

Influence de facteurs abiotiques ou biotiques sur l'évaluation de la sensibilité d'*Aphidius rhopalosiphi* De Stefani-Perez à la phosalone

O. GUELTON¹, TH. MAHAUT², R. DELEU¹, B. SCHIFFERS¹
R. PALM³ & J-J. CLAUSTRIAUX³

Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx), Unité de Chimie analytique et Phytopharmacie (Prof. A. Copin)¹

Ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture

Centre de Recherches Agronomiques de Gembloux (CRAGx), Département de Lutte biologique et de Ressources phytogénétiques, Unité de Zoologie (Dir. G. Latteur)²
FUSAGx, Unité de Statistique et Informatique³

Résumé

MEAD-BRIGGS (1992) a proposé une méthode de laboratoire permettant d'évaluer la toxicité de contact d'un pesticide à l'égard d'*Aphidius rhopalosiphi* De Stefani-Perez, un parasitoïde des pucerons des céréales. L'influence de l'humidité relative, de la photopériode, du mode de conservation des momies ainsi que du sexe des insectes sur la sensibilité des parasitoïdes à la phosalone a été étudiée. L'humidité relative influence le plus la sensibilité des insectes lors des essais, le mode de conservation des momies se révèle important lui aussi.

Introduction

L'entrée en vigueur de la directive européenne 91/414/CEE réglementant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques impose désormais l'évaluation des effets des pesticides vis-à-vis des arthropodes utiles. Une des espèces d'arthropodes retenues pour cette évaluation est *Aphidius rhopalosiphi* De Stefani-Perez (*Hymenoptera, Aphidiidae*), qui parasite les pucerons des céréales.

La directive 96/12/CE précise le type d'essais requis dans le cadre de cette nouvelle réglementation. Concernant les effets des pesticides envers les auxiliaires, elle se réfère aux recommandations contenues dans le document intitulé "Guidance document on regulatory testing procedures for pesticides with non-target arthropods" (BARETT *et al.*, 1994).

¹ Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux

² Chemin de Liroux 2, B-5030 Gembloux

³ Avenue de la Faculté d'Agronomie 8, B-5030 Gembloux

D'après celles-ci, la première étape dans l'évaluation de la toxicité d'un composé consiste à le tester en conditions de laboratoire sur un substrat inerte. MEAD-BRIGGS (1992) a proposé, pour *A. rhopalosiphi*, une méthode qui permet d'évaluer la toxicité et les effets secondaires des pesticides appliqués dans de telles conditions. Cette méthode a été légèrement modifiée en 1997 (MEAD-BRIGGS, 1997) et est utilisée notamment par MAHAUT & DELEU (1998) et DELEU & MAHAUT (1998).

L'objectif de ce travail est de vérifier, toujours en conditions de laboratoire, si des facteurs expérimentaux, tels que l'humidité relative, la photopériode appliquées lors des essais, le mode de conservation des insectes ainsi que leur sexe, influencent ou non l'évaluation de leur sensibilité à la phosalone.

Matériel et méthodes

PRODUCTION D'*A. RHOPALOSIPHI*

Production de la plante hôte des pucerons

Des pots en plastique de huit cm de diamètre contiennent de la vermiculite (Sibli grade 3) humidifiée à la base des pots par de l'eau de distribution. Une quinzaine de grains de froment *Triticum aestivum* L. cv. Estica sont semés dans chaque pot. La germination des grains s'effectue en chambre conditionnée maintenue à une température de 16,5°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) et à une humidité relative de 80% \pm 3%. La luminosité est de 4500 lux fournis par 11 tubes néons, placés à 80 cm des pots.

Production des pucerons hôtes

Les plants de froment produits sont retirés de la chambre conditionnée au stade première feuille. Dans chaque pot, une vingtaine de pucerons des céréales (*Sitobion avenae* F. et *Metopolophium dirhodum* Wlk.) de différents stades sont déposés. Ces pots sont ensuite recouverts d'une enceinte cylindrique en Plexiglas de 18 cm de haut et de huit cm de diamètre. La partie supérieure des cylindres est obturée au moyen d'une gaze et deux ouvertures latérales (4 \times 0 cm) sont découpées et également recouvertes de gaze pour permettre l'aération des enceintes. Les pots sont ensuite conservés dans une chambre conditionnée maintenue à une température de 18°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) et dont la photopériode est de 16 heures sous 5000 lux fournis par 14 tubes néons. L'humidité relative est de 70% ($\pm 2\%$).

