/graph.do?tab=graph&plugin=1&pcode=tai02&language=fr&toolbox=data> (accessed 4.17.19).
- Fairbrother, A., 1991. Methods used in determination of cholinesterase activity. *Chemicals in agriculture* 35–72.
- Farnsworth, C.A., Teese, M.G., Yuan, G., Li, Y., Scott, C., Zhang, X., Wu, Y., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 2010. Esterase-based metabolic resistance to insecticides in heliothine and spodopteran pests. *Journal of Pesticide Science* 35, 275–289.
- Feyereisen, R., Andersen, J.F., Cariño, F.A., Cohen, M.B., Koener, J.F., 1995. Cytochrome P450 in the house fly: Structure, catalytic activity and regulation of expression of CYP6 A1 in an insecticide-resistant strain. *Pesticide Science* 43, 233–239.
- Ffrench-Constant, R.H., Vickerman, G.P., 1985. Soil contact toxicity of insecticides to the european earwig *Forficula auricularia* [Dermaptera]. *Entomophaga* 30, 271–278.
- Field, L.M., Blackman, R.L., Tyler-Smith, C., Devonshire, A.L., 1999. Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal* 339, 737–742.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 272–280.
- Foster, S.P., Devine, G.J., Devonshire, A.L., 2017. Insecticide resistance, in: Van Emden, H.F., Harrington, R. (Eds.), *Aphids as Crop Pests*, 2nd Edition (Chapter 19). CABI International, Wallingford, Oxon (CABI), pp. 426–447.
- Fournier, D., 2005. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chemico-Biological Interactions, Proceedings of the VIII International Meeting on Cholinesterases* 157–158, 257–261.
- Fournier, D., Bride, J.M., Poirie, M., Bergé, J.B., Plapp, F.W., 1992. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.* 267, 1840–1845.
- Franjesevic, A.J., Sillart, S.B., Beck, J.M., Vyas, S., Callam, C.S., Hadad, C.M., 2019. Resurrection and Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Chem. Eur. J.* 25, 5337–5371.
- Frings, C.S., Fendley, T.W., Dunn, R.T., Queen, C.A., 1972. Improved Determination of Total Serum Lipids by the Sulfo-Phospho-Vanillin Reaction. *Clinical Chemistry* 18, 673–674.
- Fuentes-Contreras, E., Reyes, M., Barros, W., Sauphanor, B., 2007. Evaluation of Azinphos-Methyl Resistance and Activity of Detoxifying Enzymes in Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) from Central Chile. *J Econ Entomol* 100, 551–556.
- Gammon, D.W., Lawrence, L.J., Casida, J.E., 1982. Pyrethroid toxicology: Protective effects of diazepam and phenobarbital in the mouse and the cockroach. *Toxicology and Applied Pharmacology* 66, 290–296.
- Garnas, J.R., 2018. Rapid evolution of insects to global environmental change: conceptual issues and empirical gaps. *Current Opinion in Insect Science, Global change biology* \* *Molecular physiology* 29, 93–101.
- Giglio, A., Cavaliere, F., Giulianini, P.G., Mazzei, A., Talarico, F., Vommaro, M.L., Brandmayr, P., 2017. Impact of agrochemicals on non-target species: *Calathus fuscipes* Goeze 1777

- (Coleoptera: Carabidae) as model. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142, 522–529.
- Gilbert, L.I., Gill, S.S., 2010. *Insect Pharmacology: Channels, Receptors, Toxins and Enzymes*. Academic Press.
- Giron, D., Casas, J., 2003. Lipogenesis in an adult parasitic wasp. *Journal of Insect Physiology* 49, 141–147.
- Givaudan, N., Suchail, S., Rault, M., Mouneyrac, C., Capowiez, Y., 2016. Impact of apple orchard management strategies on earthworm (*Allolobophora chlorotica*) energy reserves. *Soil Biology and Biochemistry* 100, 252–254.
- Gorbach, S.L., 2001. Antimicrobial use in animal feed—time to stop. *Mass Medical Soc.*
- Grigg-McGuffin, K., Scott, I.M., Bellerose, S., Chouinard, G., Cormier, D., Scott-Dupree, C., 2015. Susceptibility in field populations of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), in Ontario and Quebec apple orchards to a selection of insecticides. *Pest Management Science* 71, 234–242.
- 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, 377–384.
- Haap, T., Köhler, H.-R., 2009. Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduced hsp70 baseline levels and induction. *Aquatic Toxicology* 94, 131–137.
- Habig, C., Di Giulio, R.T., 1991. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. *Cholinesterase inhibiting insecticides: Their impact on wildlife and the environment* 2, 19–34.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hatt, S., Boeraeve, F., Artru, S., Dufrêne, M., Francis, F., 2018. Spatial diversification of agroecosystems to enhance biological control and other regulating services: An agroecological perspective. *Science of The Total Environment* 621, 600–611.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 51–88.
- Hemingway, J., Field, L., Vontas, J., 2002. An Overview of Insecticide Resistance. *Science* 298, 96–97.
- Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annual Review of Entomology* 45, 371–391.
- Henry, M., Béguin, 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, 27–38.
- Hollingsworth, R.G., Steinkraus, D.C., Tugwell, N.P., 1997. Responses of Arkansas Populations of Tarnished Plant Bugs (Heteroptera: Miridae) to Insecticides, and Tolerance Differences Between Nymphs and Adults. *Journal of Economic Entomology* 90, 21–26.
- Hopkins, D.H., Fraser, N.J., Mabbitt, P.D., Carr, P.D., Oakeshott, J.G., Jackson, C.J., 2017. Structure of an Insecticide Sequestering Carboxylesterase from the Disease Vector *Culex quinquefasciatus*: What Makes an Enzyme a Good Insecticide Sponge? *Biochemistry* 56, 5512–5525.
- Hua, J., Jones, D.K., Mattes, B.M., Cothran, R.D., Relyea, R.A., Hoverman, J.T., 2015. The contribution of phenotypic plasticity to the evolution of insecticide tolerance in amphibian populations. *Evolutionary Applications* 8, 586–596.

- Hua, J., Morehouse, N.I., Relyea, R., 2013. Pesticide tolerance in amphibians: induced tolerance in susceptible populations, constitutive tolerance in tolerant populations. *Evolutionary Applications* n/a-n/a.
- INPN, 2018. *Forficula auricularia* Linnaeus, 1758 - Forficule, Pince-oreille, Perce-oreille [WWW Document]. Inventaire National du Patrimoine Naturel. URL [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/65991](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/65991) (accessed 7.10.18).
- Jager, T., Barsi, A., Hamda, N.T., Martin, B.T., Zimmer, E.I., Ducrot, V., 2014. Dynamic energy budgets in population ecotoxicology: Applications and outlook. *Ecological Modelling, Population Models for Ecological Risk Assessment of Chemicals* 280, 140–147.
- Javed, N., Viner, R., Williamson, M.S., Field, L.M., Devonshire, A.L., Moores, G.D., 2003. Characterization of acetylcholinesterases, and their genes, from the hemipteran species *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* (Glover), *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). *Insect Molecular Biology* 12, 613–620.
- Jeschke, P., Nauen, R., 2008. Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag. Sci.* 64, 1084–1098.
- Jokanović, M., Kosanović, M., Maksimović, M., 1996. Interaction of organophosphorus compounds with carboxylesterases in the rat. *Archives of toxicology* 70, 444–450.
- Jones, V.P., Mills, N.J., Brunner, J.F., Horton, D.R., Beers, E.H., Unruh, T.R., Shearer, P.W., Goldberger, J.R., Castagnoli, S., Lehrer, N., Milickzy, E., Steffan, S.A., Amarasekare, K.G., Chambers, U., Gadino, A.N., Gallardo, R.K., Jones, W.E., 2016. From planning to execution to the future: An overview of a concerted effort to enhance biological control in apple, pear, and walnut orchards in the western U.S. *Biological Control, Enhancing biological control in western orchards: a five-year project* 102, 1–6.
- Jørgensen, L.N., 1999. Denmark's action plan for pesticides - status and role of research. *Nordisk Jordbruksforskning* 81, 197–203.
- Kanga, L.H.B., Adamczyk, J., Marshall, K., Cox, R., 2010. Monitoring for Resistance to Organophosphorus and Pyrethroid Insecticides in *Varroa* Mite Populations. *jnl. econ. entom.* 103, 1797–1802.
- Kelly, S.A., Panhuis, T.M., Stoehr, A.M., 2012. Phenotypic Plasticity: Molecular Mechanisms and Adaptive Significance, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Kerkut, G.A., 2013. *Integument, Respiration and Circulation*. Elsevier.
- Kerkut, G.A., 1985. *Insect Control*. Elsevier.
- King, A.M., MacRae, T.H., 2015. Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause. *Annual Review of Entomology* 60, 59–75.
- Kliot, A., Ghanim, M., 2012. Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Management Science* 68, 1431–1437.
- Köhler, H.-R., Alberti, G., Seniczak, S., Seniczak, A., 2005. Lead-induced hsp70 and hsp60 pattern transformation and leg malformation during postembryonic development in the oribatid mite, *Archegozetes longisetosus* Aoki. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 141, 398–405.
- Köhler, H.-R., Bartussek, C., Eckwert, H., Farian, K., Gränzer, S., Knigge, T., Kunz, N., 2001. The hepatic stress protein (hsp70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8, 261–279.
- Köhler, H.-R., Knödler, C., Zanger, M., 1999. Divergent Kinetics of hsp70 Induction in *Oniscus asellus* (Isopoda) in Response to Four Environmentally Relevant Organic Chemicals

- (B[a]P, PCB52,  $\gamma$ -HCH, PCP): Suitability and Limits of a Biomarker. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 179–185.
- Köhler, H.-R., Triebskorn, R., 2013. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science* 341, 759–765.
- Köhler, H.-R., Triebskorn, R., Stöcker, W., Kloetzel, P.-M., Alberti, G., 1992. The 70 kD heat shock protein (hsp 70) in soil invertebrates: A possible tool for monitoring environmental toxicants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 334–338.
- Kölliker, M., Vancassel, M., 2007. Maternal attendance and the maintenance of family groups in common earwigs (*Forficula auricularia*): a field experiment. *Ecological Entomology* 32, 24–27.
- Kooijman, B., 2009. *Dynamic Energy Budget Theory for Metabolic Organisation*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2001. The role of glutathione S-transferases in the detoxification of some organophosphorus insecticides in larvae and pupae of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pest Management Science* 57, 501–508.
- Kostromytska, O.S., Scharf, M.E., Buss, E.A., 2018. Behavioral responses of pest mole crickets, *Neoscapteriscus* spp. (Orthoptera: Gryllotalpidae), to selected insecticides. *Pest Management Science* 74, 547–556.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*. Masson, Paris 1–9.
- Lamb, R.J., Wellington, W.G., 1975. Life history and population characteristics of the european earwig, *forficula auricularia* (dermaptera: forficulidae), at vancouver, british columbia. *Can Entomol* 107, 819–824.
- Law, J.H., Wells, M.A., 1989. Insects as biochemical models. *J. Biol. Chem.* 264, 16335–16338.
- Le Navenant, A., Siegwart, M., Maugin, S., Capowiez, Y., Rault, M., 2019. Metabolic mechanisms and acetylcholinesterase sensitivity involved in tolerance to chlorpyrifos-ethyl in the earwig *Forficula auricularia*. *Chemosphere* 227, 416–424.
- Lenfant, C., Lyousoufi, A., Chen, X., d’Arcier, F.F., Sauphanor, B., 1994. Potentialités prédatrices de *Forficula auricularia* sur le psylle du poirier *Cacopsylla pyri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 73, 51–60.
- Lenfant, C., Sauphanor, B., 1992. Des Perce-Oreilles Dans Les Vergers: Qu’en Faire? *Phytoma* 44–44.
- Li, F., Han, Z., 2004. Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 397–405.
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2007. Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annual Review of Entomology* 52, 231–253.
- Li, Y., Zhao, Q., Duan, X., Song, C., Chen, M., 2017. Transcription of four *Rhopalosiphum padi* (L.) heat shock protein genes and their responses to heat stress and insecticide exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 205, 48–57.
- Lumjuan, N., Rajatileka, S., Changsom, D., Wicheer, J., Leelapat, P., Prapanthadara, L., Somboon, P., Lycett, G., Ranson, H., 2011. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 203–209.

- Lumjuan, N., Stevenson, B.J., Prapanthadara, L., Somboon, P., Brophy, P.M., Loftus, B.J., Severson, D.W., Ranson, H., 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 1026–1035.
- Mace, G.M., Norris, K., Fitter, A.H., 2012. Biodiversity and ecosystem services: a multilayered relationship. *Trends in Ecology & Evolution* 27, 19–26.
- Maitra, S., Dombrowski, S.M., Waters, L.C., Ganguly, R., 1996. Three second chromosome-linked clustered *Cyp6* genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 180, 165–171.
- Malagnoux, L., 2014. Evaluation des impacts environnementaux liés aux pratiques phytosanitaires en vergers de pommiers: approches écotoxicologique et écologique utilisant un auxiliaire des cultures, le forficule. Université d'Avignon.
- Malagnoux, L., Capowiez, Y., Rault, M., 2014. Tissue distribution, characterization and in vitro inhibition of B-esterases in the earwig *Forficula auricularia*. *Chemosphere* 112, 456–464.
- Malagnoux, L., Capowiez, Y., Rault, M., 2015a. Impact of insecticide exposure on the predation activity of the European earwig *Forficula auricularia*. *Environ Sci Pollut Res* 22, 14116–14126.
- Malagnoux, L., Marliac, G., Simon, S., Rault, M., Capowiez, Y., 2015b. Management strategies in apple orchards influence earwig community. *Chemosphere* 124, 156–162.
- Manyuli, T., Kyamanywa, S., Luther, G.C., 2008. Capability of *Forficula auricularia* linnaeus (Dermaptera : Forficulidae) to prey on *Aphis craccivora* koch (Homoptera : Aphididae) in eastern and Central Africa. *Agronomie Africaine* 20, 49-58–58.
- Mari, M., Cembali, T., Casalini, L., Pratella, G.C., 2000. *Mucor* Species in Orchard Soil – Population Dynamics and Pathogenicity on Pear Fruit. *European Journal of Plant Pathology* 106, 449–454.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* 87, 206–210.
- Marliac, G., Mazzia, C., Pasquet, A., Cornic, J.-F., Hedde, M., Capowiez, Y., 2016. Management diversity within organic production influences epigeal spider communities in apple orchards. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 216, 73–81.
- Marliac, G., Penvern, S., Barbier, J.-M., Lescourret, F., Capowiez, Y., 2015. Impact of crop protection strategies on natural enemies in organic apple production. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 803–813.
- Marshall, J.S., DeRocher, A.E., Keegstra, K., Vierling, E., 1990. Identification of heat shock protein hsp70 homologues in chloroplasts. *PNAS* 87, 374–378.
- Mazzia, C., Pasquet, A., Caro, G., Thénard, J., Cornic, J.-F., Hedde, M., Capowiez, Y., 2015. The impact of management strategies in apple orchards on the structural and functional diversity of epigeal spiders. *Ecotoxicology* 24, 616–625.
- Melander, A.L., 1914. Can Insects Become Resistant to Sprays? *J Econ Entomol* 7, 167–173.
- Meunier, J., Wong, J.W.Y., Gómez, Y., Kuttler, S., Röllin, L., Stucki, D., Kölliker, M., 2012. One clutch or two clutches? Fitness correlates of coexisting alternative female life-histories in the European earwig. *Evol Ecol* 26, 669–682.
- Millardet, A., Gayon, U., 1885. Traitement du mildiou par le mélange de sulfate de cuivre et chaux. *Journal Agriculture Pratique* 49, 707–710.

- Mirth, C.K., Riddiford, L.M., 2007. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *BioEssays* 29, 344–355.
- Moerkens, R., Leirs, H., Peusens, G., Beliën, T., Gobin, B., 2012. Natural and human causes of earwig mortality during winter: temperature, parasitoids and soil tillage: Earwig mortality during winter. *Journal of Applied Entomology* 136, 490–500.
- 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, 19–27.
- Moïse Maïmonide, Rabbinowicz, I.-M., 1865. *Traité des poisons de Maimonide (XIIe siècle) avec une table alphabétique des noms pharmaceutiques, arabes et hébreux, d'après le Traité des synonymes de M. Clément-Mullet*. Adrien Delahaye, libraire-éditeur place de l'École-de-médecine 1865, Paris, France.
- Motoyama, N., Dauterman, W.C., 1972. *in vitro* metabolism of azinphosmethyl in susceptible and resistant houseflies. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2, 113–122.
- Motoyama, N., Rock, G.C., Dauterman, W.C., 1971. Studies on the mechanism of azinphosmethyl resistance in the predaceous mite, *Neoseiulus* (T.) *fallacis* (family: Phytoseiidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 1, 205–215.
- Mouches, C., Pasteur, N., Berge, J., Hyrien, O., Raymond, M., de Saint Vincent, B., de Silvestri, M., Georghiou, G., 1986. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science* 233, 778–780.
- Murren, C.J., Auld, J.R., Callahan, H., Ghalambor, C.K., Handelsman, C.A., Heskell, M.A., Kingsolver, J.G., Maclean, H.J., Masel, J., Maughan, H., Pfennig, D.W., Relyea, R.A., Seiter, S., Snell-Rood, E., Steiner, U.K., Schlichting, C.D., 2015. Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: limits and costs of phenotype and plasticity. *Heredity* 115, 293–301.
- Musolin, D.L., 2007. Insects in a warmer world: ecological, physiological and life-history responses of true bugs (Heteroptera) to climate change. *Global Change Biology* 13, 1565–1585.
- Mutero, Pralavorio, M., Bride, J.M., Fournier, D., 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5922–5926.
- Nadeau, D., Corneau, S., Plante, I., Morrow, G., Tanguay, R.M., 2001. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Stress Chaperones* 6, 153–163.
- Nazir, A., Mukhopadhyay, I., Saxena, D.K., Chowdhuri, D.K., 2001. Chlorpyrifos-Induced hsp70 Expression and Effect on Reproductive Performance in Transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg 9. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41, 443–449.
- Nestel, D., Papadopoulos, N.T., Pascacio-Villafán, C., Righini, N., Altuzar-Molina, A.R., Aluja, M., 2016. Resource allocation and compensation during development in holometabolous insects. *Journal of Insect Physiology* 95, 78–88.
- Nikou, D., Ranson, H., Hemingway, J., 2003. An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* 318, 91–102.
- Nover, L., 1991. *Heat Shock Response*. CRC Press.
- Nunes, B., 2011. The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology, in: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 212, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, New York, NY, pp. 29–59.

- Oakeshott, J.G., Devonshire, A.L., Claudianos, C., Sutherland, T.D., Horne, I., Campbell, P.M., Ollis, D.L., Russell, R.J., 2005. Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases. *Chemico-Biological Interactions* 157–158, 269–275.
- Öckinger, E., Schweiger, O., Crist, T.O., Debinski, D.M., Krauss, J., Kuussaari, M., Petersen, J.D., Pöyry, J., Settele, J., Summerville, K.S., 2010. Life-history traits predict species responses to habitat area and isolation: a cross-continental synthesis. *Ecology letters* 13, 969–979.
- OILB/SROP, 2002. Guidelines for integrated production of pome fruits in europe, Bulletin OILB srop.
- Oppenoorth, F.J., Smisjaert, H.R., Welling, W., van der Pas, L.J.T., Hitman, K.T., 1977. Insensitive acetylcholinesterase, high glutathione-S-transferase, and hydrolytic activity as resistance factors in a tetrachlorvinphos-resistant strain of house fly. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 7, 34–47.
- Oppenoorth, F.J., van der Pas, L.J.T., Houx, N.W.H., 1979. Glutathione S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 11, 176–188.
- Organization World Health, 1992. Fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. World Health Organization.
- Orpet, R.J., Goldberger, J.R., Crowder, D.W., Jones, V.P., 2019. Field evidence and grower perceptions on the roles of an omnivore, European earwig, in apple orchards. *Biological Control* 132, 189–198.
- Orts, R., Giraud, M., Darthout, L., 2006. Protection intégrée pommier-poirier. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes.
- Pan, C., Zhou, Y., Mo, J., 2009. The clone of laccase gene and its potential function in cuticular penetration resistance of *Culex pipiens pallens* to fenvalerate. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93, 105–111.
- Pan, Y., Guo, H., Gao, X., 2009. Carboxylesterase activity, cDNA sequence, and gene expression in malathion susceptible and resistant strains of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 152, 266–270.
- Parrou, J.L., François, J., 1997. A Simplified Procedure for a Rapid and Reliable Assay of both Glycogen and Trehalose in Whole Yeast Cells. *Analytical Biochemistry* 248, 186–188.
- 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, 515–527.
- Plinius Secundus, G., André, J., 2003. Histoire naturelle. Livre 17: ..., 2. tirage. ed, Collection des universités de France. Les Belles Lettres, Paris.
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.-P., 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 540–551.
- Prather, T.S., Ditomaso, J.M., Holt, J.S., 2000. Herbicide Resistance: Definition and Management Strategies. University of California, Agriculture and Natural Resources.
- Puinean, A.M., Foster, S.P., Oliphant, L., Denholm, I., Field, L.M., Millar, N.S., Williamson, M.S., Bass, C., 2010. Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus persicae*. *PLOS Genetics* 6, e1000999.
- Quinn, D., Topczewski, J., Yasapala, N., Lodge, A., 2017. Why is Aged Acetylcholinesterase So Difficult to Reactivate? *Molecules* 22, 1464.

