

XXXIX^{ème}
Congrès
GROUPE
FRANCAIS DES PESTICIDES

**ASPECT MULTIPLE
des
PRODUITS PHYTOSANITAIRES**

PERIGUEUX
les 17, 18 et 19 Mai 1999

Actes

Organisation :



Equipe Périgourdine de Chimie Appliquée

BP 1043 24001 Périgueux Cedex (France)

Tél. 33. (0) 5.53.35.24.29

Fax. 33. (0) 5.53.02.58.80

CRS

Une antenne en Dordogne du...

LABORATOIRE de PHYSICO et TOXICO CHIMIE
des SYSTEMES NATURELS
UMR 5472

DÉTERMINATION, EN CONDITIONS SEMI-NATURELLES, DE LA TOXICITÉ DE PESTICIDES À L'ÉGARD D'ARTHROPODES UTILES.

R. DELEU ⁽¹⁾ & T. MAHAUT ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Faculté universitaire des Sciences agronomiques, Unité de Chimie analytique et Phytopharmacie (Prof. Copin A.), Passage des Déportés, 2, B-5030 - Gembloux, Belgique.

⁽²⁾ Ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture. Centre de Recherches agronomiques, Département de Lutte biologique et Ressources phytogénétiques, Unité de Zoologie (Dir. Latteur G.), Chemin de Liroux, 2, B-5030 - Gembloux, Belgique.

RESUME.

Une méthodologie a été développée en conditions semi-naturelles pour évaluer la toxicité de pesticides à l'égard d'*Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera, Coccinellidae) et d'*Episyrphus balteatus* (De Geer) (Diptera, syrphidae). Les expérimentations sont menées en chambre conditionnées ou à l'extérieur sous abri, avec des végétaux de référence (pomme de terre et féverole).

L'originalité de notre approche réside en la collaboration de biologistes et de chimistes. En effet, la détermination, par analyse chimique, de la répartition du pesticide sur le végétal permet de fixer les seuils de résidus auxquels sont exposées les larves des deux insectes. Deux insecticides ont été soumis aux études : la deltaméthrine et la phosalone.

Dans nos conditions expérimentales la majeure partie de la dose appliquée se retrouve au niveau de la face supérieure des feuilles (94 % pour la pomme de terre et 84 % pour la féverole).

Les faces inférieures des feuilles recueillent respectivement 2 et 8 % du résidu total pour la pomme de terre et la féverole, tandis que les valeurs retrouvées sur la tige avoisinent 4 et 8 %.

Il ressort des résultats que quelle que soit la plante envisagée, *A. bipunctata* présente une sensibilité plus grande qu'*E. balteatus* aux deux insecticides testés.

INTRODUCTION.

La directive européenne 91/414 CEE, réglementant la constitution des dossiers d'homologation des pesticides, exige des données écotoxicologiques quant à l'impact des produits phytosanitaires sur les auxiliaires de lutte. Dans ce cadre, des recommandations sont formulées par BARRETT et al. (1994) tant pour les essais menés en conditions de laboratoire que pour les tests conduits en conditions semi-naturelles ou de plein champ. Des techniques de test sont proposées par l'Organisation Internationale de Lutte Biologique (OILB) pour un grand nombre d'arthropodes utiles (HASSAN, 1992). Néanmoins, ces méthodes sont pour la plupart des techniques de laboratoire et il n'existe à ce jour que très peu de méthodes relatives aux deux autres types d'essais.

En outre, jusqu'en 1997, peu ou pas d'auteurs se sont intéressés à l'association des techniques chimiques et biologiques pour déterminer les toxicités relatives de pesticides à l'égard des arthropodes utiles. M. MEAD-BRIGGS et M. LONGLEY (1997), estiment que le test de laboratoire présente, du fait de l'utilisation d'un substrat inerte (verre), des effets généralement trop importants par rapport à la réalité agronomique. Ils ont, ainsi, développé un test de laboratoire, sur plante entière, permettant d'évaluer les effets des pesticides sur *Aphidius rhopalosiphi*, un hyménoptère parasite des pucerons des céréales. En 1997, R. SCHMUCK et al. présentent également une procédure en conditions semi-naturelles qui concerne plus particulièrement la coccinelle *Coccinella septempunctata*. Dans ces deux cas, la détermination des résidus des insecticides soumis aux essais et la répartition de ceux-ci sur le végétal ne sont pas considérés.