*Production d'*A. rhopalosiphi**

Une cage dite "d'infestation", adaptée de celle proposée par Stäry (1966), est constituée d'une enceinte parallépipédique (40 \times 40 \times 60 cm) dont les parois latérales sont munies d'un treillis à fine maille pour permettre l'aération. Les parois inférieure et supérieure sont en

Plexiglas. L'accessibilité est rendue possible par les parois frontales constituées d'un voile de gaze muni d'un orifice.

Des pots de froment infestés de pucerons des céréales sont placés dans cette cage. Quelques couples d'hyménoptères (autant de couples que de pots de froment) sont lâchés dans cette enceinte et y restent durant 24 heures pour permettre la ponte des femelles. Les pots de froment sont ensuite retirés et recouverts de leur manchon en Plexiglas.

Dix jours après l'infestation, les "momies" (ou pucerons parasités) sont récoltées et mises individuellement dans un tube en verre de quatre cm de long et 0,8 mm de diamètre. Ces tubes sont conservés à température ambiante ($20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) ou en chambre conditionnée maintenue à 2°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$).

APPLICATION DE LA PHOSALONE

La formulation utilisée est une suspension concentrée à 500 g/l de phosalone (Zolone® Flo de Rhône-Poulenc Agro). L'utilisation de la phosalone se justifie par sa longue rémanence sur le verre.

Au moyen d'une pipette graduée, cette formulation est diluée dans de l'eau de distribution afin de respecter la dose maximum d'utilisation au champ qui est de 750 g de phosalone par hectare en culture de céréales. La bouillie est ensuite appliquée sur des disques de verre de cinq cm de diamètre et de 0,13 à 0,17 mm d'épaisseur par un pulvérisateur pneumatique (CAUSSIN, 1993). Un contrôle gravimétrique antérieur et postérieur à l'application de la bouillie est effectué pour s'assurer du réglage correct du pulvérisateur. Celui-ci est réglé pour appliquer un volume de 200 l de bouillie par ha. Au total, 300 disques de verre ont été traités avec la même bouillie. Les disques sont ensuite conservés jusqu'à leur utilisation dans une chambre obscure maintenue à $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

DESCRIPTION DES BIOESSAIS

Chaque essai comporte huit cellules (5 traitées et 3 témoins) contenant chacune 10 insectes de même sexe. L'essai dure 24 heures et passé ce délai, la toxicité est mesurée en fonction de la mortalité observée dans chacune des cellules traitées. Cette mortalité observée est corrigée par la mortalité éventuellement survenue dans les cellules témoins en utilisant la formule proposée par ABBOTT (1925).

Le dispositif schématisé à la figure 1 permet d'évaluer la toxicité des résidus de phosalone sur *A. rhopalosiphi*. Ce dispositif se compose d'un anneau métallique de deux cm de hauteur percé de six orifices circulaires d'un cm de diamètre. Un morceau de gaze recouvre quatre de ces orifices pour permettre l'aération. Un orifice est obturé au moyen d'une bourre d'ouate imbibée d'eau tandis qu'un autre orifice est obturé par une bourre d'ouate imbibée d'une solution miellée (1 volume d'eau pour 1 volume de miel). Un tube latéral en aluminium de deux cm de long et 0,5 mm de diamètre relie la cellule à une pompe péristaltique. Cette pompe est réglée de manière à renouveler l'air des cellules une fois par minute.

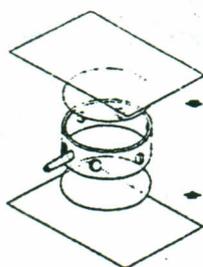


Figure 1: Cellule d'essai

Une plaque de verre de forme rectangulaire (6×9 cm) est surmontée d'un disque de verre traité. La face non traitée du disque repose sur la plaque de verre. Les insectes, préalablement anesthésiés au CO₂, sont déposés sur la face traitée du disque. La structure métallique munie des bourres d'ouate préparées quelques minutes avant l'anesthésie des insectes est déposée au-dessus de la plaque de verre. Un deuxième disque de verre est déposé

sur l'anneau métallique avec la face traitée vers l'intérieur du montage. Une plaque de verre rectangulaire de même dimension que la première recouvre ce disque de verre et le dispositif ainsi assemblé est rendu solidaire au moyen de deux élastiques.