- R4P, 2016. Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection. *Trends in Plant Science* 21, 834–853.
- Rault, M., Collange, B., Mazzia, C., Capowiez, Y., 2008. Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 3086–3091.
- Reidy, G.F., Rose, H.A., Visetson, S., Murray, M., 1990. Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 36, 269–276.
- Reyes, M., Barros-Parada, W., Ramírez, C.C., Fuentes-Contreras, E., 2015. Organophosphate Resistance and its Main Mechanism in Populations of Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) from Central Chile. *J Econ Entomol* 108, 277–285.
- Reyes, M., Collange, B., Rault, M., Casanelli, S., Sauphanor, B., 2011. Combined detoxification mechanisms and target mutation fail to confer a high level of resistance to organophosphates in *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99, 25–32.
- Rharrabe, K., Amri, H., Bouayad, N., Sayah, F., 2008. Effects of azadirachtin on post-embryonic development, energy reserves and  $\alpha$ -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research* 44, 290–294.
- Riaz, M.A., Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., David, J.-P., 2009. Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquatic Toxicology* 93, 61–69.
- Ribeiro, P.F., Johnson, B.K., Crow, M.L., Arsoy, A., Liu, Y., 2001. Energy storage systems for advanced power applications. *Proceedings of the IEEE* 89, 1744–1756.
- Ritossa, F., 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 18, 571–573.
- Rivero, A., Magaud, A., Nicot, A., Vézilier, J., 2011. Energetic Cost of Insecticide Resistance in *Culex pipiens* Mosquitoes. *Jnl. med. entom.* 48, 694–700.
- Rodríguez, M.M., Bisset, J., Ruiz, M., Soca, A., 2002. Cross-Resistance to Pyrethroid and Organophosphorus Insecticides Induced by Selection with Temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *Journal of Medical Entomology* 39, 882–888.
- Romet, L., Severac, G., 2008. Alt'carpo, une alternative efficace [WWW Document]. PHYTOMA, La défense des végétaux. URL <http://orgprints.org/13471/> (accessed 10.6.19).
- Romeu-Dalmau, C., Espadaler, X., Piñol, J., 2012. Abundance, interannual variation and potential pest predator role of two co-occurring earwig species in citrus canopies. *Journal of Applied Entomology* 136, 501–509.
- Russell, R.J., Claudianos, C., Campbell, P.M., Horne, I., Sutherland, T.D., Oakeshott, J.G., 2004. Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 79, 84–93.
- Sanchez-Hernandez, J.C., 2011. Pesticide Biomarkers in Terrestrial Invertebrates, *Pesticides in the Modern World-Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*, Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-457-3. InTech.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Mazzia, C., Capowiez, Y., Rault, M., 2009. Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150, 503–511.



- Sansavini, S., 1997. Integrated fruit production in Europe: research and strategies for a sustainable industry. *Scientia Horticulturae* 68, 25–36.
- Sauphanor, B., 1992. Une phéromone d'agrégation chez *Forficula auricularia*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 62, 285–291.
- Sauphanor, B., Chabrol, L., d'Arcier, F.F., Sureau, F., Lenfant, C., 1993. Side effects of diflubenzuron on a pear psylla predator: *Forficula auricularia*. *Entomophaga* 38, 163–174.
- Sauphanor, B., Stäubli, A., 1994. Evaluation au champ des effets secondaires des pesticides sur *Forficula auricularia* et *Anthrenus nemoralis*: validation des résultats de laboratoire. *IOBC WPRS BULLETIN* 17, 83–83.
- Sauphanor, B., Sureau, F., 1993. Aggregation behaviour and interspecific relationships in *Dermaptera*. *Oecologia* 96, 360–364.
- Sauphanor, Simon, S., Boisneau, C., Capowiez, Y., Rieux, R., Bouvier, J.-C., Defrance, H., Picard, C., Toubon, J.-F., 2009. Protection phytosanitaire et biodiversité en agriculture biologique. Le cas des vergers de pommiers. *Innovations agronomiques* 4, 217–228.
- Schmidt-Jeffris, R.A., Beers, E.H., 2018. Potential impacts of orchard pesticides on *Tetranychus urticae*: A predator-prey perspective. *Crop Protection* 103, 56–64.
- Scott, J.A., 1995. The Molecular Genetics of Resistance: Resistance as a Response to Stress. *Florida Entomologist* 399.
- Scott, J.G., 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 757–777.
- Sharley, D.J., Hoffmann, A.A., Thomson, L.J., 2008. The effects of soil tillage on beneficial invertebrates within the vineyard. *Agricultural and Forest Entomology* 10, 233–243.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily 16.
- Shel'Deshova, G.G., 1967. Ecological factors determining distribution of the codling moth *Laspeyresia pomonella* L.(Lepidoptera, Tortricidae) in the northern and southern hemispheres. *Entomol. Rev* 46, 349–361.
- Siegfried, B.D., Scharf, M.E., 2001. Mechanisms of Organophosphate Resistance in Insects, in: Ishaaya, I. (Ed.), *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 269–291.
- Silva, J.J. da, Mendes, J., Lomônaco, C., 2004. Developmental stress by diflubenzuron in *Haematobia irritans* (L.)(Diptera: Muscidae). *Neotropical Entomology* 33, 249–253.
- Simon, J.-C., Peccoud, J., 2018. Rapid evolution of aphid pests in agricultural environments. *Current Opinion in Insect Science* 26, 17–24.
- Simon, S., Morel, K., Durand, E., Brevalle, G., Girard, T., Lauri, P.-É., 2012. Aphids at crossroads: when branch architecture alters aphid infestation patterns in the apple tree. *Trees* 26, 273–282.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res* 22, 5–34.

- Smith, G.A., 1991. Chlorinated Hydrocarbon Insecticides In: Handbook of Pesticides Toxicology. Volume 2. Classes of Pesticides. Academic Press.
- Snell-Rood, E.C., 2012. Selective Processes in Development: Implications for the Costs and Benefits of Phenotypic Plasticity. *Integrative and Comparative Biology* 52, 31–42.
- Sogorb, M.A., Vilanova, E., 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* 128, 215–228.
- Sokhna, C., Ndiath, M.O., Rogier, C., 2013. The changes in mosquito vector behaviour and the emerging resistance to insecticides will challenge the decline of malaria. *Clinical Microbiology and Infection* 19, 902–907.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research* 79, 1–15.
- Source Web : Qu'est-ce que la résistance aux PPP ? - R4P, 2019. URL <https://www.r4p-inra.fr/fr/quest-ce-que-la-resistance-aux-ppp/> (accessed 1.20.20).
- Sparks, T.C., Nauen, R., 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology, Insecticide and Acaricide Modes of Action and their Role in Resistance and its Management* 121, 122–128.
- Staempfli, C., Slooten, K.B.-V., Tarradellas, J., 2002. Hsp70 instability and induction by a pesticide in *Folsomia candida*. *Biomarkers* 7, 68–79.
- Suchail, S., Guez, D., Belzunces, L.P., 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2482–2486.
- Suchail, S., Le Navenant, A., Capowicz, Y., Thiéry, A., Rault, M., 2018. An exploratory study of energy reserves and biometry as potential tools for assessing the effects of pest management strategies on the earwig, *Forficula auricularia* L. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 22766–22774.
- SudArbo, 2012. SudA12Fiche\_6\_PuceronsPommierPoirier.pdf (Les pucerons du pommier et du poirier), SudArbo.
- Sun, L., Zhou, X., Zhang, J., Gao, X., 2005. Polymorphisms in a Carboxylesterase Gene Between Organophosphate-Resistant and -Susceptible *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 98, 1325–1332.
- Surendra Nath, B., 2002. Shifts in glycogen metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74, 73–84.
- Tang, G., Yao, J., Li, D., He, Y., Zhu, Y.-C., Zhang, X., Zhu, K.Y., 2017. Cytochrome P450 genes from the aquatic midge *Chironomus tentans*: Atrazine-induced up-regulation of CtCYP6EX3 enhanced the toxicity of chlorpyrifos. *Chemosphere* 186, 68–77.
- Taylor, R.P., Benjamin, I.J., 2005. Small heat shock proteins: a new classification scheme in mammals. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38, 433–444.
- Te, J., Jia, L., Rogers, J., Miller, A., Hartson, S.D., 2007. Novel Subunits of the Mammalian Hsp90 Signal Transduction Chaperone. *J. Proteome Res.* 6, 1963–1973.
- Thompson, C.M., Richardson, R.J., 2004. 3 Anticholinesterase. *Pesticide Toxicology and International Regulation* 89.
- Thompson, H.M., 1999. Esterases as Markers of Exposure to Organophosphates and Carbamates 16.

- Thompson, S.R., Brandenburg, R.L., 2005. Tunneling Responses of Mole Crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae) to the Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana*. *Environ Entomol* 34, 140–147.
- Thorin-Trescases, N., Voghel, G., Farhat, N., Drouin, A., Gendron, M.-È., Thorin, É., 2010. Âge et stress oxydant: Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale. *Med Sci (Paris)* 26, 875–880.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677.
- Tirello, P., Pozzebon, A., Cassanelli, S., Van Leeuwen, T., Duso, C., 2012. Resistance to acaricides in Italian strains of *Tetranychus urticae*: toxicological and enzymatic assays. *Exp Appl Acarol* 57, 53–64.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2011. Neonicotinoid Insecticides: Highlights of a Symposium on Strategic Molecular Designs. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2883–2886.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247–268.
- Truhaut, R., 1977. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1, 151–173.
- Tutar, Y., 2006. Heat Shock Proteins, Substrate Specificity and Modulation of Function [WWW Document]. URL <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/ppl/2006/00000013/00000007/art00009> (accessed 10.10.19).
- Vale, J.A., Bradberry, S.M., 2017. Organophosphate and Carbamate Insecticide, in: Brent, J., Burkhart, K., Dargan, P., Hatten, B., Megarbane, B., Palmer, R., White, J. (Eds.), *Critical Care Toxicology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1829–1853.
- Valles, S.M., Yu, S.J., 1996. Detection and Biochemical Characterization of Insecticide Resistance in the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol* 89, 21–26.
- Van der Horst, D.J., 2003. Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 136, 217–226.
- van der Vies, S.M., Gatenby, A.A., Viitanen, P.V., Lorimer, G.H., 1993. Molecular Chaperones and Their Role in Protein Assembly, in: *Protein Folding*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 72–83.
- Van Driesche, R.G., Bellows, T.S., 1996. Biology of Arthropod Parasitoids and Predators, in: Van Driesche, R.G., Bellows, T.S. (Eds.), *Biological Control*. Springer US, Boston, MA, pp. 309–336.
- Van Lenteren, J.C., Bale, J., Bigler, F., Hokkanen, H.M.T., Loomans, A.J.M., 2006. Assessing Risks of Releasing Exotic Biological Control Agents of Arthropod Pests. *Annual Review of Entomology* 51, 609–634.
- Vijverberg, H.P.M., 1990. Neurotoxicological Effects And The Mode of Action of Pyrethroid Insecticides 21, 23.
- Villeneuve, J., 2006. Étude de la bio-écologie des névroptères dans une perspective de lutte biologique par conservation. Université d'Angers, France.
- Voudouris, C.Ch., Sauphanor, B., Franck, P., Reyes, M., Mamuris, Z., Tsitsipis, J.A., Vontas, J., Margaritopoulos, J.T., 2011. Insecticide resistance status of the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from Greece. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100, 229–238.
- Wakil, S.J., 1961. Mechanism of fatty acid synthesis. *J. Lipid Res.* 2, 1–24.

- Wan, C., Hao, Z., Feng, X., 2016. Structures, properties, and energy-storage mechanisms of the semi-lunar process cuticles in locusts. *Scientific Reports* 6, 35219.
- Wang, K.-Y., Guo, Q.-L., Xia, X.-M., Wang, H.-Y., Liu, T.-X., 2007. Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera : Aphididae) to selected insecticides on cotton from five cotton production regions in Shandong, China. *J. Pestic. Sci.* 32, 372–378.
- Waters, E.R., Rioflorido, I., 2007. Evolutionary Analysis of the Small Heat Shock Proteins in Five Complete Algal Genomes. *J Mol Evol* 65, 162–174.
- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P., Raymond, M., 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors: Comparative genomics. *Nature* 423, 136–137.
- Westerheide, S.D., Morimoto, R.I., 2005. Heat Shock Response Modulators as Therapeutic Tools for Diseases of Protein Conformation. *J. Biol. Chem.* 280, 33097–33100.
- Wheeler, Torchiano, 2016. *ImPerm.pdf*.
- 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), in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, NY, pp. 117–178.
- Wheelock, C.E., Shan, G., Ottea, J., 2005. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *J. Pestic. Sci.* 30, 75–83.
- www.alt-carpo.com, 2005. Alt'Carpo système de protection contre le Carpocapse - Protection Pommes - Alt'Carpo [WWW Document]. URL <https://www.alt-carpo.com/5.cfm?p=541-alt-carpo-alt-carpo-protection-carpocapse-severac-pommes-filet> (accessed 6.27.19).
- Wyss, E., Luka, H., Pfiffner, L., Schlatter, C., Uehlinger, G., Daniel, C., 2005. Research Article Approaches to pest management in organic agriculture: a case study in European apple orchards 4.
- Yahouédo, G.A., Chandre, F., Rossignol, M., Ginibre, C., Balabanidou, V., Mendez, N.G.A., Pigeon, O., Vontas, J., Cornelie, S., 2017. Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Scientific Reports* 7, 11091.
- Yasmin, S., D'Souza, D., 2010. Effects of Pesticides on the Growth and Reproduction of Earthworm: A Review [WWW Document]. *Applied and Environmental Soil Science*. URL <https://www.hindawi.com/journals/aess/2010/678360/abs/> (accessed 10.10.19).
- Yu, S.J., Nguyen, S.N., 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 44, 74–81.
- Zalucki, M., Furlong, M., 2017. Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence. *Current Opinion in Insect Science* 21, 19–25.
- 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.
- Zeidler, O., 1873. Beitrag zur Kenntniß der Verbindungen zwischen Aldehyden und aromatischen Kohlenwasserstoffen: Inaug. Diss. Zeidler.
- Zhu, K.Y., Lee, S.H., Clark, J.M., 1996. A Point Mutation of Acetylcholinesterase Associated with Azinphosmethyl Resistance and Reduced Fitness in Colorado Potato Beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 55, 100–108.
- Ziegler, R., 1991. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. *J Comp Physiol B* 161, 125–131.

## Annexes

Annexe 1: An exploratory study of energy reserves and biometry as potential tools for assessing the effect of pest management strategies on the earwig, *Forficula auricularia* L.



# An exploratory study of energy reserves and biometry as potential tools for assessing the effects of pest management strategies on the earwig, *Forficula auricularia* L

Séverine Suchail<sup>1</sup> · Adrien Le Navenant<sup>1,2</sup> · Yvan Capowiez<sup>3</sup> · Alain Thiéry<sup>1</sup> · Magali Rault<sup>1</sup>

Received: 8 February 2018 / Accepted: 22 May 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

Apple orchards are heavily treated crops and some sprayed insecticides are recognized to have toxic effects on non-target arthropods. Earwigs are important natural enemies in pip-fruit orchards and contribute to the biological control of aphids. In addition, due to their ease of capture and identification, they are an interesting potential bioindicator of the possible detrimental effects of different orchard management strategies. In this study, we measured the energy reserves and some morphological traits of *Forficula auricularia* L. sampled in apple orchards under management strategies (organic versus integrated pest management (IPM)). We observed a significant decrease in mass (22 to 27%), inter-eye width (3%), and prothorax width (2 to 5%) in earwigs from IPM compared to organic orchards. Energy body reserves also confirmed these results with a significant decrease of 48% in glycogen and 25 to 42% in lipid content in earwigs from IPM compared to organic orchards. However, the protein content was approximately 70% higher in earwigs from IPM than in organic orchards. Earwigs sampled in IPM orchards may adapt to minimize the adverse toxic effects of pesticide treatments using a large number of strategies, which are reflected in changes to their energy reserves. These strategies could, in turn, influence the population dynamics of natural enemies and impair their role in the biological control of pests in apple orchards.

**Keywords** Earwig · Energy reserves · Glycogen · Lipid · Protein · Biometry · Pest management strategy

## Introduction

The United Nations Food and Agricultural Organization reported that the world's population will reach to nearly

10 billion by 2050. This will lead to an increase in world food production in order to keep pace with the demand of this growth (Gill and Garg 2014). Agricultural chemicals can enhance crop productivity. However, pesticides can also have

## Highlights

- Females and males from organic orchards have higher weight
- Inter-eye and prothorax widths are lower in IPM orchards
- Lipid and glycogen contents decrease in earwigs coming from IPM orchards
- Protein increase in females and males from IPM versus organic orchards

Responsible editor: Philippe Garrigues

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11356-018-2371-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Séverine Suchail  
severine.suchail@univ-avignon.fr

<sup>1</sup> UAPV, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Aix Marseille Univ, CNRS IRD, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale (IMBE), Pôle Agrosociétés, 301 rue Baruch de Spinoza, BP 21239, 84916 Avignon Cedex, France

<sup>2</sup> INRA, Unité PSH, Equipe Ecologie de la Production Intégrée, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France

<sup>3</sup> INRA, UMR 1114 Environnement Méditerranéen et Modélisation des Agro-Hydrosystèmes (EMMAH), Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France

negative effects on the environment, ecosystem, and biodiversity. Pesticides can have an impact on non-target and beneficial species through direct or indirect routes, such as water contamination and runoff, pesticide residues, and by consuming food that has been sprayed (Martinou et al. 2014). The destruction of these beneficial arthropods can exacerbate pest problems as they play an important role in regulating pest population levels. In France, apple orchards are heavily treated with, on average, more than 30 pesticide applications per year (Sauphanor et al. 2009; Mazzia et al. 2015). Two pest management strategies are generally identified in commercial apple orchards: integrated pest management (IPM) and organic farming. The European earwig, *Forficula auricularia* L. (Dermaptera: Forficulidae) is a common, sub-social, and omnivorous insect in agroecosystems worldwide. These arthropods are commonly found in apple orchards. Adults and nymphs are nocturnal and hide during the day under shelters such as bark or in holes in the ground. They can be found in high abundance in artificial shelters and traps (Sauphanor 1992; Fountain and Harris 2015). In apple orchards, earwigs are a key biological control agent against numerous insect pests such as aphids, psyllids, and spider mites (Dib et al. 2010; Debras et al. 2007; Romeu-Dalmau et al. 2012). Their ease of capture and identification make them an interesting potential bioindicator of the intensity of pesticide use in orchards (Dib et al. 2010).

Earwigs are sensitive to different management strategies in IPM apple orchards where several pesticides can be applied, e.g., organophosphates (Ffrench-Constant and Vickerman 1985; Malagnoux et al. 2015a), pyrethroids (Badji et al. 2004), or neonicotinoids (Shaw and Wallis 2010; Malagnoux et al. 2015b). Other agricultural practices such as tillage and the presence and quality of hedges can also influence earwig abundance (Sharley et al. 2008; Moerkens et al. 2012) and the presence and quality of hedges (Debras et al. 2007). Management strategies in apple orchards also influence diversity in the earwig community, with *F. auricularia* being less sensitive to insecticides than *Forficula pubescens* (Malagnoux et al. 2015b). Studies concerning *F. auricularia* focused on its ecological role in orchards (Kölliker and Vancassel 2007; Malagnoux et al. 2015a) or the direct impact of commonly used pesticides on its populations (Ffrench-Constant and Vickerman 1985; Campos et al. 2011; Malagnoux et al. 2015a; Fountain and Harris 2015). However, there is, to our knowledge, little available data on the negative physiological effects of pesticides on energy reserves in these earwigs.

Glycogen and the lipid, triacylglycerol, are the predominant energy reserves stored in the fat bodies distributed throughout the body of the insect (Arrese and Soulage 2010). This compartment plays an essential role in energy storage and has important functions throughout the insect's life cycle including growth, timing of metamorphosis, and

egg development. In addition, the fat body also synthesizes most of the hemolymph proteins and circulating metabolites. Glycogen can be rapidly hydrolyzed to glucose in the hemolymph of insects to be used as a glycolytic fuel (Steele 1982). The glycogen content may vary depending on physiological state (Anand and Lorenz 2008) or environmental conditions (Chowanski et al. 2015).

Triacylglycerol is formed by fatty acids that can be used for energy production through  $\beta$ -oxidation. Lipids are always the main component of the fat body which, in insect, represents more than 50% of their dry weight (Ziegler 1991). Lipids provide energy during diapause (Hahn and Denlinger 2007) for embryo development (Ziegler and Van Antwerpen 2006) and sustained flight activity (Van der Horst 2003).

Proteins can also supply energy through catabolism and are essential in tissue building and repair. For this reason, it is also relevant to study the variability of insect protein content under different conditions.

Living organisms use reserves to maintain their bodies, growth, development, and reproduction (Arrese and Soulage 2010). Under stressful conditions, there is an increased expenditure associated with detoxification which can have a negative impact on life history traits in the life cycle. After exposure to pesticides, it has been shown that energy reserves decreased in several insects (Ribeiro et al. 2001; Nath 2003; Da Silva et al. 2004; Rharrabe et al. 2008).

A low level of energy reserves could potentially influence the population dynamics of earwigs and decrease their role in pest management in apple orchards. Markow (1995) and Nestel et al. (2016) showed that ecological stressors can affect developmental instability, which leads to reduced fitness. Morphological parameters, e.g., mass or insect size can be used to detect the effects of environmental stress on an organism.

The aim of our study was to assess the effects of two orchard management strategies, organic and IPM practices, on earwig (*F. auricularia*) weight; energy reserves (glycogen, lipid, and protein contents); and two morphometric parameters (inter-eye and prothorax widths).

## Materials and methods

### Chemical compounds

Sodium chloride, Tris-HCl, trichloroacetic acid, ethanol, oyster glycogen, glucose, sodium acetate, amyloglucosidase from *Aspergillus niger*, phosphovanillin, sulfuric acid, and bovine serum albumin were purchased from Sigma-Aldrich® (Saint Quentin-Fallavier, France) while glucose RTU™ was purchased from bioMérieux SA® (Geneva, Suisse).

## Earwigs

Male and female adults of *F. auricularia* L. earwigs were caught in July 2015 using cardboard traps placed on apple tree branches in five orchards located in Noves, near Avignon (south-eastern France). The landscape around these orchards is similar and characterized by the presence of a dense network of windbreak hedgerows, which protects orchards against the prevailing northern winds. Since this species is univoltine, these adults were of roughly the same age. The five orchards had two management strategies: three were under IPM management and thus applied synthetic plant protection products and two were under organic farming and used a restricted range of products (such as Carpovirusine, spinosad, copper, sulfur ...). Twenty male and 20 female earwigs were collected from each management system (i.e., 40 and 60 earwigs per sex for organic and IPM strategies, respectively), frozen and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until biochemical and morphometry measurements were carried out.