L'originalité de notre approche réside dans le développement et dans l'application d'une méthodologie en conditions semi-naturelles permettant d'associer un effet toxique à un niveau de résidu.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Les essais en conditions semi-naturelles ont été effectués sur de jeunes larves d'*Adalia bipunctata* L. (Coleoptera : Coccinellidae) et d'*Episyrphus balteatus* (De Geer) (Diptera : Syrphidae). Deux substances actives ont été testées sur ces deux auxiliaires, à savoir, la deltaméthrine (DECIS EC 2,5 à 25 g s.a. / l) et la phosalone (ZOLONE FLO à 500 g s.a. / l), appliquées respectivement à raison de 5 et 750 g s.a. / ha. Ces expérimentations ont été réalisées sur des plantules de pommes de terre (var. Kennebec) et de féveroles (var. Tic). Pour chacun des objets testés, les semis et les essais proprement dits ont été effectués soit en chambre conditionnée à 20EC, soit à l'extérieur sous abri entre la mi-juin et la mi-septembre.

Production des insectes.

Adalia bipunctata (L.) (Coleoptera : Coccinellidae).

Les bioessais sont réalisés sur des jeunes larves âgées de deux à trois jours. L'élevage des coccinelles est effectué 20EC. Les adultes placés dans des cages de reproduction contenant du papier chiffonné, servant de support pour les pontes, sont nourris de pollen et de pucerons (*Acyrtosiphon pisum*). Tous les deux jours le papier est retiré des cages. Les portions de papier portant des amas d'oeufs sont découpées et placées dans des boîtes de Pétri. Les oeufs éclosent dans les 72 heures. Les larves obtenues sont nourries de pucerons jusqu'à la pupaison. La durée du développement de l'oeuf à l'adulte prend environ un mois dans nos conditions d'élevage.

Episyrphus balteatus (De Geer) (Diptera : Syrphidae).

Les bioessais sont réalisés sur des jeunes larves âgées de deux à trois jours. Celles-ci sont produites à partir de couples de mouches placés dans des cages en plexiglas de 90 cm de haut et 60 cm de côté qui leur procurent suffisamment de volume pour voler et s'accoupler. Des récipients

contenant du saccharose en morceaux et du pollen sont disposés en guise de nourriture. Régulièrement de jeunes plantes de fèves, infestées de pucerons noirs de la fève (*Aphis fabae*), sont introduites dans les cages de ponte. Les femelles déposent leurs oeufs sur les plantules. Après 24 heures, les fèves sont retirées, coupées à leur base et déposées dans des boîtes rectangulaires en plastique transparent d'un volume de 2,5 litres fermées à leur face supérieure par un voile. Les oeufs éclosent le plus souvent dans les 72 heures. Les larves sont nourries exclusivement de pucerons (*A. pisum*). L'entièreté du cycle s'effectue en chambre conditionnée à la température de 20°C et dure environ 20 jours.

Production des plantes.

La pomme de terre.

Des plants de pomme de terre (var. Kennebec) sont plantés individuellement dans des pots de tourbe. Après émergence des premiers jets, une seule tige est conservée par pot. Celle-ci est alors pincée au-dessus de la troisième feuille composée de manière à limiter la croissance en hauteur de la plantule. Les folioles latéraux des trois feuilles composées sont alors retirés et seuls les trois folioles terminaux sont conservés. De cette façon, la structure végétale de la plantule est simplifiée et sa superficie peut facilement être mesurée.

La féverole.

Des semences de fèves (var. Tic) sont semées dans des pots de tourbe à raison de trois semences par pot. Après émergence des plantules, une seule tige est conservée par pot. Celle-ci est ensuite pincée de manière à ne conserver que les deux premiers folioles opposés sur la tige dans le cas des semis en chambre conditionnée. Pour les semis extérieurs, les deux premiers folioles sont retirés et seuls les deux suivants sont conservés afin d'obtenir des plantules d'environ 12 centimètres de hauteur, similaires à celles produites en chambre conditionnée.