Les cellules témoins sont assemblées de la même manière que décrite ci-dessus mais ne comportent pas de disques traités.

Les huit cellules sont ensuite reliées à la pompe péristaltique au moyen d'un tuyau en silicone. Une cellule contenant un enregistreur d'humidité relative et de température est également reliée à la pompe. L'enregistreur est programmé préalablement au moyen d'un logiciel Escort Software (version 1.00) fonctionnant sous Windows 95. L'intervalle de temps choisi entre deux mesures est de une minute et la précision des mesures est de ±3% pour l'humidité relative et de ±0,3°C pour la température.

ANALYSE DES RÉSIDUS DE PHOSALONE

Les disques de verre étant conservés jusqu'à leur utilisation, une détermination quantitative des résidus de phosalone est effectuée à trois intervalles de temps au cours de l'expérimentation pour s'assurer que la concentration en résidus de phosalone reste stable. Cette analyse fait appel à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Avant chaque analyse, les résidus de phosalone sont mis en solution dans 10 ml d'un mélange acétonitrile/acide phosphorique 0,1% (70/30 v/v).

Conditions d'analyse:

HPLC BECKMAN 166 +118

Injecteur automatique, boucle de 20 µl

Volume injecté: 20 µl

Colonne: MN NUCLEOSIL 100-5C18 (10 cm de long et 4 mm de Ø intérieur)

Eluant: acétonitrile/acide phosphorique 0,1% (70/30 v/v), isochratique

Débit: 1,1 ml/minute

Détecteur UV

Longueur d'onde de travail $\lambda = 201$ nm

Logiciel d'acquisition des données: GOLD 8.01

FACTEURS ÉTUDIÉS

L'objectif est d'évaluer l'influence sur la mortalité des insectes de l'humidité relative, de la photopériode appliquée lors des essais, du mode de conservation des insectes ainsi que de leur sexe. Chacun de ces facteurs a été étudié à deux niveaux.

L'influence de l'humidité relative est évaluée à 60% et à 85% ($\pm 5\%$).

L'influence de la photopériode est étudiée en comparant les résultats obtenus avec une photopériode de 16 heures de luminosité (1000 lux) et ceux obtenus à l'obscurité.

Les insectes soumis à l'expérimentation sont issus de momies qui sont conservées à température ambiante ($20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) ou conservées entre 10 et 20 jours à $2^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

La sensibilité des femelles (E) et des mâles (G) est également évaluée.

Le plan d'expérience retenu est un plan factoriel 2^4 , chaque niveau (ou variante) d'un facteur étant associé à chaque niveau des autres facteurs. Les 16 combinaisons de facteurs, ou objets, ont été étudiés à raison d'une combinaison par essai. Ces essais ont été réalisés les uns à la suite des autres, deux expériences préliminaires ayant en effet montré que la population des insectes utilisés reste stable au cours du temps. Le dispositif expérimental est donc complètement aléatoire, avec cinq répétitions par essai. Toutefois, pour quatre essais, les nombres de répétitions ont été réduits à trois en raison d'un nombre insuffisant d'insectes.

Analyse des résultats

La mortalité corrigée moyenne obtenue pour chaque combinaison est reprise dans le tableau 1.

TABLEAU 1
Mortalité corrigée moyenne des cellules traitées, exprimée en %.

Humidité relative	60% ($\pm 5\%$)				85% ($\pm 5\%$)			
	E	G	E	G	E	G	E	G
Photo-période	lumière	lumière	obscurité	obscurité	lumière	lumière	obscurité	obscurité
2°C	93	67	93	86	100	100	100	100
20°C	40	57	10	30	100	96	94	98

Une différence importante est observée entre les mortalités obtenues sous une humidité relative de 85% ($\pm 5\%$) et les mortalités obtenues sous une humidité relative de 60% ($\pm 5\%$). Lorsque les essais sont effectués à 85% d'humidité relative, cinq mortalités corrigées valent 100% et les trois autres mortalités corrigées sont comprises entre 94% et 98%, avec une très

faible variabilité entre répétitions. Les mortalités corrigées obtenues lorsque les essais s'effectuent à 60% d'humidité relative sont plus variables.