## Morphometric measurements

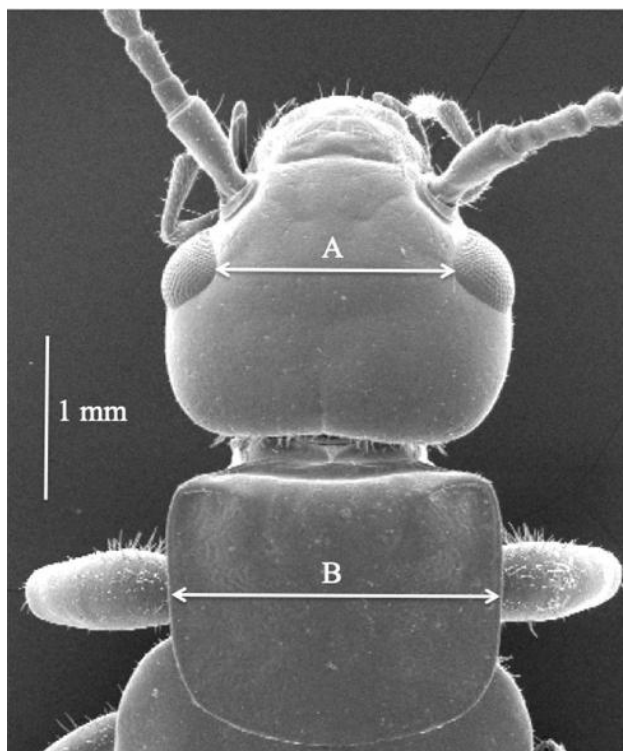
Frozen earwigs were slightly thawed to avoid change to morphometric measurements. All morphometric measurements of earwigs were carried out using an eyepiece micrometer on a Nikon® binocular microscope. Measurements were first recorded as units of the ocular micrometer scale to the nearest  $1\text{ }\mu\text{m}$  and were then converted into millimeters ( $\pm 0.1\text{ mm}$ ). Each earwig was positioned carefully to avoid bias in measuring and to achieve the same plane of view. A single person carried out all the measurements to avoid user bias. We measured the maximum prothorax and inter-eye (i.e., distance between the eyes) widths. The inter-eye width was measured in a straight line between the two eyes and the prothorax width between two reference points (Fig. 1).

## Scanning electron microscopy

We used scanning electron microscope photography (Philips XL 30 ESEM with detector SE) to obtain images (e.g., Fig. 1) of dried specimens coated with a gold layer of  $10^{-12}\text{ m}$ . The equipment was set to operate at 20 kV acceleration voltage, at  $\times 35$  for the magnification and at 28.9 mm for the working distance.

## Crude extract preparation

After morphometric measurements, earwigs (male and female) were weighed individually using a Precisa® XT120A electronic precision balance with a readability of 0.1 mg. The whole body of the earwig was homogenized on ice in 10% (w/v) low-salt buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.3) and 10 mM NaCl and centrifuged for 10 min at 3000g. This



**Fig. 1** Scanning electron microscopy dorsal view of head and prothorax of a male earwig showing the measurement method applied to selected body parts: the inter-eye (a) and the prothorax (b)

supernatant was the crude extract on which further glycogen, lipid, or protein measurements were carried out.

## Biochemical measurements

### Determination of glycogen content

The method, based on enzymatic hydrolysis of glycogen by amyloglucosidase (EC 3.2.1.3), was used according to Parrou and François (1997). Solution trichloroacetic 4% acid was added to 250  $\mu\text{L}$  of crude extract (v/v) for deproteinization and the solution was centrifuged at 3000g for 1 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After centrifugation, two volumes of 95% ethanol were added to precipitate the glycogen, which was present in the supernatant. Glycogen was finally pelleted by centrifugation at 5000g for 5 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ethanol was removed and the pellet was dried at room temperature. The dried pellet was incubated for 2 h at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 500  $\mu\text{L}$  of 0.2 M sodium acetate, pH 5.2, containing 7 UI of amyloglucosidase. After incubation, the solution was cooled on ice for 5 min and the amount of glucose generated from glycogen was determined using the Glucose RTU™ method adapting to 96-well microplate format. The reaction mixture (275- $\mu\text{L}$  final volume), containing 250- $\mu\text{L}$  Glucose RTU™ and 25  $\mu\text{L}$  glucose produced above, was left to stand for 20 min at room temperature before glucose



detection by measuring the absorbance at 505 nm. The amount of glucose was calculated from a standard curve ( $A_{505} = f[\text{glucose}]$ ) containing pure glucose as a standard treated within the same conditions. Because the final values were included, the amount of glycogen was corrected for the glucose content in samples that were not incubated with amyloglucosidase.

### Determination of lipid content

Total lipids were determined using a sulfo-phospho-vanillin reaction according to the method of Frings et al. (1972) adapted to a 96-well microplate format. Two hundred ninety-four-microliter concentrated sulfuric acid was added either to 6  $\mu\text{L}$  of earwig crude extract or to 6  $\mu\text{L}$  of a standard solution (olive oil). The solutions were homogenized and placed in boiling water for 10 min and cooled on ice for 5 min. A 700  $\mu\text{L}$  of phospho-vanillin reagent was added to each extract or lipid standard, homogenized and incubated at 37 °C in a water bath for 15 min. After the samples were allowed to cool for 5 min, the absorbance was recorded at 540 nm.

### Determination of protein content

Total protein content was determined by the Lowry method modified according to Markwell et al. (1978), with bovine serum albumin as the standard. The energy reserve values were derived directly from a standard curve prepared with known concentrations of bovine serum albumin, glycogen, and lipid. All assays were run in triplicate. All the above components were expressed as milligrams per gram of earwig.

### Statistical analysis

For all the parameters (energy reserves and morphometric measurements), the effects of orchard management (organic versus IPM) and earwig sex were included in a mixed model with management and sex as fixed factors and apple orchard as a random factor. The assumptions of normality and homogeneity of variance were first tested, and log transformation was applied when required (weight and morphometric measurements). We compared all the means for both factors using the “lsmeans” package. The effects of the factor were thus assessed with the general model but sometimes also on simplified models (one factor only) depending on the significance of the interaction between the factors. All computations were carried out using R (version 2.15.3).

## Results

### Weight

Both earwig sex and orchard management had a significant effect on earwig weight ( $p < 0.001$ ) and no significant interaction was observed between the two factors ( $p = 0.37$ ). Regardless of orchard management strategy, male earwigs were significantly heavier than females. The weight of both sexes of earwigs sampled in organic orchards was also higher than those sampled in IPM orchards (Fig. 2).

### Morphometric parameters

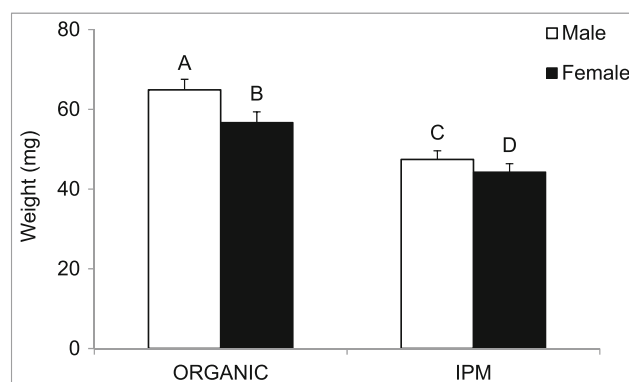
#### Prothorax and inter-eye widths

Similar observations to above were obtained with the morphometric analysis of the earwigs. For both prothorax and inter-eye widths measurements, sex did not have a significant effect, and the interaction between sex and management strategy was also not significant. Only management strategy had a significant effect with significantly smaller prothorax ( $p = 0.032$ ) and inter-eye widths ( $p = 0.026$ ) for earwigs sampled in IPM orchards compared to those sampled in organic orchards (Fig. 3). The decrease in inter-eye width was about 3% and between 2 to 5% for the prothorax width.

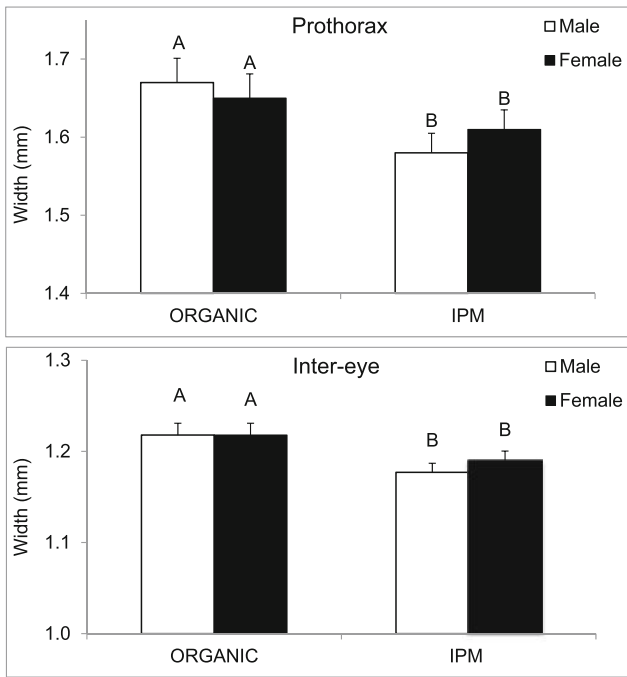
### Biochemical analysis

#### Glycogen

The interaction between sex and management strategy was highly significant ( $p < 0.001$ ) for the glycogen content. For both management practices ( $p < 0.001$ ), sex had a significant effect with females having higher glycogen content than males. Management practices had no overall effect but when only females were considered, higher glycogen contents were



**Fig. 2** Mean weight (+SE) of the female and male adults of earwigs depending on the management strategy in apple orchards. ( $n = 40$  for males and  $n = 40$  for females for each strategy)



**Fig. 3** Measurements of morphometric parameters: prothorax and inter-eye widths (means + SE) according to the management strategy in apple orchards. For each morphometric parameter, bars with the same letters are not significantly different from each other ( $n = 40$  for males and females for each strategy)

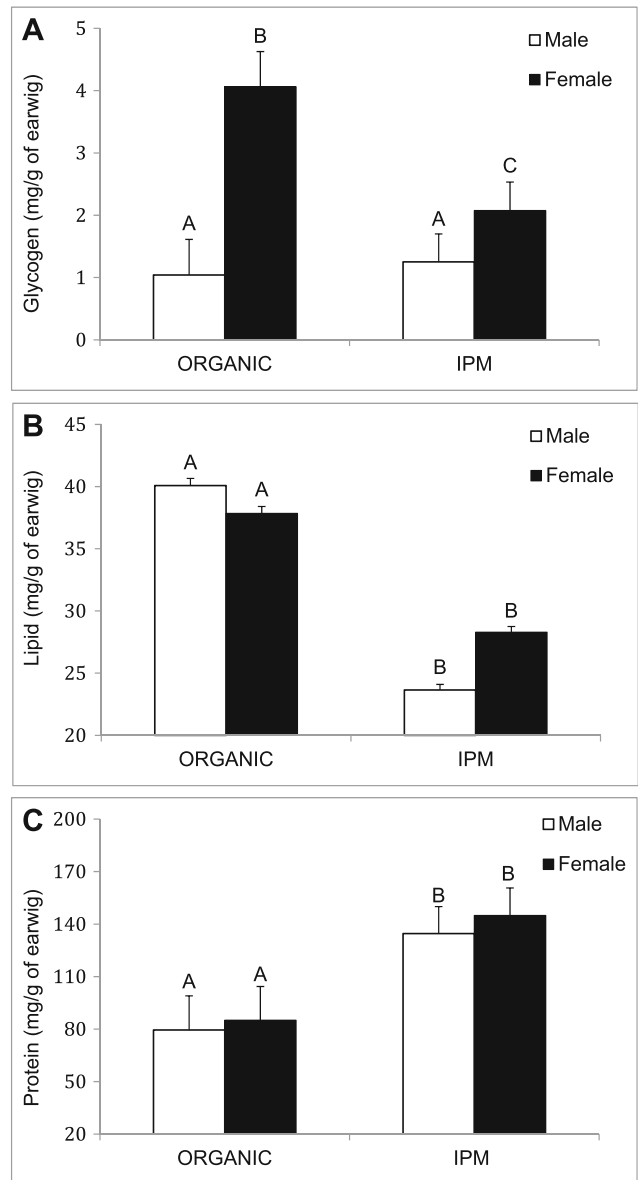
observed in earwigs from organic compared to IPM orchards. No significant difference was observed for males explaining the significant interaction.

**Lipids**

Sex and the interaction between sex and management strategy had no significant effect on the earwig lipid contents. However, management strategy had a significant effect ( $p = 0.008$ ) with lower lipid content in earwigs sampled in IPM orchards than those sampled in organic orchards ( $23.49 \pm 10.57$  mg versus  $32.10 \pm 10.39$  mg and  $24.23 \pm 11.12$  mg vs  $29.49 \pm 10.57$  mg, respectively, for females and males (Fig. 4b)). On average, earwigs sampled in IPM orchards had 25 to 42% less triacylglycerol than those under organic management.

**Proteins**

Sex and the interaction between sex and management strategy had no significant effect on earwig protein contents. However, management strategy had a significant effect ( $p = 0.016$ ) with higher body protein content in earwigs from IPM than organic orchards (Fig. 4). Earwigs in IPM orchards had 70% more protein than those under organic management for both female and male.



**Fig. 4** Energy reserves content of the female and male of earwigs for each management strategy in apple orchards. **a** Glycogen. **b** Lipid. **c** Protein. Data represent the means (+SE). Bars with the same letters are not significantly different from each other ( $n = 40$  for males and females for each strategy)

**Discussion and conclusion**

It is well recognized that agricultural management practices including the use of pesticides affects non-target species and leads to a decline in biodiversity in agroecosystems (McLaughlin and Mineau 1995; Kromp 1999; Nash et al. 2008). The hazard of pesticide usage depends on the application rate, intrinsic toxicity, and the level of uptake, persistence, volatilization, metabolism, and bioavailability of the active ingredient (Sánchez-Bayo 2009). The exposure time is also a critical variable in risk assessments of agrochemicals. Organisms may develop a number of strategies to minimize

the negative toxic effects induced by chemical stress. All responses to resist toxicants are costly for the organism in terms of metabolic resources and energy demand (Calow 1991). Because the energy resources of organisms are limited and used for growth, reproduction, and basal metabolism, the additional metabolic costs due to pesticide management results in a reallocation of energy resources and can increase energy consumption leading to reduced energy reserves (Congdon et al. 2001; Yasmin and Souza 2010). Resource allocation and life history strategies are inevitably interconnected for all organisms because of the competition and the limitation of available energy reserves either in the environment or within the individual itself.

Our results confirm that pest management strategy can result in changes to energy reserves in earwigs. Our measurements of energy reserves indicated a lower lipid and glycogen contents in earwig bodies collected from IPM compared to organic orchards. The major differences between the organic and IPM strategies were lower total treatment frequency index (TFI: total number of pesticide treatment weighted by the ratio of the dose used to the recommended dose (Jørgensen 1999), and agricultural practices such as tillage, total weed removal, or the presence and quality of hedges in the organic orchard. In organic strategy, pest control is based on a greater use of mineral fungicides (copper and sulfur) and natural insecticides (granulovirus, mineral oils, and spinosad). In contrast, non-organic orchards mainly used synthetic pesticides which are known to be more efficient against pests. Beside the fact that the total TFI was slightly but significantly lower in organic orchards (22.2) than in IPM orchards (26.6), it has been previously shown that the earwig community of *F. auricularia* was lower in IPM orchards compared to organic orchards and was correlated to a higher insecticide use (4.9 in organic versus 9.2 in IPM) (Malagnoux et al. 2015b). By their toxicity, insecticides increase lethality and/or affect the behavior of non-target organisms. For example, high sensitivity of *F. auricularia* to many insecticides was observed after exposure to organophosphates (Ffrench-Constant and Vickerman 1985; Malagnoux et al. 2015a), pyrethrinoids (Badji et al. 2004), and neonicotinoids (Shaw and Wallis 2010; Malagnoux et al. 2015b). Moreover, insecticide exposure induced disturbed behavior in predation activity of earwigs (Malagnoux et al. 2015a), cast production of earthworms (Jouni et al. 2018), feeding rate of the white shrimp (García-de la Parra et al. 2006), or locomotion of zebrafish (Tilton et al. 2011). Because the process of food detection involves complex nervous activity that can be disrupted by neurotoxic pesticides (Desneux et al. 2007), impairments on behavior modify the feeding ability of the organisms and leads to a decrease in their energy reserves. Then, despite the possible loss in prey availability induced by higher TFI in IPM orchards (Sauphanor and Stäubli 1994; Altieri 1999; Pekar 1999; Dib et al. 2016), we assumed that the main factor responsible for depletion in

energy reserves lies to a direct effect of insecticides on the organisms rather than on environmental modification (i.e., food availability). Our assumption was supported by several studies that have been conducted in laboratory experiments without food limitation. These studies have shown that exposure to organophosphorus insecticides, either severely disturbed glycogen metabolism in the Lepidoptera *Bombyx mori* (Nath 2003), or induced a significant depression of glycogen, lipid, and protein contents in the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus* (Ribeiro et al. 2001).

Glycogen is a major glucose reserve and can be rapidly mobilized whereas lipids and proteins are considered as long-term reserves (Arrese and Soulage 2010). In our study, the protein values were higher in male and female earwigs sampled from the orchard under IPM. Our results are in agreement with those of Jeon et al. (2013) who observed an increase in protein of *Daphnia magna* after carbaryl exposure, associated to a decrease in lipid and carbohydrate contents, or with the results of Staempfi et al. (2007) in the soil arthropod, *Folsomia candida* after dinoseb exposure. Reallocation of energy reserves to maintain homeostasis under pesticide exposure mainly focuses on protein induction to improve defense mechanisms and they often involve overproduction of detoxification enzymes (Calow 1991). According to those results and ours, it is unlikely that the increase in protein levels in IPM practices may offset the reduction in glycogen and lipid but, on the contrary, the consumption of glycogen and lipid content allow protein synthesis, which is highly cost effective. According to the thermodynamics of each nutrient (17.5 kJ/g glycogen, 24 kJ/g protein, and 39.5 kJ/g lipids) (Gnaiger 1983), total energy reserves are higher in term of global kilojoules in IPM orchards by 19 and 28% for male and female earwigs, respectively. However, this amount of energy is not available fast enough. When the organisms become unable to cope with stress or pollutants, the energy budget results of imbalance between the rate of synthesis and rate of degradation. Then, after the use of glycogen and lipids, proteins constitute the last energy reserve to change or be used upon stress exposure (Ferreira et al. 2015). In this context, studies have reported that a decrease of protein content is associated to an increase in mortality. It was the case observed by Staempfi et al. (2007) where a biphasic concentration-response linked to the phenomenon of hormesis was observed, showing that after having produced an effort to increase growth and reproduction, lethality increases. Rharrabe et al. (2008) demonstrated that for Lepidoptera *Plodia interpunctella* Hübner, the insecticide azadirachtin caused a severe reduction in protein levels and led larval weight loss, developmental delay followed by high lethality. These authors postulated that azadirachtin exerts its effect on insects by modifying the protein synthesis capacity of the fat body as also observed for *Spodoptera litura* (Huang et al. 2004). Moreover, Ribeiro et al. (2001) observed a decrease in

protein content in parathion-intoxicated isopods along with an increase in mortality, indicating that physiological adaptability to compensate pesticide stress requires high energy but associated with ineffective demand.

In addition to agricultural practices, other factors can have an impact on rates of energy consumption, e.g., age and environmental conditions including temperature or dehydrating state. Anand and Lorenz (2008) reported that the cricket, *Gryllus bimaculatus*, fat body energy reserves were age-dependent. Climatic conditions also change abundance of energy reserves (Chowanski et al. 2015). *F. auricularia* is univoltine, and in south of France, earwigs reach the adult stage in early summer. It is noteworthy that because all the organisms analyzed were caught in July, they were of roughly the same age. Moreover this study was carried out on a same town and thus a reduced geographic area (less than 10-km radius), climatic conditions, and landscape type are very similar. In this region, all orchards are surrounded by hedges due to the prevailing wind. Moreover, earwigs are nocturnal, inactive, and hidden during the day inside the cardboard traps. When they are captured, we can assume they are all in the same diet stage with an almost empty gut that will limit differences in energy reserves. Thus, in the studied apple orchards, the main factor governing energy budget in *F. auricularia* was assumed to be management strategy and suggested that insecticide use, quantitatively and qualitatively, is able to decrease *F. auricularia* energy reserves. Other pollutant molecules can also lead to changes in energy reserves under natural conditions. Indeed, studies of chronically polluted with metals effects on the beetle *Pterostichus oblongopunctatus*, showed a significant decrease in energy reserves (Bednarska et al. 2013). Givaudan et al. (2016) showed higher lipid and glycogen contents in earthworms collected in abandoned and organic orchards compared to IPM orchards. Thus, the depletion of such biochemical constituents can be due to the major mobilization of these nutrients in response to the toxic effect of the pesticides.

Biochemical parameters appear to be good biomarkers for monitoring environmental management strategies but they need to be complemented with morphological parameters to confirm the impact of orchard management practices. Weight and morphometric traits in our earwigs were lower in IPM than in organic orchards. Earwigs from IPM orchards have to make tradeoffs between maintenance, growth, storage, and resistance to agrochemicals so as to maximize their fitness. The observed reduction in their prothorax and inter-eye widths is likely to be the consequence of these tradeoffs induced by pesticides. A lot of studies in other insects showed that pesticides can lead to morphometric variations. Marcus and Fiumera (2016) showed that exposure to atrazine, the one of the most widely used herbicides significantly affected male and female adult body size of *Drosophila melanogaster*. In *Pterostichus melasitalicus*, a carabidae, morphometric

analyses also showed that dimethoate application caused a reduction in body or elytra lengths in females (Giglio et al. 2011). Giglio et al. (2017) showed in another carabidae, *Calathus fuscipes*, that morphological parameters, e.g., body and pronotum width decreased after an exposure to the larvicide lambda-cyhalothrin. Moreover, studies of the effects of an inorganic insecticide (boric acid) against *Blattella germanica* showed a reduction in the size of basal oocytes, which affected its reproduction (Habes et al. 2013). All these studies suggest that agrochemical molecules can have an impact on the morphometric parameters of exposed organisms.

Our results underline the possible modifications in biochemical and morphometric parameters in earwigs due to orchard management strategies. Body energy reserves and prothorax and inter-eye widths in earwigs may be interesting biomarkers to characterize changes induced by agricultural farming both with pesticides and for other practices in orchards. This study shows more widely that *F. auricularia*, along with some other characteristics (ease of capture, identification, univoltine species) is an interesting potential bioindicator of the orchard management practices, especially in pip-fruit orchards, where it is considered an active natural enemy of aphids. In order to characterize the specific effects of pest management strategy on earwigs (direct and indirect effects), future studies should also be performed in abandoned orchards to assess the consequence of a pesticide-free environment. Other morphometric parameters could additionally be investigated to further determine if agricultural strategies influence other earwig life history traits and further weakens these non-target species. In conclusion, this present study highlights the need to develop an integrated approach to assess both the physiological and biochemical modifications induced by pest management strategies on natural enemies.