La pulvérisation.

Les plantes de féverole et de pomme de terre sont traitées à l'aide d'un pulvérisateur pneumatique pour plantules, régulé électro-mécaniquement, permettant d'imposer une durée et une pression de pulvérisation constantes (CAUSSIN R. 1993). Une pulvérisation à la pression de 0,5 kg/cm² permet d'obtenir un dépôt de bouillie avoisinant les 200 litres/ha.

Détermination de la répartition de l'insecticide sur le végétal.

La pulvérisation de la bouillie d'insecticide n'est certainement pas homogène sur l'entièreté de la plante. L'insecte a ainsi la possibilité de rencontrer diverses concentrations de pesticide. L'analyse chimique des résidus sur différentes parties de la plante (faces supérieure et inférieure des feuilles, surface totale de la tige) permet d'estimer la répartition de ces concentrations sur le végétal. La phosalone a été considérée comme pesticide de référence pour ces expérimentations à la dose d'application de 750 g s.a./ha dans un volume de bouillie proche de 200 l/ha. L'estimation de la masse spécifique des feuilles permet de convertir les résultats des résidus obtenus lors des bioessais (exprimés en mg/g), en mg/cm² de feuille. A cette fin, la surface des feuilles est

déterminée par gravimétrie après photocopie.

Description des bioessais.

Pour chaque essai, dix plantules de pomme de terre ou de féverole sont traitées à l'insecticide. Dix plantules supplémentaires servent de témoins. Deux heures après la pulvérisation, deux larves d'*E. balteatus* ou d'*A. bipunctata* sont déposées sur chacune des tiges. Des pucerons verts du pois (*Acyrtosiphon pisum*) sont ajoutés ensuite à la base des tiges en guise de nourriture. Les pots sont placés dans un plateau à l'intérieur d'une cage d'essai à raison de dix pots par cage pour les féveroles et cinq pots par cage pour les pommes de terre. Les parois latérales de la cage sont constituées d'une fine toile métallique permettant les échanges gazeux. La face supérieure consiste en une plaque de verre transparente. Enfin, l'intérieur de la cage est accessible par les faces avant et arrière, obturées par une toile de nylon. Dans le cas des essais avec les larves de syrphes, un film d'eau est apporté dans chaque bac, ce qui limite le passage des larves d'un pot à l'autre. Toutes les 24 heures, les larves vivantes et mortes sont dénombrées et leur localisation est notée avec précision. De nouveaux pucerons verts du pois sont apportés à la base de chaque plantule. Les larves non retrouvées sont comptabilisées comme disparues. La mortalité corrigée est calculée en utilisant la formule d'ABBOTT (1925). L'essai se poursuit au plus tard jusqu'au 10^{ème} jour, mais est interrompu dès que toutes les larves déposées sur les plantes traitées sont comptabilisées comme mortes, disparues ou empupées. En fin d'essai, les plantules sont collectées et préparées en vue de l'analyse des résidus.

Analyse des résidus.

En fin d'expérimentation, les plantes sont découpées (feuilles et tiges). Les échantillons sont soumis à une extraction au moyen d'hexane. Le dosage des résidus est effectué par chromatographie en phase gazeuse en colonne capillaire. Un détecteur à capture d'électrons et un détecteur thermoïonique sont utilisés respectivement pour les dosages de la deltaméthrine et de la phosalone.

RÉSULTATS.

Répartition du dépôt d'insecticide sur le végétal.

Pour les deux végétaux, 15 répétitions ont été réalisées. Les résultats moyens de phosalone, pour les deux végétaux, sont regroupés au tableau 1. Ils sont exprimés en pourcentage de la quantité totale retrouvée sur la plante entière.

Végétal	Faces supérieures des feuilles	Faces inférieures des feuilles	Tige
Pomme de terre	93,3 (1,5 %)	2,2 (50,6 %)	4,5 (22,8 %)
Féverole	83,5 (6,5 %)	8,2 (42,1 %)	8,3 (42,9 %)

Tableau 1 : Répartition de la phosalone sur pomme de terre et féverole.