Du fait des fortes différences de moyennes entre les essais réalisés à une humidité relative de 85% et ceux réalisés à 60% et de l'inégalité des variances des résultats des essais de ces deux groupes, l'analyse statistique globale de l'expérience n'est pas effectuée. L'analyse de la variance (tableau 2) est réalisée uniquement sur les résultats obtenus pour les essais effectués à une humidité relative de 60% ($\pm 5\%$). Afin de respecter la condition d'application d'égalité des variances des populations, cette analyse est réalisée après avoir effectué une transformation angulaire des données initiales qui correspondent à des pourcentages (DAGNELIE, 1998).

TABLEAU 2
Analyse de la variance à trois critères de classification.

Sources de variation	Degrés de liberté	F observées	Probabilités
Sexe	1	0,00	0,965
Mode de conservation	1	60,10	0,000 *
Photopériode	1	2,73	0,111
Sexe*Mode de conservation	1	9,08	0,006 *
Sexe*Photo-période	1	1,40	0,249
Mode de conservation*Photopériode	1	10,15	0,004 *
Sexe*Mode de conservation* Photopériode	1	0,12	0,729
Erreur	24		
Total	31		

A une humidité relative de 60% ($\pm 5\%$), on constate une différence très hautement significative du mode de conservation des momies, une différence non significative des facteurs "sexe" et "photopériode". On note également une interaction significative entre les facteurs "mode de conservation *sexe", d'une part, et "mode de conservation* photopériode", d'autre part. Pour cette raison, deux analyses séparées ont été refaites pour chacun des deux modes de conservation des momies (Tableau 3).

A une humidité relative de 60% et pour des momies conservées à 20°C, on observe une différence significative de la photopériode, une plus grande mortalité est obtenue lorsque les essais s'effectuent sous une photopériode de 16 heures (mortalité corrigée moyenne de 49%) plutôt qu'à l'obscurité (mortalité corrigée moyenne de 12%).

A une humidité relative de 60% et pour des momies conservées à 2°C, on observe une différence significative liée au sexe. La mortalité corrigée moyenne des femelles (95%) est supérieure à celle des mâles (79%).

TABLEAU 3
Analyse de la variance à 2 critères de classification.

Sources de variation	Degrés de liberté	Mode de conservation 20°C		Mode de conservation 2°C	
		F observées	Probabilités	F observées	Probabilités
Sexe	1	3,48	0,087	6,72	0,024*
Photopériode	1	8,71	0,012*	1,79	0,206
Sexe*Photo-période	1	0,26	0,621	1,79	0,206
Erreur	12				
Total	15				

Discussion

Les analyses des résidus de phosalone effectuées par chromatographie liquide à haute performance ont démontré que la concentration en résidus est restée stable au cours de l'expérimentation. La concentration moyenne en résidus de phosalone est de 6,09 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (CV = 3,8%) le premier jour d'expérimentation; 6,37 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (CV = 2,9%) le vingt et unième jour et de 6,29 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (CV = 4,4%) le dernier jour. La concentration moyenne en résidus retrouvée sur les disques de verre utilisés dans l'expérimentation est de 6,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (CV = 4,3%).

L'humidité relative à laquelle se déroulent les essais de laboratoire se révèle être le facteur le plus important. En effet, les mortalités obtenues lorsque les essais s'effectuent à 85% ($\pm 5\%$) sont très élevées (mortalités proches de 100%) et masque l'éventuel effet des autres facteurs étudiés. Il apparaît donc comme très important de déterminer l'humidité relative adéquate lors de l'évaluation de la toxicité d'un produit phytopharmaceutique.

Lorsque les essais s'effectuent sous une humidité relative de 60% ($\pm 5\%$), le mode de conservation des momies se révèle important car les mortalités obtenues sont plus importantes pour les insectes issus de momies conservées à 2°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Cette plus grande mortalité des insectes conservés au froid peut s'expliquer par la théorie du "cold shock". Selon DENLINGER *et al.* (1991), une exposition rapide à de basses températures positives provoque une altération des membranes cellulaires. Lors des essais pratiqués avec des momies ayant été conservées au froid, celles-ci passaient de 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) à 2°C $\pm 2^\circ\text{C}$ sans diminution progressive de température.