**Acknowledgments** We thank Alain Tonetto (Pratim, Aix Marseille University) for assistance in taking the electronic microscopy photos.

**Funding Information** We are grateful to the Rovaltain Foundation for its financial support of the I-ResPect project.

## References

- Altieri MA (1999) The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agric Ecosyst Environ* 74:19–31
- Anand A, Lorenz MW (2008) Age-dependent changes of fat body stores and the regulation of fat body lipid synthesis and mobilisation by adipokinetic hormone in the last larval instar of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J Insect Physiol* 54:1404–1412
- Arrese EL, Soullage JL (2010) Insect fat body: energy metabolism and regulation. *Annu Rev Entomol* 55:207–225
- Badji CA, Guedes RNC, Silva AA, Araujo RA (2004) Impact of deltamethrin on arthropods in maize under IPM and no-tillage cultivation. *Crop Prot* 23:1031–1039
- Bednarska AJ, Stachowicz I, Kurianska L (2013) Energy reserves and accumulation of metals in the ground beetle *Pterostichus*

- oblongopunctatus* from two metal-polluted gradients. *Environ Sci Pollut Res* 20:390–398
- Calow P (1991) Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comp Biochem Physiol* 100(1/2):3–6
- Campos MR, Picanço MC, Martins JC, Tomaz AC, Guedes RNC (2011) Insecticide selectivity and behavioral response of the earwig *Doru luteipes*. *Crop Prot* 30:1535–1540
- Chowanski S, Lubawy J, Spochacz M, Paluch E, Smykalla G, Rosinski G, Slocinska M (2015) Cold induced changes in lipid, protein and carbohydrate levels in the tropical insect *Gromphadorhina coquereliana*. *Comp Biochem and Physiol Part A* 183:57–63
- Congdon JD, Dunham AE, Hopkins WA, Rowe CL (2001) Resource allocation-based life histories: a conceptual basis for studies of ecological toxicology. *Environ Toxicol Chem* 20(8):1698–1703
- Da Silva JDJ, Mendes J, Lomonaco C (2004) Developmental stress by diflubenzuron in *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Neotrop Entomol* 33(2):249–253
- Debras JF, Dussaud A, Rieux R, Dutoit T (2007) Prospective research on the “source” role of hedges in integrated fruit production. The case of earwigs: *Forficula auricularia* L. et *Forficula pubescens* L. *Gené. CR Biol* 330:664–673 (in French)
- Desneux N, Decourtaye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52:81–106
- 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 (2016) Effect of management strategies on arthropod communities in the colonies of rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera: Aphididae) in South-Eastern France. *Agric Ecosyst Environ* 216:203–206
- Ferreira NGC, Morgado R, Santos MJG, Soares AMVM, Loureiro S (2015) Biomarkers and energy reserves in the isopod *Porcellionides pruinosus*: the effects of long-term exposure to dimethoate. *Sci Total Environ* 502:91–102
- Ffrench-Constant RH, Vickerman GP (1985) Soil contact toxicity of insecticides to the European earwig *Forficula auricularia* (Dermaptera). *Entomophaga* 30:271–278
- Fountain MT, Harris AL (2015) Non-target consequences of insecticides used in apple orchards on *Forficula auricularia* L. (Dermaptera: Forficulidae). *Biol Control* 91:27–33
- Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA (1972) Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clin Chem* 18(7):673–674
- García-de la Parra LM, Bautista-Covarrubias JC, 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*). *Ecotox Environ Safe* 65:372–380
- Giglio A, Giuliani PG, Zetto T, Talarica F (2011) Effects of the pesticide dimethoate on a nontarget generalist carabid, *Pterostichus melas italicus* (Dejean, 1828) (Coleoptera: Carabidae). *Italian J Zoology* 78(4):471–477
- Giglio A, Cavaliere F, Giuliani PG, Mazzei A, Talarica F, Vommaro ML, Brandmayr P (2017) Impact of agrochemicals on non-target species: *Calathus fuscipes* Goeze 1777 (Coleoptera: Carabidae) as model. *Ecotox Environ Safety* 142:522–529
- Gill HK, Garg H (2014) Pesticides: environmental impacts and management strategies. *Pesticides – Toxic Aspects* pp:187–230
- Givaudan N, Suchail S, Rault M, Mouneyrac C, Capowiez Y (2016) Impact of orchard management strategies on earthworm (*Allobophora chlorotica*) energy reserves. *Soil Biol Chem* 100:252–254
- Gnaiger E (1983) Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. In: Gnaiger E, Forstner H (eds) Polarographic oxygen sensors. Aquatic and physiological applications. Springer, Berlin, pp 337–345
- Habes D, Messiad R, Gousmia S, Grib L (2013) Effects of an inorganic insecticide (boric acid) against *Blattella germanica*: morphometric measurements and biochemical composition of ovaries. *Afr J Biotech* 12(18):2492–2497
- Hahn DA, Denlinger DL (2007) Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. *J Insect Physiol* 53:760–773
- Huang Z, Shi P, Dai J, Du J (2004) Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin. *Pest Biochem Physiol* 80:85–93
- Jeon J, Kretschmann A, Escher BI, Hollender J (2013) Characterization of acetylcholinesterase inhibition and energy allocation in *Daphnia magna* exposed to carbaryl. *Ecotox Environ Safety* 98:28–35
- Jørgensen LN (1999) Denmark’s action plans for pesticides: status and role of research. *Nordisk Jordbrugsforskning* 81:201–202
- Jouni F, Sanchez-Hernandez JC, Mazzia C, Jobin M, Capowiez Y, Rault M (2018) Interspecific differences in biochemical and behavioral biomarkers in endogenous earthworms exposed to ethyl-parathion. *Chemosphere* 85–93
- Kölliker M, Vancassel M (2007) Maternal attendance and the maintenance of family groups in common earwigs (*Forficula auricularia*): a field experiment. *Ecological Entomology* 32:24–27
- Kromp B (1999) Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. *Agric Ecosyst Environ* 74:187–228
- Malagnoux L, Capowiez Y, Rault M (2015a) Impact of pesticide exposure on the predation activity of the European earwig, *Forficula auricularia*. *Environ Sci Pollut Res* 22:14116–14126
- Malagnoux L, Marliac G, Simon S, Rault M, Capowiez Y (2015b) Management strategies in apple orchards influences earwig community. *Chemosphere* 124:156–162
- Marcus SR, Fiumera AC (2016) Atrazine exposure affects longevity, development time and body size in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 91–92:18–25
- Markow TN (1995) Evolutionary ecology and developmental instability. *Annu Rev Entomol* 40:105–120
- Markwell MAK, Hass SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87:206–210
- Martinou AF, Seraphides N, Stavrinides MC (2014) Lethal and behavioral effects of pesticides on the insect predator *Macrolophus pygmaeus*. *Chemosphere* 96:167–173
- Mazzia C, Pasquet A, Caro G, Thénard J, Cornic J-F, Hedde M, Capowiez Y (2015) The impacts of management strategies in apple orchards on the structural and functional diversity of epigeal spiders. *Ecotoxicology* 24:616–625
- Mclaughlin A, Mineau P (1995) The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agric Ecosyst Environ* 55:201–202
- 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. *J Appl Entomol* 136:490–500
- Nash MA, Thomson LJ, Hoffmann AA (2008) Effect of remnant vegetation, pesticides, and farm management on abundance of the beneficial predator *Notonomus gravis* (Chaudoir) (Coleoptera: Carabidae). *Biol Control* 46:83–93
- Nath BS (2003) Shifts in glycogen metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Pest Biochem Physiol* 74:73–84
- Nestel ND, Papadopoulos NT, Pascacio-Villafán C, Righini N, Altuzar-Molina AR, Aluja M (2016) Resource allocation and compensation during development in holometabolus insects. *J Insect Physiol* 95:78–88

- Parrou JL, François J (1997) A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal Biochem* 248:186–188
- Pekar S (1999) Effect of IPM practices and IPM spraying on spider population dynamics in an apple orchard. *Agric Ecosyst Environ* 26:155–166
- Rharrabe K, Amri H, Bouayad N, Sayah F (2008) Effects of azadirachtin on post-embryonic development, energy reserves and  $\alpha$ -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *J Stored Prod Res* 44:290–294
- Ribeiro S, Sousa JP, Nogueira AJA, Soares AMVM (2001) Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotox Environ Safety* 49:131–138
- Romeu-Dalmau C, Pinol J, Espadaler X (2012) Friend or foe? The role of earwigs in a Mediterranean organic citrus orchard. *Biol Control* 63:143–149
- Sánchez-Bayo F (2009) From simple toxicological models to prediction of toxic effects in time. *Ecotoxicology* 18:343–354
- Sauphanor B (1992) An aggregation pheromone in the European earwig *Forficula auricularia* L. *Entomol Exp Applic* 62(3):285–291
- Sauphanor B, Stäubli A (1994) Evaluation au champ des effets secondaires des pesticides sur *Forficula auricularia* et *Anthocoris nemoralis*: validation des résultats de laboratoire. In: Vogt H (ed) OILB–SRP Section Régionale Ouest Paléarctique, Pesticides and beneficial organisms, vol. 17. Bulletin OILB/SROP, pp 83–88
- Sauphanor B, Dirwimmer C, Boutin S, Chaussabel AL, Dupont N, Fauriel J, Gallia V, Lambert N, Navarro E, Parisi L, Plenet D, Ricaud V, Sagnes JL, Sauvaitre D, Simon S, Speich P, Zavagli F (2009) Comparative analysis of different systems in fruit tree farming. In: INRA (Ed.), *Ecophyto R&D: towards crop management systems that save crop protection products*, expert report, volume IV, National Institute of agronomic research
- Sharley DJ, Hoffmann AA, Thomson LJ (2008) The effects of soil tillage on beneficial invertebrates within the vineyard. *Agric For Entomol* 10:233–243
- Shaw PW, Wallis DR (2010) Susceptibility of the European earwig, *Forficula auricularia*, to insecticides residues on apple leaves. *New Zeland Plant Prot* 63:55–59
- Staempfi C, Tarradellas J, Becker-van Slooten K (2007) Effects of dinoseb on energy reserves in the soil arthropod *Folsomia candida*. *Ecotox Environ Safety* 68:263–271
- Steele JE (1982) Glycogen phosphorylase in insects. *Insect Biochem* 12(2):131–147
- Tilton FA, Bammler TK, Gallagher EP (2011) Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comp Biochem Phys C* 153:9–16
- Van Der Horst DJ (2003) Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. *Comp Biochem Physiol B* 136:217–226
- Yasmin S, Souza D (2010) Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm: a review. *Appl Environ Soil Sci* 2010:1–9. <https://doi.org/10.1155/2010/678360>
- Ziegler R (1991) Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. *J Comp Physiol Part B* 161:125–131
- Ziegler R, Van Antwerpen R (2006) Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochem Mol Biol* 36:264–272

Annexe 2: Rapport final Rovaltain



# PROJECT I-RESPECT

—

## FINAL REPORT

RT2E CALL FOR PROPOSALS

RAULT MAGALI

IMBE – Avignon University -CNRS-IRD-Aix-Marseille University  
& INRA AVIGNON, INRA INSTITUT SOPHIA AGROBIOTECH, INSTITUTE FOR EVOLUTION  
AND ECOLOGY Tübingen University



## INDEX

PROJECT IDENTITY .....	3
RESUME GRAND PUBLIC .....	4
FOCUS .....	5
GRAPHICAL ABSTRACT .....	5
EXECUTIVE SUMMARY .....	5
PROJECT CONTEXT & OBJECTIVES .....	7
MAIN RESULTS.....	10
IMPACT OF THE PROJECT .....	24
OUTREACH & DISSEMINATION .....	24
DEVIATIONS FROM INITIAL WORKING PLAN: .....	26
FINANCIAL REPORT .....	27

## PROJECT IDENTITY

Project Acronym	I-ResPect
Project Title	Insecticide <b>Resistance</b> , <b>Population</b> and <b>effect</b> on biodiversity
Project coordinator	Magali RAULT
Project dates	From 31/05/2016 to 30/05/2018
Dates of reporting period	31/05/2016 to 30/05/2017
Partners	<p>Myriam SIEGWART: INRA, Unité Plantes et systèmes horticoles, Agroparc – Domaine St Paul, 84914 AVIGNON Cedex 9.</p> <p>Heinz KÖHLER: Animal Physiological Ecology – Institute for Evolution and Ecology, Tübingen University, Germany.</p> <p>Christine COUSTAU: Institut Sophia Agrobiotech INRA PACA, UMR INRA 1355 -CNRS 7254 – UNS, 06903 Sophia Antipolis.</p>
Website if appropriate	

## RESUME GRAND PUBLIC

Les vergers de pommiers sont des cultures fortement traitées. Une utilisation massive d'insecticides de différentes familles chimiques (organophosphorés, néonicotinoïdes et pyréthriinoïdes) induit, chez les organismes non-cibles, des effets toxiques non intentionnels à l'origine d'apparition de cas de résistance. Parmi ces organismes non-cibles, la présence de différents ennemis naturels (coccinelles, syrphes, forficules) constitue un écosystème utile permettant de réguler les populations de ravageurs en vergers et représente une alternative intéressante à la diminution de l'utilisation des pesticides. Prédateur généraliste le forficule (perce oreille), *Forficula auricularia* L., contribue à la lutte biologique grâce à son efficacité sur certains ravageurs tels que les pucerons en vergers de pommiers. De plus, les forficules sont faciles à piéger et présentent l'intérêt de couvrir différents niveaux (sol, surface du sol et surface foliaire) en fonction de leurs stades larvaires et de la période de l'année.

Dans le contexte Européen visant la réduction de l'utilisation des pesticides, la connaissance des effets des insecticides sur les auxiliaires est une piste novatrice et prometteuse au développement de nouveaux programmes en Production Fruitière Intégrée (PFI). Ce projet présente la première étude sur la résistance aux insecticides chez le forficule.

Les forficules sont prélevés dans des vergers de pommiers conduits en agriculture biologique (agriculture n'utilisant que des traitements d'origine naturelle), en PFI (traitements appliqués uniquement en réponse à un seuil), en agriculture conventionnelle (traitements appliqués en prévision des risques) ou dans des vergers ne recevant aucun traitement. Nos résultats montrent que cet auxiliaire est capable de développer des mécanismes de résistance /tolérance aux insecticides.

En effet, la capacité de détoxification des perce-oreilles, dépend de leur verger d'origine. En particulier, on observe une plus faible mortalité, une activité des voies de détoxification plus élevée ainsi qu'une diminution de la sensibilité de l'acétylcholinestérase (une enzyme du système nerveux, cible des insecticides organophosphorés) chez les organismes provenant de vergers conventionnels par rapport aux organismes prélevés en vergers biologiques. Une mutation au niveau du gène *ace2* pourrait expliquer la baisse de sensibilité de l'acétylcholinestérase. Sachant que, quelque soit l'organisme considéré, les mécanismes de défense mis en place pour lutter contre une perturbation extérieure génèrent un coût métabolique important, nous avons analysé la quantité de réserves énergétiques (glucides, lipides et protéines) et les caractéristiques morphologiques des forficules, selon leur verger d'origine. Les perce-oreilles prélevés en verger conventionnel sont généralement plus petits que ceux provenant de vergers biologiques. Cependant, il apparaît que l'impact observé sur les réserves énergétiques, le développement des jeunes larves et l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes de défense dépend davantage de l'activité anthropique présente dans les vergers que de l'utilisation de différents traitements insecticides.

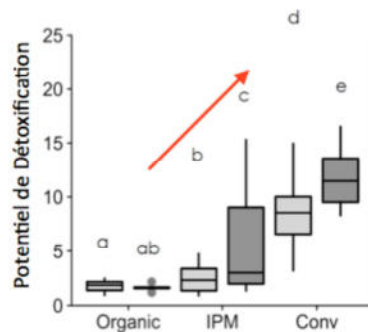
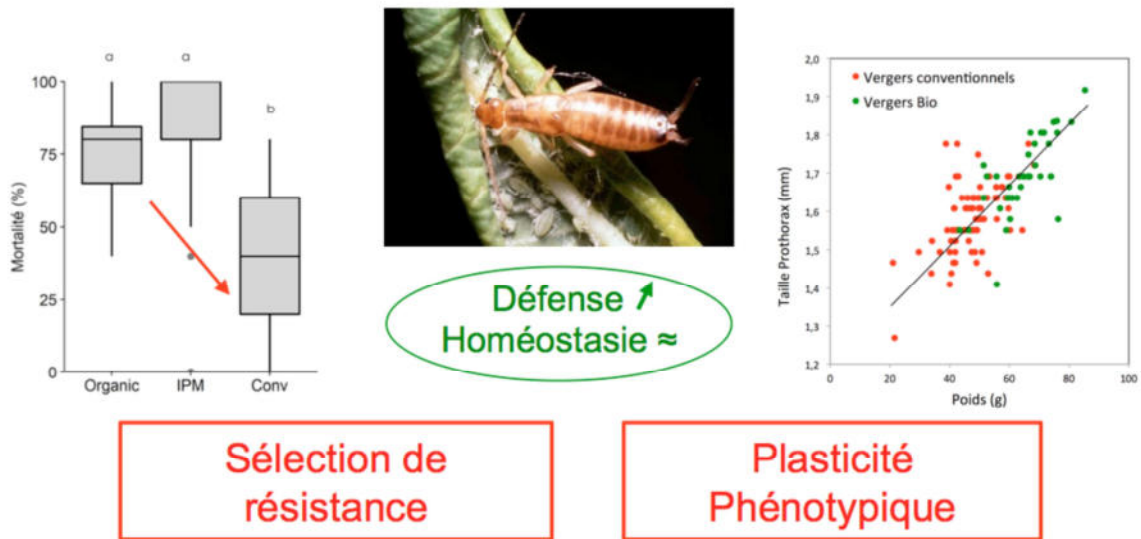
En conclusion, notre étude met en évidence pour la première fois l'acquisition de mécanismes de résistance chez le forficule fortement exposé aux insecticides en vergers conventionnels. Elle ouvre la voie à de nouvelles pistes de recherche sur l'apparition de cette résistance en fonction de la pression anthropique exercée sur un auxiliaire des cultures utile en vergers de pommiers.

## FOCUS

- les forficules issus de vergers conventionnels sont moins sensibles aux pesticides
- Les voies de détoxification sont plus efficaces chez les forficules conventionnels
- Chez le forficule les males sont plus sensibles aux insecticides que les femelles
- La résistance induit une diminution de la taille des organismes en conventionnel
- Le développement larvaire des insectes ne semble pas affecté par les pesticides

## GRAPHICAL ABSTRACT

### I-ResPect Effet des traitements insecticides *Agriculture Bio / IPM / Conventionnelle*



**Coûts énergétiques ?**

## EXECUTIVE SUMMARY

Apple orchards are highly treated crops, in which organophosphorus (OP) are among the most heavily sprayed insecticides. These pesticides are toxic to non-target arthropods and their repeated use increases the risk of resistance. In the European context of reducing the use of pesticides, the development of biocontrol agent is of prime importance. Earwigs are important natural enemies in apple orchards and contribute to the biological control of aphids. In addition, their ease of capture and identification make them an interesting potential bioindicator of the possible detrimental effects of orchard management. In this project, we performed the first study on pesticide resistance in earwigs, and our results suggest that the earwig *F. auricularia* is able to acquire tolerance/resistance to OP insecticides.

Adult earwigs were sampled in apple orchards managed under contrasting strategies : organic, where all chemical pesticides are replaced with natural products including insecticides with natural origin such as Spinosyn; integrated pest management (IPM), where chemical pesticides are used sparingly according to damage thresholds and finally, conventional orchards where chemical pesticides are routinely used within the limits of the French law and untreated orchards.

Our study underlines the differences in metabolic pathway responses in *F. auricularia* populations influenced by their historic management strategies. In particular, we have shown that earwigs collected in conventional orchard exhibited lower mortality and higher enzyme activities involved in detoxification, compare to organic orchard. A decrease in sensitivity of the acetylcholinesterase (the molecular target of OP insecticides, involved in the nervous system functioning) was also observed in earwigs pre-exposed in the conventional orchard. A mutation found in the gene *ace2* could be involved in the decrease in acetylcholinesterase sensitivity.

It is well known that re-allocation of energy reserves to maintain homeostasis under pesticide exposure mainly focuses on protein induction to improve defense mechanisms. Earwigs from conventional orchards increase their detoxification metabolism and thus divert energy from maintenance and growth. Indeed, *F. auricularia* weighed less and had smaller morphometric traits (inter-eye distance, femur length) in conventional than organic orchards. However, we have shown that the main impact on energy reserves, expression levels of resistance-related transcripts and the developmental rate of the F1 generation is exerted by a general anthropogenic use of the orchards rather than by the usage of distinct pesticides.

In summary, for the first time our findings suggest that the earwigs with a high historic level of insecticide exposure could acquire resistance to insecticides used in apple orchards. These results pave the way for future studies, further exploring the potentially diverse resistance-associated mutations and their occurrence in earwigs, according to the treatment pressure.

## PROJECT CONTEXT & OBJECTIVES

The widespread use of pesticides in agriculture to control crop pests exerts adverse side effects on the environment (Köhler and Triebkorn, 2013). These side effects have been classified into two categories: ecotoxicity (Carson, 1962) and pest resistance to pesticides (R4P, 2016). Apple orchards are highly productive crops. In France, approximately 54,000 ha of apple orchards are sprayed with pesticides with, on average, more than 30 pesticide applications per year in Provence (Sauphanor et al., 2009; Mazzia et al., 2015). French apple orchards can be classified into three management practices depending on the type and frequency of pesticides used: 1) organic orchard where all chemical pesticides are replaced with natural products including insecticides with natural origin such as Spinosyn; 2) integrated pest management (IPM), where chemical pesticides are used sparingly according to damage thresholds and finally, 3) conventional orchards (conv), where chemical pesticides are routinely used within the limits of the French law. Among the treatments applied in IPM and conventional orchards, organophosphorus (OP), neonicotinoid and synthetic pyrethroid compounds are the most widely used insecticides.