Les résultats sont exprimés en pour-cent du dépôt total sur la plante
(Coefficient de variation en %) - Moyenne de 15 répétitions.

La technique de pulvérisation assure une bonne reproductibilité sur les deux végétaux. La majeure partie de la phosalone se retrouve au niveau des faces supérieures des feuilles. Pour la pomme de terre, ces faces recueillent plus de 90 % de la dose appliquée, tandis que les faces inférieures et la tige se partagent le solde de 10 %. En ce qui concerne la féverole, un pourcentage de 80 % se retrouve sur les faces supérieures des feuilles et 10 % de cette valeur sont présents sur les deux autres objets.

A titre d'exemple, les résultats moyens de la répartition des deux insecticides sur les deux végétaux obtenus lors des tests de toxicité en conditions semi-naturelles sous abri sont présentés au tableau 2.

Végétal	Insecticide	µg/g plante entière	µg/cm ² F.S.	µg/cm ² F.I.	µg/cm ² tige
Pomme de terre	Phosalone	48,9	9,99	0,23	0,76
	Deltaméthrine	0,36	0,084	0,002	0,007
Féverole	Phosalone	62,5	5,46	0,54	1,24
	Deltaméthrine	0,43	0,043	0,004	0,010

Tableau 2 : Répartition de la phosalone et de la deltaméthrine sur pomme de terre et féverole. Expérimentations menées en conditions semi-naturelles sous abri. Les résultats sont exprimés en mg/g sur la plante entière et en mg/cm² sur les feuilles et la tige.

Moyenne de 10 répétitions.

F.S. = faces supérieures des feuilles

F.I. = faces inférieures des feuilles

Il apparaît que par substance active (appliquée à 5 g de deltaméthrine/ha et à 750 g de phosalone/ha) les résidus exprimés par unité de surface sont systématiquement plus élevés sur les faces supérieures des feuilles de pomme de terre que sur féverole. La détermination par voie chimique des résidus est donc primordiale lors de l'estimation de la toxicité d'un pesticide.

Détermination de la toxicité des deux insecticides à l'égard d'*Adalia bipunctata* et d'*Episyrphus balteatus*.

Les tableaux 3 et 4 présentent les mortalités corrigées moyennes obtenues au cours du temps dans les essais menés respectivement avec *A. bipunctata* et *E. balteatus* sur pomme de terre et féverole.

Plante	Subst. active	Localisation	Résidus ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			Mortalité corrigée (%)			
			FS	FI	T	J1	J2	J3	J4
P. de terre	deltaméthrine	Chambre condit.	0,115	0,003	0,009	75	100		
		sous abri	0,084	0,002	0,007	73	100		
	phosalone	Chambre condit.	7,40	0,17	0,34	97	100		
		sous abri	9,99	0,23	0,76	93	100		
Féverole	deltaméthrine	Chambre condit.	0,025	0,002	0,003	89	94	100	
		sous abri	0,043	0,004	0,010	100			
	phosalone	Chambre condit.	4,20	0,42	0,38	52	86	96	100
		sous abri	5,46	0,54	1,24	100			

Tableau 3 : Pourcentages de mortalité moyens obtenus dans les essais avec *A. bipunctata* sur pomme de terre et féverole traitées à la deltaméthrine ou à la phosalone.

FS = Faces supérieures des feuilles
 FI = Face inférieures des feuilles
 T = Tige

Plante	Substance	Localisation	Résidus ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			Mortalité corrigée (%)									
			FS	FI	T	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
P. de t.	deltaméthrine	Chamb. condit.	0,129	0,003	0,007	35	50	69	94	100					
		sous abri	0,068	0,002	0,006	3	25	32	36	25	46	70	80	79	85
	phosalone	Chamb. condit.	11,46	0,27	0,78	63	68	75	88	94	94	93	92		
		sous abri	10,63	0,25	0,82	34	54	89	100						
Féverole	deltaméthrine	Chamb. condit.	0,027	0,003	0,006	-	39	56	63	69	73	73	85	85	85
		sous abri	0,032	0,003	0,004	25	41	47	45	45	48	55	55	65	80
	phosalone	Chamb. condit.	4,29	0,42	0,65	20	42	59	60	60	54	46			
		sous abri	6,18	0,61	1,27	16	32	47	50	94	-	94	94	94	

Tableau 4 : Pourcentages de mortalité moyens obtenus dans les essais avec *E. balteatus* sur pomme de terre et féverole traitées à la deltaméthrine ou à la phosalone.