La photopériode s'est avérée exercer une influence lorsque les essais s'effectuent à une humidité relative de 60% ($\pm 5\%$) avec des insectes issus de momies conservées à 20°C. Le sexe des insectes influence également leur sensibilité à la phosalone lorsque les momies sont conservées à 2°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) et les essais réalisés sous une humidité relative de 60% ($\pm 5\%$). L'influence de la photopériode et du sexe dans ces conditions mériterait d'être confirmée.

D'autres facteurs tels que le mode d'application de la bouillie du produit phytopharmaceutique, la température, l'âge et la taille des insectes pourraient également influencer la sensibilité des parasitoïdes à la phosalone. Il serait également intéressant de vérifier si les résultats obtenus en utilisant la phosalone sont confirmés pour une autre matière active.

Remerciements

Ces recherches ont été financées par l'Administration Recherche et Développement (DG6) du Ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture, (Bruxelles, Belgique).

Summary

EFFECTS OF SOME ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL FACTORS ON THE ASSESSMENT OF THE SENSITIVITY OF *APHIDIUS RHOPALOSIPHI* DE STEFANI-PEREZ TO PHOSALON.

MEAD-BRIGGS (1992) proposed a laboratory method to evaluate the side effects of pesticides on *Aphidius rhopalosiphi* De Stefani-Perez (Hymenoptera, Aphidiidae), a parasitoid of cereals aphids.

The influence of relative humidity (60% and 85%), photoperiod (16h light and obscurity), storage temperature of mummies (2°C and 20°C) and the sensitivity of females and males was studied in this research.

It appears from our results that the most important factors is relative humidity. Storage temperature of mummies is also important. Photoperiod during the assays and sex of parasitoids seem to have no influence on the sensitivity to phosalon.

Références

- ABBOTT W., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of economic entomology* 18:265-267.
- BARRETT K.L., GRANDY N., HARRISON E.G., HASSAN S.A. & OOMEN P., 1994. Guidance document on regulatory testing procedures for pesticides with non-target arthropods from the workshop european standard characteristics of beneficials regulatory testing (ESCORT) 28-30 march 1994, 45p.
- CAUSSIN R., 1993. Techniques d'application des produits phytopharmaceutiques. *Publication IRSIA*, 139p.
- DAGNELIE P., 1998. Statistique théorique et appliquée. Tome 2 : inférence statistique à une et à deux dimensions. Bruxelles, De Boeck, 659p.
- DELEU R. & MAHAUT T., 1998. Predictive models of pirimicarb toxicity on three beneficial arthropods. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent*, 63/2b:593-596.
- DENLINGER D.L., JOPLIN K.H., CHEN C.P. & LEE R.E. in LEE R.E. & DENLINGER D.L., 1991. Insects at low temperature. Chapman and Hall, New-York, 513p.

- Directive du conseil du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques (91/414/CEE). *Journal officiel des Communautés européennes* N°L 230, 32p.
- Directive 96/12/CE de la commission du 8 mars 1996 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. *Journal officiel des Communautés européennes* N°L 65:20-37.
- MAHAUT T. & DELEUR., 1998. Influence du substrat végétal sur la toxicité de pesticides à l'égard de trois arthropodes utiles en grandes cultures. *1^{er} Colloque transnational sur les lutttes biologique, intégrée et raisonnée*. Lille, 21-23 janvier 1998.
- MEAD-BRIGGS M., 1992. A laboratory method for evaluating the side-effects of pesticides on the cereal aphid parasitoid *Aphidius rhopalosiphi* (DeStefani-Perez). *Aspects of applied biology* 31:179-190.
- MEAD-BRIGGS M., 1997. A standard laboratory test to evaluate the effects of plant protection products on adults of the parasitoid *Aphidius rhopalosiphi* (Hymenoptera, Braconidae). <http://www.soton.ac.uk/~aeumail/lab.html>
- STARY P., 1966. Aphids parasites of Czechoslovakia, a review of the Czechoslovak *Aphidiidae* (Hymenoptera). Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 242p.

août, 1999