Following the European aim at reducing the use of pesticides, the development of biocontrol agents is of prime importance. Considered as beneficial insects in apple orchards, earwigs (*Forficula auricularia* L.) have been extensively studied due to their key role in the regulation of pest species such as aphids, leaf rollers and psyllids (Dib et al., 2010; Dib et al. 2011). Adults and nymphs are nocturnal, hiding during the day under shelters such as bark or holes in the ground. Their ease of capture and identification make them promising bioindicators of orchard management intensity. It has been shown that pesticides are likely to impact their abundance and diversity (Sharley et al., 2008; Moerkens et al., 2012; Malagnoux et al., 2015a). Several studies have also shown that insecticides directly affect biochemical (Malagnoux et al., 2014), or behavioral biomarkers in these insects such as predatory activity (Sauphanor et al., 1993; Malagnoux et al., 2015b).

Among insecticides, OP and especially chlorpyrifos-ethyl, are highly and acutely toxic to wildlife (Köhler and Triebkorn, 2013). These neurotoxic compounds inhibit acetylcholinesterase activity (AChE, EC 3.1.1.7) and induce cascade effects and severe neurological disruption. After exposure, AChE activity is only restored by de novo enzyme synthesis (Rault et al., 2008). Beside direct impacts on biochemical and behavioral mechanisms, insecticide exposure can increase resistance (Schmidt-Jeffris and Beers, 2018) and induce tolerance in organisms (Poupardin et al., 2008). Tolerant populations can undergo rapid phenotypic changes within the limits of phenotypic plasticity, a phenomenon which is defined by the ability of one genotype to produce different phenotypes in response to time or spatial environmental variability (Kelly et al., 2012).

Resistance to insecticides can occur via various mechanisms, but modifications to both the detoxification pathways and molecular target of the insecticide are two of the most common ways. Point mutations in the AChE gene have been identified in many insect species, and some of them were demonstrated to be responsible for resistance (Feyereisen et al., 2015). On another hand, two major stages of metabolic transformation of insecticides underlie biotransformation-based acclimation or resistance (Li et al., 2007): (i) a phase of functionalization, which results in oxidation by cytochrome P450 multiple function oxygenase (P450) (Puinean et al., 2010). This phase I reaction can be followed by ester hydrolysis or bioscavenging (especially for OP insecticides) by carboxylesterases (CbEs) which can enhance the functionalization stage or decrease the available OP concentration (Wheelock et al., 2005); and (ii) a second stage named phase II using glutathione conjugation through glutathione-S-transferases (GSTs), the most important enzyme group involved (Kostaropoulos et al., 2001; Enayati et al., 2005). Through these different stages, metabolites are, generally spoken, less toxic than their parent molecules and excreted more easily, but numerous examples also showed an

increase in toxicity by phase I or II reactions (Casida, 2016). This is particularly the case for OP insecticides, which are activated by P450 (Costa, 2006).

CbEs (EC 3.1.1.1.) belong to the B-esterases which are inhibited by OPs. They play an important role in the metabolism of many agrochemicals and pharmaceuticals products. In particular, they hydrolyze pyrethroids and bind stoichiometrically to carbamates and organophosphates (Wheelock et al., 2005). The chemical interaction with OP is considered an efficient mechanism of detoxification by which fewer OP molecules may reach the active site of AChE. CbEs consist of multiple isozymes with variable, tissue and organism-dependent expression levels and activities (Wheelock et al., 2008). Previous results have pointed out their role in the tolerance of some insect pests to OP pesticides (Farnsworth et al., 2010; Reyes et al., 2011).

GSTs enzymes (EC 2.5.1.18.) are involved in the detoxification of various endogenous and xenobiotic compounds, such as drugs, insecticides, organic pollutants, secondary metabolites and other toxins (Hayes et al., 2005). They increase conjugates that are more readily excreted than the parent insecticide (Sheehan et al., 2001; Hayes et al., 2005). It is now well established that insect GSTs are associated with resistance to OP, pyrethroids and organochlorine insecticides (Hemingway and Ranson, 2000; Li et al., 2007; Lumjuan et al., 2011). Moreover, increases in GSTs activity and expression levels in pyrethroid resistant mosquitoes have also been reported (Li et al., 2007).

In addition to the modification of molecular target and detoxification pathways, heat shock proteins of the 70 kD family (Hsp70) play an important role in protein repair (Hartl 1996; Lindquist and Craig 1988). They are generally induced in response to various biotic or abiotic stressors (Schlesinger 1990). The induction of Hsp70s following toxicant exposure represents an efficient defense mechanism and could play an important role in tolerance to insecticide. In ecotoxicology, this stress protein induction is regarded a sensitive molecular biomarker of effect, indicating proteotoxicity (Köhler et al. 1992).

Beside resistance to insecticides, in stressful conditions, there is an increasing expenditure associated with detoxification and defense mechanisms resulting in a negative impact on life-history traits of the life cycle. Living organisms use energy reserves to maintain their bodies, growth, development, and reproduction (Arrese and Soulage, 2010). A low level of energy reserves could potentially influence the population dynamics of earwigs and decrease their role in pest management in apple orchards. Consequently, such potential negative physiological side effects on the maintenance, reproduction and energy budget of non-target species should be considered whenever pesticides are applied. Nestel et al. (2016) showed that ecological stressors can affect developmental instability, which induces reduced fitness in insects. Morphological parameters, e.g. individual mass or size could be used to detect the effects of environmental stress on insects.

After exposure to pesticides, it has been shown that energy reserves decrease in several organisms (Ribeiro et al., 2001; Nath 2003; Rharrabe et al., 2008). Glycogen and the lipid, triacylglycerol, are predominant energy reserves stored in the fat body which is distributed throughout the body of insects (Arrese and Soulage, 2010). This compartment plays an essential role in energy storage and the utilization of different functions of the insect's life including growth, timing of metamorphosis and egg development. Moreover, the fat body also synthesizes most of hemolymph proteins and circulating metabolites. Glycogen can be rapidly hydrolyzed to glucose which is released into the haemolymph of insects in order to be used as a glycolytic fuel (Steele 1982). Lipids are always the main component of the fat body representing more than 50% of the dry weight of an insect (Ziegler 1991). Lipids provide energy during diapause (Hahn and Denlinger 2007), for embryo development (Ziegler and Van Antwerpen 2006) and sustained flight activity. Finally, proteins can also supply energy through catabolism and are essential in tissue building and repair.

The aim of the I-ResPect project was to assess the resistance/tolerance of the earwig *F.*

*auricularia*, an effective generalist predator, using an integrated approach at different levels of response: energy reserves; metabolic pathways involved in detoxification; Hsp70 induction involved in defense; and expression of genes involved in resistance. This approach was carried out using earwigs sampled in orchards under different management strategies (conventional, Integrated Pest Management (IPM), and organic), with different developmental and, therefore, different physiological status (nymphs, adults with sex distinction; Fig.1). Three tasks have been under investigation:

Task 1: Bio-monitoring and effect of management strategies on the energy reserves of earwigs, *Forficula auricularia*. The effects of orchard management strategies on earwig weight, energy reserves (glycogen, lipid and protein contents) and morphometric parameters (inter-eye and prothorax widths) were analyzed at different developmental statuses (nymphs, adults with sex distinction).

Task 2: Inter-generational effects of management strategies on earwig fitness traits: fecundity, offspring size and insecticide susceptibility. Earwigs either from different orchards or their respective F1 generation were subjected to bio-tests using the insecticide chlorpyrifos-ethyl (Pyrinex® from Philagro, organophosphorus).

Task 3: Metabolic pathways, defense mechanisms and gene expression involved in insecticide resistance of *Forficula auricularia*. The aim was to assess (i) the effects of the orchard management strategies on metabolic pathways involved in resistance and/or tolerance (CbEs, and GSTs) and the sensitivity of the AChE target, either before or after exposure to chlorpyrifos-ethyl; (ii) the effect of various exposure times on Hsp70 induction and (iii) the impact of management strategies on the expression of genes involved in insecticide resistance.



Figure 1: Earwigs *Forficula auricularia*. (A) Adults, male and female. The sex distinction could be easily observed regarding the form of the cerci at the distal end of the abdomen (straight cerci for females, and curved cerci for males). (B) Female earwig predating on aphids. (C) Female with their eggs and (D) with their first stage nymphs.



## MAIN RESULTS

### 1. Bio-monitoring and effect of management strategies on energy reserves of the earwigs *Forficula auricularia*.

The effects of orchard management strategies on earwig weight, energy reserves (glycogen, lipid and protein contents) and morphometric parameters (inter-eye and prothorax widths) were analyzed at different developmental statuses (nymphs, adults with sex distinction). Two different studies were conducted: (i) an exploratory analysis in which we measured the energy reserves and some morphological traits of adults *F. auricularia* L. sampled in a few apple orchards under 2 management strategies (organic versus IPM) and (ii) an extended study in which adults collected in 80 different apple orchards, and their offspring, were analyzed.

#### 1.1. An exploratory study of energy reserves and biometry as potential tools to assess the effects of pest management strategies on the earwig, *Forficula auricularia* L. (Suchail et al. 2018).

We observed a significant decrease in mass (22 to 27%), inter-eye width (3%), and prothorax width (2 to 5%) in earwigs from IPM compared to organic orchards. Energy body reserves also confirmed these results with a significant decrease of 48% in glycogen and 25 to 42% in lipid content in earwigs from IPM compared to organic orchards (Fig. 2). However, the protein content was approximately 70% higher in earwigs from IPM than in organic orchards.

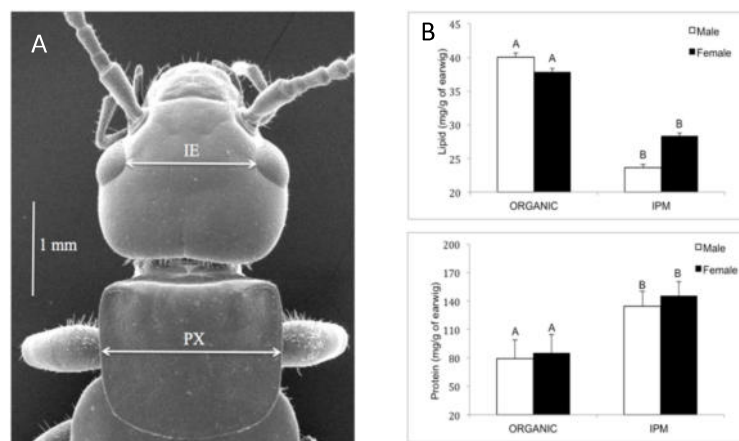


Figure 2: (A) Scanning electron microscopy, dorsal view of head and prothorax of a male earwig showing the method of measurement applied to selected body parts: the inter-eye (IE) and the prothorax (PX) distances. (B) Lipid and protein content for female and male of earwigs for each management strategy.

Earwigs sampled in IPM orchards may adapt to minimize the adverse toxic effects of pesticide treatments using a large number of strategies, which are reflected in changes to their energy reserves. These results were published in ESPR in 2018 (Suchail et al. 2018).

#### 1.2. Analysis of energy reserves and morphometric parameters in adult earwigs and their offspring

We extended the analyses using adult earwigs caught in apple orchards (no treatment, organic, IPM and conventional) during the summer period from June to September 2016, and on their offspring of the next generation reared under controlled conditions in the following year. About 80 orchards were sampled. The size of characters (weight, inter-ocular distance, femur length, prothorax length) was found to be greater in earwigs deriving from IPM orchards without treatment (Fig.3).

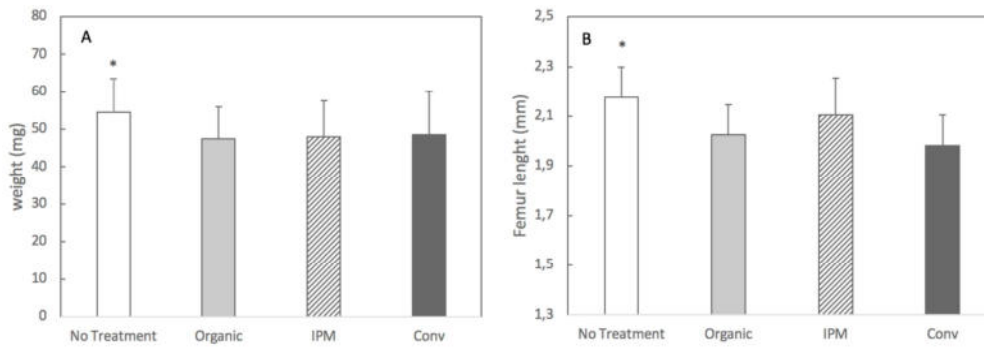


Figure 3: Analysis of weight (A) and morphometric characters (B) of adult earwigs depending on orchards management strategies.

All the earwigs used for morphometric analysis were individually analyzed for energy reserves in order to obtain combined measurements and estimate the reallocation of reserves for defense mechanisms rather than maintenance. The size and the corresponding energy reserves of the earwigs from the first generation (nymphs at different stage of development) obtained in our rearing program were measured. The results are still under statistical analysis. However, a quick overview of our results confirms the previous measurements, suggesting that both energy reserves and biometry are impaired by anthropization in general rather than by management strategy.

In conclusion, when comparing orchards with contrasted treatments (Suchail et al. 2018), it appeared that, in order to face insecticide exposure, both energy reserves and the size of earwigs decreased. In contrast, when considering a larger number of orchards within the same treatment group but with varying ways of treatment application, these differences tend to be minimized. In this latter case, human impact in general, independent of the management type seems to induce the strongest impact on earwig's reserves and biometry.

## 2. Inter-generational effects of management strategies on earwig fitness traits: fecundity, offspring size and susceptibility to insecticide.

Our rearing was set in early fall 2016 using 20 to 30 females per orchard (over the 80 orchards sampled) which were individually isolated in the presence of a single male, until the first egg laying. The males were removed, the eggs were counted, and the nymphs were followed every week until the third nymphal stage was reached (at this time the nymphs are able to survive by themselves without their mother support) and the mothers were removed. Time needed for hatching and for the development between the different stages was recorded. Interestingly, we observed a progressive time in the clutch period from females caught in low input (the sooner clutches), to organic, IPM then conventional orchards that exhibited the latter clutch period. Moreover, females from organic orchards exhibited at least two different periods of egg-laying starting in late autumn for the first one and in early winter for the second one, both of them of equivalent importance. For females caught in conventional orchards, clutch period started mostly in early winter (Fig. 4).

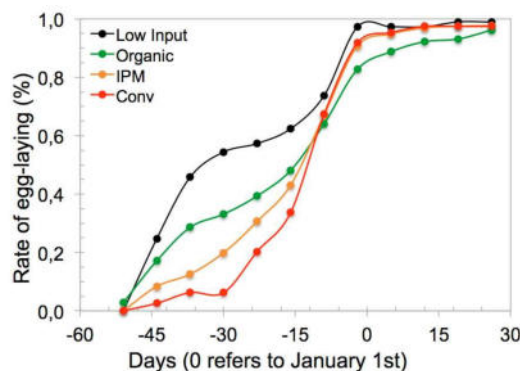


Figure 4: Rate of egg-laying depending on management strategies. Clutches are starting in early fall (November) for low-input and organic orchards while a delay of 30 days is observed for IPM and conventional orchards with clutches starting in December.

A positive correlation was obtained between the female weight and the offspring size. A slight but not significant decrease in offspring size from organic orchards to conventional ones was observed. The developmental rate of the F1 descendants was calculated as the number of days between eggs laying to the third instar emerging nymphs. The number of emerging third instar was counted and divided by the number of initial eggs to quantify survival of the offspring. For both parameters, no significant differences were observed between management strategies (Fig. 5). However, we observed a higher natural mortality despite a lower rate of parasitism for females collected in conventional orchards, when bred in the laboratory under controlled conditions (Fig. 5).

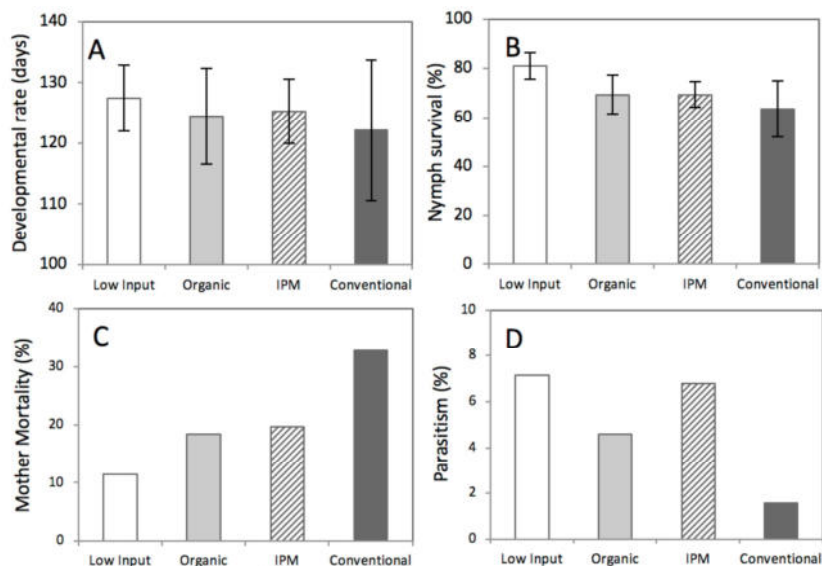


Figure 5: (A) Developmental rate in days between egg laying and third instar. (B) Nymph survival for the third instar (%) calculated from the number of initial eggs. (C) Female Mortality (%) during our rearing program. (D) Parasitism rate (%) observed in females.

The results concerning inter-generational effects of management strategies pointed out that pesticides treatments applied in the orchards did not strongly impact fitness traits or biological cycle of the earwigs, either in the survival of nymphs nor in the developmental rate of the offspring. The differences lie mostly in the ability of mother earwigs to survive and in the clutch period over the year, but no statistically significant differences could be noted. The higher mortality observed for conventional females support the fact that their historically pre-exposed condition could increase their weakness even if no significant impact could be observed on energy reserves as mentioned above.

Earwigs (nymph, males and females) either from different orchards and F1 generation were subjected to bio-tests using the insecticide chlorpyrifos-ethyl (Pyrinex® from Philagro, organophosphorus). At the normal application rate allowed for French apple orchards, it appears that susceptibility to OP exposure decrease in earwig population that were previously exposed to chemicals compounds (i.e IPM and conventional orchards) in comparison with “naïve populations” that were never exposed to synthetic insecticides (i.e. low input or organic orchards). This difference in sensitivity remained stable in the F1 generation. In that context we further decided to focus our investigations on metabolic pathways (task 3) involved in resistance and/or tolerance to insecticides in different earwig population.

### 3. Metabolic pathways, defense mechanisms and gene expression involved in insecticide resistance of *Forficula auricularia*.

The effects of the orchard management strategies on earwig population's metabolic pathways involved in resistance and/or tolerance and the sensitivity of the AChE target were assessed. We investigated, (i) both, the CbEs and the GST as metabolic pathways either before or after exposure to chlorpyrifos-ethyl; (ii) the effect of various exposure times on HSP70 induction and (iii) the impact of management strategies on the expression of genes involved in insecticide resistance. We chose 3 commercial orchards (1 orchard per practice organic, IPM and conventional), with known contrasting treatments for the last ten years especially concerning the use of OP insecticides (Table 1). All orchards were located in Noves (south-eastern France) within a 10 km radius. Even if very mobile on plants, the dispersal distance of earwigs is very low, less than 30m per month (Moerkens et al., 2010). This means that we studied 3 distinct populations which were strongly under the influence of local pesticide use. As specified above, earwig populations collected in organic orchards are considered as naïve population regarding OP exposure since they never were exposed to OP treatments, while those from conventional orchard were pre-exposed for years to OP (more than twice a year). Earwigs from IPM are considered as less exposed to OP because after a period of about 1-OP treatment per year, no OP was applied in the IPM orchard since 2013.

Table 1. Origin of earwig populations analyzed and the average of their received treatments regarding OPs and total neurotoxic insecticides in the last 10 years. Neurotoxic insecticides include OP, neonicotinoid and synthetic pyrethroid compounds or spinosyns for the organic orchard.

Earwig population	Origin	OP insecticides per year	Neurotoxic insecticides per year
Organic	Organic commercial apple orchard using « Alt'Carpo » netting system	0	≈3
IPM	Commercial apple orchard under IPM strategy	1	6
Conv	Commercial apple orchard under conventional strategy	5,9	11,4

Male and female adult *F. auricularia* earwigs were collected in July 2017, using cardboard traps placed around the trunk of apple trees in orchards under the three different management strategies described above: organic, integrated pest management (IPM) and conventional. Adults were of roughly the same age and care was taken to sample earwigs of similar weight. All bio-test experiments were conducted with Pyrinex® an insecticide authorized in the European Union and commonly used in French non-organic apple orchards until 2017. The insecticide solution was diluted with distilled water to adjust the pesticide concentration to the Normal Application Rate (NAR) allowed in French apple orchards (50 g.hL<sup>-1</sup> active ingredients, chlorpyrifos-ethyl). After exposure time, the earwig status (alive or dead) was noted. Alive earwigs were frozen at -80°C for biochemical measurements.

#### 3.1. Metabolic mechanisms and acetylcholinesterase sensitivity involved in tolerance to chlorpyrifos-ethyl in the earwig *Forficula auricularia* (Le Navenant et al. 2019).

At the normal application rate allowed for French apple orchards, chlorpyrifos-ethyl led to high mortality in earwigs after 12 hours exposure, with marked differences depending on their origin. Earwigs collected in either organic or IPM orchards were more sensitive than earwigs collected in conventional ones. More than 80% mortality was observed in earwigs from organic and IPM, whereas less than 50% mortality was observed in earwigs from the conventional orchard (Fig. 6).

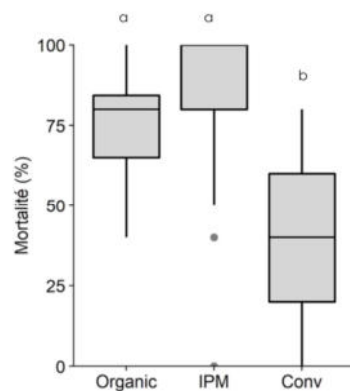


Figure 6: Effect of chlorpyrifos-ethyl exposure on *F. auricularia* mortality (%). Tukey box plots indicate the median, 25th and 75th percentiles (box edges), the range (whiskers) and outliers (black dots). Different letters denote significant differences between management strategies (p-value: 0.003).

Based on the lethal response data, the 50% decrease in mortality of *F. auricularia* collected in a conventional apple orchard suggests resistance to the insecticide in this population. A similar decrease in mortality was previously observed in different insect species such as pests (Aïzoun et al., 2013; Grigg-McGuffin et al., 2015) or natural enemies (Tirello et al., 2012).