FS = Faces supérieures des feuilles
 FI = Face inférieures des feuilles
 T = Tige

COMMENTAIRES.

Il apparaît que, quelle que soit la plante ou la substance active envisagée, *A. bipunctata* présente une sensibilité plus grande qu'*E. balteatus* aux deux insecticides testés. Ainsi, aucune larve de coccinelle n'a été observée vivante au delà du troisième jour, alors que parfois plus de 50 % des larves de syrphes sont encore en vie à ce moment. Ces résultats confirment ceux obtenus dans les essais de laboratoire réalisés en cellules où *A. bipunctata* s'est montré très sensible à la deltaméthrine (MAHAUT et DELEU 1997, 1998). De plus, quelle que soit la substance active envisagée, le test effectué sur pomme de terre apparaît plus sévère que celui réalisé sur féverole. Ce fait trouve très vraisemblablement son explication dans les concentrations par unité de surface systématiquement plus élevées sur les faces supérieures des pommes de terre que sur les faces supérieures des féveroles. Comparativement aux résultats obtenus dans les tests menés en conditions de laboratoire, où les insectes sont exposés de 24 à 48 heures durant aux résidus, la méthode développée ici peut être considérée comme moins sévère. Pour un niveau de résidu comparable par unité de surface, les mortalités obtenues après 24 ou 48 heures sont moins élevées en conditions semi-naturelles, ce qui laisse supposer que les larves ne sont pas en contact permanent avec les parties de plantes les plus riches en résidus.

Cette constatation est d'ailleurs confirmée par le résultat des observations relatives à la localisation des larves. En effet, ces dernières se trouvent principalement sur les faces inférieures et sur les tiges des plantes traitées lors de chaque comptage quotidien.

REMERCIEMENTS.

Ces recherches ont été financées par le département " Recherche et Développement " (DG 6) du Ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture, Bruxelles, Belgique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

Abbott S.W. (1925). A method of computing the effectiveness of insecticides. J. Econ. Entomol., 18, 265-267.

K.L. Baret, N. Grandy, E.G. Harisson, S. Hassan and P. Oomen (1994). Guidance document on regulatory testing procedures for pesticides with non-target arthropods. From the Workshop European Standard Characteristics of beneficial Regulatory Testing (ESCORT) 28-30 March 1994, 41 pp.

Caussin R. (1993). In : techniques d'application des produits phytopharmaceutiques. Publication I.R.S.I.A. - Décembre 1993 - 139 pp.

Directive européenne 91/414 (1991). Directive du conseil du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. Journal officiel des Communautés européennes n° L 230, 32 pp.

Hassan S.A. (1992). Guideleines for testing the effects pd pesticides on beneficial organisms : Description of test methods. IOBC/WPRS Bulletin XV/3, 186 pp.

Mahaut T. et Deleu R. (1997). Relation entre le comportement chimique et la toxicité de pesticides à l'égard d'*Aphidius rhopalosiphi* De Stefani-Perez, *Adalia bipunctata* (L.) et *Episyrphus balteatus* (De Geer): Premiers résultats. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 62/2b, 573-580.

Mahaut T. et Deleu R. (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 luttes biologique, intégrée et raisonnée. Lille, 21 - 23 janvier 1998.

M. Mead-Briggs & M. Longley. (1997). A standard ' extended 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/extlab.html>. 6 pp.

R. Schmuck, I. Tornier, K.-D. Bock, A. Waltersdorfer and Ch. Künast. (1997). A semi-field testing procedure using the ladybird beetle, *Coccinella septempunctata* L. (Col., Coccinellidae), for assessing the effects of pesticides on non-target leaf-dwelling insectes under field exposure conditions. J. Appl. Ent. 121, 111-120.