### 3.1.1. Impact of chlorpyrifos-ethyl on metabolic pathways

Unexposed males and control females from conventional orchards exhibited about two times higher basal CbE activity and four times higher basal GST compared to earwigs from organic and IPM. (Table 2; Fig 7). This higher constitutive activity of both GSTs and CbEs in earwigs collected in the conventional orchard is consistent with resistance in this species. Previous studies have shown the involvement of GSTs in resistance to organophosphate insecticides in the codling moth (Fuentes-Contreras et al., 2007; Voudouris et al., 2011). Similar effects were described for resistant versus susceptible strains of the diamondback moth *P. xylostella* and the cockroach *B. germanica* resistant to chlorpyrifos-ethyl (respectively a 2.2- and a 3.4-times higher GSTs activities) (Yu and Nguyen, 1992; Valles and Yu, 1996). Enhanced production of CbEs confers resistance to insecticides, such as organophosphates, carbamates and, to a lesser extent, pyrethroids by sequestering and metabolizing these insecticides before they reach the nervous system (Bass et al., 2014). The constitutive CbE activity in *F. auricularia* collected in the conventional orchard is similar to the quantitative increase observed in the codling moth and the cotton aphid where a 2- and a 3.7-times higher constitutive activity in resistant compared to susceptible strains was found, respectively (Pan et al., 2009; Reyes et al., 2011). In this case, the protection resulted in an effective molecular sequestration of OP insecticides (Sogorb and Vilanova, 2002; Wheelock et al., 2008), which avoids inhibition of AChE, the molecular target of OP.

Table 2. Specific enzyme activities, expressed as U.mg<sup>-1</sup> protein (mean±SD) were measured in homogenates from the head (AChE) or abdomen (GSTs and CbE) of *F. auricularia* earwigs, sampled from three different management strategies.

	Acetylcholinesterase (mU.mg <sup>-1</sup> )			Carboxylesterase (U.mg <sup>-1</sup> )			Glutathion-S-transferase (U.mg <sup>-1</sup> )		
	Organic	IPM	Conv	Organic	IPM	Conv	Organic	IPM	Conv
Male	40.86 ± 17.68	40.81 ± 15.01	32.63 ± 12.24	1.01 ± 0.29	1.03 ± 0.44	1.86 ± 0.69	1.77 ± 0.56	2.8 ± 1.92	9.18 ± 4.57
Female	30.55 ± 16.39	26.35 ± 12.98	28.62 ± 13.49	0.69 ± 0.31	0.92 ± 0.59	1.52 ± 0.66	1.98 ± 1.16	4.24 ± 3.31	8.83 ± 3.83

After exposure to chlorpyrifos-ethyl, sex and origin of earwigs influenced the effect on CbEs activity. We observed a strong decrease in CbEs in male earwigs caught either in organic or IPM orchards (78.0% and 54.5% inhibition respectively). For females, only those collected in the organic orchard showed a decrease in activity (-67.7%). In contrast, after exposure to chlorpyrifos-ethyl, GSTs activity increased, for both male and female earwigs collected in IPM and conventional orchards (Fig. 7C & 7D). This increase was more pronounced for females, especially when collected in the IPM orchard. The low basal GST activity observed in earwigs from IPM orchard suggests that, when insecticide pressure was relaxed (end of OP treatments since 2013), susceptible genotypes could have survived and reproduced. However, among this earwig population, a substantial number of individuals were able to maintain their ability to adapt to insecticide exposure. These two events confirmed the plasticity of the individuals belonging to the IPM population. They are consistent with the potential role of plasticity in evolutionary response to pesticides depending on spatiotemporal variation in pesticide exposure, which can lead to rapid environmental changes (Cothran et al 2013; Hua et al. 2015).

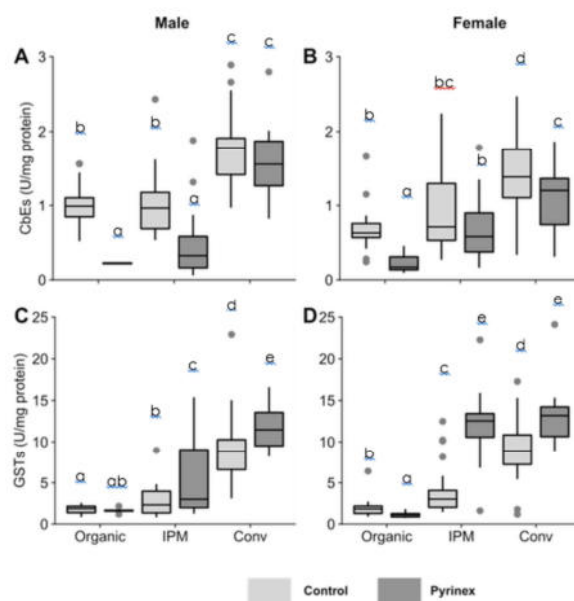


Figure 7: Response of Carboxylesterase (CbE) and Glutathion-S-Transferase (GST) activities ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteins) in earwigs depending on management strategy after 12h exposure to chlorpyrifos-ethyl. Tukey box plots indicate the median, the 25th and 75th percentiles (box edges), the range (whiskers) and outliers (black dots). Different letters indicate significant differences between orchards and treatment.

### 3.1.2. Impact of chlorpyrifos-ethyl on acetylcholinesterase activity

Basal AChE activity levels in both male and female earwigs are summarized in Table 2. No significant differences could be observed either between sexes or management strategies. However, exposure to chlorpyrifos-ethyl, induced a sex-dependent response in AChE activity. Strong and significant decreases in AChE activity were observed for males (80.3%, 45.4% and 73.4% inhibition for organic, IPM and conventional orchards respectively) while the female AChE activity remained constant.

*In vitro* inhibition kinetics in homogenates incubated in the presence of chlorpyrifos-ethyl-oxon generated typical sigmoid dose-dependent curves (Fig. 8). Both sexes exhibited very closely related  $\text{IC}_{50}$  values, with an increase in sensitivity for organic and IPM organisms compare to conventional ones. The estimated  $\text{IC}_{50}$  values for earwigs from organic and IPM were lower than those from conventional orchards (4- and 5.5-times respectively). Therefore, the intrinsic sensitivity of AChE to

this OP insecticide could be a significant additional explanation for the differences observed between management practices. Data on AChE activity and sensitivity support the ability of earwigs collected in conventional orchards to better cope with chlorpyrifos exposure.

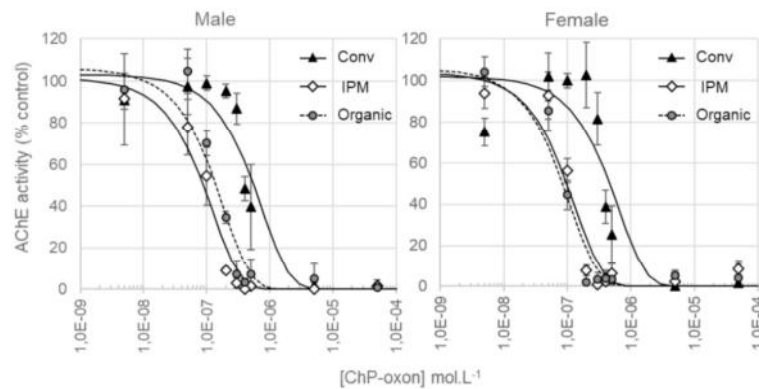


Figure 8: Dose-dependent inhibition curves for *F. auricularia* acetylcholinesterase (AChE) in the presence of serial molar concentrations of chlorpyrifos-ethyl-oxon. Symbols are the mean±SD expressed as percentage of the control. Each point corresponds to the mean of three independent assays.

### 3.2. Induction of Hsp70 and acetylcholinesterase inhibition in the earwig *Forficula auricularia* depends on time-exposure and orchard management strategies.

The Hsp70 family proteins differ from other classes of heat shock proteins by being one of the most highly conserved proteins and first to be induced under stress conditions. It is one of the most widely studied and well-defined classes of Hsp (Gupta et al 2010). Due to its specific response represented by an optimum curve (low-dose/stress induction, high-dose/stress down-regulation/breakdown), induction of Hsp70 should preferably be used in combination with other biomarkers. In the current work, responses were compared using two biochemical endpoints, a change in heat shock protein level (Hsp70) and the inhibition of AChE activity. Earwigs were analyzed before exposure, and 3 and 6.5 hours after exposure to chlorpyrifos-ethyl. We chose short-time exposure to avoid mortality. In the earwig *F. auricularia*, both parameters were found to depend on time-exposure and orchard management strategies. Conventional earwigs appear less sensitive to chlorpyrifos exposure either concerning AChE inhibition and Hsp70 induction (Fig. 9). We observed a constant level of Hsp70, close to the control, either for male and female earwigs collected in IPM and conventional orchards (Fig. 9).

In earwig females, induction of Hsp70 followed the theoretical response with higher induction level for stressed individuals (No treatment and organic > IPM and conv) compared to the control. A strong decrease in the ability to maintain a normal Hsp70 level was observed for male earwigs collected in non-treated orchards after 3h exposure (only 60% of normal hsp70 level). This result suggests that male earwigs are submitted to a severe stress after a short exposure time, which was confirmed by a strong decrease in AChE activity in male after 3h exposure compare to other earwigs. The recovery level of hsp70 in male after 6.5h exposure pointed out the ability of the few alive organisms to maintain a basic level of Hsp70. The biomarkers used (AChE inhibition and change in Hsp70 level) were in good accordance and revealed differences between management strategies. Males from orchards with no treatment proved to be the most sensitive organism, while female seemed the least sensitive earwigs.

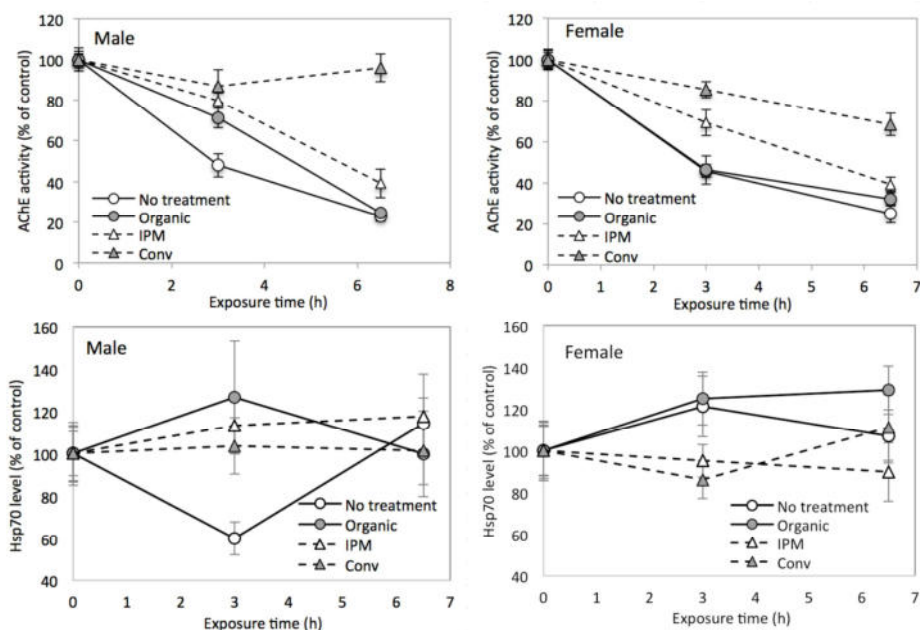


Figure 9: Time-dependent response of AChE inhibition (mean  $\pm$  SE) and hsp70 induction (mean  $\pm$  SE) following chlorpyrifos-ethyl exposure depending on management strategies.

### 3.3. Potential involvement of detoxification enzyme expression and AChE mutation in resistance to insecticides in the earwig *Forficula auricularia*.

As shown in Table 1, the number of treatments is highest in conventional orchards. Molecules belonging to different insecticide families can act on the same target in the insect. For example, the neonicotinoids applied either in conventional or IPM orchards target the nicotinic acetylcholine receptors. Spinosad used in organic orchard targets also those receptors. The correspondence between each family of insecticides and its target is listed in the Table 3.

Table 3. Correspondences between insecticide families and the target in insect.

Insecticide family	Molecular target	GenBank accession number
Organophosphorus (OP)	acetylcholinesterase (AChE)	ace1 (MK756004)
Carbamates		ace2 (MK756005)
Neonicotinoids	nicotinic acetylcholine receptors (nAChR)	nAChR $\alpha$ 1 (MK756006)
Spinosyns		nAChR $\alpha$ 3 (MK756010) nAChR $\beta$ 2 (MK756007)
Pyrethroids	voltage-gated sodium channels Para	Under submission
Avermectins	glutamate-gated chloride channel GluCl	Under submission
Anthranilic diamides	ryanodine receptor RyR	Under submission

As the *F. auricularia* genome is not yet available, we searched the sequences of these targets in phylogenetically related insect species. Earwigs belong to the order Dermaptera and the superorder Polyneoptera (Misof et al., 2014). Crickets and cockroaches are from the same superorder, belong to the Orthoptera and Blattodea, respectively (Misof et al., 2014), and offer the advantage to have gene sequences available. These sequences allowed us to perform a BLAST search on transcriptome data of *F. auricularia* (Roulin et al., 2014). Thus, primers were designed from



consensus EST sequences and used to amplify and clone these targets from the collected earwigs of this study. Genes were cloned in a vector and sequenced several times. Validated sequences were submitted to GenBank (accession numbers are indicated in Table 3).

### 3.3.1. Identification of mutations

Mutation in **acetylcholinesterase** genes is a well-known resistance mechanism of OP insecticides. In *F. auricularia*, two genes code for acetylcholinesterases, *ace1* and *ace2*, whereas the dipteran *Drosophila melanogaster* only one gene. Our sequencing study did not detect any mutation in *ace1*, but allowed to detect two mutations in *ace2*. One of these mutations corresponds to a change of the serine at the position 238 to a glycine. In the Colorado potato beetle, the same mutation S238G is responsible for the resistance to azinphosmethyl (Zhu et al., 1996). An additional mutation corresponding to the change of a lysine at position 393 to a glutamine was also identified but was not recorded in other insects yet.

**Nicotinic acetylcholine receptors** are complex receptors composed of several subunits. In the model insect *D. melanogaster* they are composed of seven  $\alpha$  subunits ( $\alpha1$  to  $\alpha7$ ) and three  $\beta$  subunits ( $\beta1$  to  $\beta3$ ) (Adams et al., 2000). The number of subunits is unknown in *F. auricularia*. However most insects display a similar number as *Drosophila* (Jones and Sattelle, 2010). We were able to clone 2 nAChR subunits, the  $\alpha1$  and  $\beta2$ . We found two independent mutations in the  $\alpha1$  subunit, one corresponds to the change of the proline at the position 145 to a histidine and the other is the change of a glutamic acid to a lysine at the position 546. The P145H mutation is located in the N-terminal extracellular region, which contains the ligand-binding domain (either acetylcholine or neonicotinoids), the proline is the first amino acid after the loop E (Ihara et al., 2014). To our knowledge, this mutation was not reported until now. However, because this amino acid is very well conserved from insect to human it suggests that it is important in the receptor function and may have an effect in resistance. The second mutation is located at the end of the protein, which was not identified as an important part for the binding of neither neonicotinoids nor spinosyns. However, its role in resistance cannot be excluded without complementary analyses. The subunit  $\beta2$  was also sequenced. In one clone, one mutation was found corresponding to the change of a serine at the position 16 to a proline, this position is not very well conserved however its location in the N-terminal domain may affect the insecticide binding. The other mutations were found in the sequence from earwig collected in IPM (G102R, K135M, A136T, E161K and Q508N). Some of these changes affect conserved residues in insects and are located in the loops identified as regions important for the agonist binding (Corringer et al., 2000). K135M and A136T are located in the loop E and are well conserved in insect. Further experiments are required to investigate their role in resistance. The modification of E161K is at a poorly conserved position and may correspond to genetic variability.

The gene coding for *para*, the **voltage-gated sodium channel** was cloned in three fragments and we were unable to get the full sequence due to the complexity of the gene. It codes for a protein with four repeated domains (I to IV), each having 6 trans-membrane segments. In *Drosophila*, the locus *para* was shown to be large and complex with at least 26 exons and alternative splicing increasing the diversity of the obtained transcripts (Loughney et al., 1989). Resistance to pyrethroids was first identified in the house fly. The presence of two-point mutations has been detected and named *kdr* (for knockdown resistance) and *super-kdr* (Williamson et al., 1996). Additional mutations were then reported to confer resistance, they are mainly present in the domain II and III (Rinkevich et al., 2013). The fragment 2 that we have cloned contains this domain II. However, no mutation was found. No point mutation, but sequence variation was detected in the fragment 1. This variation is an insertion of 13 nucleotides between positions 148-149 (corresponding to the intracellular N-terminal loop) and is probably linked to alternative splicing.

No mutations have been detected in the **chloride channel glutamate dependent (GluCl)**, the target of avermectins. Similarly, we were unable to determine the presence of mutation in the gene coding for the **ryanodine receptor**, the target of anthranilic diamides because it is a very large gene (more than 15000 nucleotides in most insects) and we were not successful in obtaining the full sequence.

### 3.3.2. Gene expression variations associated with resistance

In order to evaluate the potential involvement of detoxification enzymes in insecticide resistance of earwigs, we first searched genes coding for candidates of the three main families of detoxification enzymes cytochrome P450 (P450), carboxylesterases (CbEs) and glutathione S-transferases (GSTs). Four sequences coding for P450 have been identified and sent to the annotation committee for naming (Nelson, 2009). They correspond to Cyp4G189 (Genbank No. MK756000), Cyp6NQ1 (Genbank No. MK756001), Cyp6NW1 (Genbank No. MK756002) and Cyp6NP1 (Genbank No. MK756003). One GST (MK756011) from the delta class and two CbEs were also identified. The expression of these enzymes as well as three types of insecticide targets (Ace1 and nicotinic acetylcholine receptors) was followed by qRT-PCR (Fig. 10). The cloning of three genes used as reference has been taken, actin, elongation factor 1 (EF1), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH).

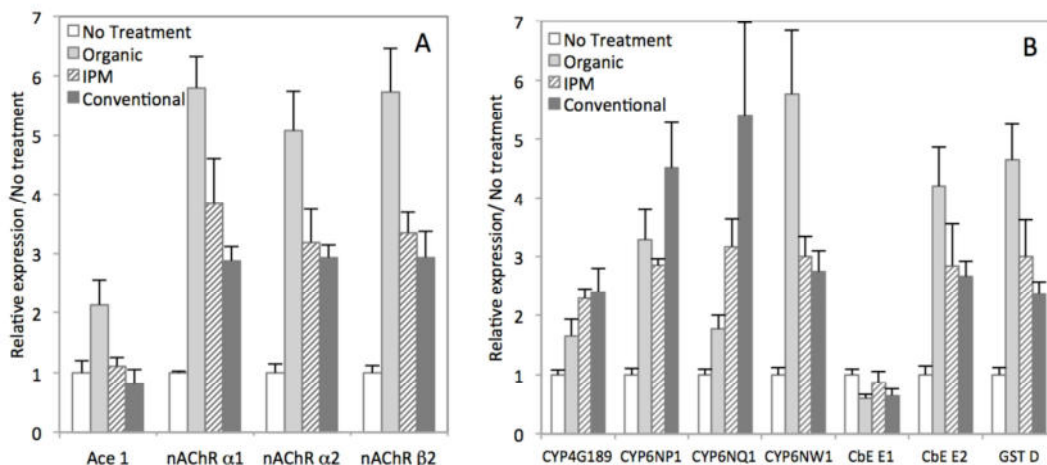


Figure 10: Comparison of expression levels of resistance-related transcripts in earwigs collected from different orchards (one orchard without any insecticide treatment referred as “No treatment”, organic, IPM, conventional). Relative expression levels, measured by qPCR were normalized with the three reference genes (actin, EF1, G6PDH). (A) Expression of insecticide targets. (B) Expression of resistance-related genes for detoxification enzymes.

A first general observation is that the expression levels of resistance-related transcripts are higher in earwigs from treated orchards (except for CbE E1) as compared with non-treated earwigs. This expected result confirms that both, the orchard sampling and the genes identified and studied here are appropriate. A second general observation, rather unexpected, is that earwigs from organic orchards show the highest expression level of resistance-related genes for 7 out of the 11 genes tested. This suggests that earwigs from organic orchards have been exposed to substantial treatments, either chemical or natural molecules.

Regarding the level of expression of insecticide targets, (ace and nAChR), only earwigs collected in organic orchards show an overexpression of ace1. Three subunits of nAChRs are induced at least by a factor three in earwigs whatever their orchard of origin was, compared to the orchard without treatment. The highest induction is seen for the individuals from the organic treatment. As spinosyns are often used in organic orchards, resistance has been reported to date due to mutations

in the  $\alpha 6$  subunit. However, the increase in the expression of several subunits should be further explored.

Several genes coding for detoxification enzymes are induced in treated orchards. Two P450 from the family 6 (CYP6NP1 and CYP6NQ1) are highly induced in earwigs collected in conventional orchards. The CYP6 are well known in many insects for their role in insecticide resistance. CYP6G1 have been demonstrated to be able to metabolize the insecticide in a least toxic molecule. It is overexpressed in many resistant strains of *Drosophila* and its ability to metabolize DDT, neonicotinoids has been demonstrated (Le Goff and Hilliou, 2017). One of the two carboxylesterases is induced in treated orchards with the highest induction level obtained from organic as well as the glutathione S-transferase from delta class. However, based on biochemical measurements we have shown above, CbE and GST activities were lower in organic orchards. Eventually, the available energy measured in earwigs from the organic treatment may be insufficient to allow suboptimal enzyme synthesis. Those results corroborate the lower protein amount observed in earwigs from organic orchards (Suchail et al. 2018).

In conclusion, we identified the major pesticide targets as well as several point mutations potentially related to resistance. We also identified major detoxification enzymes and increased expression of resistance-related genes (pesticide targets or detoxification enzymes) in individuals that have been exposed to chemical and/or organic treatments.

#### 4. Conclusion

There is increasing interest in understanding the underlying mechanisms that drive evolutionary responses of populations to environmental changes, including the role of plasticity and resistance (Garnas, 2018). Here, we performed the first study on pesticide resistance in earwigs, and our results suggest that the earwig *F. auricularia* is able to acquire tolerance/resistance to OP insecticides. In apple orchards, earwigs are among the most beneficial arthropods, and their resistance to effective biocontrol agents in pesticide-treated crops may be a desirable feature. For example, the release of resistant populations of the predatory mite *K. aberrans* had been successfully carried out in vineyards and apple orchards where pest control strategies included chlorpyrifos and other pesticides (Duso et al., 2009, 2012; Ahmad et al., 2013).

Our study underlines the differences in metabolic pathway responses in *F. auricularia* populations influenced by their historic management strategies. In particular, constitutive GSTs and CbEs activity levels were higher following conventional agriculture, and a decrease in sensitivity of AChE was also observed in male and female earwigs pre-exposed in the conventional orchard. The mutation S238G found in the gene *ace2* (responsible for the resistance to azinphosmethyl), could be involved in the decrease in AChE sensitivity. Moreover, the highly induced CYP6NQ1 gene in earwigs collected in conventional orchards support the emergence of resistance to pesticides in such agricultural plots.

In addition to earwig origin, AChE inhibition after chlorpyrifos exposure depended on sex. In previous studies, we have shown that *F. auricularia* males are more sensitive to OP and neonicotinoid insecticides than females (Malagnoux et al., 2014, Malagnoux et al., 2015a). Here, both the *in vivo* response of AChE and the Hsp70 induction observed after chlorpyrifos-ethyl exposure, support the sex-specific sensitivity in earwig species.

Insecticide resistance is frequently associated with fitness costs, explaining why susceptible genotypes increase in frequency when insecticide pressure is relaxed (Foster et al 2017). It is well known that re-allocation of energy reserves to maintain homeostasis under pesticide exposure mainly focuses on protein induction to improve defense mechanisms, which often involve overproduction of detoxification enzymes (Calow, 1991; Kooijman, 2010). Earwigs from conventional

orchards increase their detoxification metabolism and thus divert energy from maintenance and growth. Indeed, *F. auricularia* weighed less and had smaller morphometric traits (inter-eye distance, femur length) in conventional than organic orchards (Suchail et al., 2018) which is consistent with the interpretation of energy re-allocation to the actual induction of GSTs and higher CbE levels. However, we have shown that the main impact on energy reserves, expression levels of resistance-related transcripts and the developmental rate of the F1 generation is exerted by a general anthropogenic use of the orchards rather than by the usage of distinct pesticides.

In summary, these results pave the way for future ecotoxicological studies, further exploring the potentially diverse resistance-associated mutations and their occurrence in earwigs according to the treatment pressure.

## REFERENCES

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.
- Ahmad, S., Pozzebon, A., Duso, C. 2013. Augmentative releases of the predatory mite *Kampimodromus aberrans* in organic and conventional apple orchards. *Crop Prot.* 52, 47–56.
- Aïzoun, N., Aïkpon, R., Gnanguenon, V., Oussou, O., Agossa, F., Padonou, G.G., Akogbéto, M. 2013. Status of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles gambiae sensu lato* from the south and north Benin, West Africa. *Parasit. Vectors* 6, 274.
- Arrese, E.L., Soulage, J.L. 2010. Insect faty body : energy metabolism and regulation. *Ann Rev Entomol* 55 :207–225.
- Bass, C., Puinean, A.M., Zimmer, C.T., Denholm, I., Field, L.M., Foster, S.P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R., Williamson, M.S. 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51, 41–51.
- Calow, P. 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 100, 3–6.
- Carson, R. 1962. Silent spring. Mifflin Company, Boston.
- Casida, J.E. 2016. Unexpected Metabolic Reactions and Secondary Targets of Pesticide Action. *J. Agric. Food Chem.* 64, 4471–4477.
- Corringer, P.J., Le Novere, N., Changeux, J.P. 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 431–458.
- Costa, L.G. 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin. Chim. Acta* 366, 1–13
- Cothran, R. D., Brown, J. M., Relyea R. A. 2013. Proximity to agri- culture is correlated with pesticide tolerance: evidence for the evolu- tion of amphibian resistance to modern pesticides. *Evolutionary Applications* 6:832–841.
- 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*). *Biol. Control* 59, 90–97.
- 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.
- Duso, C., Fanti, M., Pozzebon, A., Angeli, G. 2009. Is the predatory mite *Kampimodromus aberrans* a candidate for the control of phytophagous mites in European apple orchards? *BioControl* 54, 369–382.
- Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* 14, 3–8.
- Farnsworth, C.A., Teese, M.G., Yuan, G., Li, Y., Scott, C., Zhang, X., Wu, Y., Russell, R.J., Oakeshott, J.G. 2010. Esterase-based metabolic resistance to insecticides in heliothine and spodopteran pests. *J. Pestic. Sci.* 35, 275–289.
- Feyereisen, R., Dermauw, W., Van Leeuwen, T. 2015. Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. *Pestic Biochem Physiol* 121, 61–77.
- Foster, S.P., Devine, G., Devonshire, A.L. 2017. Insecticide resistance. In *Aphids as Crop Pests*, edn 2. Edited by VanEmden HF, Harrington R. CAB International:426–447.
- Fuentes-Contreras, E., Reyes, M., Barros, W., Sauphanor, B. 2007. Evaluation of Azinphos-Methyl Resistance and Activity of Detoxifying Enzymes in Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) from Central Chile. *J. Econ. Entomol.* 100, 551–556.
- Garnas, J.R. 2018. Rapid evolution of insects to global environmental change: conceptual issues and empirical gaps. *Curr. Opin. Insect Sci.* 29, 93–101.
- Grigg-McGuffin, K., Scott, I.M., Bellerose, S., Chouinard, G., Cormier, D., Scott-Dupree, C. 2015. Susceptibility in field populations of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), in Ontario and Quebec apple orchards to a selection of insecticides. *Pest Manag. Sci.* 71, 234–242.

- 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: 377-384.
- Hahn, D.A., Denlinger, D.L. 2007. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. *J. Insect Physiol.* 53:760-73
- Hartl, U.F. 1996. Molecular chaperons in cellular protein folding. *Nature* 381:571-580
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. 2005. Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.
- Hemingway, J., Ranson, H. 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 371-391.
- Hua, J., Jones, D.K., Mattes, B.M., Cothran, R.D., Relyea, R.A., Hoverman, J.T. 2015. The contribution of phenotypic plasticity to the evolution of insecticide tolerance in amphibian populations. *Evol. Appl.* 8, 586-596.
- Ihara, M., Okajima, T., Yamashita, A., Oda, T., Asano, T., Matsui, M., Sattelle, D.B., Matsuda, K. 2014. Studies on an acetylcholine binding protein identify a basic residue in loop G on the beta1 strand as a new structural determinant of neonicotinoid actions. *Mol Pharmacol* 86, 736-746.
- Jones, A.K., Sattelle, D.B. 2010. Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Adv Exp Med Biol* 683, 25-43.
- Kelly, S.A., Panhuis, T.M., Stoehr, A.M. 2012. Phenotypic Plasticity: Molecular Mechanisms and Adaptive Significance, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Köhler, H.-R., Triebkorn, R. 2013. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science* 341, 759-765.
- Köhler, H.R., Triebkorn, R., Stöcker, W., Kloetzel, P.M., Alberti, G. 1992. The 70 kD heat shock protein (hsp 70) in soil invertebrates: a possible tool for monitoring environmental toxicants. *Arch Environ Contam Toxicol* 22:334-338
- Kooijman, S.A.L.M. 2010. Dynamic energy budget theory for metabolic organisation. Cambridge university press.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou-Mourkidou, E. 2001. The role of glutathioneS-transferases in the detoxification of some organophosphorus insecticides in larvae and pupae of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pest Manag. Sci.* 57, 501-508.
- Le Goff, G., Hilliou, F. 2017. Resistance evolution in *Drosophila*: the case of CYP6G1. *Pest Manag Sci* 73, 493-499.
- Le Navenant, A., Siegwart, M., Maugin, S., Capowiez Y., Rault, M. 2019. Metabolic mechanisms and acetylcholinesterase sensitivity involved in tolerance to chlorpyrifos-ethyl in the earwig *Forficula auricularia*. *Chemosphere* 227: 416-424.
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R. 2007. Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 231-253.
- Lindquist, S., Craig, E.A. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631-677
- Loughney, K., Kreber, R., Ganetzky, B. 1989. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* 58, 1143-1154.
- Lumjuan, N., Stevenson, B.J., Prapanthadara, L., Somboon, P., Brophy, P.M., Loftus, B.J., Severson, D.W., Ranson, H. 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1026-1035.
- Malagnoux, L., Capowiez, Y., Rault, M. 2014. Tissue distribution, characterization and in vitro inhibition of B-esterases in the earwig *Forficula auricularia*. *Chemosphere* 112, 456-464.
- Malagnoux, L., Capowiez, Y., Rault, M. 2015b. Impact of insecticide exposure on the predation activity of the European earwig *Forficula auricularia*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 14116-14126.
- Malagnoux, L., Marliac, G., Simon, S., Rault, M., Capowiez, Y. 2015a. Management strategies in apple orchards influence earwig community. *Chemosphere* 124, 156-162.
- Mazzia, C., Pasquet, A., Caro, G., Thénard, J., Cornic, J.-F., Hedde, M., Capowiez, Y. 2015. The impact of management strategies in apple orchards on the structural and functional diversity of epigeal spiders. *Ecotoxicology* 24, 616-625.
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R.S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P.B., Ware, J., Flouri, T., Beutel, R.G., et al. 2014. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346, 763-767.
- Moerkens, R., Leirs, H., Peusens, G., Beliën, T., Gobin, B. 2012. Natural and human causes of earwig mortality during winter: temperature, parasitoids and soil tillage: Earwig mortality during winter. *J. Appl. Entomol.* 136, 490-500.
- 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. *Entomol. Exp. Appl.* 137, 19-27.
- Nath, B.S. 2003. Shifts in glycogen metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Pest Biochem Physiol* 74 :73-84.
- Nelson, D.R. 2009. The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics* 4, 59-65.
- Nestel, N.D., Papadopoulos, N.T., Pascacio-Villafán, C., Righini, N., Altuzar-Molina, A.R., Aluja, M. 2016. Resource allocation and compensation during development in holometabolus insects. *J Insect Physiol* 95:78-88.
- Pan, Y., Guo, H., Gao, X. 2009. Carboxylesterase activity, cDNA sequence, and gene expression in malathion susceptible and resistant strains of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 152, 266-270.
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.-P. 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 540-551.

- Puinean, A.M., Foster, S.P., Oliphant, L., Denholm, I., Field, L.M., Millar, N.S., Williamson, M.S., Bass, C. 2010. Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus persicae*. *PLOS Genet.* 6, e1000999.
- R4P, 2016. Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection. *Trends Plant Sci.* 21, 834–853.
- Rault, M., Collange, B., Mazzia, C., Capowicz, Y. 2008. Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion. *Soil Biol. Biochem.* 40, 3086–3091.
- Reyes, M., Collange, B., Rault, M., Casanelli, S., Sauphanor, B. 2011. Combined detoxification mechanisms and target mutation fail to confer a high level of resistance to organophosphates in *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 99, 25–32.
- Rharrabe, K., Amri, H., Bouayad, N., Sayah, F. 2008. Effects of azadirachtin on post-embryonic development, energy reserves and  $\alpha$ -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *J Stored Prod Res* 44 :290-294.
- Ribeiro, S., Sousa, J.P., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M. 2001. Effect of Endosulfan and Parathion on Energy Reserves and Physiological Parameters of the Terrestrial Isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotox Environ Safety* 49 :131-138.
- Rinkevich, F.D., Du, Y., Dong, K. 2013. Diversity and Convergence of Sodium Channel Mutations Involved in Resistance to Pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol* 106, 93-100.
- Roulin, A.C., Wu, M., Pichon, S., Arbore, R., Kuhn-Buhlmann, S., Kolliker, M., Walser, J.C. 2014. De novo transcriptome hybrid assembly and validation in the European earwig (Dermaptera, Forficula auricularia). *PLoS One* 9, e94098.
- Sauphanor, B., Chabrol, L., d’Arcier, F.F., Sureau, F., Lenfant, C. 1993. Side effects of diflubenzuron on a pear psylla predator: *Forficula auricularia*. *Entomophaga* 38, 163–174.
- Sauphanor, B., Simon, S., Boisneau, C., Capowicz, Y., Rieux, R., Bouvier, J.-C., Defrance, H., Picard, C., Toubon, J.-F. 2009. Protection phytosanitaire et biodiversité en agriculture biologique. Le cas des vergers de pommiers. *Innov. Agron.* 4, 217–228.
- Schlesinger, M.J. 1990. Heat shock proteins. *J Biol Chem* 265:12111– 12114
- Schmidt-Jeffris, R.A., Beers, E.H. 2018. Potential impacts of orchard pesticides on *Tetranychus urticae*: A predator-prey perspective. *Crop Prot.* 103, 56–64.
- Sharley, D.J., Hoffmann, A.A., Thomson, L.J. 2008. The effects of soil tillage on beneficial invertebrates within the vineyard. *Agric. For. Entomol.* 10, 233–243.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Sogorb, M.A., Vilanova, E. 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* 128, 215–228.
- Steele, J.E. 1982. Glycogen phosphorylase in insects. *Insect Biochem.* 12 (2) :131-147.
- Suchail, S., Le Navenant, A., Capowicz, Y., Thiéry, A., Rault, M. 2018. An exploratory study of energy reserves and biometry as potential tools for assessing the effects of pest management strategies on the earwig, *Forficula auricularia* L. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 22766–22774.
- Tirello, P., Pozzebon, A., Cassanelli, S., Van Leeuwen, T., Duso, C. 2012. Resistance to acaricides in Italian strains of *Tetranychus urticae*: toxicological and enzymatic assays. *Exp. Appl. Acarol.* 57, 53–64.
- Valles, S.M., Yu, S.J. 1996. Detection and Biochemical Characterization of Insecticide Resistance in the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 89, 21–26.
- Voudouris, C.C., Sauphanor, B., Franck, P., Reyes, M., Mamuris, Z., Tsitsipis, J.A., Vontas, J., Margaritopoulos, J.T. 2011. Insecticide resistance status of the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from Greece. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100, 229–238.
- 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), in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, NY, pp. 117–178.
- Wheelock, C.E., Shan, G., Ottea, J. 2005. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *J. Pestic. Sci.* 30, 75–83.
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., Devonshire, A.L. 1996. Identification of mutations in the housefly paratype sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet* 252, 51-60.
- Yu, S.J., Nguyen, S.N. 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pestic. Biochem. Physiol.* 44, 74–81.
- Zhu, K.Y., Lee, S.H., Clark, J.M. 1996. A Point Mutation of Acetylcholinesterase Associated with Azinphosmethyl Resistance and Reduced Fitness in Colorado Potato Beetle. *Pestic Biochem Physiol* 55, 100-108.
- Ziegler, R. 1991. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. *J Comp Physiol Part B* 161 :125-131.
- Ziegler, R., Van Antwerpen, R. 2006. Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36:264–72.

## IMPACT OF THE PROJECT

The results obtained during the I-ResPect project has been extensively disseminated through seminars to farmers, producers organizations and associations as well as during meeting or scientific congresses on ecology, resistance to pesticides and ecotoxicology (see below in the next section).

Moreover, in the context of coordinated Integrated Pest Management, the efficiency and sustainability of combinations of practices, which are alternative to chemicals to control apple pests, should be considered. According to this current ecotoxicological challenge our integrated approach improved the knowledge of how insecticides affect various biological functions involved in the maintenance of natural enemies population. It helps to link environmental stress to adaptive capacities processes and contributes to develop novel control pest strategies, less harmful for ecosystems and health. Natural enemies biology (diet, dispersal, lifecycle, life history traits) as well as abundance, diversity and/or efficacy is important to consider. In that context, our results could help to develop practices related to the design of agroecological infrastructures to enhance food resources and shelters for pest natural enemies. However, whereas a subsequent increase in natural enemies abundance and/or diversity is well documented, pest decrease is not always observed. Among aphid antagonists, predatory generalists such as earwigs (*Forficula auricularia*) show great predation potential. It is therefore important to consider both the presence and the functional role of biocontrol agent to improve non-pesticide control methods. As an example, natural enemies release could contribute to successfully control the whole pest complex. In particular, early releases of tolerant earwigs could be tested to better match the incidence of aphids in orchards. This topic is part of an European project C-IPM (API-Tree “Developing Apple Pest control strategies through an Integrated Agro-ecosystem approach” 2017-2020).

## OUTREACH & DISSEMINATION

### LIST OF SCIENTIFIC PUBLICATIONS

#### ***Publications***

1. Le Navenant A., Siegwart M., Maugin S., Capowiez Y., Rault M. “Metabolic mechanisms and acetylcholinesterase sensitivity involved in resistance to chlorpyrifos-ethyl in the earwig *Forficula auricularia* “ 2019. *Chemosphere* 227: 416-424.
2. Suchail, S., Le Navenant, A., Capowiez, Y., Thiéry, A., Rault, M., 2018. “An exploratory study of energy reserves and biometry as potential tools for assessing the effects of pest management strategies on the earwig, *Forficula auricularia* L. “ *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 22766–22774.
3. Le Navenant A., Brouchoud C., Maugin S., Siegwart M., Capowiez Y., Rault M., Köhler H-R. “Role of Hsp70 in the resistance to organophosphorus insecticide in the earwig *F. auricularia*”. *in prep* 2019.
4. Le Navenant A., Brouchoud C., Malik C., Viala B., Capowiez Y., Rault M., Suchail S.. “Misappropriation of energy flow and impact of life traits on resistance to organophosphorus insecticide on earwig *F. auricularia*”. *in prep* 2019.
5. Rault M., Le Navenant A., Franoux L., Malagnoux L., Brouchoud C., Suchail S., Capowiez Y. “Inter-generational effects of management strategies on earwig fitness traits: fecundity, offspring size and susceptibility to insecticide”. *in prep* 2019.

### **Oral communications**

1. Le Navenant A., Siegwart M., Rault M. "Impact des pratiques culturales utilisées en verger de pommiers sur la sensibilité aux pesticides et sur les traits de vie de *Forficula auricularia* L". SFR Tersys (Avignon, France) 2019.
2. Le Navenant A., Siegwart M., Capowiez Y., Rault M. "Impact des traitements phytosanitaires chez l'auxiliaire *Forficula auricularia* L. en vergers de pommiers". SEFA (Montpellier, France) 27-28 juin 2018.
3. Le Navenant A., Siegwart M., Rault M. "Impact des traitements phytosanitaires chez l'auxiliaire *Forficula auricularia* L. en vergers de pommiers" Journée des doctorants IMBE 2018.
4. Le Navenant A., Siegwart M., Rault M. "Impact des pratiques culturales en vergers de pommier sur la sensibilité aux insecticides et sur les traits de vie de *Forficula auricularia* L.". Journée des doctorants IMBE 2017.
5. Rault M. Capowiez Y. ALZUBIK S., Mazzia M., Pasquet A. "Impacts des modes de protection phytosanitaires sur les prédateurs généralistes en vergers de pommiers. Quels indicateurs efficaces?" Fondation Rovaltain (Alixan, France) October 2017.
6. Capowiez Y. Indicateurs biologiques d'impacts liés à la régulation naturelle des ravageurs en arboriculture fruitière. Colloque Recherche. 22-24 March 2017.

### **Posters**

1. Le Navenant A., Siegwart M., Capowiez Y., Rault M., Suchail S. "Resistance in the non-target earwig *Forficula auricularia* to agricultural pesticides". 8th International Meeting on Pesticide Resistance. Resistance'19 (Rothamsted, UK) 16-18 September 2019.
2. Fricaux T., Le Navenant A., Coustau C. Le Goff G. "Insecticide resistance of earwigs: comparison between conventional, integrated pest and organic management of orchards. 8th International Meeting on Pesticide Resistance. Resistance'19 (Rothamsted, UK) 16-18 September 2019.
3. Le Navenant A., Siegwart M., Capowiez Y., Rault M. "Insecticide resistance in the natural enemy *F. auricularia*: detoxification pathways and sensitivity to organophosphorus insecticide". SETAC (Rome, Italy) 13-17 May 2018.
4. Le Navenant A., Siegwart M., Capowiez Y., Rault M. "Impact des traitements phytosanitaires chez l'auxiliaire de culture *Forficula auricularia* L. en vergers de pommiers". SEFA (Lille, France) 29-30 juin 2017.

### **SYNERGIES WITH SCIENCE EDUCATION**

Thanks to the I-ResPect project, we obtained a financial support for a PhD fellowship from October 2016 to September 2019.

Adrien LE NAVENANT, the PhD student, participated to the JER2017, "Journées d'Echanges sur les Résistances aux produits de protection des plantes" yielded on 7-8 March 2017, (Bordeaux, France) and organized by the R4P (Réseau de Réflexion et de Recherches sur les Résistances aux Pesticides).



The I-ResPect project allowed the different partners to welcome trainees thanks to the gratuity of a total of 13 internship months:

- 6 months internship for a Master II degree
- 2 times 2,5 months internship for 2 different students from a technological institute
- 2 months internship for a graduate degree

These students helped to greatly support lab works and field experiments.

Moreover, we taught ecotoxicology and occurrence of resistance to insecticide in beneficial organisms at Avignon University.

In that context the research team "Biomarkers, Environment, Health" IMBE, located on Avignon University campus obtained a financial support to build an outdoor insectarium (40 000€ in works) to develop their research project concerning rearing programs either on earwigs and spiders.

### **MEDIA AND COMMUNICATION TO THE GENERAL PUBLIC**

1. Front of science: Public discussion and roundtable on the scientific thematic: "Climate change and new agricultural practices" Le Navegant A. Avignon University (France) 10 April 2019.
2. Fête de la science: Scientific workshops and exhibitions for kids : The role of natural enemies in apple orchards. Le Navegant A. Avignon University. 7-15 October 2017 & 6-14 October 2018.
3. Seminar to producers from the « Coopérative PERLIM ». "Le rôle fonctionnel des prédateurs généralistes (forficules et araignées) en verger de pommiers contre les pucerons." Capowiez Y. Brive (France) 8-9 January 2018.
4. Pesticides et alternatives. Impacts des pratiques phytosanitaires utilisées en vergers de pommiers sur les organismes non-cibles. Les Jeudis de la Fondation. M. Rault. Rovaltain (Alixan, France) 10 September 2016.

### **DEVIATIONS FROM INITIAL WORKING PLAN:**

There is no major deviation from our initial project. As explained in the interim report, the only difficulties we met concerned the measurements of the mixed-function oxidases cytochrome-P450-dependant activity, due to the fluorescence of endogenic molecules. As mentioned previously, this part was then investigated following the expression of cytochrome P450 genes involved in detoxification pathways.

### Annexe 3: Posters

Poster 1: **Le Navenant A.**, Brouchoud C., Siegwart M., Capowiez Y., Rault M., Suchail S. "Impacts of agricultural management on energetic reserves and morphometric traits in two succeeding generations of the earwig *F. auricularia*." **8th International Meeting on Pesticide Resistance. Resistance 19' (Rothamsted, UK)** 16-18 September 2019

Poster 2: Fricaux T., **Le Navenant A.**, Coustau C., Le Goff G. "Insecticide resistance of earwigs: comparison between conventional, integrated pest management, and organic management of orchards" **8th International Meeting on Pesticide Resistance. Resistance 19' (Rothamsted, UK)** 16-18 September 2019

Poster 3: **Le Navenant A.**, Siegwart M., Capowiez Y., Rault M. "insecticide resistance in the natural enemy *F. auricularia*: detoxification pathways and sensitivity to organophosphorus insecticide". **SETAC (Rome, IT)** 13-18 May 2018

Poster 4: **Le Navenant A.**, Siegwart M., Capowiez Y., Rault M. "Impact des traitements phytosanitaires chez l'auxiliaire de culture *Forficula auricularia* L. en vergers de pommiers" **SEFA (Lille, FR)** 29-30 juin 2017

## Impacts of agricultural management on energetic reserves and morphometric traits in two succeeding generations of the earwig *F. auricularia*



A. Le Navenant<sup>(1)(2)</sup>, C. Brouchoud<sup>(1)</sup>, M. Siegwart<sup>(2)</sup>, Y. Capowiez<sup>(3)</sup>, M. Rault<sup>(1)</sup>, S. Suchail<sup>(1)</sup> Resistance 19

(\*) adrien.lenavenant@imbe.fr

(1) IMBE UAPV UMR 7263, Pôle Agrosociétés, 301 rue Baruch de Spinoza, BP 21239, 84916 Avignon cedex 9,  
(2) INRA, Unité PSH, 84914 Avignon cedex 9 ; (3) INRA UMR EMMAH, 84914 Avignon cedex 9



### Context



**The earwig *Forficula auricularia*** is an effective generalist predator in apple orchards on pest like aphids. It is present in Conventional (Conv), Integrated Pest Management (IPM), and Organic (O) orchards with Treatment Frequency Index (TFI) varying from Conv > IPM > Organic.

*F. auricularia* is exposed to pesticides by contact with leaves and trunk.

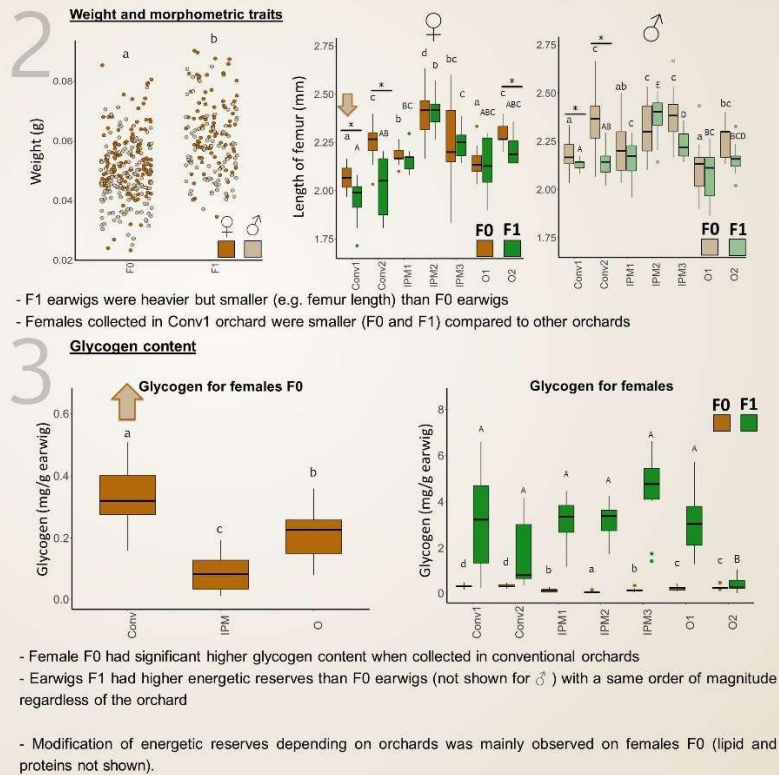
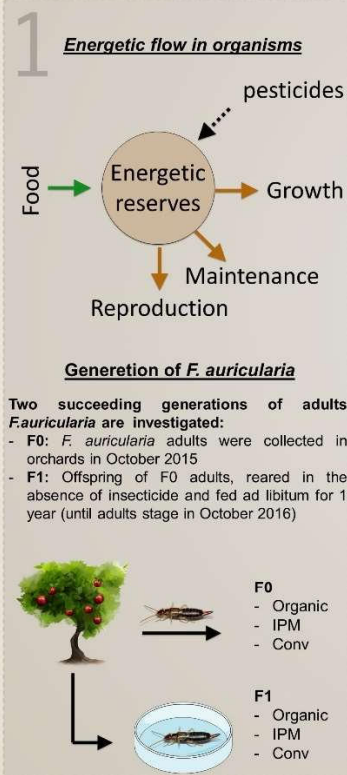
Earwigs with high historic level of pesticide exposure (conventional) have been shown to acquire tolerance to insecticides<sup>(1)</sup> with :  
→ A decrease in sensitivity of acetylcholinesterase (target of organophosphorus insecticides)

→ A higher level of constitutive Glutathione-S-Transferases and Carboxylesterases activities involved in detoxification.

Moreover, when collected from IPM compare to Organic orchards during the pesticide application period, *F. auricularia* exhibited smaller morphometric traits and lower energetic reserves<sup>(2)</sup>.

<sup>1</sup>Le Navenant, A et al. 2019 Chemosphere 227, 416–424. <sup>2</sup>Suchail et al. 2018 ESPR 25, 22766–774.

### Is there any modification in morphometric traits and energetic content in earwigs collected in orchards under different management strategies and their progeny?



### Conclusion



We confirmed previous results<sup>(2)</sup> concerning lower morphometric traits of earwigs F0 collected in highly treated orchards compared to organic ones. Despite the fact that offspring were smaller than their parents (regardless the management strategy), the progeny of earwigs collected in conventional orchards were still smaller than all the others.

Due to the breeding conditions (food ad libitum) all the earwigs F1 exhibited higher weights and energetic reserve content than their parents.

The high glycogen content observed in females F0 collected in conventional orchards, 2 months after the end of treatments, supports a reallocation of reserves to the reproduction. This is an interesting result compare to a low content detected during the full treatment period when reserves were preferentially allocated to maintenance<sup>(2)</sup>.

**Female are able to quickly adapt their energetic flow when the pesticide exposure is relaxed, from maintenance to reproduction.**

**The breeding conditions (absence of pesticide application) allowed the earwigs to reach the same order of magnitude in reserve content and weight despite the origin of their parents**

# Target mutation and expression level involved in insecticide resistance of earwigs

Thierry FRICAUX<sup>a</sup>, Adrien LE NAVENANT<sup>b</sup>, Magali RAULT<sup>b</sup>, Christine COUSTAU<sup>a</sup>, Gaëlle LE GOFF<sup>a</sup>

<sup>a</sup>UCA, INRA, CNRS, Institut Sophia-Agrobiotech, Sophia-Antipolis, France - <sup>b</sup>Avignon université, Aix Marseille univ, CNRS, IRD, IMBE, Avignon, France



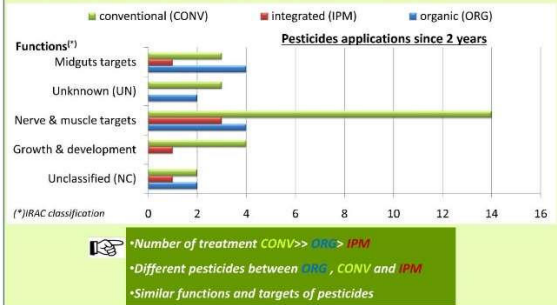
## Introduction:

In France, approximately 37,000 ha of apple orchards are sprayed with agrochemicals with, on average, more than 30 pesticide applications per year <sup>(1)</sup>. Reducing pesticide treatments is an important challenge in apple orchards. *Forficula auricularia* is a significant generalist predator of a range of orchard pests <sup>(2)</sup>. However, earwigs are exposed to the same treatments than pests and can develop resistance <sup>(3)</sup>. Because earwig resistance to pesticide has been poorly studied so far, here we started investigating potential genetic resistance mechanisms from earwigs collected in orchards.



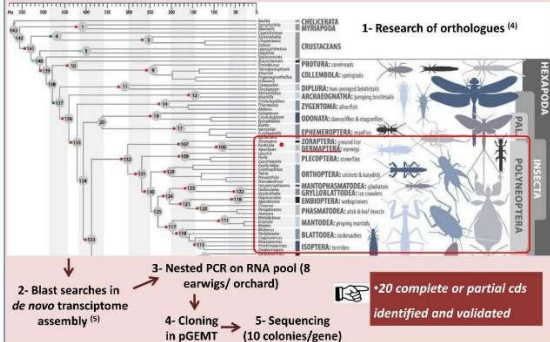
## I-Orchard treatments:

Earwigs were collected in several orchards from the south-east of France: conventional, integrated or organic and not treated. They were subjected to treatments with neonicotinoids, organophosphorus, pyrethroids, anthranilic diamide, avermectin, flonicamid, spinosyn, fenoxycarb, tetric acid, granuloviruses, paraffin oil (NC), sexual pheromone (NC), micronized sulfur (UN) and azadirachtin (UN).



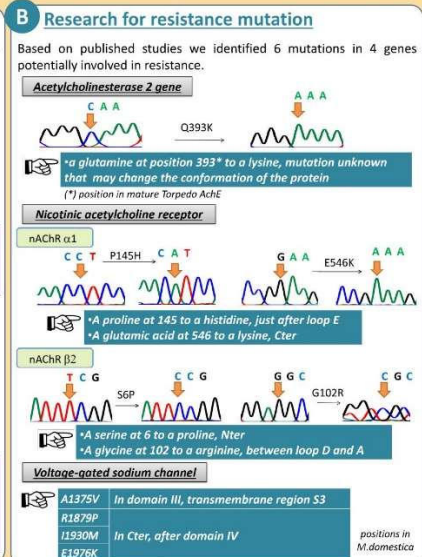
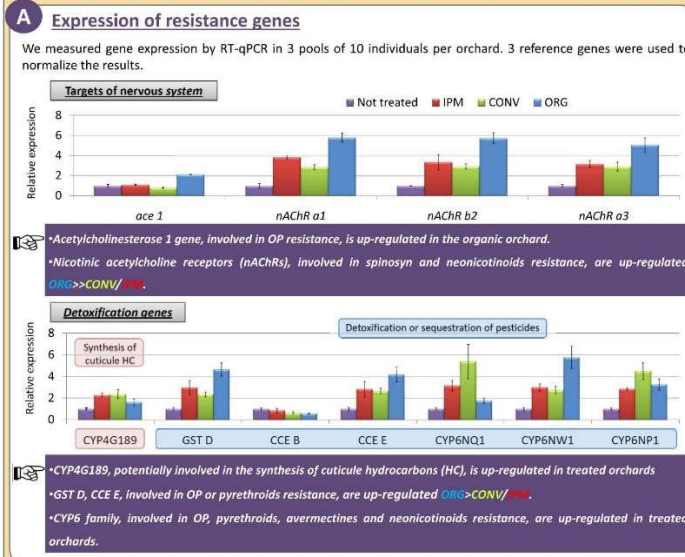
## II- Identification of target and detoxification genes:

The two major mechanisms of insecticide resistance characterized in other insect species rely either on a modification of the insecticide target or on a degradation of the insecticide by detoxification enzymes.



## III-Gene expression and mutations:

We identified point mutations in target genes, and increased expression levels of resistance-related genes (pesticide targets or detoxification enzymes) in individuals that have been exposed to chemical and/or organic treatments.



## Conclusions and perspectives:

We identified the major pesticide targets as well as several point mutations potentially related to resistance. We also identified major detoxification enzymes and increased expression of resistance-related genes in individuals that were exposed to chemical and/or organic treatments. Altogether, these results pave the way for future ecotoxicological studies, further exploring the potentially diverse resistance-associated mutations and their occurrence in earwigs.

References: <sup>(1)</sup> Sauphanor et al. *Innovations Agronomiques* (2009); <sup>(2)</sup> J. H. McLeod et al. *The Canadian Entomologist* 84: 11 (1952); <sup>(3)</sup> Le Navenant et al. *Chemosphere* (2019); <sup>(4)</sup> Misof et al., *Science* (2014); <sup>(5)</sup> Roulin et al. *Plos One* (2014).

Financial support: This work was supported by the Royaltain Foundation (I-ResPect project)





## Insecticide resistance in the natural enemy *F. auricularia* : detoxification pathways and sensitivity to organophosphorus insecticide.



Adrien LE NAVENANT<sup>(1)(2)</sup>, Myriam SIEGWART<sup>(2)</sup>, Yvan CAPOWIEZ<sup>(3)</sup>, Magali RAULT<sup>(1)</sup>

(\*) adrien.le-navenant@imbe.fr (1) IMBE UAPV UMR 7263, Pôle Agrosociétés, 301 rue Baruch de Spinoza, BP 21239, 84916 Avignon cedex 9, (2) INRA, Unité PSH, 84914 Avignon cedex 9 ; (3) INRA UMR EMMAH, 84914 Avignon cedex 9

### Context



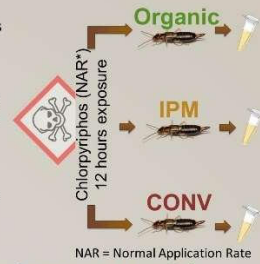
***Forficula auricularia*** is an effective generalist predator in apple orchards on pest like aphids. It is present in organic, integrated production management (IPM) and conventional (Conv) orchards.

*F. auricularia* is exposed to the pesticides used in orchards by contact with leaves and trunks.

**Insecticides** : Chlorpyrifos-ethyl is the active substance of Pyrinex®, an **organophosphorus** insecticides (OP) used in apple orchard against pest species. This insecticide inactivates acetylcholinesterase activity (AChE).

#### Metabolic pathways involved in defense and detoxification :

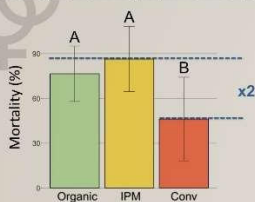
- Carboxylesterases (CbEs) are involved in the protection of AChEs by scavenging OP insecticides
- Glutathione-S-transferases (GST) are involved in detoxification pathways



**→ Do earwigs (*Forficula auricularia*) collected from different management strategies orchards, develop resistance to organophosphorus insecticides ?**

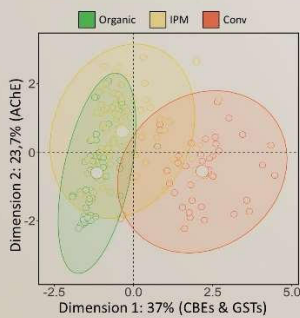
### Results

#### Mortality following Pyrinex® exposure



⚡ Mortality in earwigs from conventional orchard  
Earwigs from Conventional orchards are less sensitive to Pyrinex

#### FAMD : Control earwigs

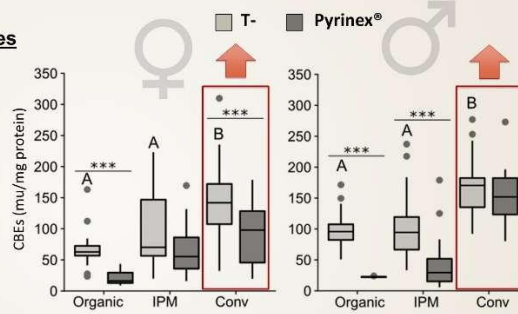


CbEs and GSTs activities discriminate earwigs from conventional orchards compare to organic and IPM.

#### AChE activity is inhibited after Pyrinex® exposure in earwigs from all orchards

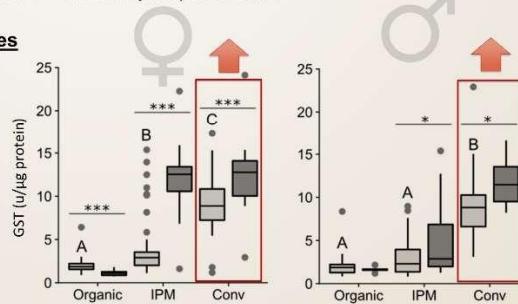
No difference either in threshold AChE activity or in AChE inhibition was observed between orchard.

#### CbE activities



Threshold activities: CbE activities are higher in females and males collected in conventional orchards. Pyrinex® exposure : ⚡ CbE activity compare to control

#### GST activities



Threshold activities: GST activities increase from Organic and IPM to conventional orchards. Pyrinex® exposure : ⚡ GST activity compare to control


### Conclusion



- Mortality decreased in earwigs from conventional orchard in comparison to IPM or Organic orchards after insecticide exposure.
- Threshold activities of metabolic pathways involved in insecticide resistance are higher in earwigs collected in conventional orchards.
- The addition of Pyrinex® induced a decrease in AChE (target of insecticide) and CbE activities.
- Insecticide exposure induced an increase in GST activities in surviving earwigs.




**In conventional apple orchards, *F. auricularia* earwigs exhibit a resistance to organophosphorus insecticides**



# Impact des pratiques phytosanitaires sur la sensibilité de *Forficula auricularia* L. en vergers de pommiers

Adrien LE NAVENANT<sup>(1)(2)</sup>, Myriam SIEGWART<sup>(2)</sup>, Yvan CAPOWIEZ<sup>(3)</sup>, Magali RAULT<sup>(1)</sup>

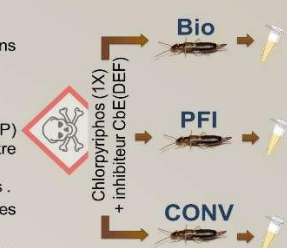


---

## Contexte & protocole

***Forficula auricularia*:**  
*F. auricularia* est une espèce de forficule, **prédateur généraliste** efficace notamment sur certains **ravageurs** clés comme les pucerons. Il est présent dans les vergers de pommiers biologiques (Bio) intégrés (PFI) et conventionnels (Conv)


**Insecticides & inhibiteurs des voies métaboliques de défense:**  
 → Le Chlorpyrifos-éthyl est la matière active du Pyrinex®, insecticide organophosphoré (OP) réduisant l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), Il est utilisé en verger de pommier contre les ravageurs  
*F. auricularia* est exposé à ce dernier principalement par contact avec les feuillages / tronc traités .  
 → Les Carboxylestérases (CbE) sont impliquées dans la protection de l'AChE vis-à-vis des insecticides OP. Les CbEs sont inhibées par le DEF  
 → Les Glutathion-S-transférases (GST) sont elles aussi impliquées dans le métabolisme de détoxification



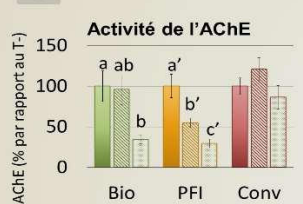
→ **Quels sont les effets des différents traitements agricoles sur la sensibilité de *Forficula auricularia* aux insecticides organophosphorés ?**

---

## 1 Terrain



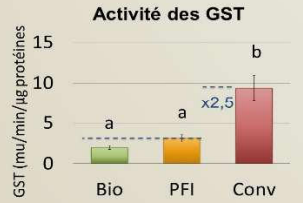
### Activité de l'AChE



**AChE:**  
L'ajout du Pyrinex® + DEF entraîne une inhibition de l'AChE pour le Bio et PFI.


Pas de différence pour le Conv  
 ↳ activité conservée de l'AChE même en présence de Pyrinex®+ DEF

### Activité des GST

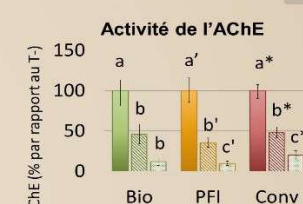


**GST:**  
Pas de différence entre traitement T- / Pyrinex® / Pyrinex® + DEF  
L'activité des **GSTs** pour le **Conv** est supérieure d'un **facteur 2,5** par rapport aux autres modalités

## 2 Elevage (F1)



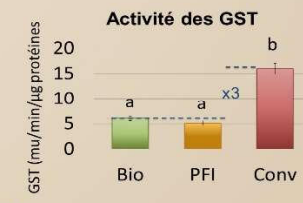
### Activité de l'AChE



**AChE :**  
Inhibition plus importante chez les F1 que chez les individus du terrain.

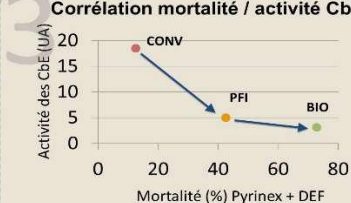
**Conv:** Gradient d'activité de l'AChE en fonction des modalités

### Activité des GST



**GST:**  
Pas de différence entre traitement T- / Pyrinex® / Pyrinex® + DEF  
L'activité des **GSTs** pour le **Conv** est supérieure d'un **facteur 3** par rapport aux autres modalités

## 3 Corrélation mortalité / activité CbE



**Pyrinex® en présence de DEF entraîne une augmentation de la mortalité**

↳ Rôle protecteur des CbEs  
**Mortalité:** Bio > PFI > Conv  
**L'inhibition CbE :** Bio > PFI > Conv

→ Corrélation entre la mortalité et les CbEs

Les barres d'erreurs sont des erreurs standards

## Conclusion

- La **mortalité** est très **faible** en Conventionnel par rapport aux autres modalités (Bio ou PFI)
- L'action inhibitrice spécifique du DEF est bien confirmée sur les CbEs.
- Les CbE ont une **action protectrice** de l'AChE car l'activité AChE diminue en présence de DEF+Pyrinex®

**Chez les individus provenant de vergers conventionnels:**

**Aucune inhibition de l'AChE** même quand les CbEs sont inhibées.

→ Quels sont les moyens de protection mis en place contre l'action du Pyrinex®?  
 Plusieurs hypothèses possibles  
 → l'AChE est modifiée (mutation qui change son affinité pour le Pyrinex®)  
 → Augmentation de l'activité des GSTs

**Scannez moi !**



(1) IMBE UAPV UMR 7263, Pôle Agrosociétés, 301 rue Baruch de Spinoza, BP 21239, 84916 Avignon cedex 9; (2) INRA, Unité PSH, Equipe Ecologie de la Production Intégrée, Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9; (3) INRA UMR EMMAH, Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9

